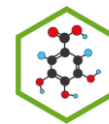


GRUPO POLIFENOLES UTP



**ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE UN MÉTODO
ESPECTROFLUOROMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES
DE LA PROTEASA ASPARTICA SECRETADA (Sap) DE *Cándida albicans*, A
PARTIR DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MELASTOMATACEAE Y RUBIACEAE**

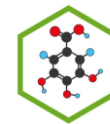
TRABAJO DE GRADO
Requisito parcial para optar el título de Tecnólogo Químico

Presentado por:

**CRISTIAN MAURICIO ARIAS ARISTIZÁBAL
JACKELINE MARULANDA OSORIO**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2010**

GRUPO POLIFENOLES UTP



**ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE UN MÉTODO
ESPECTROFLUOROMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES
DE LA PROTEASA ASPARTICA SECRETADA (Sap) DE *Cándida albicans*, A
PARTIR DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MELASTOMATACEAE Y RUBIACEAE**

Presentado por:

**CRISTIAN MAURICIO ARIAS ARISTIZÁBAL
JACKELINE MARULANDA OSORIO**

TRABAJO DE GRADO

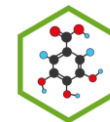
Requisito parcial para optar el título de Tecnólogo Químico

Directora:

Dra. LUZ STELLA RAMIREZ ARISTIZABAL

Grupo Polifenoles UTP

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
GRUPO POLIFENOLES UTP
PEREIRA
2010**



NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

**ESTANDARIZACIÓN Y APLICACIÓN DE UN MÉTODO
ESPECTROFLUOROMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES
DE LA PROTEASA ASPARTICA SECRETADA (Sap) DE *Cándida albicans*, A
PARTIR DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MELASTOMATACEAE Y RUBIACEAE**

Presentado por:

**CRISTIAN MAURICIO ARIAS ARISTIZÁBAL
JACKELINE MARULANDA OSORIO**

El suscrito director y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy ____ de _____, de _____.

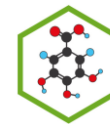
Directora: _____

Nombre: LUZ STELLA RAMÍREZ ARISTIZÁBAL

Jurado: _____

Nombre: JUAN CARLOS SEPÚLVEDA ARIAS

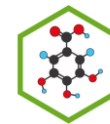
GRUPO POLIFENOLES UTP



DEDICATORIA

A nuestros padres y hermanos por el amor, confianza y apoyo prestado durante el transcurso de la carrera.

GRUPO POLIFENOLES UTP



AGRADECIMIENTOS

A la profesora Luz Stella por su motivación, aportes y orientación en la realización de este trabajo.

Al profesor José Hipólito por las asesorías y la información que nos brindó en el desarrollo del trabajo.

A Johana Tapias por las indicaciones en el HPLC para el desarrollo del proyecto.

A los profesores de la Escuela de Química por compartir sus conocimientos con nosotros.

A nuestros amigos y compañeros por el apoyo y amistad en el transcurso de la carrera

Agradecemos a Colciencias por el apoyo financiero para la realización de este trabajo

Un merecido reconocimiento a las instituciones y equipos de investigación que hicieron posible este aporte: el Grupo de Polifenoles de la Universidad Tecnológica de Pereira-CENIVAM.

GRUPO POLIFENOLES UTP

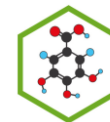
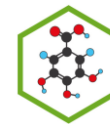


TABLA DE CONTENIDO

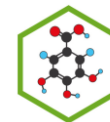
	Pág.
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Surgimiento del problema.....	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.3 Objetivos.....	2
1.3.1 Objetivo General.....	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 Justificación.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Características de los hongos.....	5
2.1.1 Estructura.....	5
2.1.2 Morfología y crecimiento de micóticos.....	5
2.1.3 Levaduras y mohos.....	5
2.1.4 Dimorfismo.....	6
2.2 Patogenia, inmunidad y quimioterapia de las infecciones micóticas.....	6
2.2.1 Aspectos generales de las micosis.....	6
2.2.2 Adherencia.....	7
2.2.3 Invasión.....	7
2.2.4 Quimioterapia antimicótica.....	8
2.2.4.1 Antimicrobianos antimicóticos que afectan los esteroides de membrana	
2.2.4.1.1 Polienos.....	8
2.2.4.1.2 Azoles.....	8
2.2.5 Mecanismos de resistencia.....	9
2.3 <i>Cándida</i>	9
2.3.1 Características generales.....	9
2.3.2 Cultivo.....	9
2.3.3 <i>Cándida albicans</i>	10
2.3.3.1 Taxonomía.....	10

GRUPO POLIFENOLES UTP



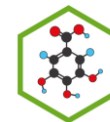
2.3.3.2 Micología.....	10
2.3.3.3 Epidemiología.....	10
2.3.3.4 Patogenia.....	11
2.3.4 Candidiasis (Aspectos clínicos).....	11
2.3.4.1 Manifestaciones.....	11
2.3.4.2 Tratamiento.....	12
2.4 Proteasa Aspártica Secretada (Sap).....	12
2.4.1 Patogenia.....	12
2.4.2 Isoenzimas.....	12
2.4.3 Inhibición.....	13
2.5 Descripción de la familia Melastomátaceae.....	14
2.5.1 Morfología general de la familia Melastomataceae.....	14
2.5.2 Taxonomía previa de la familia Melastomátaceae.....	15
2.5.3 Farmacognosia y fitoquímica de la familia Melastomataceae.....	16
2.5.4 Descripción del género <i>Miconia</i>	17
2.5.4.1 Morfología general del género <i>Miconia</i>	17
2.5.4.2 Productos naturales y farmacognosia del género <i>Miconia</i>	17
2.5.4.3 Descripción de la especie <i>Miconia coronata</i> (Bonpl) DC.....	19
2.5.5 Descripción del género <i>Clidemia</i>	20
2.5.5.1 Morfología general del género <i>Clidemia</i>	20
2.5.5.2 Descripción de la especie <i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.....	20
2.5.5.3 Morfología general de la especie <i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.....	21
2.5.5.4 Fitoquímica y farmacognosia de la especie <i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.....	
2.6 Descripción de la familia Rubiaceae.....	22
2.6.1 Morfología general de la familia Rubiaceae.....	23
2.6.2 Clasificación taxonómica de la familia Rubiaceae.....	23
2.6.3 Farmacognosia y fitoquímica de la familia Rubiaceae.....	23
2.6.4 Usos de la familia Rubiaceae.....	24
2.6.5 Descripción del género <i>Palycourea</i>	24
2.6.5.1 Descripción de la especie <i>Polycurea lirystipula</i>	25

