

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO PROTEICO CRUDO Y SU HIDROLIZADO OBTENIDOS A PARTIR DE
HOJA DE MANI FORRAJERO, *Arachis pinto* (Fabaceae).**

ANGELA TATIANA TRILLOS FAJARDO

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de pregrado en
Biología**

Director

**JOHN JAIRO MÉNDEZ ARTEAGA
Ph. D. en Ciencias Químicas Universidad de Lleida**

Co-directores

**CARLOS ALBERTO PELÁEZ JARAMILLO
Ph.D. en Ciencias Químicas Instituto Químico de Sarria**

**CATALINA ARROYAVE QUICENO
Ph.D. en Biotecnología Universidad Autónoma de Barcelona**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ-TOLIMA**

2014



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto proteico crudo y su hidrolizado obtenidos a partir de hoja de mani forrajero, *Arachis pintoi*

AUTORES: Ángela Tatiana Trillos Fajardo

DIRECTOR: John Jairo Méndez Arteaga

CO-DIRECTORES: Carlos A. Peláez- Catalina Arroyave

JURADOS: Oscar Marino Mosquera Martínez

Walter Murillo Arango

CALIFICACIÓN: 4,34

APROBADO

REPROBADO

OBSERVACIONES: Los jurado por consenso establecimos la misma nota de calificación después de revisar las observaciones realizadas sobre el documento y la presentación del trabajo

FIRMAS

JURADO 1

JURADO 2

Director del trabajo

Director del programa

Ciudad y fecha: Ibagué, Septiembre 17 del 2014

**A Dios,
mis padres
y hermanos
que tanto amo.**

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

Al Dr. John Jairo Méndez, director de la investigación por su apoyo y dedicación.

A la Dra. Catalina Arroyave, codirectora del trabajo por enseñarme, instruirme, apoyarme en este camino con paciencia e incondicionalidad.

Al Dr. Carlos Peláez, codirector del trabajo por su respaldo y apoyo.

Al Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares, quienes me acogieron por este tiempo brindándome su amistad y cariño; especialmente a Carol Díaz, Alejandra Martínez y Andrea Patiño.

Al profesor Miguel Acevedo y David Rodas, por la colaboración en ensayos microbianos.

Al profesor Lucas Blandón, por la asistencia en ensayos de actividad antioxidante.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	18
1.1. OBJETIVO GENERAL	18
1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	18
2. MARCO REFERENCIAL	19
2.1. ANTECEDENTES	19
2.2. MARCO TEÓRICO	20
2.2.1. Mecanismo de defensa de las plantas	20
2.2.2. Péptidos bioactivos	22
2.2.3. Hidrolisis enzimática	22
2.2.4. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	24
2.2.5. Péptidos con actividad antioxidante	24
2.2.6. Maní forrajero (<i>Arachis pintoï</i>)	25
3. METODOLOGÍA	27
3.1. SIEMBRA DE PLÁNTULAS <i>Arachis pintoï</i>	27
3.1.1 Material vegetal	27
3.1.2 Plantas infectadas	27
3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL HONGO PRESENTE EN LAS HOJAS DE <i>Arachis pintoï</i> .	28
3.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO PROTEICO A PARTIR DE HOJAS DE <i>Arachis pintoï</i>	30

3.3.1. Cuantificación de proteína	31
3.3.2. Electroforesis sds-page del extracto crudo proteico.	31
3.3.3. Diálisis del extracto crudo proteico	31
3.4. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE <i>Arachis pintoï</i>	31
3.4.1. Cinética de hidrolisis del extracto crudo proteico de <i>Arachis pintoï</i>	31
3.4.2. Electroforesis sds-page de la cinética de hidrolisis del extracto crudo	32
3.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DE LOS HIDROLIZADOS DE <i>Arachis pintoï</i>	32
3.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO Y SU HIDROLIZADO.	33
3.6.1 Actividad fungicida del extracto crudo proteico	33
3.6.2. Actividad bactericida del extracto crudo proteico y su hidrolizado de <i>Arachis pintoï</i> .	34
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO A PARTIR DE HOJAS DE <i>Arachis pintoï</i>	35
4.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DEL EXTRACTO PROTEICO DE <i>Arachis pintoï</i>	35
4.3. CINÉTICA DE HIDROLIZADOS DEL EXTRACTO PROTEICO DE <i>Arachis pintoï</i>	36
4.3.1. Electroforesis en gel sds-page de los hidrolizados de <i>Arachis pintoï</i>	36
4.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DE LOS HIDROLIZADOS DE <i>Arachis pintoï</i>	39
4.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO Y SU HIDROLIZADO DE <i>Arachis pintoï</i> .	41

4.5.1 Actividad fungicida del extracto crudo proteico de <i>Arachis pinto</i> .	41
4.5.2. Actividad bactericida del extracto crudo proteico y su hidrolizado de <i>Arachis pinto</i> .	42
4.5.2.1. Actividad bactericida del extracto crudo.	42
4.5.2.2. Actividad bactericida del hidrolizado.	42
5. CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIA	50

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Actividad antioxidante expresada en equivalente Trolox para hidrolizados del extracto crudo proteico de <i>A. pinto</i> a diferentes tiempos.	40
Tabla 2. Actividad bactericida del extracto puro proteico de <i>A. pinto</i> y sus hidrolizados a diferentes tiempos.	43
Tabla 3. Actividad bactericida del extracto puro proteico de <i>A. pinto</i> a diferentes concentraciones.	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de acción de los AMPs sobre la membrana celular. (A) Mecanismo barril, (B) Mecanismo de alfombra, (C) Mecanismo anular, (D) Mecanismo de electroporación molecular, (E) Mecanismo de agregado.	21
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la Papaína	23
Figura 3. Siembra de diez plántulas de <i>A. pintoï</i> en cuatro masetas (A) y una adicional de plántula elicitada (B).	27
Figura 4. Mancha foliar identificada como <i>Collectotrichum spp.</i>	28
Figura 5. Aislamiento del hongo de la hoja de <i>Arachis pintoï</i> .	29
Figura 6. Identificación del hongo por conidias. <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> , patógeno causante de la antracnosis, encontradas en el aislamiento de las hojas de <i>A. pintoï</i> .	29
Figura 7. Esquema de la obtención de extracto crudo proteico a partir de hojas de <i>Arachis pintoï</i>	30
Figura 8. SDS-PAGE al 12% realizada como control de extracción del concentrado proteico de <i>A. pintoï</i> : (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) proteínas solubles en una concentración 1:1.	36
Figura 9. SDS-PAGE al 12% y 16% realizada como control de la hidrolisis del concentrado proteico de <i>A. pintoï</i> , tinción azul de Comassie: (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) hidrolizado de una hora T1, (C) hidrolizado de tres horas T3, (D) hidrolizado de cinco horas T5.	37
Figura 10. SDS-PAGE al 12% y 16% realizada como control de la hidrolisis del concentrado proteico de <i>A. pintoï</i> , tinción con nitrato de plata: (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) extracto proteico sin papaína tiempo cero, (C)	38

extracto proteico sin papaína tiempo una hora, (D) extracto proteico sin papaína tiempo dos horas, (E) extracto proteico con papaína tiempo cero, (F) extracto proteico con papaína tiempo treinta minutos, (G) extracto proteico con papaína tiempo sesenta minutos.

Figura 11. Promedios de valores en Eq. Trolox para Actividad antioxidante de hidrolizados de *A. pintoi*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,01$). 40

Figura 12. Actividad antifúngica de extracto crudo proteico de *Arachis pintoi* frente a *Cladosporium* ssp. (A) extracto crudo, (B) control negativo 41

Figura 13. Promedios de valores de diámetro de inhibición para la actividad bactericida de los hidrolizados a diferentes tiempos del extracto puro proteico de *A. pintoi* sobre *Staphylococcus aureus*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,01$). 44

Figura 14. Promedios de valores de diámetro de inhibición para la Actividad bactericida del extracto puro proteico de *A. pintoi* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,01$). 44

Figura 15. Antibiograma de extracto proteico y control positivo (Oxitetraciclina) en Gram positivas. (A). *Staphylococcus aureus* y (B). *Bacillus subtilis*; Gram negativas. (C). *Salmonella typhi* y (D). *Escherichia coli* 45

Figura 16. Antibiograma de extracto proteico *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (A). Testigo, (B) Control positivo (Oxitetraciclina) y control negativo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, (C y D) *Escherichia coli*, (E y F) *Staphylococcus aureus* 45

Figura 17. Actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* (gram -) de hidrolizados (A) tiempo cero (B) tiempo una hora (C) tiempo tres horas (D) tiempo cinco horas. 46

Figura 18. Actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (gram +) 46

de hidrolizados (A) tiempo cero (B) tiempo una hora (C) tiempo tres horas (D) tiempo cinco horas.

Figura 19. Actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* (Gram -) de extracto proteico a diferentes concentraciones: (A) 2000 µg /ml (B) 1435 µg /ml (C) 835 µg /ml (D) 400 µg /ml.

47

LISTA DE ANEXO

	Pág.
Anexo A. Matriz de Datos Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de <i>A. pintoii</i> .	60
Anexo B. ANOVA – Test de Duncan Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de <i>A. pintoii</i> .	61
Anexo C. Matriz de Datos de Actividad bactericida de hidrolizados sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	62
Anexo D. ANOVA – Test de Duncan actividad bactericida de hidrolizados sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	63
Anexo E. Matriz de Datos de Actividad bactericida a diferentes concentraciones del extracto crudo proteico <i>Escherichia coli</i>	64
Anexo F. ANOVA – Test de Duncan actividad bactericida a diferentes concentraciones del extracto proteico <i>Escherichia coli</i>	65
Anexo G. Protocolo de aislamiento de <i>Colletotrichum sp.</i>	66

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de los hidrolizados del extracto crudo proteico de *Arachis pintoii*. Se encontró que estos presentan un potencial antioxidante y antimicrobiano. Al obtener el extracto crudo proteico de *A. pintoii* se encontró una eficiencia de 47,5 mg/g de hoja.

Los resultados indican que a una temperatura de 37 °C durante una hora se obtiene una hidrolisis total del extracto. Estos hidrolizados presentan una mejor actividad antioxidante que el Trolox y no se encontró para este potencial diferencias significativas entre los tiempos de hidrolizados.

También se identificó una actividad fungicida del extracto crudo proteico frente a *Cladosporium ssp.* a una concentración de 2000 µg/ml, para un 11 % del efecto inhibitorio en el crecimiento del control negativo. El extracto crudo proteico presentó potencial bactericida frente a bacterias gram negativas, *Escherichia coli*. Para los hidrolizados de este extracto se observó actividad bacteriostática para *Staphylococcus aureus*, bacteria gram positiva. No se evidencio diferencia significativa entre los tiempos de hidrolizados.

Este trabajo permitió conocer el potencial antioxidante y antimicrobiano que posee el extracto crudo proteico e hidrolizados de hojas de *Arachis pintoii*. Estos resultados sugieren que *A. pintoii*, presenta un importante potencial antioxidante y antimicrobiano.

Palabras claves: Péptidos, *Arachis pintoii*, Hidrolizados, Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

In this work, the antioxidant and antimicrobial activity of pure crude extract protean hydrolyzate by *Arachis pintoï* was evaluated. It was found that these present an antioxidant and antimicrobial potential. By obtaining the crude protein extract *A. pintoï* efficiency 47.5 mg/g of leaves was found.

The results show that at a temperature of 37 °C for one hour the total hidrolisys of the pure extract protean was reached. These hydrolysates show more antioxidant activity than Trolox and wasn't found significant differences for this potential between times.

Extract pure protean fungicidal activity against *Cladosporium sp.* was also identified at a concentration of 2000 mg/ml, for a 11% growth inhibitory effect versus negative control. The protean crude extract exhibited bactericidal potential against, *Escherichia coli* a gram-negative bacteria. This hydrolysates extracts showed bacteriostatic activity to *Staphylococcus aureus*, gram positive bacteria. No evidences significant differences between the times of hydrolysates.

This work makes evident the antioxidant and antimicrobial potential of the crude extract and hydrolyzed protean in leaves *Arachis pintoï*. These results suggest that *A. pintoï*, presents an important antioxidant and antimicrobial potential.