GRUPO POLIFENOLES UTP



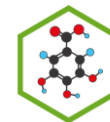
2.7 Metabolitos secundarios de interés en plantas Melastomatácea.....	26
2.7.1 Descripción de taninos.....	26
2.7.2 Clasificación.....	27
2.7.2.1 Taninos Condensados o Proantocianidinas.....	27
2.7.2.2 Taninos hidrolizables.....	28
2.7.2.2.1 Galotaninos.....	29
2.7.2.2.2 Elagitaninos.....	30
2.7.3 Aplicaciones de los Polifenoles vegetales.....	31
2.8 Metodología fluorométrica para el estudio de actividad de Sap.....	32
3. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	34
3.1 Condiciones instrumentales generales.....	34
3.2 Material vegetal.....	34
3.3 Levadura de prueba.....	34
3.4 Controles.....	35
3.5 Estandarización.....	35
3.6 Crecimiento de <i>Cándida albicans</i> y producción de Sap.....	36
3.7 Inhibición de producción de Sap.....	37
3.8 Hidrólisis de Sap en medio de hemoglobina (Hb).....	37
3.9 Evaluación de extractos.....	37
3.9.1 Preparación de extractos.....	37
3.9.2 Ensayo de inhibición.....	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Estandarización.....	39
4.2 Crecimiento de <i>Cándida albicans</i> y producción de Sap.....	42
4.3 Inhibición de producción de Sap.....	49
4.4 Hidrólisis de Sap en medio de hemoglobina (Hb).....	53
4.5 Evaluación de extractos.....	54
5. CONCLUSIONES.....	63
6. RECOMENDACIONES.....	64
ANEXOS.....	65

GRUPO POLIFENOLES UTP



Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Cándida albicans</i>	10
Tabla 2. Extractos de plantas evaluados contra Sap de <i>Cándida albicans</i>	34
Tabla 3. Concentraciones de fluorexón y cobre ensayadas.....	36
Tabla 4. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD.....	36
Tabla 5. Parámetros hallados para la programación del equipo.....	39
Tabla 6. Valores de pH durante el periodo de incubación.....	43
Tabla 7. Degradación de BSA durante el tiempo de incubación, en medición por HPLC.....	46
Tabla 8. Cálculo de pendientes para las curvas obtenidas entre 16 y 26 horas en la evaluación por fluorometría.....	49
Tabla 9. Pendientes obtenidas para las curvas de medición de Sap a 22 horas de incubación con y sin inhibidor de pepstatin A, por fluorometría.....	52
Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los extractos evaluados por HPLC.....	59
Tabla 11. Porcentajes de inhibición de los extractos evaluados por fluorometría.....	62



Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Compuestos extraídos de <i>Miconia myriantha</i> (Melastomataceae).....	4
Figura 2. Morfología típica de las <i>Melastomataceae</i>	15
Figura 3. Compuestos aislados de algunas especies del género <i>Miconia</i>	18
Figura 4. Morfología típica de <i>Miconia coronata</i>	19
Figura 5. Especie <i>Clidemia hirta</i> (L.) D.Don.....	22
Figura 6. Especie <i>Polycourea guianensis</i>	25
Figura 7. Especie <i>Polycourea lyrastipula</i>	26
Figura 8. Estructura de Flavan-3,4-dioles.....	27
Figura 9. Reacción coloreada para taninos condensados.....	28
Figura 10. Componentes de un tanino hidrolizable.....	29
Figura 11. Reacción de los taninos hidrolizables.....	29
Figura 12. Estructuras de galotaninos.....	30
Figura 13. Estructura de elagitaninos.....	31
Figura 14. Interacción Cobre-fluorexón-aminoácido.....	33
Figura 15. Efecto de la variación en la concentración de cobre.....	40
Figura 16. Efecto de la variación en la concentración de fluorexón.....	40
Figura 17. Medicion por fluorometria de acoplamiento de fluorexon 5,5 μ M y cobre 5,0 μ M.....	41
Figura 18. Medicion por fluorometria del efecto de la pancreatina.....	42
Figura 19. Gel de electroforesis obtenido en monitoreo de producción de Sap durante las primeras 14 horas de crecimiento.....	43
Figura 20. Gel de electroforesis obtenido en monitoreo de producción de Sap para un periodo comprendido entre 16 y 26 horas de crecimiento.....	44
Figura 21. Determinación de tiempos de retención para el DMSO, BSA y Sap e inhibición de Sap, medido por HPLC.....	45
Figura 22. Curva de calibración obtenida para el BSA, medido por HPLC.....	47
Figura 23. Expresión de Sap a diferentes tiempos de incubación, evaluado por HPLC..	48

GRUPO POLIFENOLES UTP

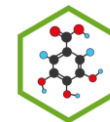
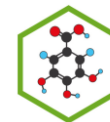
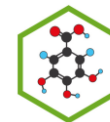


Figura 24. Medición de la actividad de Sap por fluorimetría a diferentes tiempos de incubación.....	49
Figura 25. Gel de electroforesis para la evaluación del inhibidor pepstatin A.....	50
Figura 26. Gel de electroforesis para la evaluación del inhibidor pepstatin A.....	51
Figura 27. Efecto de pepstatin A evaluado por fluorometria.....	52
Figura 28. Hidrólisis producida por la Sap de <i>Cándida albicans</i> e inhibición por parte de la pepstatin A.....	53
Figura 29. Cromatograma de Sap de <i>Cándida albicans</i>	54
Figura 30. Cromatograma de Sap de <i>Cándida albicans</i> + DMSO.....	55
Figura 31. Gel de electroforesis para la evaluación de extractos.....	56
Figura 32. Gel de electroforesis para la evaluación de extractos.....	56
Figura 33. Evaluación por HPLC del extracto de <i>Polycurea lirystipula</i> acuoso contra Sap de <i>Cándida albicans</i>	57
Figura 34. Evaluación por HPLC del extracto de <i>Polycurea lirystipula</i> butanólico contra Sap de <i>Cándida albicans</i>	57
Figura 35. Evaluación por HPLC del extracto de <i>Clidemia hirta</i> butanólico contra Sap de <i>Cándida albicans</i>	58
Figura 36. Evaluación por HPLC del extracto de <i>Miconia coronata</i> acuoso contra Sap de <i>Cándida albicans</i>	58
Figura 37. Cromatograma de Sap 22 horas + ChAF en max Plot.....	59
Figura 38. Medición por fluorimetría de Sap.....	60
Figura 39. Medición por fluorimetría de Sap con pepstatin A.....	61
Figura 40. Medición por fluorimetría de Sap con <i>extracto Clidemia hirta</i> ButOH.....	61



Índice de Anexos

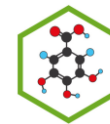
	Pág.
Anexo 1. Protocolo SDS-PAGE	65
Anexo 2. Longitudes de onda máximas de excitación y emisión halladas mediante un barrido espectral para el fluorexón.....	67
Anexo 3. Cromatograma de Sap 0 horas en max Plot.....	67
Anexo 4. Cromatograma de Sap 2 horas en max Plot.....	68
Anexo 5. Cromatograma de Sap 4 horas en max Plot.....	68
Anexo 6. Cromatograma de Sap 6 horas en max Plot.....	68
Anexo 7. Cromatograma de Sap 8 horas en max Plot.....	69
Anexo 8. Cromatograma de Sap 10 horas en max Plot.....	69
Anexo 9. Cromatograma de Sap 14 horas en max Plot.....	69
Anexo 10. Cromatograma de Sap 16 horas en max Plot.....	70
Anexo 11. Cromatograma de Sap 18 horas en max Plot.....	70
Anexo 12. Cromatograma de Sap 20 horas en max Plot.....	70
Anexo 13. Cromatograma de Sap 22 horas en max Plot.....	71
Anexo 14. Cromatograma de Sap 24 horas en max Plot.....	71
Anexo 15. Cromatograma de Sap 26 horas en max Plot.....	71
Anexo 16. Medición por fluorometría de Sap con extracto de <i>M. coronata</i> acuoso.....	72
Anexo 17. Medición por fluorometría de Sap con extracto de <i>P. lirstipula</i> Acuoso.....	72
Anexo 18. Medición por fluorometría de Sap con extracto de <i>P. lirstipula</i> ButOH.....	73
Anexo 19. Cromatograma de Sap 22 horas + Ch-EtoAc en max Plot.....	73
Anexo 20. Cromatograma de Sap 22 horas + Mc-EtoAc en max Plot.....	74
Anexo 21. Cromatograma de Sap 22 horas + McBF en max Plot.....	74
Anexo 22. Cromatograma de Sap 22 horas + pepstatin A r1 en max Plot.....	75
Anexo 23. Cromatograma de Sap 22 horas + pepstatin A en max Plot.....	75
Anexo 24. Cromatograma de Sap 22 horas + PIAF en max Plot.....	76
Anexo 25. Cromatograma de Sap 22 horas + PIAF en max Plot.....	76
Anexo 26. Cromatograma de Sap 22 horas + PIBF r3 en max Plot.....	77
Anexo 27. Cromatograma de Sap 22 horas + PIBF en max Plot.....	77



RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la estandarización de un método espectrofluorométrico para la medición de Sap de *C. albicans*, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia. Se determinaron las condiciones óptimas de funcionamiento del equipo y se hallaron las concentraciones ideales para los reactivos utilizados, también se estableció las condiciones del cultivo para la obtención de Sap. Con el fin de encontrar inhibidores de esta proteasa, se evaluaron extractos acuosos, butanólicos y en acetato de etilo de las plantas *Polycurea lirstipula* (Rubiácea), *Miconia coronata* y *Clidemia hirta* (Melastomatácea). Además de esta técnica, se utilizaron otras metodologías para corroborar la actividad de Sap y su inhibición, como fue la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), electroforesis SDS-PAGE e hidrólisis en medio de hemoglobina, mediante las cuales se monitoreó la producción de Sap durante un periodo de incubación de 26 horas, donde se observó el tiempo en que se inicia la secreción de Sap y se identificó el periodo de mayor producción.

Se realizaron ensayos para verificar la acción inhibitoria de pepstatin A y se evaluaron los extractos aplicando las metodologías antes mencionadas, obteniendo como resultado inhibición de Sap por parte de los extractos acuosos de *Polycurea lirstipula* y *Miconia coronata*, y butanólicos de *Polycurea lirstipula* y *Clidemia hirta*, donde *Polycurea lirstipula* presentó los porcentajes más altos de inhibición.



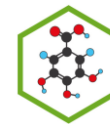
1. ANTECEDENTES

1.1. Surgimiento del problema

Un aumento en las infecciones por *Cándida albicans* en las últimas dos ó tres décadas, y una tendencia inevitable que continúa en el siglo XXI; lo ha convertido en el patógeno fúngico más prevalente en humanos, siendo la cuarta causa de infecciones nosocomiales¹. Alrededor del 20-25% de las mujeres saludables y completamente asintomáticas presentan cultivos de secreción vaginal positivos para este patógeno. Cerca del 75% de las mujeres adultas tiene al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal (CVV) durante su vida, con una prevalencia de *C. albicans* de 70-90%². Algunos de estos pacientes experimentaran episodios nuevamente y un 5% sufrirán VVC recurrente (CVVR). Sin embargo, los factores responsables de esta transformación y los mecanismos que dan lugar a los efectos patológicos de *C. albicans* son poco comprendidos³.

La candidiasis oral es una de las infecciones oportunistas más comunes relacionadas con el VIH/SIDA, hasta un 90 % de las personas infectadas con el VIH experimentan al menos un episodio de Candidiasis durante el curso de su enfermedad. *C. albicans* es el agente etiológico más frecuentemente asociado con esta infección⁴. En las personas sin infección por VIH, puede aparecer la candidiasis cuando el sistema inmune está temporalmente deprimido a causa de factores tales como el estrés, consumo de alcohol, o enfermedades tales como la diabetes. La candidiasis puede también afectar a las personas que están tomando antibióticos, puesto que éstos pueden destruir de manera temporal algunas de las bacterias inofensivas que el cuerpo alberga, ofreciendo así una oportunidad a la *Cándida* para ocupar su lugar⁵. Debido a la resistencia que ha desarrollado *Cándida albicans* frente a algunos fármacos, y la toxicidad y riesgos para la salud que presentan algunos otros, surge la necesidad de buscar nuevas fuentes de agentes antimicóticos para el tratamiento de infecciones por *Cándida albicans*, que inhiban la producción de Sap.

GRUPO POLIFENOLES UTP



1.2. Formulación del problema

¿Presentan los extractos butanólico, acuosos y en acetato de etilo de *Miconia coronata*, *Clidemia hirta* y *Polycurea lirystipula*, actividad inhibitoria frente a Sap de *C. albicans*?

Para dar respuesta parcial a este problema, la investigación está guiada por los siguientes objetivos:

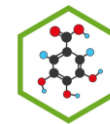
1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar extractos de plantas Melastomataceae y Rubiaceae contra la proteasa aspártica secretada (Sap) de *Cándida albicans* mediante la aplicación de un método espectrofluorométrico.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las condiciones de crecimiento de *Cándida albicans* para la producción de Sap.
- Estandarizar un método espectrofluorométrico para la medición de Sap de *C. albicans*.
- Evaluar la actividad inhibitoria de Sap en los extractos acuosos, butanólicos y en acetato de etilo de plantas Melastomataceae y Rubiaceae.



1.4 Justificación

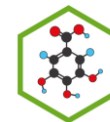
La incidencia de infecciones fúngicas que amenazan la vida se ha incrementado dramáticamente en los últimos años; sin embargo, el arsenal de drogas antimicóticas se ha limitado a flucitocina, unos pocos azoles aprobados y polienos, principalmente anfotericina B; casi todos tienen una o más limitaciones, como sus efectos adversos intensos, el espectro antimicótico reducido, la escasa penetración a ciertos tejidos. La situación se agrava con el desarrollo de resistencia a algunos de los agentes corrientemente usados y con la mínima actividad fungicida de los azoles^{6,7}.

Desde que la actividad proteolítica fue descubierta en *Cándida albicans*, la proteasa aspártica secretada Sap, ha sido intensivamente estudiada; puesto que se le atribuye la virulencia de esta levadura, patógeno para humanos⁸. La inhibición de la secreción de Sap, ofrece un camino para combatir la patogenicidad de *Cándida albicans*. Se ha observado que la terapia antirretroviral altamente efectiva en pacientes VIH, reduce la frecuencia de infecciones por *Cándida albicans* y su adhesión a los tejidos. La mayoría de los estudios de inhibición de Sap de *Cándida albicans*, se han llevado a cabo con el inhibidor de la proteasa aspártica Pepstatin, el cual bloquea el crecimiento al ser adicionado junto con el medio de cultivo⁸. Sin embargo, este medicamento no es un agente ideal debido a su falta de seguridad y puede ocasionar efectos adversos en la salud del paciente.