Keywords: Peptides, *Arachis pintoï*, hydrolysates, antioxidant activity, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

A través de la evolución las plantas han desarrollado una variedad de mecanismo de defensa que le han permitido generar diversas respuestas contra el ataque de fitopatógenos (Blanco-Labra y Aguirre, 2002; De Wit, 1997). Las plantas han construido líneas de protección contra ataques microbianos, entre las cuales se encuentran la producción sistémica de metabolitos secundarios, proteínas y ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) con actividad antimicrobiana (Maróti *et al.*, 2011).

El sistema inmune de las plantas se basa en la producción de diversos tipos de péptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales pueden tener dos mecanismos de acción, en el que el péptido interactúa con la estructura celular ocasionando una lisis celular del fitopatógeno; o donde el péptido por interacción electrostática forma poros transitorios que permitan el transporte de péptidos al interior de la célula. Estos péptidos al encontrarse al interior de esta, pueden unirse al ADN, ARN y proteínas, e inhibir la síntesis de la pared celular, ADN, ARN y proteínas, causando así la muerte de la célula fitopatógena (Maróti *et al.*, 2011).

Como mecanismo de defensa se encuentra también la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Proteínas PR), las cuales se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas y tolerancia a valores de pH extremos (Van Loon y Van Kammen, 1970). En su mayoría son péptidos bioactivos, secuencias de aminoácidos que se encuentran dentro de una proteína precursora de manera inactiva, que al ser hidrolizadas de manera química o enzimática puede tener determinadas funciones biológicas (Meisel, 1998).

Algunas de las proteínas PR tienen actividad antimicrobianas como es el caso de las osmotinas, tioninas y defensinas que actúan degradando su membrana celular, y algunas hidrolasas como la β -1,3-glucanasas y quitinasas que poseen actividad antifúngica, que degradan la pared celular del hongo (Madriz, 2002).

Los hongos, como patógenos, tienen una gran incidencia en las especies vegetales (Manners, 1986), ya que pueden desarrollar dos tipos de interacciones con las plantas:

de tipo biótrofico, donde el hongo toma los nutrientes de células vivas sin causarle mayor daño; y de tipo necrotrófico, en la que el hongo ataca con toxinas a la célula huésped, destruyéndola y adquiriendo nutrientes del tejido muerto (Madriz, 2002).

Una vez el patógeno incide en la planta, esta reconocerá los efectores del patógeno por medio de receptores, que activarán la resistencia sistémica adquirida (SAR) que esta a su vez inducirá la síntesis de ácido Salicílico (SA). Esta es una hormona que inhibe a las catalasas y ascorbato de peroxidasa que actúan como antioxidante, lo cual producirá un aumento en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una mayor producción de Proteínas PR (Díaz-Puentes, 2012), de esta manera se da una relación dependiente entre la producción de péptidos antimicrobianos y la producción de péptidos antioxidantes.

Muchas plantas gracias a su alto contenido de proteína, han servido como fuente de péptidos. Se han obtenido péptidos de origen vegetal con actividad antioxidante de la Soya (*Glycine max* L.), Arroz (*Oryza sativa* L.), Maíz (*Zea mays* L.), Garbanzo (*Cicer arietinum* L.), Amaranto (*Amaranthus* spp.), Trigo Sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), Colza (*Brassica napus* L.), Piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.), entre otras (Gallegos-Tintoré *et al.*, 2013); péptidos antibacterianos encontrados en el árbol de castaño de India (*Aesculus hippocastanum*), frijol cabecita negra (*Vigna unguiculata*), el haba (*Vicia faba*), entre otros (PhytAmp, 2014); y péptidos con potencial antifúngico, en hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum cerasiforme*) (Riaño y Zamora, 2005), semillas de maca (*Lipidium peruvianum* G. Chacón), entre otras (Álvarez y Monteghirfo, 2003).

Al momento no se ha evaluado la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto proteico crudo y su hidrolizado obtenidos a partir de hoja de *Arachis pintoii*, a pesar que esta planta se considera una especie nativa con potencial agronómico (Bastiani-Perez y Pizarro, 2005) dado que presenta un alto porcentaje de proteínas metabolizables del 16,2% (Corpoica, 1999) y la resistencia micótica que presenta contra la roya del maní (*Puccinia arachidis*) y *Mycosphaerella* spp. (CIAT, 1992; Fisher y Cruz, 1995; Jayaram *et al.*, 1991) que respaldaría la hipótesis que *A. pintoii* posee mecanismos de defensa que actúan contra el ataque de hongos, y que estos podrían ser los péptidos bioactivos.

Esta investigación es un trabajo exploratorio que tiene como fin evaluar el potencial antioxidante y antimicrobiano del extracto crudo proteico y los péptidos obtenidos a partir de hidrolizados *in vitro* de este, a partir de hojas de *A. pintoii*. Partiendo de la hipótesis que las plantas poseen proteínas que han sido reportadas para este género por tener capacidad antimicrobiana y antioxidante propia de la planta (Chen *et al.* 2007; Chadha y Das, 2006; Enyonam, 2005).

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto crudo proteico y su hidrolizado obtenidos a partir de hoja de maní forrajero *Arachis pinto*.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener extracto crudo proteico a partir de hojas de *Arachis pinto*.
- Obtener hidrolizado a partir del extracto crudo proteico de hojas de *Arachis pinto*.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados del extracto crudo proteico de hojas de *Arachis pinto*.
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto crudo proteico y su hidrolizado a partir del extracto crudo proteico de hojas de *Arachis pinto*.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. ANTECEDENTES

Actualmente los péptidos bioactivos han tomado gran relevancia por los efectos beneficiosos que estos producen (Mulero *et al.*, 2011), lo cual ha originado que diversas investigaciones se hayan orientado a la evaluación y obtención de péptidos de origen vegetal con diferentes actividades biológicas, entre ellas la actividad antioxidante y antimicrobiana.

Se han obtenido péptidos antioxidantes a partir de los hidrolizados de plantas como la Soya (*Glycine max L.*), Arroz (*Oryza sativa L.*), Maíz (*Zea mays L.*), Garbanzo (*Cicer arietinum L.*), el Amaranto (*Amaranthus spp.*), Trigo Sarraceno (*Fagopyrum esculentum Moench*), Colza (*Brassica napus L.*), Piñón mexicano (*Jatropha curcas L.*) (Gallegos-Tintoré *et al.*, 2013); en semillas de *Parkia speciosa* (Hwee-Leng y Chee-Yuen, 2013); en semillas de *Cannabis sativa L* (Girgih *et al.*, 2014); en frutos de *Zizyphus jujuba* (Memarpoor-Yazdi *et al.*, 2013).

También se han descubierto la existencia de péptidos producido por la planta con potencial antimicrobiano. Existe una base de datos dedicada solo a péptidos antimicrobianos (AMPs) de origen vegetal, ejemplos de plantas que producen estos péptidos son el frijol cabecita negra (*Vigna unguiculata*), la cebada (*Hordeum vulgare*), el haba (*Vicia faba*) (PhytAmp, 2014). También se encuentra un gran potencial en proteínas que luego de ser hidrolizadas por vía enzimática (*in vitro*) se obtienen péptidos con actividad antimicrobiana ejemplo de esto son las plantas de *Salpichroa organifolia* (Rocha *et al.*, 2013) y frijol lima (*Phaseolus lunatus*) (Bojórquez *et al.*, 2013).

En esta base de datos indican el nombre del péptido, que tipo de actividad posee, antibacteriana o antifúngica, el nombre del hongo o bacteria hacia la que presenta

sensibilidad, y el artículo que respalda el descubrimiento del péptido. En esta herramienta se han descrito 271 AMPs secretadas por diversas familias y se encuentran clasificadas como cyclotides, defensins, Hevein-like, Impatiens, knottins, lipid-transfer proteins, shepherins, snakins, thionins or vicilin-like, además de MBP-1 y MiAMP1 (PhytAmp, 2014).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Mecanismos de defensa en las plantas: Las plantas presentan diferentes mecanismos de defensa contra ataques microbianos como es la producción sistémica de metabolitos secundarios, proteínas y especies reactivas de oxígeno, que poseen un potencial antimicrobiano (Maróti *et al.*, 2011).

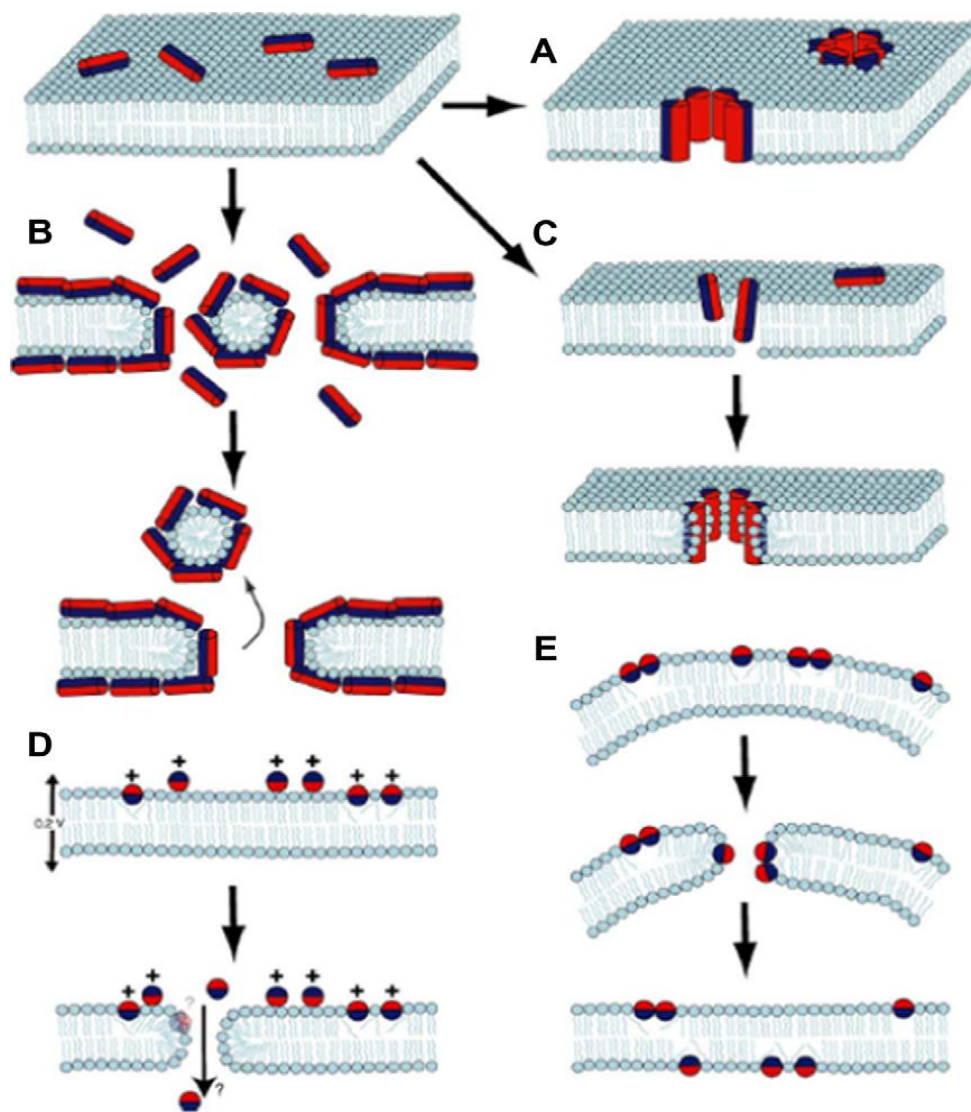
El mecanismo de defensa de la planta inicia con el reconocimiento del patógeno, donde se activa la “*resistencia inducida*”, que activan una serie de procesos para evitar el avance del patógeno, como la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas, la activación del Resistencia sistémica Adquirida (SAR) (Madriz, 2002).

En este último, se dan dos etapas: en la primera, se induce la defensa en las células cercanas al ataque del patógeno, llamada respuesta local. Y en la segunda etapa, se da la inducción de las defensas en los tejidos alejados al foco de infección. Este último, origina el aumento en los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que induce la respuesta hipersensible (HR) de la célula, liberando ROS y moléculas antimicrobianas, del tipo fitoalexina, péptidos antimicrobianos, proteínas PR (Díaz-Puentes, 2012).

Las proteínas PR se encuentran acumuladas en espacios intercelulares y en las vacuolas, las cuales liberan moléculas que inducen la defensa y potencian la respuesta de la planta. Por esta razón la resistencia a una enfermedad está dada por numerosas proteínas PR que actúan en conjunto, por lo que la alta expresión o el silenciamiento de una sola proteína generan un efecto en la resistencia o susceptibilidad de la planta

hacia un amplio rango de patógenos (Jaulneau *et al.*, 2010; Niderman *et al.*, 1995; Riviere *et al.*, 2008). La mayoría de estas proteínas son péptidos bioactivos, entre los que se encuentran las defensinas y tioninas que poseen actividad antimicrobiana, ambos son péptidos muy pequeños de aproximadamente 5 kDa y son ricos en cisteína (Islam, 2006).

Figura 1. Mecanismos de acción de los AMPs sobre la membrana celular. (A) Mecanismo barril, (B) Mecanismo de alfombra, (C) Mecanismo anular, (D) Mecanismo de electroporación molecular, (E) Mecanismo de agregado.



Fuente: Brogden, (2005).

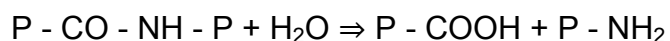
2.2.2. Péptidos bioactivos: En las últimas décadas se ha despertado un gran interés en el mundo científico por realizar estudios sobre péptidos derivados de alimentos naturales con actividad biológica, ya que estos son fragmentos de proteínas específicas que han mostrado propiedades farmacológicas beneficiosas en el cuerpo humano más allá de cumplir un rol nutricional normal o adecuado (Hartmann y Meisel, 2007).

Estos péptidos presentan una variación en tamaño, se pueden presentar desde 3 a 20 aminoácidos o más, que se liberan durante la digestión gastrointestinal o en el procesado de alimentos. Al ser liberados dentro del organismo, puede ejercer su efecto sobre los diferentes sistemas que lo componen, como el sistema cardiovascular, inmunológico y nervioso; llegando a alterar el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Mulero *et al.*, 2011).

2.2.3. Hidrolisis enzimática: La hidrolisis enzimática presenta numerosas ventajas, como es la selectividad. Cada enzima es específica para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación; posee condiciones moderadas de temperatura y pH; y no necesita de sustancias extrañas; se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados (Guadix *et al.*, 2000).

Este tipo de hidrolisis está mediada por una reacción que ocurre en un lugar específico del enzima, llamado “*sitio activo*”. La molécula que se fija en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima es denominada “*sustrato*”. Esta interacción va a formar un complejo intermediario, posteriormente, la descomposición del complejo intermediario para formar los productos y regenerar la enzima (Phua *et al.*, 1987).

Entre los tipos de enzima están las proteasas, que se caracteriza por catalizar específicamente la hidrólisis del enlace peptídico, rompiéndolo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo de la siguiente manera:

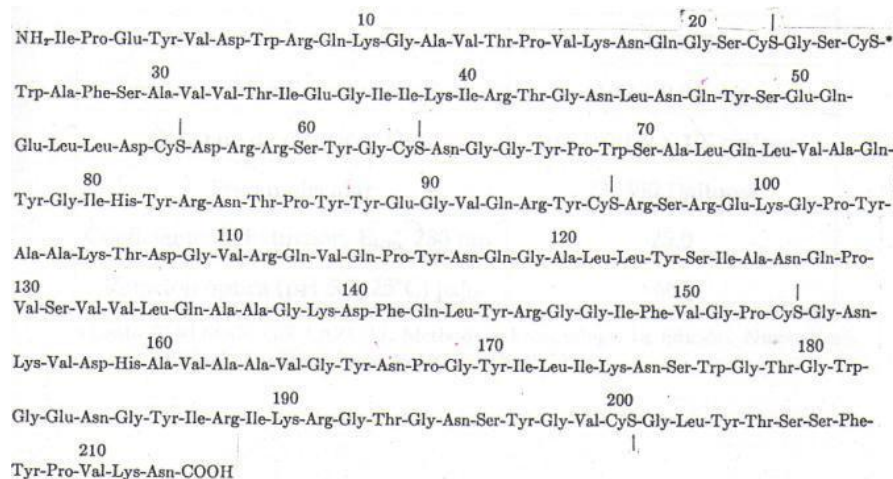


Los grupos amino y carboxilos formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis (Rupley, 1967; Steinhardt y Beychok, 1964)

La papaína es una enzima proteolítica, cuya acción se da sobre los enlaces peptídicos de las proteínas (unión de un carbono y un aminoácido) provocando que éstas se degraden, la enzima es utilizada en estado líquido o en polvo, es soluble en alcohol etílico y metílico, contiene hidruro de azufre; y es relativamente resistente al calor (Hong-Yu *et al.*, 2013). Esta enzima escinde sobre aminoácidos básicos, como la histidina, arginina, lisina y fenilalanina (Florence, 2012).

La papaína existe como un monómero, consistente de 212 residuos (Figura 2). Es una proteína simple conteniendo solamente aminoácidos y desprovista de carbohidratos (Mundo y Serrano, 2012).

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la Papaína



Fuente: Mundo y Serrano, (2012).

2.2.4. Péptidos antimicrobianos (AMPs): Los AMPs son un mecanismo de defensa ampliamente distribuido en plantas. Estos péptidos se clasifican en diferentes familias, de acuerdo con su estructura secundaria. La estructura más importante es la de péptido anfipático con 2-4 estructuras beta, alfa-hélice anfipática, estructura de asa y estructura extendida (De Franco *et al.*, 2007). Los AMPs presentan una composición de aminoácidos, una carga neta (generalmente son catiónicos), así como sus características anfipáticas y de tamaño, que favorecen su interacción con bicapas lipídicas, principalmente aquellas que forman las membranas citoplasmáticas de patógenos como las bacterias, hongos, virus envueltos y parásitos, en las que forman poros (Brodgen, 2005).

Recientemente se ha descubierto que su rango de acción se ha extendido al citoplasma bacteriano, donde pueden tener múltiples dianas intracelulares. Pueden unirse al ADN, ARN y proteínas, e inhibir la síntesis de la pared celular, ácidos nucleicos, proteínas, así como algunas actividades enzimáticas (Maróti *et al.*, 2011).

2.2.5. Péptidos con actividad antioxidante: La actividad antioxidante esta mediada por una sustancia que reduce en gran manera el efecto negativo de las especies reactivas en las funciones fisiológicas normales del organismo (Huang *et al.*, 2005). Estas especies reactivas también conocidas como radicales libre (RL), son moléculas cuya estructura presenta un electrón desapareado en el orbital externo, lo cual lo hace muy inestable, reactiva y efímera; lo que le permite combinarse con otras biomoléculas celulares, alterando su estructura y su funcionamiento (Criado y Moya, 2009).

Estos RL son importantes ya que intervienen en procesos como señalización y prevención de infecciones, cumpliendo funciones útiles dentro de un organismo (Halliwell, 2006), pero al aumentarse o desequilibrarse estos, pueden causar daño celular. Debido a su inestabilidad, estos colisionan con biomoléculas oxidándolas, ocasionando así, que esta pierda su estructura original y por ende su función (Criado y Moya, 2009). Por lo que estos han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como el cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares (Halliwell, 2006).

Cuando la planta es sometida a un estrés biótico y abiótico, es fundamental para la respuesta, una acumulación de aniones de oxígeno reactivos. En los dos tipos de estrés se pueden agravar los daños o activar múltiples respuestas defensivas, actuando como moléculas de señalización (Compant *et al.* 2005; Klarzynski *et al.* 2003; Ohno *et al.* 2006). Debido a esto, los organismos vegetales han desarrollado la producción de péptidos antioxidantes, los cuales presentan, en su mayoría, un intervalo de peso molecular de 500 a 1800 Da, e incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos como Val o Leu en el amino terminal (Saito *et al.*, 2003). Estas características les permiten a los péptidos poseer una actividad antioxidante, los cuales reducen en gran manera el efecto negativo de las especies reactivas en las funciones fisiológicas normales del organismo, la cual recibe el nombre de antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

2.2.6. Maní forrajero (*Arachis pintoi*): El género *Arachis* está compuesto por sesenta y nueve (69) especies y nueve secciones taxonómicas basadas en su morfología, distribución geográfica y compatibilidad cruzada (Krapovickas y Gregory, 1994). Entre estas encontramos la especie *Arachis pintoi* o como se conoce comúnmente, Maní forrajero, que se caracteriza por su alta adaptabilidad a las regiones tropicales con alturas de 0 a 1800 msnm y con precipitación de 2000 a 3500 mm anuales (Corpoica, 1999).

Esta leguminosa, es una planta perenne con hábito de crecimiento estolonífero. Las hojas son cuatrifoliada (dos pares de folíolos) y las flores son de color amarillo. Esta planta produce una densa capa de estolones con entrenudos cortos, los estolones se forman por las raíces abundantes y clavijas de fructificación (ginóforos). Es una planta con frutos geocarpicos la mayoría posee una sola vaina con un pericarpio duro, la semilla varía en tamaño y peso (CIAT, 1992).

La gran cantidad de estolones que posee ayudan a resistir el pastoreo y también le permiten invadir fácilmente cualquier suelo descubierto. Debido a esta característica el daño o la fractura por los cascos del ganado es muy mínimo, por lo cual, las pasturas asociadas con esta planta se caracteriza por su alta productividad animal, sin llegar a generar ningún síntoma de degradación después de varios años de pastoreo (Corpoica, 1999).

Esta planta también es de gran uso en la ganadería debido a alto contenido de proteína y de minerales, con excepción del fósforo, llena los requerimientos de estos, en condiciones de suelos oxisoles donde el contenido de fósforo es muy bajo (Corpoica, 1999). Las ganancias de peso vivo anuales de los novillos que consumen estas pasturas, con un buen sistema de manejo, varían de 160 a 200 Kg/ha y de 250 a 600 Kg/ha (Lascano, 1995).

También presenta otras características como la adaptabilidad a diversos tipos de suelos, desde oxisoles, ácidos y pobres en nutrientes, hasta aquellos encontrados en la zona cafetera de mejor fertilidad (Corpoica, 1999). También presenta resistencia contra varios fitopatógenos como la roya del maní (*Puccinia arachidis*) y *Mycosphaerella spp.*, parece ser resistente a algunos nematodos (*Meloidogyne spp.*) (CIAT, 1992).

En la actualidad, se han llevado a cabo estudios sobre *Arachis pintoii* en temas relacionados con su taxonomía (Krapovickas y Gregory, 1994; Tang *et al.*, 2008), importancia como suplemento alimenticio para el ganado (Corpoica, 1999; Lascano, 1995); como mejorador de suelos (Argel, 1995; Argel *et al.*, 1995; Argel *et al.*, 1996; Corpoica, 1999); sobre sus nódulos radiculares y su captación de nitrógeno (Khetmalasa y Bal, 2005); y diversidad genética (Bertozzo y Valls. 2001); pero hasta el momento los estudios relacionados con la función biológica de péptidos extraídos de *Arachis pintoii* no se encuentran citados o reportados a través de las bases de datos como ScienceDirect y Scopus.

3. METODOLOGIA

3.1. SIEMBRA DE PLÁNTULAS DE *Arachis pinto*

3.1.1 Material vegetal: Se realizó la siembra de diez plántulas de *A. pinto*, distribuidas en cinco masetas (Figura 3), las cuales fueron enumeradas y marcadas con la fecha de siembra (Enero 16-2014). Estas se mantuvieron durante un mes en un vivero de la Universidad de Antioquia a temperatura ambiente (25°C), con una humedad relativa del 65 %. Las masetas poseen una dimensión de 15 cm de ancho, 55 cm de largo y 12 cm de alto. En cada masetas se sembró dos plántulas con un seguimiento fotográfico día de por medio, a partir del 21 Enero.