En nuestro país existe un gran recurso natural en la familia Melastomataceae, la cual ha sido en varias ocasiones objeto de estudio en investigaciones microbiológicas; algunas especies de la familia han sido usadas en Colombia como medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, heridas de piel, enfermedades respiratorias, cálculos en la vejiga y otras dolencias genitourinarias, como diuréticos y remedios tópicos para irritaciones en las encías⁹.

Especies pertenecientes a la familia de plantas Melastomataceae, tienen compuestos de tipo fenólico y polifenólico en extractos polares como son fenoles, taninos hidrolizables, taninos

GRUPO POLIFENOLES UTP



condensados y flavonoides entre otros, para los cuales se ha sugerido una importante actividad biológica antioxidante, antibacteriana, antimicótica e ictiotóxica¹⁰⁻¹³.

Algunos productos naturales del tipo xantona aislados de *Tovomita krukovii* han mostrado actividad inhibitoria de Sap de *C. albicans*¹⁴.

El fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto etanólico de las hojas y ramas de *Miconia myriantha* (Melastomataceae) condujo al aislamiento de dos compuestos inhibidores de proteasa aspártica secretada por *Candida albicans*, matucinol-7-O-[4'',6''-di-O-(S)-hexahidroxidifenoil]-β-D-glucopiranosido (a) y ácido elágico (b)

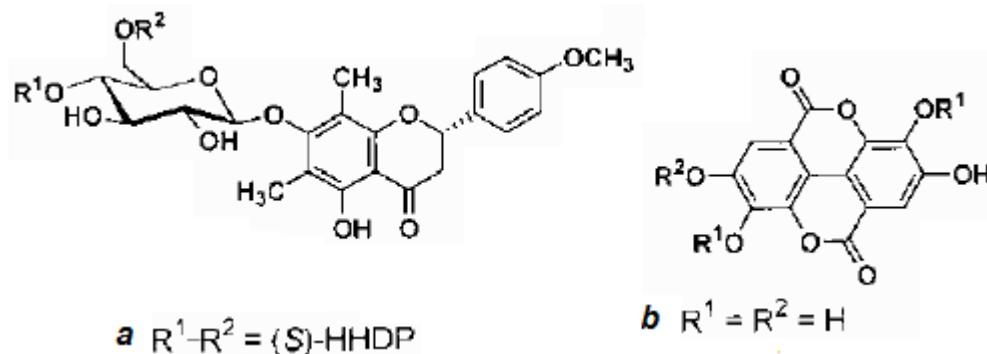
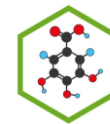


Figura 1. Compuestos extraídos de *Miconia myriantha* (Melastomataceae)

Al observar las estructuras de estos compuestos, se deduce que la actividad inhibitoria de las Sap de *C. albicans* está relacionada con la presencia de unidades hexahidroxidifenoilo (HHDP) o ácido elágico.

Con base en los antecedentes encontrados en plantas Melastomatácea, se decidió estudiar extractos pertenecientes a esta familia para ver si presentan inhibición de Sap de *C. albicans*. Además se evaluaron extractos de plantas Rubiaceae, para los cuales no hay reportes de actividad anti Sap.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS

2.1.1. Estructura

La composición de la pared distingue a los hongos de las bacterias y las plantas. Otra diferencia importante respecto de las células de mamíferos es la cobertura de esterol de la membrana citoplásmica. En los hongos, el esterol dominante es el ergosterol; en los mamíferos es el colesterol.¹⁵

La estructura química de la pared celular de los hongos es muy diferente en comparación con la de las células bacterianas, ya que no contiene peptidoglicano, glicerol o ribitol, ácidos teicoicos ni lipopolisacáridos. En su lugar se encuentran los polisacáridos *manano*, *glicano* y *quitina*, que guardan una estrecha relación entre ellos y con las proteínas estructurales.¹⁵

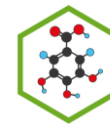
2.1.2. Morfología y crecimiento micóticos

El tamaño de los hongos varía en gran proporción. El tamaño de una sola célula sin tabiques transversales puede variar desde la dimensión de una bacteria (2 a 4 μm) hasta una estructura visible a simple vista. Los aspectos morfológicos de crecimiento varían desde colonias con ligera similitud a la de las bacterias hasta algunas de las estructuras multicelulares más complejas, coloridas y fascinantes de la naturaleza.¹⁵

2.1.3. Levaduras y mohos

El crecimiento inicial de una sola célula puede seguir uno de dos caminos, levaduras o mohos. El primero y más simple es la formación de una yema que sobresale de una célula progenitora redonda u oblicua, se constriñe y forma una nueva célula. Estas yemas se conocen como *blastoconidios* y los hongos que se reproducen de esta forma se denominan *levaduras*. En las placas, las levaduras forman colonias parecidas a las bacterianas.¹⁵

GRUPO POLIFENOLES UTP



Los hongos también pueden crecer mediante desarrollo de hifas, extensiones tubulares de la célula que tienen paredes gruesas y paralelas. A medida que las hifas se extienden, forman una masa entrelazada llamada *micelio*. La mayoría de los hongos crea tabiques de hifas, que son paredes cruzadas perpendiculares a las paredes celulares que dividen a las hifas en subunidades. El crecimiento superficial más visible puede asumir un carácter esponjado conforme el micelio se vuelve aéreo. Las paredes de las hifas son lo bastante rígidas para soportar esta red entrelazada y extensa, a menudo llamada *moho*.

Los hongos oportunistas son los que se encuentran en el ambiente o la flora normal y en ocasiones causan una enfermedad, casi siempre en un huésped comprometido.¹⁵

2.1.4. Dimorfismo

En general, los hongos crecen como levaduras o mohos; la forma de moho muestra la mayor diversidad. Algunas especies pueden crecer en una fase de levadura o moho, según sean las condiciones ambientales. Estas especies se conocen como *hongos dimórficos*. Varios patógenos humanos presentan dimorfismo; crecen en forma de moho en su reservorio ambiental y en cultivo a temperatura ambiente, pero se convierten en levaduras o alguna otra forma en el tejido infectado.

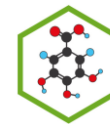
Gracias a esta admirable capacidad dimórfica, el hongo puede desarrollarse en el organismo, extenderse gradualmente y vencer las defensas que el huésped le ofrece, aunque a veces el organismo parasitado es capaz de eliminar al agente de una micosis profunda.¹⁵

2.2 PATOGENIA, INMUNIDAD Y QUIMIOTERAPIA DE LAS INFECCIONES MICÓTICAS

2.2.1. Aspectos generales de las micosis

Los hongos que son patógenos para los animales superiores son igualmente patógenos para el hombre, salvo contadas excepciones. Según su localización en el hombre las micosis se dividen en: superficiales (cutáneas) y profundas (dérmicas o viscerales). Los mecanismos de contagio de estas dos formas son totalmente opuestos. Las micosis superficiales se

GRUPO POLIFENOLES UTP



contraen por simple contacto con personas o animales parasitados. Por el contrario, las micosis profundas se adquieren únicamente en lugares o terrenos contaminados, ya sea de una manera endémica o no, en la que las esporas culpables son inhaladas por hombres o animales. Otras veces la infección se produce a causa de las heridas ocasionadas por fragmentos de vegetales que transportan al hongo agresor.

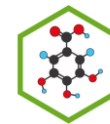
Los hongos dermatófitos son los principales agentes productores de micosis superficiales. De las diversas infecciones por hongos los dermatófitos son los que ocupan el primer lugar por su frecuencia, tanto en el hombre como en los animales.¹⁵

2.2.2. Adherencia

Varias especies de hongos, sobre todo las levaduras, pueden colonizar las superficies mucosas de los sistemas digestivo y genital femenino. Ya se ha demostrado en estudios experimentales que la capacidad para adherirse a las células epiteliales bucales o vaginales se vincula con la colonización y la virulencia. En el caso de *C. albicans*, se cree que los componentes manoproteicos que se extienden desde la pared celular actúan como moléculas de adhesión, mientras que la fibronectina y otros elementos de la matriz extracelular funcionan como receptores. Ya se han identificado unos cuantos mediadores de unión para otros hongos, casi siempre una manoproteína superficial.¹⁵

2.2.3. Invasión

Desencadenados por la temperatura y tal vez otros indicios, los hongos dimórficos del ambiente sufren un cambio metabólico similar a la respuesta de golpe de calor y cambian por completo su morfología y crecimiento a una forma más invasiva. La invasión directa a través de las barreras mucosas por la levadura endógena *C. albicans* también se acompaña de un cambio morfológico, la formación de hifas. Se desconocen los mecanismos desencadenantes de este cambio, pero la nueva forma es capaz de penetrar y diseminarse. Las enzimas extracelulares (ej. Proteasa y elastasas) se encuentran en la forma de hifas de *Cándida* y en las formas invasivas de muchos de los hongos dimórficos y otros hongos patógenos. Aunque estas enzimas deben contribuir en algún aspecto de la invasión o diseminación, se desconoce su papel preciso en cualquier hongo.¹⁵



2.2.4. Quimioterapia antimicótica

2.2.4.1. Antimicrobianos antimicóticos que afectan los esteroides de membrana

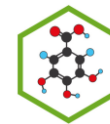
2.2.4.1.1. Polienos

Los polienos nistatina y anfotericina B son lipofílicos y se unen con los esteroides de la membrana citoplasmática de las células eucariotas. Después de la unión, forman canales anulares que penetran la membrana y permite la fuga de pequeñas moléculas esenciales del citoplasma, lo que conduce a la muerte celular. La base de su toxicidad selectiva es su mayor afinidad por los esteroides de las membranas micóticas, como el ergosterol, en comparación con los esteroides de las células humanas. Esta diferencia es relativa porque también se unen con el colesterol de las membranas de los mamíferos, lo que causa efectos tóxicos considerables que limitan su aplicación. Después de la infusión suelen observarse escalofríos, fiebre, cefalea y disnea.¹⁵

2.2.4.1.2. Azoles

Los azoles son una gran familia de compuestos orgánicos sintéticos que incluye agentes con propiedades antibacterianas, antimicóticas y antiparásitas. Los azoles antimicóticos importantes son el imidazol, ketoconazol y los triazoles, fluconazol e itraconazol. Otros más están en desarrollo o evaluación. Su actividad se basa en la inhibición de una enzima del citocromo que cataliza la conversión de lanosterol en ergosterol, principal componente de la membrana citoplásmica micótica. Esto ocasiona acumulación de lanosterol y formación de una membrana celular defectuosa con características anormales de permeabilidad.

El ketoconazol fue el primer azol con utilidad para infecciones sistémicas, pero ahora casi siempre se sustituye por fluconazol o itraconazol para la mayoría de las micosis sistémicas, incluida la aspergilosis y la candidosis, para las cuales el ketoconazol no es efectivo. Aunque la náusea, vómito y elevación de las enzimas hepáticas complican el tratamiento de algunos pacientes, los azoles son mucho menos tóxicos que la anfotericina B.¹⁵



2.2.5. Mecanismos de resistencia

La pared celular y la membrana citoplásmica representan una barrera para que los antimicóticos lleguen al interior del hongo. Aunque casi siempre se considera un mecanismo de resistencia innata, hay ejemplos en los que los cambios de los esteroides de la membrana parecen limitar la permeabilidad a los azoles ¹⁵.

2.3. CÁNDIDA

2.3.1. Características generales

El género *Cándida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominante unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37 °C y ocasionalmente pueden ser patógenas para el hombre, estas especies son entre otras: *C. albicans*, *C. parakrusei*, *C. reylanvides*, *C. stelladiodea* y *C. bremptii* ¹⁶.

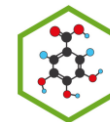
La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar, todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a alargada o esférica ¹⁶.

2.3.2. Cultivo

Las especies de *Cándida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas y miden de 1.5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días ¹⁶.

Candida albicans da colonias blancas o blanco-amarillentas, de superficie lisa y brillante, borde entero y consistencia cremosa. Luego de un cierto tiempo, la colonia emite filamentos hacia la profundidad y se convierte en la forma R o membranosa. Las colonias de *Cándida* crecen in vitro en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2.5 y 7.5 y temperatura que oscila entre 20 °C y 38 °C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra ¹⁶.

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.3.3. *Cándida albicans*

2.3.3.1. Taxonomía

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente como se muestra en la Tabla 1.

Reino	Hongo
División	<i>Deuteromycota</i>
Clase	<i>Blastomycetes</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>
Genero	<i>Cándida</i>
Especie	<i>Albicans</i>

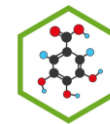
Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Cándida albicans*¹⁶

2.3.3.2. Micología

Cándida albicans crece en múltiples formas, más a menudo como levadura con gemación mediante la formación de blastoconidios. También es capaz de formar hifas por los cambios de las condiciones, como temperatura, pH y nutrientes disponibles. Cuando se observan en sus etapas iniciales, cuando aún están unidas a la célula, estas hifas parecen brotes y se denominan tubos germinales. Otras formas alargadas con restricciones a intervalos se llaman *seudohifas* porque carecen de las paredes paralelas y tabiques de las hifas verdaderas. Hay evidencia de que estas tres formas tienen estímulos y regulación genética distintos, lo que hace de *C. albicans* un hongo polimórfico.¹⁵

2.3.3.3. Epidemiología

C. albicans es un integrante frecuente de la flora bucofaríngea, gastrointestinal y genital femenino. Las infecciones son endógenas, excepto en los casos de contacto mucoso directo con lesiones de otras personas (ej. Mediante contacto sexual). Aunque *C. albicans* es una causa frecuente de infecciones intrahospitalarias, los hongos también provienen más a menudo de la propia flora del paciente que de una infección cruzada.¹⁵



2.3.3.4. Patogenia

Como *Cándida albicans* es un habitante regular de las superficies mucosas, la enfermedad implica un cambio en el microorganismo, el huésped o ambos. El cambio de la forma de levadura a la de hifa tiene una relación importante con el aumento del potencial patógeno de *C. albicans*. Lo que se sabe es que el cambio morfológico también se relaciona con la aparición de varios factores vinculados con la adherencia y digestión tisulares.