3.1.2 Plantas infectadas: Las plántulas presentes en la masetas número cinco (5) se encontraban infectadas por un hongo. Estas plantas no fueron utilizadas para los ensayos, sin embargo se consideró tomar una muestra de la mancha marrón presente en la hoja, que luego fue identificada en el laboratorio (GIEM) como un hongo perteneciente al género *Collectotrichum*. Para aislar el hongo de la hoja se siguió el siguiente protocolo (3.2).

Figura 3. Siembra de diez plántulas de *A. pinto* en cuatro masetas (A) y una adicional de plántula elicitada (B).



Fuente: Autor.

3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL HONGO PRESENTE EN LAS HOJAS

DE *Arachis pintoii*.

Se realizó el aislamiento e identificación del hongo presente mediante el método de Venegas-Ferrín (2002), por el cual se retiraron algunas de las hojas que presentaban la mancha foliar (Figura 4) de las plántulas infectadas de forma natural y se procedió a su aislamiento en un medio ideal de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Figura 5). Se realizó la identificación del hongo aislado con tinción de azul de lactofenol (Anexo G).

Figura 4. Mancha foliar identificada como *Collectotrichum spp.*

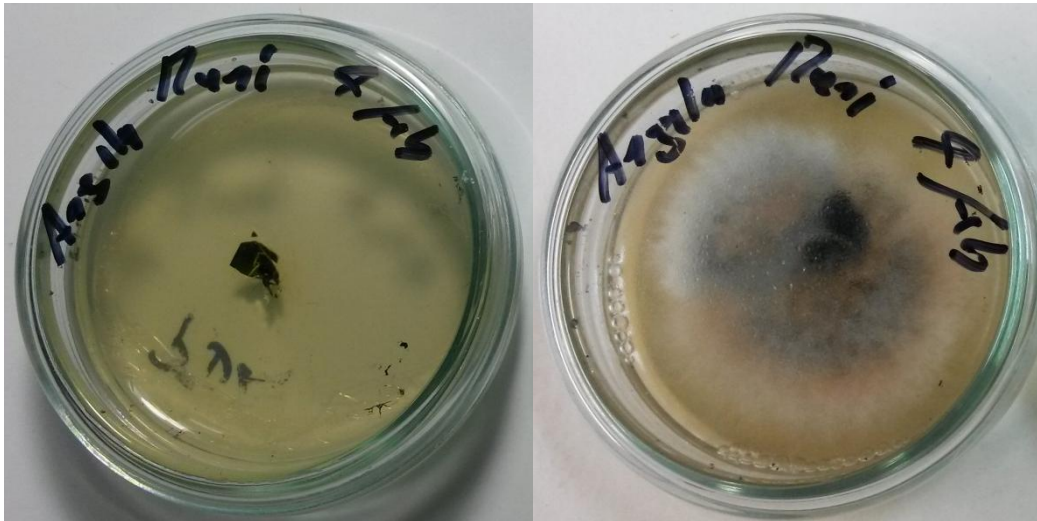


Fuente: Autor.

El hongo identificado pertenece al género *Collectotrichum spp.* el cual está reportado como un hongo fitopatógeno para el género *Arachis*. Este hongo se caracteriza por presentar conidias con ambos extremos redondeados (Figura 6) que corresponden con el tipo morfológico de *C. gloeosporioides* (Oliveira *et al.* 2005) patógeno causante de la antracnosis, una enfermedad grave, ampliamente distribuida en todas las regiones del mundo (Freeman *et al.*, 1996; Martín y García- Figueres, 1999; Oliveira *et al.*, 2005), y que ya ha sido reportada por Kelemu *et al.* (2000) en *A. pintoii*. Las manchas identificadas como *Collectotrichum spp.* desaparecieron a los 5 días, lo que indica que

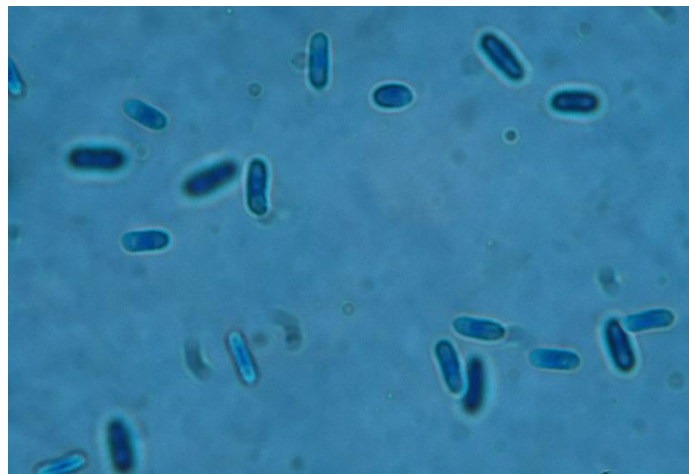
hay una respuesta del sistema inmunológico por parte de *A. pintoi*. De acuerdo a este resultado es posible que las plantas que presentaban *Collectotrichum spp.* estuvieran elicidadas, sin embargo estas no fueron evaluadas, lo que podría llevar a plantear un trabajo con plantas previamente elicidadas en campo.

Figura 5. Aislamiento del hongo de la hoja de *Arachis pintoi*.



Fuente: Autor.

Figura 6. Identificación del hongo por conidias. *Collectotrichum gloeosporioides*, patógeno causante de la antracnosis, encontradas en el aislamiento de las hojas de *A. pintoi*.

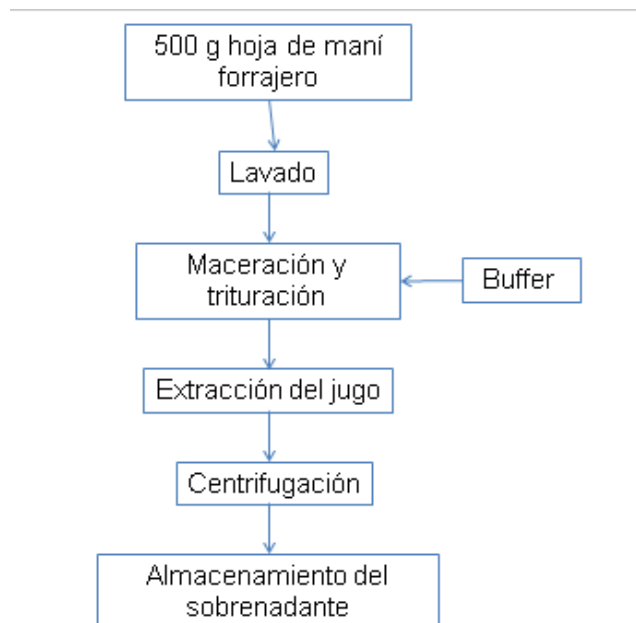


Fuente: Autor

3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO PROTEICO A PARTIR DE HOJAS DE *Arachis pinto*

La extracción de proteína se realizó de acuerdo a Fu *et al* (2010) con modificaciones. Se tomaron 500 g de hojas de maní forrajero que fueron separadas de los tallos y peciolas, y enjuagadas con agua del grifo. El material se trituró y maceró con el buffer fosfato (Na_2HPO_4 0.025 M, KH_2PO_4 0.2 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 25 mM) en una proporción 1:5 (w/v) con un pH 7.85, esto con el fin de inducir lisis celular y de esta manera liberar las proteínas. Posteriormente, el líquido se separó de la biomasa de la hoja para centrifugarlo a 13.800 rpm durante 20 minutos a 4 °C y de esta manera precipitar los cloroplastos. La proteína se mantuvo en el sobrenadante, el cual fue filtrado al vacío para eliminar sólidos suspendidos en la solución (Figura 7).

Figura 7. Esquema de la obtención de extracto crudo proteico a partir de hojas de *Arachis pinto*



Fuente: Autor.

La proteína fue liofilizada y resuspendida en agua destilada para obtener concentraciones de 2000 y 1435 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La solución se mantuvo refrigerada a 4 °C.

3.3.1. Cuantificación de proteína: La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), con lectura a una absorbancia de 595 nm en un Multiskan GO, empleando el software Skanlt 3.2.

La solución usada como patrón fue Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma) en las siguientes concentraciones 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 mg/ml, usando como blanco 1 ml del buffer empleado para la extracción proteica.

3.3.2. Electroforesis SDS-PAGE del extracto crudo proteico: Se determinó el patrón de migración electroforética y el tamaño de proteínas presentes en la muestra, por medio de la técnica de electroforesis en gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 12% (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis") en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN (BIO-RAD). Para lo cual se sembró en el gel 2 μl del marcador de peso molecular (Amersham- LMW Calibration kit for SDS Electroresis; GE Healthcare) en el primer carril, en el segundo y tercer carril 7 μl de extracto proteico de *A. pintoii*, la segunda muestra diluida (1:50). Las muestras se corrieron a 300 V. Las proteínas separadas fueron teñidas con una solución de Comassie, el exceso de colorante fue eliminado con una solución de desteñido.

3.3.3. Diálisis del extracto crudo proteico: El extracto crudo proteico se purificó por el método de diálisis, utilizando una membrana con diámetro de poro de un Dalton. Este proceso tuvo una duración de tres días con un recambio de agua cada cinco horas. Para asegurar la remoción de las sales del buffer (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4) se midió el pH del agua antes de sumergir la membrana con el extracto crudo proteico y en cada recambio hasta alcanzar el pH inicial.

3.4. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO DE *Arachis pintoii*

3.4.1. Cinética de hidrolisis del extracto crudo proteico de *Arachis pintoi*: La hidrolisis enzimática se realizó con papaína, a una concentración de 835 µg /ml de proteína en 0.01 M buffer fosfato a un pH 7.0, y una relación E:S del 2 % de acuerdo a Barbosa *et al.* (2004). La hidrolisis del extracto crudo proteico se realizó en 4 tiempos: tiempo cero (T0), una hora (T1), tres horas (T3) y cinco horas (T5), por triplicado, las condiciones fueron las mismas para todos los tratamientos, se incubaron a 37°C, la hidrolisis fue detenida en baño maría a 95°C, durante 20 minutos.

Luego, se centrifugaron los hidrolizados de los 4 tiempos evaluados a 3000 rpm durante 10 minutos, para obtener la fracción soluble, equivalente al hidrolizado.

Posteriormente se realizó el proceso anterior pero en muestras sin papaína a tiempo cero, una y dos horas; y muestra con papaína a tiempo cero, treinta y sesenta minutos.

3.4.2. Electroforesis SDS-PAGE de la cinética de hidrolisis del extracto crudo: Los hidrolizados realizados a los 4 tiempos y el extracto crudo proteico fue evaluado por electroforesis en gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 12% y 16 % (Mini-PROTEAN (BIO-RAD)), con el fin de observar si efectivamente estaba ocurriendo la hidrolisis por efecto de la papaína. Se sembró en el gel de poliacrilamida 2 µl del marcador de peso molecular (Amersham- LMW Calibration kit for SDS Electroresis; GE Healthcare) en el primer carril, y en los siguientes 7 µl de la muestra de los hidrolizados a diferentes tiempos en el siguiente orden: extracto crudo proteico sin hidrolizar, hidrolizado a una hora, a tres horas y a cinco horas. Las muestras se corrieron a 200 y 300 V. Las proteínas separadas fueron teñidas con una solución de Comassie y tinción con nitrato de plata.

Adicionalmente se realizó el proceso anterior pero en muestras sin papaína a tiempo cero, una y dos horas; y muestra con papaína a tiempo cero, treinta y sesenta minutos. Se corrieron las muestras a 200-300 V y después se usó tinción de plata para el revelado.

3.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS HIDROLIZADOS DE *Arachis pintoi*

La actividad antioxidante se midió por el método de reducción electroquímica utilizado por Milardovic *et al.* (2006) con modificaciones. Para la curva de calibración se prepararon soluciones de DPPH 10mM en metanol y Trolox 0,5 mM. Las medidas se hicieron electroquímicamente usando un método cronoamperométrico. Se utilizó un potencióstato-galvanostato Autolab PGSTAT 101. Las medidas se realizaron usando un carbono vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como contraelectrodo. El volumen de celda fue de 5mL.

La curva se construyó usando un volumen inicial de 30uL de DPPH y realizando adiciones de 10uL de Trolox y se midió la disminución de corriente producto de la disminución del radical DPPH. Todas las medidas se realizaron usando como electrolito soporte, una solución buffer fosfato.

Luego de la construcción de la curva, se adicionaron a 30 uL de DPPH y 20 uL de muestra. Para calcular el equivalente Trolox, se usa la siguiente ecuación:

$$\text{Eq. Amp.} = \frac{i_{\text{DPPH}} - i_{20 \text{ uL muestra}}}{i_{\text{DPPH}} - i_{20 \text{ uL TROLOX}}}$$

3.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO Y SU HIDROLIZADO.

3.6.1 Actividad fungicida del extracto crudo proteico: Se tomaron tres tubos de ensayo con 12 ml de medio ideal PDA para hongos previamente esterilizado, fundido y enfriado a 40°C. A estos se les adicionó 100 µl del extracto crudo proteico a una concentración de 2000 µl /ml de proteína, posteriormente se homogenizó en un vórtex a 3000 rpm por 15 segundos. Luego se dispuso en cajas de petri estériles hasta que el medio solidifico.

Se sembró una rodaja 0,5 cm de diámetro del micelio del hongo *Cladosporium spp.*, proveniente de un cultivo de 12 días y se incubó a temperatura ambiente durante 10 días, usando como blanco el medio de cultivo sin muestra. Se monitoreó el crecimiento

radial de la colonia por un periodo de 10 días, hasta que el micelio alcanzó el diámetro total de la caja de petri. Esto se realizó por triplicado. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento de la colonia, comparándolo con el diámetro del control negativo (hongo *Cladosporium spp* en PDA, sin extracto crudo proteico); fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro colonia control} - \text{diámetro colonia tratamiento}}{\text{diámetro colonia control}} \times 100$$

3.6.2. Actividad bactericida del extracto crudo proteico y su hidrolizado: Para la evaluación de la actividad bactericida fueron seleccionados dos especies representativas de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; y dos bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Para realizar la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto crudo proteico (concentración proteica de 835 µg/mL) y la cinética de hidrolizado a partir de hojas de *Arachis pintoii*, se empleó la técnica de difusión en agar con discos impregnados, basada en el Método de Kirby-Bauer, usando como control positivo oxitetraciclina.

El cultivo se realizó en medio sólido sobre la superficie de una placa con agar nutritivo se sembró por medio de un hisopo, donde el inóculo se esparció minuciosamente en ángulos rectos respecto de la estría primaria, luego la placa se gira 90°, y el inóculo se esparció para cubrir toda la superficie. Luego fueron colocados los discos de papel de filtro impregnados con 20 µl del extracto proteico sin hidrolizar y los hidrolizados a diferentes tiempos T0 (tiempo cero), T1 (1 hora), T3 (3 horas) y T5 (5 horas). Se incubó la caja durante 18-24 horas a 37 °C y luego se midió los halos de inhibición de desarrollo.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la actividad antioxidante y bactericida se realizó un análisis de varianza (ANOVA), obteniéndose la diferencia de medias por la prueba de Duncan ($P < 0,01$). Se utilizó el software estadístico InfoStat versión libre, 2012e.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO A PARTIR DE HOJAS DE *Arachis pinto*

Se obtuvo el extracto crudo proteico de plantas de *A. pinto* con una eficiencia de 47,5 mg/g (835 µg/mL) de hoja. Estos resultados pueden deberse a que *A. pinto* se caracteriza por tener un alto contenido proteico del 19,4% (Sánchez *et al.*, 2000), debido a que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico para transformarlo en proteína (Crews, 1999).

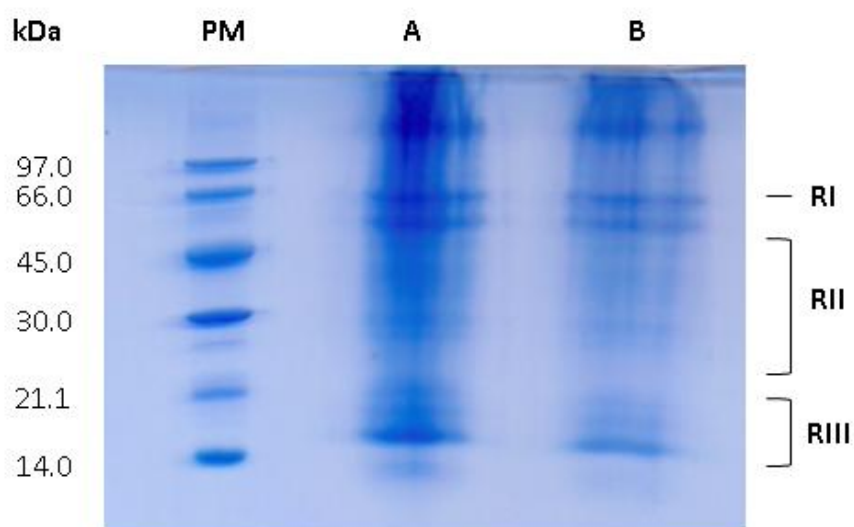
4.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DEL EXTRACTO PROTEICO

La realización del gel SDS-PAGE al 12% permitió observar la presencia de proteínas en el extracto crudo, además de identificar el perfil de las bandas. En la figura 8 se puede observar el perfil electroforético del extracto proteico crudo del extracto proteico de *A. pinto* muestra bandas de diferente peso molecular que han sido reportados para la sección Caulorrhizae a la cual pertenece esta planta. Estos perfiles generales que han sido descritos por Krishna *et al.* (1986) y Singh *et al.* (1994), se dividen en tres grandes regiones, la Región I (RI) o Conarachin, que consta de una única banda principal de la proteína de alto peso molecular, 66,2 kDa; Región II (RII) o Arachin ácida, que contiene subunidades ácidas con bandas de peso molecular entre 31 a 45 kDa, y la Región III (RIII) o Arachin básica que contiene subunidades básicas con bandas de proteínas de peso molecular que van desde 14,3 hasta 24 kDa.

Este perfil también ha sido reportado por Bertozzo y Valls (2001), para proteínas extraídas de semillas de *A. pinto*. Para este trabajo el extracto proteico obtenido a partir de hojas de *A. pinto* presenta las mismas regiones I, II y III (Figura 8), indicando un patrón para la misma planta en diferente tejido. Las bandas representativas de cada

región en hoja de *A. pintoii* presentan el siguiente patrón: una banda a 66.0 kDa (RI), presentando un alto peso molecular; también hay bandas presentes a 45.0 KDa (RII); y otras a bandas entre 14.0 y 21.2 KDa (RIII). La única banda que no se encuentra reportada para esta sección presenta un peso molecular de 97.0 KDa, cabe destacar que tiene una de gran intensidad, esta banda no ha sido reportada por otros investigadores (Figura 8).

Figura 8. SDS-PAGE al 12% realizada como control de extracción del concentrado proteico de *A. pintoii*: (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) proteínas solubles en una concentración 1:1.



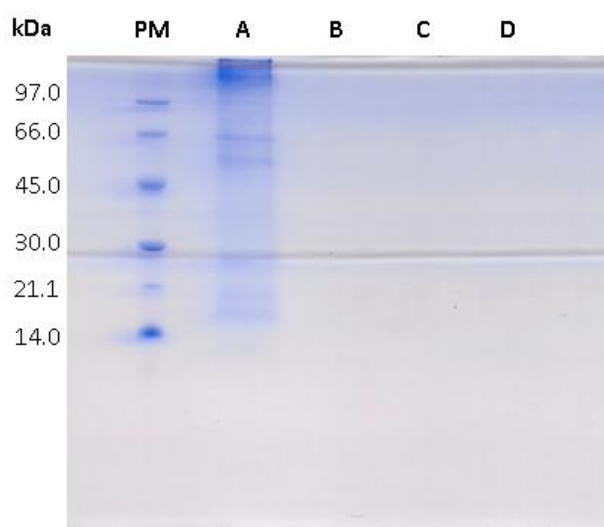
Fuente: Autor.

4.3. CINÉTICA DE HIDROLIZADOS DEL EXTRACTO PROTEICO DE *A. pintoii*.

4.3.1. Electroforesis en gel SDS-PAGE de los hidrolizados de *A. pintoii*: En la figura 9 A. se muestran el perfil del extracto crudo proteico y los perfiles hidrolizados a diferentes tiempos. En los hidrolizados para las bandas descritas como R I,II y III desaparecen, esto puede atribuirse como era de esperarse a la hidrolisis, dado que esta implica la ruptura de los enlaces peptídicos por acción enzimática en este caso, lo cual produce cambios de las características y disminución en el pesos moleculares de

las proteínas (Benitez *et al.*, 2008) dando como resultado para este trabajo péptidos de muy bajo peso molecular por lo que no fueron retenidos por los poros del gel de poliacrilamida del 16 %.

Figura 9. SDS-PAGE al 12% y 16% realizada como control de la hidrólisis del concentrado proteico de *A. pinto*, tinción azul de Comassie: (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) hidrolizado de una hora T1, (C) hidrolizado de tres horas T3, (D) hidrolizado de cinco horas T5.



Fuente: Autor.

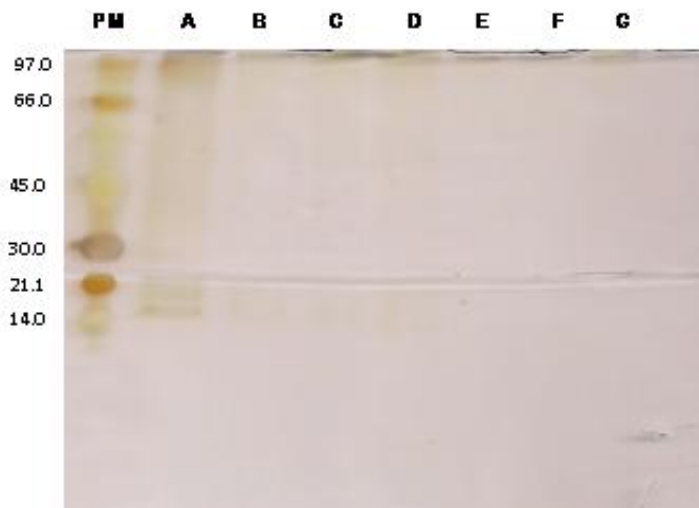
Bajo las condiciones establecidas por Barbosa *et al.* (2004) desde el punto de vista económico y de elaboración, la temperatura y la relación E:S empleada es eficiente, comparado con otros donde se obtuvieron los mismos resultados con una mayor temperatura y una relación E:S cinco veces mayor en 24 horas (Nanda *et al.*, 1977).

También se evaluó el extracto de proteína bajo las mismas condiciones de temperatura con variaciones significativas en los tiempos de cinética, además teniendo en cuenta el tiempo cero para los tratamientos B, C y D que no contienen papaína, y en los tratamientos E, F y G con papaína. En estos se observó para los primeros tratamientos sin papaína (Figura 10 B, C, D) que hay presencia de bandas, sin embargo estas son muy tenues, dado que estas muestras fueron sometidas a incubación y probablemente

en el extracto obtenido, también se encontraban proteasas que al estar a una temperatura optima durante una y dos horas, se reactivó su acción sobre las proteínas causando así una degradación, esto no se evidencio en el extracto puro de proteína debido a que la muestra se encontraba a 4 °C y una vez descongelada se llevo ha corrido en gel de poliacrilamida.

Para el segundo tratamiento con papaína (Figura 10 E, F y G) se observó una ausencia de bandas, debido a que la papaína hidrolizo por completo el extracto proteico de *A. pintoii*. Enyonam en el (2005) obtuvo un resultado similar, donde se evidencia la ausencia de bandas en un corrido de hidrolizados de *A. hypogea*, en esta investigación se consideró el grado de hidrolisis (GH) que fue del 9,1% a diferencia de nuestro estudio.

Figura 10. SDS-PAGE al 12% y 16% realizada como control de la hidrolisis del concentrado proteico de *A. pintoii*, tinción con plata: (PM) Bandas de los marcadores de referencia. (A) proteínas solubles a la concentración obtenida, (B) extracto proteico sin papaína tiempo cero, (C) extracto proteico sin papaína tiempo una hora, (D) extracto proteico sin papaína tiempo dos horas, (E) extracto proteico con papaína tiempo cero, (F) extracto proteico con papaína tiempo treinta minutos, (G) extracto proteico con papaína tiempo sesenta minutos.