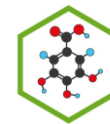
Las hifas también secretan proteinasas y fosfolipasas que pueden digerir las células epiteliales y tal vez facilitar la invasión. También hay evidencia de que *C. albicans* es capaz de inducir su propia fagocitosis por las células endoteliales. En conjunto, estos factores representan un fuerte armamento de factores de virulencia, todos al parecer vinculados con el cambio de levadura al crecimiento de hifas.¹⁵

2.3.4. Candidiasis (aspectos clínicos)

2.3.4.1. Manifestaciones

La invasión superficial de las membranas mucosas por *C. albicans* produce una placa blanca adherida con suavidad a la superficie mucosa. Por lo general, la lesión es indolora, a menos que la placa se desprenda o se exponga la superficie invadida. Las lesiones bucales llamadas *algodoncillo*, se forman en la lengua, paladar y otras superficies mucosas como parches blancos deshilachados, únicos o múltiples. Una infección similar en la vagina, la Candidiasis vaginal, da lugar a una secreción espesa, pruriginosa, parecida a cuajo en la vulva. Aunque la mayoría de las mujeres tiene por lo menos un episodio de *Candidiasis vaginal* en su vida, un pequeño porcentaje sufre infecciones crónicas recurrentes. No se ha vinculado ningún defecto inmunitario general o específico con este síndrome.

La boca del recién nacido y la vagina de las mujeres embarazadas tienen un bajo pH, favoreciendo la colonización por *Cándida*.¹⁵



2.3.4.2. Tratamiento

Por lo regular, *C. albicans* es susceptible a la anfotericina B, nistatina, flucitosina y los azoles. Las infecciones superficiales casi siempre se tratan con preparaciones tópicas de nistatina o algún azol. Las medidas para disminuir la humedad y el traumatismo crónico son elementos adjuntos importantes en el tratamiento de las infecciones cutáneas por *Cándida*. Las infecciones más profundas por *C. albicans* pueden resolverse en forma espontánea si se eliminan o controlan los trastornos predisponentes¹⁵.

2.4. PROTEASA ASPÁRTICA SECRETADA (Sap)

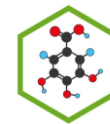
2.4.1. Patogenia

La habilidad de causar enfermedad es probablemente un proceso complejo que involucra múltiples interacciones entre *Cándida* y el huésped, la mayoría de los estudios se enfocan en el papel de la aspartil proteasa (Sap), como factor de virulencia. Las evidencias que soportan el papel de Sap en virulencia son las siguientes: 1) correlación existente entre virulencia y niveles de expresión de la proteasa; 2) mutantes con deficiencia de proteasa son menos virulentos o avirulentos; 3) Sap y anticuerpos de Sap han sido detectados en huéspedes infectados; y 4) Sap puede degradar un amplio rango de sustratos, incluyendo proteínas relacionadas con defensas inmunológicas y estructurales, tales como cadenas pesadas de IgG (Inmunoglobulina), queratina, colágeno acidificado y proteínas de matriz extracelular¹⁷⁻²¹.

2.4.2. Isoenzimas

La Sap de *C. albicans* comprende una familia de 10 isoenzimas, codificadas por los genes sap1-10^{22,23}. Análisis filogenético de esta familia multigénica han demostrado que los genes *Sap1*, *Sap2*, *Sap3* y genes *Sap4*, *Sap5*, *Sap6*, se dividen en dos subgrupos²³, cada producto de genes puede tener una función específica durante la colonización y la infección del huésped^{24,25}.

GRUPO POLIFENOLES UTP



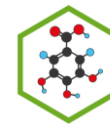
Sap2 es la enzima que más se produce cuando *C. albicans* se cultiva en medios que contiene proteína como única fuente de nitrógeno^{24,25}. Sap1 y Sap3 son regulados durante cambios fenotípicos^{24,25}. Sap4 a Sap6, se expresan durante la transición de levadura a hifa a pH neutro^{24,25}.

Las enzimas de la familia Sap (en particular, Sap2) son bien conocidos por su capacidad para degradar una serie de proteínas importantes para la defensa del paciente, como el Igs (Inmunoglobulinas) y citoquinas^{19,26,27}. En particular, los experimentos con genes individuales de Sap han demostrado que el gen *Sap2*, el cual codifica la proteína Sap2, producido abundantemente en la cavidad vaginal, es esencial para la expresión del potencial vaginopático de *C. albicans*²⁸.

2.4.3. Inhibición

Recientes estudios usando inhibidores de proteasa han demostrado que la inhibición de Sap con pepstatin A previene la penetración inicial de *C. albicans* a través de superficies mucosas, pero no la difusión una vez las células del hongo hayan alcanzado los vasos sanguíneos²². Además, pepstatin A previene la invasión de *C. albicans* y daños en el tejido oral y vaginal²⁹. Aunque Sap2 es inhibido por pepstatin A, y no por inhibidores de otras proteasas no-aspártica^{30,31}; este, sin embargo, no es un agente ideal para terapia en vista de su falta de selectividad, potencia y seguridad³².

La búsqueda de potentes inhibidores de proteasa requiere de nuevos métodos para la rápida evaluación de compuestos. La necesidad de desarrollar un método rápido y sensible para la evaluación de posibles inhibidores de Sap de *C. albicans* ha permitido investigar compuestos péptido fluorogénico como posibles sustratos³³.



2.5. Descripción de la familia Melastomatócea

La familia Melastomataceae, según el sistema de clasificación de Takhtajan (1997), se encuentra incluida dentro de la división *Magnoliopsida*, clase *Rosidae*, orden *Myrtales*. Comprende 180 géneros y 4400 especies, particularmente de las regiones tropicales del Nuevo Mundo. En Suramérica se encuentran 166 géneros, ninguno de los cuales existe naturalmente en el Viejo Mundo. Para Colombia se registran aproximadamente 61 géneros, con mayor área de distribución en los Andes, Choco biogeográfico y Amazonía. En la Orinoquía se encuentran 38 géneros y alrededor de 180 especies, distribuidas en el piedemonte, morichales, bosques de galena y sabanas, siendo estas últimas las más pobres en especies y las de la Serranía de la Macarena las de mayor diversidad. Muchas especies son de importancia hortícola como ornamentales, por su follaje y flores⁹.

2.5.1. Morfología general de la familia de la Melastomatócea

Las *Melastomatócea* pueden ser árboles, arbustos, hierbas o trepadoras, también algunas veces son hemiepifitas. Se caracterizan por presentar hojas simples, opuestas, raramente verticiladas, algunas veces desiguales, puntiagudas, prolongadas u ovadas, margen entero, sin estipulas, con 3 a varios nervios palmados o plinervadas. Inflorescencias axilares o terminales por lo general cimosas y ocasionalmente solitarias. Flores actinomorfas a ligeramente zigomorfas, tetrámeras, pentámeras y ocasionalmente 60 a 7-meras. Androceo con el doble número de estambres que los pétalos. Estambres libres, inflexos en el botón floral, anteras basifijas, usualmente con deshiscencia poricida o longitudinal. Gineceo sincárpico, ínfero o medio. Ovario más o menos concretescente con el hipanto, 3-4-5 locular, estilo y estigma uno. Óvulos numerosos en cada lóculo del ovario, generalmente anatropos. Frutos deshiscentes o indehiscentes, en capsula o baya³⁴.