Fuente: Autor.

4.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS HIDROLIZADOS DE *Arachis pinto*

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados de *A. pinto*, indican que no existen diferencias significativas entre las medias de los valores de actividad antioxidante de los hidrolizados de *A. pinto* y Trolox (control) ($p=0,9443$; $p<0.01$) demostrando tener un potencial antioxidante. La capacidad antioxidante es directamente proporcional al tiempo de hidrolisis, a mayor tiempo de hidrolisis mayor el valor en equivalente Trolox (Tabla 1) Chen *et al.* (2007) también se reportó actividad antioxidante para hidrolizados en *A. hipogea*.

Este resultado reveló que los hidrolizados de *A. pinto*, posiblemente contienen algunos aminoácidos o péptidos que son donantes de hidrógenos. Zhang *et al.* (2009) postula que estos pueden reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables y terminar la reacción en cadena de estos.

Al utilizar la papaína como catalizador de la hidrolisis en enlaces peptídicos, esta pudo dar como productos, péptidos con terminales que implican aminoácidos básicos, como histidina, arginina, lisina y fenilalanina, debido a que esta enzima escinde en estos aminoácidos (Florence, 2012). La particularidad de estos radica en la presencia de grupos especiales en las cadenas laterales, como es el caso del grupo imidazol en la histidina y aminoácidos aromáticos como fenilalanina, que pueden actuar como donantes de hidrógeno.

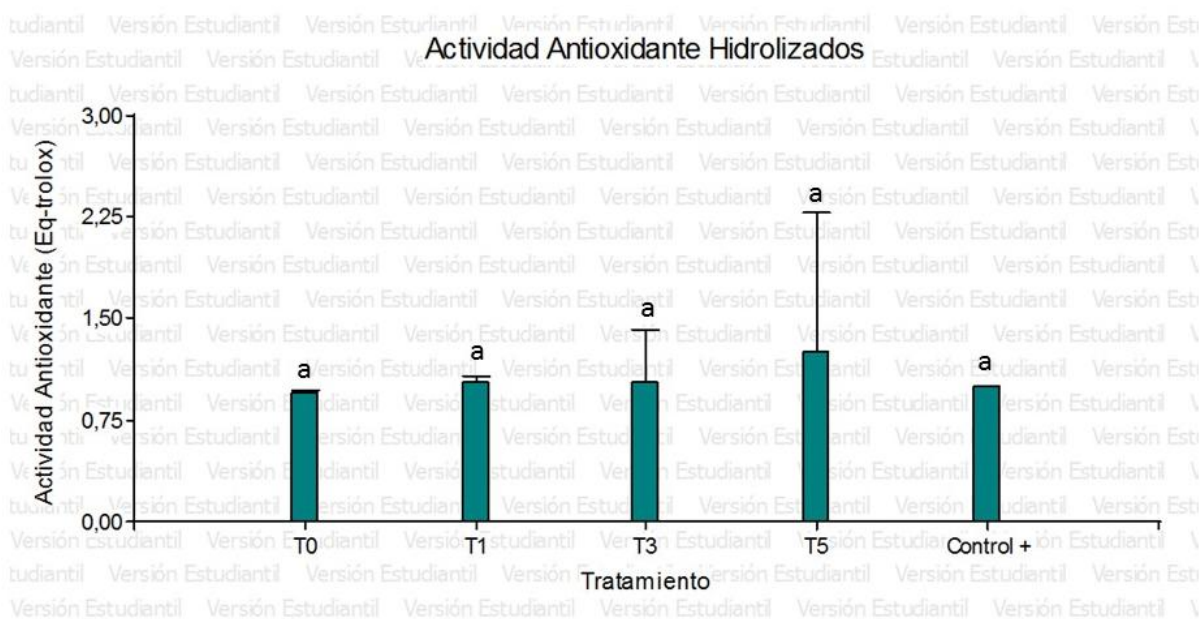
Según lo reportado por Zhang *et al.* (2009), los aminoácidos aromáticos se consideran generalmente como eliminadores de radicales eficaces, ya que se transfiere átomos de hidrógenos fácilmente a radicales de electrones deficientes, mientras que al mismo tiempo mantienen su estabilidad a través de estructuras de resonancia.

Tabla 1. Actividad antioxidante expresada en equivalente Trolox para hidrolizados del extracto crudo proteico de *A. pinto* a diferentes tiempos.

MUESTRA	Eq.Trolox Amperometría
Trolox	1,00a
Hidrolizados	
Tiempo cero	0,95a
A una hora	1,02a
A tres horas	1,03a
A cinco horas	1,26a

^a Índices de Duncan (P<0,01) letras diferentes indican diferencias significativas

Figura 11. Promedios de valores en Eq. Trolox para Actividad antioxidante de hidrolizados de *A. pinto*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas (P<0,01).



Fuente: Autor.

4.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO CRUDO PROTEICO Y SU HIDROLIZADO DE *Arachis pinto*.

4.5.1 Actividad fungicida del extracto crudo proteico de *Arachis pinto*.: Al evaluar la actividad fungicida del extracto crudo proteico en *Cladosporium* ssp. se pudo apreciar una actividad inhibitoria en la concentración de 2000 µg /ml, para 11 % del efecto inhibitorio del control negativo (Figura 12). Ng en el (2004) reportó para *A. hypogea* un péptido con actividad antifúngica en *Mycosphaerella arachidicola*, *Coprinus comatus* y *Fusarium oxysporum*. En un estudio realizado por Chadha y Das en el (2006) identificaron proteínas (AhPR10, AhPR10-K54N) en *A. hypogea* con actividad antifúngica, con 10% de crecimiento para *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

Este trabajo permiten vislumbrar el potencial antimicrobiano de esta planta, *Arachis pinto*, con una clara capacidad de defensa frente a patógenos. Probablemente los responsables de esta actividad antimicrobiana sean mediadas por proteínas y péptidos, ya que existen proteínas cuyo modo de acción todavía no se conoce (Chadha y Das, 2006).

Figura 12. Actividad antifúngica de extracto crudo proteico de *Arachis pinto* frente a *Cladosporium* ssp. (A) extracto crudo, (B) control negativo



Fuente: Autor.

4.5.2. Actividad bactericida del extracto crudo proteico y su hidrolizado de *Arachis pintoii*.

4.5.2.1. Actividad bactericida del extracto crudo: Se evaluó la actividad bactericida del extracto crudo proteico de las hojas de *A. pintoii* en una concentración proteica de 835 µg /ml, para *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Figura 15) no se encontró actividad bactericida mientras que para *Escherichia coli* si presento (Figura 16).

Se evaluaron concentraciones del extracto crudo proteico 2000, 1435, 835 y 400 µg /ml en *E. coli*, para la concentración de 400 µg /ml no se encontró actividad bactericida. La mayor actividad fue presentada para el extracto a una concentración de 2000 µg /ml con un 100% de inhibición, no hubo crecimiento bacteriano (Figura 19, B). En la Figura 19, Tabla 3 se puede ver diferencias significativas entre los valores de inhibición para las concentraciones de 1435, 835 y 400 µg /ml ($p < 0.0001$; $p < 0.01$)

4.5.2.2. Actividad bactericida del hidrolizado: Se evaluó la acción bacteriostática de los hidrolizados en 4 tiempos (T0, T1, T3 y T5) en dos bacterias representativas de las gram positivas y gram negativas, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Los resultados encontrados mostraron una actividad de los hidrolizados sobre *S. aureus* se evidenció un efecto bacteriostático con un halo de inhibición perceptible (Figura 18). No hubo diferencias significativas entre las medias de los valores de actividad bacteriostática de los hidrolizados de *A. pintoii* sobre *S. aureus*. Sin embargo presento diferencias significativas respecto al control (oxitetraciclina), un antibiótico conocido para bacterias ($p = 0,0001$; $p < 0.01$). Mientras que para *E. coli* no presentó ninguna actividad (Figura 17). Esto evidencia el potencial antimicrobiano que presenta el extracto puro e hidrolizados de *A. pintoii* sobre algunos microorganismos, numerosas investigaciones han demostrado que las leguminosas presentan diversas proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana (De Souza *et al.*, 2011; Kelemu *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 1995).

Enyonam en el (2005) demostró que las bacterias gram positivas son más susceptibles que las gram negativas, a los hidrolizados obtenidos a partir de *A. hipogea*, resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo para *A. pintoii*.

Para bacterias gram negativas Enyonam en el (2005) demostró que hubo una actividad bactericida proporcional al aumento en la concentración del extracto crudo proteico, en este trabajo los resultados mostraron una actividad antimicrobiana para 2000 µg /ml donde presento la máxima actividad.

Tabla 2. Actividad bactericida del extracto puro proteico de *A. pintoii* y sus hidrolizados a diferentes tiempos.

Microorganismo	Diámetro de Inhibición (mm)					
	Extracto puro sin hidrolizar	Tiempo cero	Una hora	Dos horas	Cinco horas	Control +
<i>Escherichia coli</i>	21	0	0	0	0	40
<i>Salmonella typhi</i>	0	NE	NE	NE	NE	40
<i>Bacillus subtilis</i>	0	NE	NE	NE	NE	42
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	24a	22,4a	22,6a	24,3a	33b

NE: No se evaluó

Control +: Oxitetraciclina

^{a,b} Índices de Duncan (P<0,01) letras diferentes indican diferencias significativas

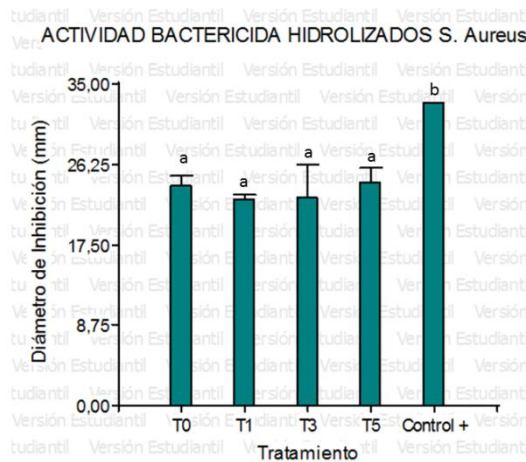
Tabla 3. Actividad bactericida del extracto puro proteico de *A. pintoii* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*.

Microorganismo	Diámetro de inhibición				
	2000 µg /ml	1435 µg /ml	835 µg /ml	400 µg /ml	Control
Escherichia coli	130e	10,3b	18c	0a	43d

Control +: Oxitetraciclina

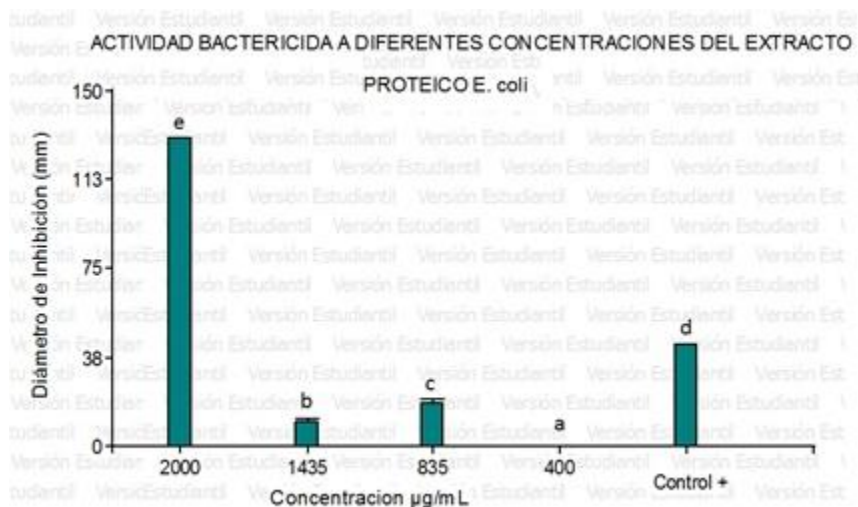
^{a,b,c,d,e} Índices de Duncan (P<0,01) letras diferentes indican diferencias significativas.