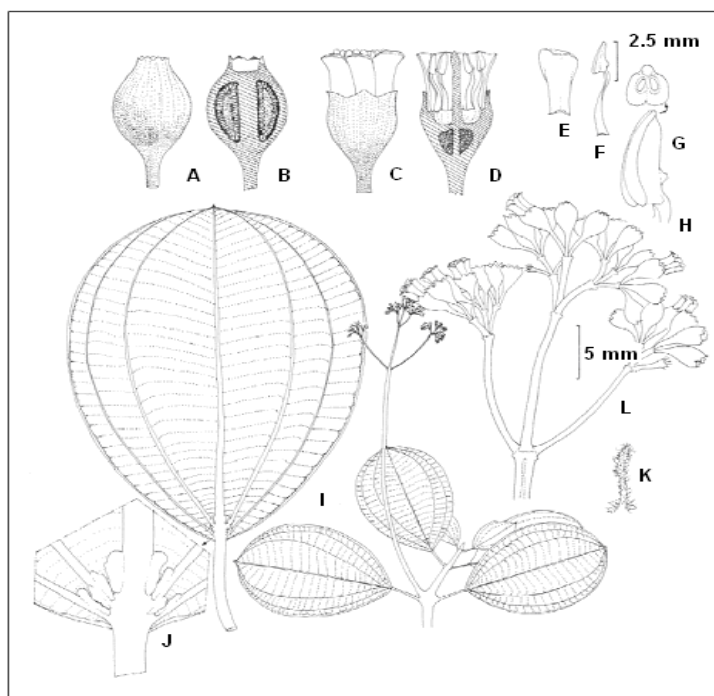
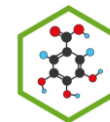


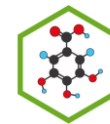
Figura 2. Morfología típica de las *Melastomataceae*

A-B. Fruto de *Sandemanianthus hoehnei*. **C-D.** Flor tetrámera de *S. hoehnei* (Cogn) Wurd.
E. Pétalo. **F.** Estambres geniculados antesépalos y antepétalos de *S. hoehnei*. **G-H.** Antera.
I. Hoja con venación acrodroma de *Miconia multiflora*. **J.** Domacios. **K.** Hábito. **L.** Tricoma

2.5.2. Taxonomía previa de la familia Melastomataceae

La familia Melastomataceae, es la séptima familia más grande de plantas con flores, sin embargo ha sido escasamente estudiada desde el punto de vista fitoquímico. Aunque un gran número de compuestos han sido aislados, sólo unas pocas especies han sido estudiadas ampliamente. Los mayores constituyentes de ésta familia son los compuestos polifenólicos, principalmente taninos hidrolizables oligoméricos de pesos moleculares superiores o iguales a 3800, algunos flavonoides y antocianinas aciladas³⁵.

GRUPO POLIFENOLES UTP



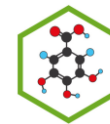
2.5.3. Farmacognosia y Fitoquímica de la Melastomatácea

Las Plantas Melastomataceae están ampliamente distribuidas en áreas tropicales y subtropicales en Sur América, Sudeste de Asia y en la parte sur de China. Algunas de estas han sido usadas como remedios para diarrea, disentería, leucorrea, y varias enfermedades de la piel, y también como astringentes y homeostáticos, en Indonesia, Malasia y China⁹. Estas actividades se atribuyen a los taninos, y la existencia de ácido elágico y sus derivados alquilados en una variedad de plantas de esta familia que han sido reportados³⁶. La presencia de taninos y de derivados alquilados del ácido elágico, en varios grupos de estas plantas pueden ser responsables de estas aplicaciones medicinales³⁶.

Muchos de los constituyentes químicos de las plantas Melastomataceae son de tipo polifenolico; sin embargo, también han sido reportado algunos triterpenoides y alquilbencenos, Se han detectado alcaloides en *Clidemia hirta* D. Don. Y *Sonerila heterostemon* Naudin, pero aun no se han aislado³⁷.

Las plantas Melastomataceae han demostrado ser ricas fuentes de taninos oligoméricos hidrolizables en diversos estudios realizados³⁸. Hasta ahora los taninos hidrolizables monoméricos aislados de las especies de Melastomatácea son representativos de grupos galotaninos y elagitaninos.

Las hojas de tres especies estrechamente relacionadas de los géneros *Lavoisiera*, *Microlicia* y *Trembleya* fueron analizadas para determinar su composición en flavonoides, obteniendo un total de 116 compuestos, que comprenden 69 flavonolas y 47 flavonas glicosiladas. Se identifico en el género *Lavoisiera* la presencia de flavonas, incluyendo derivados 6-oxigenados (que frecuentemente producen flavonoles metoxilados y flavonas). Los flavonoles son predominantes en especies del genero *microlicia*³⁹.



2.5.4. Descripción del genero *Miconia*

Es el género más grande de la familia Melastomataceae, se encuentra distribuido en la región neotropical con aproximadamente 1000 especies. Estas han sido agrupadas en 11 diferentes secciones con base en la gran variedad morfológica de androceo⁴⁰.

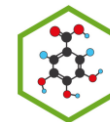
2.5.4.1. Morfología general del genero *Miconia*

Árboles, arbustos, rara vez trepadoras leñosas, las ramillas glabras o con diferentes tipos de pubescencia, rollizas, cuadrangulares o aplanadas; las hojas de cada par iguales a desiguales, margen entero a ondulado, serrulado o denticulado, 3-7-nervadas o 3-7-plinervadas; flores hermafroditas, o en caso contrario las plantas dioicas, (4)5(6)-meras, sésiles o cortamente pediceladas, generalmente dispuestas en cimas multifloras, bracteadas y terminales, rara vez en espigas o agrupadas por pocas; hipatio cilíndrico campanulado, ocasionalmente costulado, rara vez alado, cáliz generalmente sobresale en la planta, pero a veces truncado y en forma de reborde (cerrado en botón y fracturándose en la antesis en algunas especies), típicamente persistentes pero caduco en algunas especies, dientes exteriores de cáliz por lo común ausentes; pétalos blancos a rosados (rara vez amarillos), obovado-oblongos a linearoblongos, granulados o papilosos; estambres isomórficos o anisomórficos, anteras oblongas, subuladas o cuneadas, 2-4-loculares, abriéndose por medio de 1,3,6,4 poros terminales o rara vez a través de fisuras alargadas, conectivo sencillo, desprovisto o solo con leves prolongaciones o apéndices dorso-basales y/o ventro-basales; ovario (2)3-5-locular, parcial o totalmente ínfero, estigma punctiforme a capitado; fruto en forma de baya; semillas ovoides, anguloso-obovoides o galeiformes, piramidales o en forma de media luna, lisas o diversamente ornamentales⁴¹

2.5.4.2. Productos naturales y farmacognosia del género *Miconia*

Los metabolitos secundarios del género *Miconia* han sido muy poco investigados a pesar de la gran diversidad de especies que contiene. Las sustancias más comúnmente aisladas de estas plantas son del tipo benzoquinona.