Figura 13. Promedios de valores de diámetro de inhibición para la actividad bactericida de los hidrolizados a diferentes tiempos del extracto puro proteico de *A. pintoi* sobre *Staphylococcus aureus*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,01$).



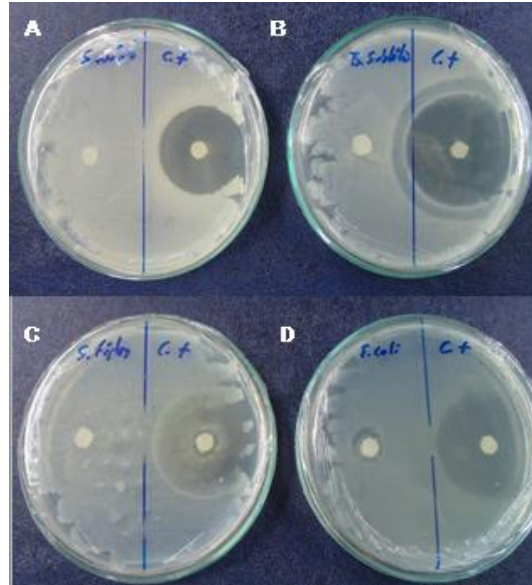
Fuente: Autor

Figura 14. Promedios de valores de diámetro de inhibición para la Actividad bactericida del extracto puro proteico de *A. pintoi* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*. Test de Rangos Múltiples de Duncan. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,01$).



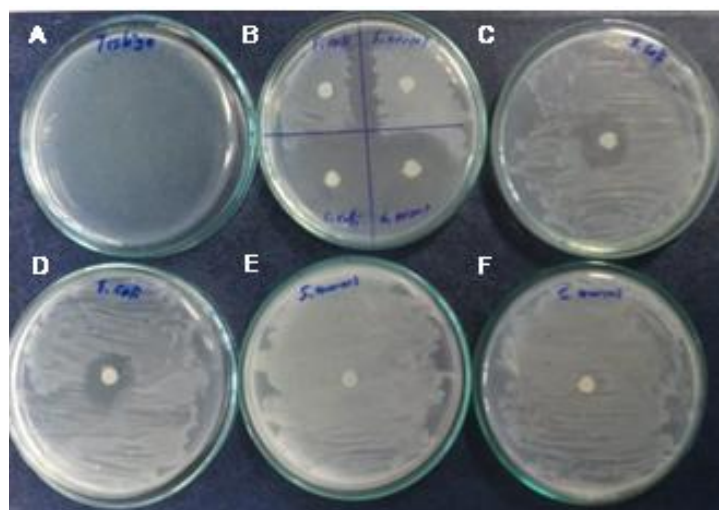
Fuente: Autor.

Figura 15. Antibiograma de extracto proteico y control positivo (Oxitetraciclina) en Gram positivas. (A). *Staphylococcus aureus* y (B). *Bacillus subtilis*; Gram negativas. (C). *Salmonella typhi* (D). *Escherichia coli*



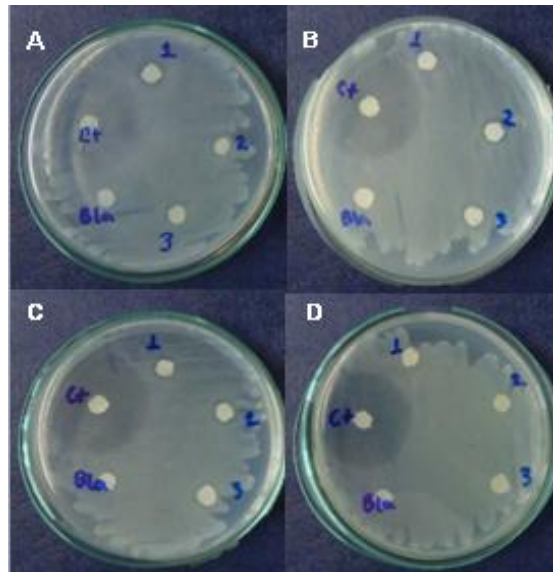
Fuente: Autor.

Figura 16. Antibiograma de extracto proteico *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (A). Testigo, (B) Control positivo (Oxitetraciclina) y control negativo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, (C y D) *Escherichia coli*, (E y F) *Staphylococcus aureus*.



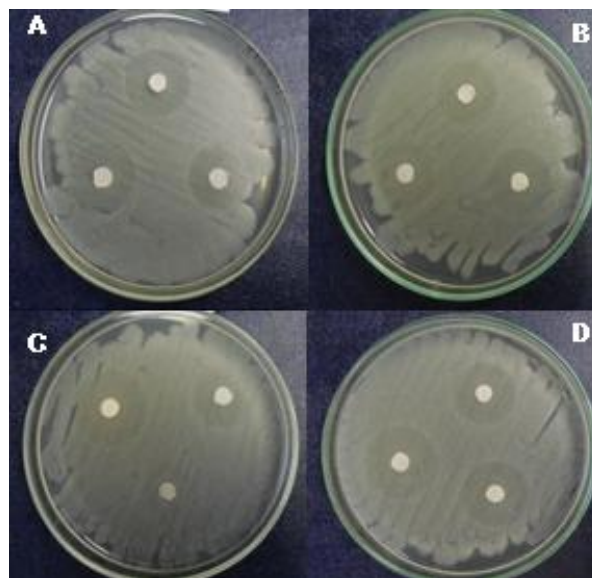
Fuente: Autor.

Figura 17. Actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* (gram -) de hidrolizados (A) tiempo cero (B) tiempo una hora (C) tiempo tres horas (D) tiempo cinco horas.



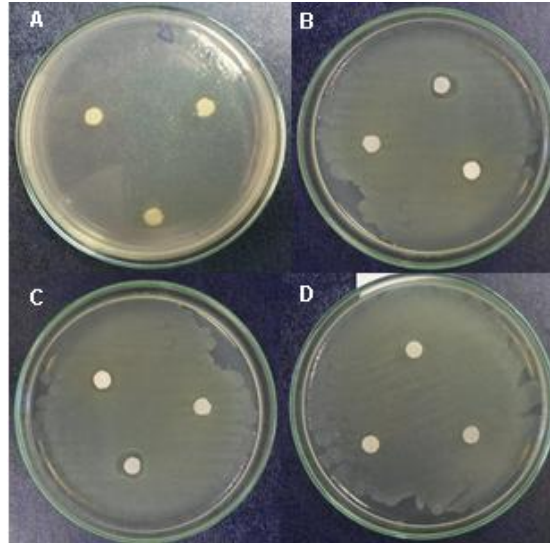
Fuente: Autor.

Figura 18. Actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (gram +) de hidrolizados (A) tiempo cero (B) tiempo una hora (C) tiempo tres horas (D) tiempo cinco horas.



Fuente: Autor.

Figura 19. Actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* (Gram -) de extracto proteico a diferentes concentraciones: (A) 2000 $\mu\text{g/ml}$ (B) 1435 $\mu\text{g/ml}$ (C) 835 $\mu\text{g/ml}$ (D) 400 $\mu\text{g/ml}$.



Fuente: Autor.

5. CONCLUSIONES

El extracto crudo proteico de *Arachis pinto* tuvo una eficiencia proteica de 47,5 mg/g de hoja, el cual presentó una actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, bacteria gram negativa, y frente al hongo *Cladosporium* sp.

Se observó una actividad bacteriostática de los hidrolizados del extracto crudo proteico de *Arachis pinto* sobre *Staphylococcus aureus*, bacteria perteneciente al grupo de gram positivas.

El hidrolizado del extracto crudo proteico de *A. pinto* presenta una mejor actividad antioxidante que el Trolox. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre los tiempos de hidrolizados para este potencial.

RECOMENDACIONES

Proponer una comparación entre la actividad antimicrobiana del extracto crudo proteico de *Arachis pinto* previamente elicitada por un fitopatógeno y sin elicitar, sobre un rango más amplio, que permita establecer el potencial fungicida y bactericida en ambos casos.

Realizar una identificación de las proteínas y péptidos presentes en el extracto crudo proteico de las hojas de *Arachis pinto* y sus hidrolizados.

REFERENCIAS

Álvarez, J.C. & Monteghirfo, M. (2003). Aislamiento de una fracción proteica de bajo peso molecular de semillas de maca (*Lipidium peruvianum* G. Chacón) con propiedades antifúngicas. *Rev. Soc. Quim.*, 69 (4), 222-228.

Argel, P.J. (1995). *Biología y agronomía de especies forrajeras de Arachis*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Argel, P.J.; Villarreal, M.; Valerio, A. & Monge, L.F. (1995). *Comportamiento de Arachis pintoï solo y asociado con especies de Brachiaria en pasturas invadidas por Ratana*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Argel, P. J.; Valerio, A. & Martínez, R. (1996). Efecto de la quema y la aplicación de herbicidas en la sobrevivencia de *Arachis pintoï*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Barbosa, C.; Morais, H.A.; Delvivo, F.M.; Mansur, H.S.; De Oliveira, M.C. & Silvestre, M.P. (2004). Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J Sci Food Agric.*, 84, 1891–1900.

Bastiani-Perez, N. & Pizarro, E. (2005). Potencial forrajero del genero *Arachis* en el trópico americano. En: N, Bastiani-Perez, E, Pizarro. *IX Seminario de Pastos y Forrajero*. (pp. 23-24). Curitiba, Brasil.

Benítez, R.; Ibarz, A. & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42, 227-36.

Bertoza M & Valls J. (2001). Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoï* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 121–130.

Bojórquez, E.; Ruiz-Ruiz, J.; Segura-Campos, M.; Betancur-Ancona, D. & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones

peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. (pp. 139-154) Barcelona: OmniaScience.

Bortan, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 61-92.

Blanco-Labra, A. & Aguirre, C. (2002). Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria*, 12 (3), 3-5.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 248–254.

Brodgen, KA. (2005). Antimicrobial Peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol.*, 3, 238-250.

Chadha, P. & Das, R.H. (2006). A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta*, 225, 213–222

Chen, G.; Zhao, L.; Zhao, L.; Cong, T. & Bao, S. (2007). *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *J Sci Food Agric.*, 87, 357–362.

CIAT. (1992). *Pastures for the Tropical Lowlands: CIAT's Contributions*. Recuperado de:<http://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=EXVWwNCeyWcC&oi=fnd&pg=PA57&dq=arachis+pintoi&ots=VFQ9hd32aQ&sig=QCzyZEj8rGRxP4f3RrEtnGvJ7eE#v=onepage&q=arachis%20pintoi&f=false>

Crews, T.E. (1999). The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. *Biogeochemistry*, 46, 233–246.

Criado, C. & Moya, M. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma*. (p.p 6-10). Madrid: Saned.

Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; & Barka, E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of

action, and future prospects. *Minireview Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 4951-4959

Corpoica. (1999). Maní forrajero (*Arachis pintoi*), la leguminosa para sistemas sostenibles de producción agropecuaria. Recuperado de:http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127164516_Man%C3%ADforrajero%20alimento%20animal.pdf.

De Franco, A.L.; Locksley, R.M. & Robertson, M. (2007). Immunity. The immune response in infectious and inflammatory disease. Primers in Biology. *New Science Press*, 3, 387.

De Souza, E.; Soares, M.; Barbosa, P.; Bergamin, T.; Nascimento O.; Pogue, R... Franco, O.L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*. 3291.

De Wit, P.J. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science*, 2, 452 - 458.

Diaz-Puentes, L. N. (2012). Systemic acquired resistance induced by salicylic acid. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2), 260

Enyonam, E. (2001). *Peanut (Arachis hypogaea L.) as a source of antihypertensive and antimicrobial peptides*. (Tesis). Faculty science. University of Georgia. Athens, Georgia.

Fisher, M. J. & Cruz, P. (1995). "Algunos aspectos de la ecofisiología de *Arachis pintoi*" en *Biología y Agronomía de especies forrajeras de Arachis*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

Florence, E.A. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2), 99-104

Freeman, S.; Minz, T. & Shabli, E. (1996). Characterization of *Colletotrichum gloeosporoides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1014-1020.

- Fu, H.; Machado, P.A.; Hahma, T.S.; Kratochvil R.J.; Wei C.I. & Lo, Y.M. (2010). Recovery of nicotine-free proteins from tobacco leaves using phosphate buffer system under controlled conditions. *Bioresource Technology*, 101, 2034–2042
- Gallegos-Tintoré, S.; Chel-Guerrero, L.; Corzo-Ríos, L.J.; & Matínez-Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience.
- Gómez, L. (2013). *Propiedades biológicas de los hidrolizados enzimáticos de Plasma de bovino: actividad antioxidante, antihipertensiva y Antimicrobiana*. (Tesis). Facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia.
- Girgiha, A.; He, R.; Malomo, S.; Offengenden, M.; Wu, J. & Aluko, R. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa L.*) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384–394
- Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P. & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41, 79-89.
- Hartmann, R. & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141, 312-322.
- Hong-Yu, L.; Bin, W.; Zhong-Rui, L.; Chang-Feng, C.; Qi-Hong, Z. & Guang-yuan, H. (2013). Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. *Food Science and Technology*, 51, 281-288.
- Huang, D.; Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.

- Hwee-Leng, S. & Chee-Yuen, G. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141, 3435–3442
- Islam, A. (2006). Fungus Resistant Transgenic Plants: Strategies, Progress and Lessons Learnt. *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, 16(2), 117-138.
- Jaulneau, V.; Cazaux, M.; Hoi, J.W.S. & Dumas, B. (2010). Host and Nonhost Resistance in Medicago Colletotrichum Interactions. *MPMI*, 23(9), 1107-1117.
- Jayaram, S. & Bal, A.K. (1991). Oleosomes (lipid bodies) in nitrogen-fixing root nodules, *Plant Cell Environ.*, 14, 195–205.
- Kelemu, S.; Muñoz, F. & Rodríguez M.X. (2000). Diversidad genética y patogénica de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* que infectan la leguminosa forrajera *Arachis pintoi*. *Pasturas Tropicales*, 22 (3), 16.
- Kelemu, S.; Cardona, C. & Segura, G. (2004). Antimicrobial and insecticidal protein isolated from sedes of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 867–873.
- Khetmalasa, M. & Bal A. (2005). Microscopical studies of *Arachis pintoi* root nodule with special reference to bacteroids and oleosomes at different stages of plant growth and nodule development. *Plant Science*, 168, 557–563
- Klarzynski, O.; Descamps, V.; Plesse, B.; Yvin, J.C.; Kloareg, B. & Fritig, B. (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact*, 16 (2), 115-112.
- Krapovickas, A. & Gregory, W C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8, 1-186.
- Krishna, T.G.; Pawar, S.E. & Mitra, R. (1986). Variation and inheritance of the arachin polypeptides of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor. Appl. Genet*, 73, 82–87.

Lascano, C. (1995). Valor nutritivo y producción animal de *Arachis forrajero*. *Biología y agronomía de especies forrajeras de arachis*. (pp.117-130). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

Laemmli, V. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Manners, J.G. (1986). *Introducción a la fitopatología*. México D. F.: Editorial LIMUSA.

Maróti, G.; Kereszt, A.; Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162, 363-374.

Martín, M.P. & García-Figueres, F. (1999). *Collectotrichum acutatum* and *Collectotrichum gloeosporioides* cause anthracnose in olives. *Eur. J. Plant Pathol*, 105, 733-741.

Memarpoor-Yazdi, M.; Mahaki, H. & Zare-Zardini H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal of functional foods*, 5, 62 –70

Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J.*, 8, 363-373.

Milardovic´, S.; Ivekovic, D. & Grabaric, B.S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68, 175 – 180.

Mundo, J. & Serrano, D. (2012). *Extracción de la enzima papaína del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queloides y verrugas*. (Tesis). Facultad de química y farmacia. Universidad de el Salvador. San salvador. El salvador.

Mulero, J.; Zafrilla, P.; Martínez-Cachá, A.; Leal, M. & Abellán, J. (2011). Péptidos bioactivos. Revisión. *Clin Invest Arterioscl*, 23 (5), 219-227.

Nanda, C.L.; Ternouth, J.H. & Kondosa, A.C. (1977). In vitro Hydrolysis of Plant Protein Concentrate with Papain. *J. Sci. Fd Agric*, 28, 20-22.

Niderman, T.; Genetet, I.; Bruyere, T. & Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related Pr-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of 314-Kilodalton proteins of tomato and of a basic Pr-1 of tobacco with Inhibitory activity against *P. Infestans*. *P. Physio.*, 108 (1),17-27.

Ng, T.B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. Review. *Peptides*, 25, 1215-1222.

Ohno, S.; Im, H.; Knudson, C.; & Knudson, J. (2006). Hyaluronan Oligosaccharides Induce Matrix Metalloproteinase 13 via Transcriptional Activation of NFB and p38 MAP Kinase in Articular Chondrocytes *J. Biol. Chem*, 281 (26), 17952-17960.

Oliveira, R.; Moral, J.; Bouhmidi, K. & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum spp.* causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31, 531-548.

Osborn, R.W.; De Samblanx, G.W.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Van Leuven, F... Broekaert, W.F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, 368, 257-262

Patrzykat, A.; Friedrich, CL.; Zhang, L.; Mendoza, V. & Hancock, RE. (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 605-614.

Phua, SK.; Castillo, E.; Anderson, JM. & Hiltner, A. J. (1987). Biodegradation of a polyurethane in vitro. *Biomedical Materials Research*, 21, 231.

PhytAmp, (2014). *PhytAmp: a database dedicated to plant antimicrobial peptides*. Recuperado de: <http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php>

Riaño, L. & Zamora, H. (2005). Proteínas antifúngicas contra *P. Infestans* en los espacios intercelulares de hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum cerasiforme*) posibles defensinas de plantas. *Rev.Colomb.Quim.* 34 (1).

Riviere, M.P.; Marais, A. & Galiana, E. (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular beta-(1 →3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *J. Exper. Bot.*, 59(6), 1225-1239.

Rocha, G.; Kise, F.; Rosso, A. & Parisi, M. (2013). Péptidos con Actividad Antimicrobiana obtenidos de Proteínas Lácteas con Extractos de *Salpichroa organifolia*. *Información Tecnológica*, 24 (2), 23-30.

Rupley, J.A. (1967). Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Meth. Enzymol.*, 11, 905-917.

Saito, K.; Hao, J.D.; Ogawa, T.; Muramoto, K.; Hatakeyama, E... Nokiara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry. *J. Agric Food Chem.*, 51 (12), 3668-3674.

Sánchez, J.; Villarreal, M. & Soto, H. (2000). Caracterización nutricional de los componentes forrajeros de cuatro asociaciones gramíneas/*Arachis pintoi*. *Nutrición Animal Tropical*, 6 (1), 7.

Singh, A.K.; Gurtu, S. & Jambunathan, R. (1994). Phylogenetic relationships in the genus *Arachis* based on seed protein profiles. *Euphytica*, 74, 219–255.

Steinhardt, J. & Beychock S. (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. *The proteins*, II, 139-304.

Tang, R.; Zhuang, W.; Gao, G; Hell-Han, Z.; Shan, S... Li, Y. (2008). Phylogenetic Relationships in Genus *Arachis* Based on SSR and AFLP Markers. *Agricultural Sciences in China*, 7(4), 405-414.

Van Loon, LC. & Van Kammen, RT. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40, 199-211.

Venegas-Ferrín, J.P. (2002). *Adaptación de técnicas y métodos para la caracterización patogénica de Colletotrichum lindemuthianum y Phaeoisariopsis griseola en frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. (Tesis). ZAMORANO Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Honduras.

Zhang, S.B.; Wang, Z.; Ying Xu, S. & Fu Gao, X. (2009). Purification and Characterization of a Radical Scavenging Peptide from Rapeseed Protein Hydrolysates. *J Am Oil Chem Soc*, 86, 959–966.

ANEXOS

Anexo A. Matriz de Datos Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de *A. pintoi*.

T0	0,94
T0	0,96
T0	0,96
T1	1,08
T1	0,98
T1	1,01
T3	1,45
T3	0,69
T3	0,95
T5	0,66
T5	0,68
T5	2,44
Trolox	1
Trolox	1
Trolox	1

Anexo B. ANOVA – Test de Duncan Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de *A. pintoii*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Actividad Antioxidante	15	0,07	0,00	46,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	4	0,04	0,18	0,9443
Tratamiento	0,17	4	0,04	0,18	0,9443
Error	2,39	10	0,24		
Total	2,56	14			

Test:Duncan Alfa=0,01

Error: 0,2393 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T0	0,95	3	0,28 A
Control +	1,00	3	0,28 A
T1	1,02	3	0,28 A
T3	1,03	3	0,28 A
T5	1,26	3	0,28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Anexo C. Matriz de Datos de Actividad bactericida de hidrolizados sobre *Staphylococcus aureus* (Gram +)

T0	24
T0	25
T0	23
T1	23
T1	22
T1	22
T3	26
T3	23
T3	19
T5	26
T5	23
T5	24
Control +	33
Control +	33
Control +	33

Anexo D. ANOVA – Test de Duncan actividad bactericida de hidrolizados sobre *Staphylococcus aureus* (Gram +)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de Inhibición	15	0,88	0,83	7,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	232,93	4	58,23	18,20	0,0001
Tratamiento	232,93	4	58,23	18,20	0,0001
Error	32,00	10	3,20		
Total	264,93	14			

Test:Duncan Alfa=0,01

Error: 3,2000 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T1	22,33	3	1,03	A
T3	22,67	3	1,03	A
T0	24,00	3	1,03	A
T5	24,33	3	1,03	A
Control +	33,00	3	1,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Anexo E. Matriz de Datos de Actividad bactericida a diferentes concentraciones del extracto crudo proteico *Escherichia coli*

2840	9
2840	10
2840	8
2000	130
2000	130
2000	130
1435	12
1435	10
1435	9
835	20
835	18
835	16
400	0
400	0
400	0
Control +	43
Control +	43
Control +	43

Anexo F. ANOVA – Test de Duncan actividad bactericida a diferentes concentraciones del extracto proteico *Escherichia coli*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de Inhibición (mm..)	18	1,00	1,00	3,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	35662,28	5	7132,46	5835,65	<0,0001
Concentracion µg/mL	35662,28	5	7132,46	5835,65	<0,0001
Error	14,67	12	1,22		
Total	35676,94	17			

Test:Duncan Alfa=0,01

Error: 1,2222 gl: 12

Concentracion µg/mL	Medias	n	E.E.	
400	0,00	3	0,64	A
2840	9,00	3	0,64	B
1435	10,33	3	0,64	B
835	18,00	3	0,64	C
0	43,00	3	0,64	D
2000	130,00	3	0,64	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Anexo G. Protocolo de aislamiento de *Colletotrichum sp.*

Materiales:

- Hipoclorito al 1.5 %
- Alcohol Antiséptico
- Mechero
- Erlenmeyers
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Cajas petri: 40 cajas / litro de medio
- Toallas estériles de papel toalla
- Beakers pequeños
- Pinzas
- Bisturí
- Puntas de transferencia
- Rastrillo de vidrio
- Medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)
- Cintas de Parafilm®
- Cámara de flujo laminar

Aislamiento:

Siembra

1. Cortar explantes de 5 x 3 mm de vainas, hojas y tallos infectados con *C. lindemuthianum*. Las lesiones no deben estar muy maduras o viejas para evitar que otros patógenos contaminen el medio de aislamiento.
2. Desinfestar los explantes con hipoclorito de sodio a 1.5 %, agitándolos por 1 minuto (hojas), 2 minutos (vainas y tallos finos), ó 3 minutos (tallos gruesos).
3. Enjuagar los explantes con agua destilada estéril después de quitarlos del hipoclorito de sodio. Hacer tres enjuagues dentro de la cámara de flujo laminar.

4. Sacar los explantes y secar en papel servilleta esterilizado, tratando de que los dos lados de los cortes queden bien secos.
5. Colocar 4 a 5 explantes por caja petri y enterrarlos hasta la mitad en el medio PDA solidificado.
6. Colocar los platos petri en la incubadora a 24° C durante 4 días o en un horno con base de 28 ° C para evitar que en la noche la temperatura baje y afecte el crecimiento del cultivo.