GRUPO POLIFENOLES UTP



La separación en columna sobre DIAION HP-20 y Toyopearl HW-40 del extracto en acetona al 70% de *Miconia coronata*, permitió el aislamiento del Kamferol-7-*O*- α,β -ramnosido (**c**), compuesto que presentó inhibición contra *Salmonella ATCC 13311*, *Salmonella de gallina* y *Escherichia coli* aislada de una granja de Pimpollo (sensible a la amoxicilina) a unas concentraciones de 0.8, 0.6 y 0.4 mg/L, lo cual es un aporte importante, pues podría ser fuente de un nuevo antibiótico⁴².

Del extracto butanólico proveniente de *Miconia aeruginosa* se encontró un compuesto con porcentaje alelopático inhibitorio alrededor del 50%, el cual fue aislado e identificado como flavona 5, 7, 4'-trihidroxil-6-C-arabinosido (**d**); posible fuente de un herbicida natural⁴³.

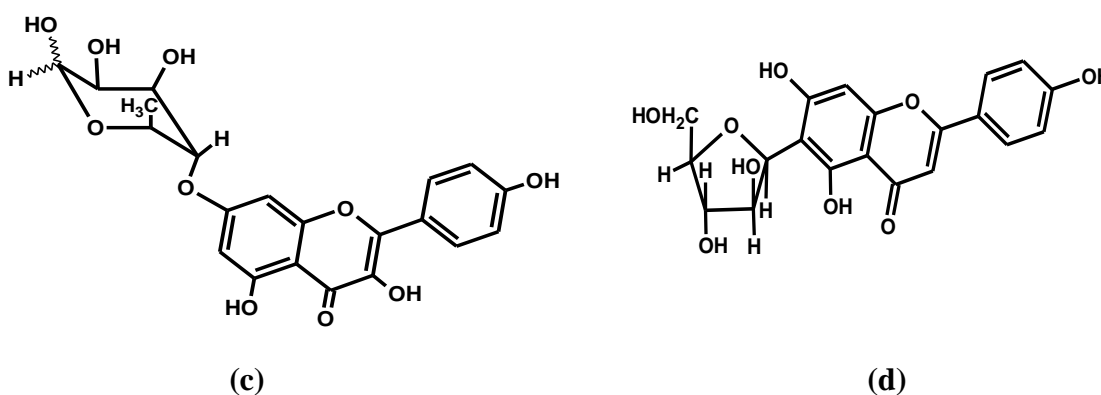
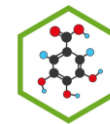


Figura 3. Compuestos aislados de algunas especies del género *Miconia*

El fraccionamiento guiado por bioensayos de los extractos en etanol del tallo y las hojas de *Miconia myriantha*, produjo dos nuevos compuestos, 7-*O*-(4'',6''-(*S*)-hexahidroxi-difenil)- β -D-glucopiranosilmatucinol, y 7-*O*-(4'',6''-di-*O*-galoil)- β -D-glucopiranosilmatucinol, junto con matucinol-7-*O*- β -D-glucopiranosido, ácido elágico, ácido 3,3'-di-*O*- β -D-xilopiranosil elágico y ácido gálico. Los compuestos 7-*O*-(4'',6''-(*S*)-hexahidroxi-difenil)- β -D-glucopiranosilmatucinol y ácido 3,3'-di-*O*- β -D-xilopiranosil elágico mostraron efectos inhibitorios contra las proteasas aspartica de *Candida albicans*¹⁰.

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.5.4.3. Descripción de la especie *Miconia coronata* (Bonpl) DC.

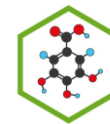
La especie *Miconia coronata* (Bonpl) DC se caracteriza por tener árboles coposos de 4-8 m de altura, con hojas tiernas e inflorescencia, que suele ir desapareciendo con la edad y a veces desiguales en el nudo, pentanervadas y heptanervadas con varios robustos muy salientes en la cara inferior. Inflorescencias grandes en panículas piramidales de 15 a 35 cm de largo, muy vistosas. Flores pentámeras con pedicelos cortos de 1 a 4 mm. Estambres levemente desiguales en tamaño, con filamento blanco o rosado de 6 a 8 mm aplanados. Frutos en baya de 4 a 5 mm de diámetro, coronada por el cáliz tubuloso.

Por sus grandes hojas plinervadas, los estambres purpúreos y estrechamiento hacia la mitad del conjunto tubular, no se confunde con ninguna otra *Miconia* de Colombia⁴⁴.

Esta especie tiene como localidad típica el norte de Quindío y se encuentra distribuida en las cordilleras central y oriental. El clima templado crece a orillas de los bosques y junto a las quebradas en suelos húmedos³⁴.



Figura 4. Morfología típica de *Miconia coronata*



2.5.5. Descripción del genero *Clidemia*

El género *Clidemia* restringido al hemisferio occidental, se ubica preferencialmente en las tierras bajas de la amazona, selvas tropicales, y eventualmente en las zonas altas de las montañas, en su mayoría especies endémicas de una región limitada. En el hábitat las especies son muy diversas. Comprende unas 150 especies entre arbustos y lianas leñosas. La mayoría con indumento denso de pelos largos simples o estrellados.

El género cuenta con una gran cantidad de especies que han sido objeto de investigación en diversos campos; así, en estudios de morfología, ecología y modelos de distribución de las especies de *C. epiphytica* y *C. longifolia* de Amazonia occidental se ha analizado la aplicación del principio de exclusión competitivo en ecosistemas⁴⁵.

2.5.5.1. Morfología general del genero *Clidemia*

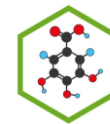
Habito hierbas, sufrútices o arbustos de 0.3-2 m de talla, raras veces lianas. Plantas grabras, pubescentes, villosas, estrigosas o con indumentos de diferentes tipos. Tricomas sencillos filiformes o engrosados en la base (rectos o curvos), glandulares o estrellados (sésiles o estipitados), dendríticos, bulbosos, piniodeos, lepidotos, o harinosos. Tallo generalmente terete, menos frecuente subcuadrangular o aplanado.

Hojas opuestas algunas provistas de mirmecodomacios, de base cordiforme a redondeada, lámina cordada o lanceolada. Con inflorescencias axilares, flores 4-8 meras con pétalos obtusos con colores blancos a rosados y frutos en baya. Los frutos son jugosos, de color morado, rojo, negro y café. Generalmente con pelos largos⁴⁶.

2.5.5.2 Descripción de la especie *Clidemia hirta* (L.) D. Don.

Planta nativa del Neotrópico, Antillas Mayor y Menor, el sur de México, América Central y América del Sur. Sin embargo se ha naturalizado en muchas islas del Pacífico y Océano Indico, Australia, Asia del Sur, Sri Lanka, India y África Oriental.

GRUPO POLIFENOLES UTP



La elevación puede variar desde cerca al nivel del mar hasta más 1500 m. La especie se desarrolla mejor en sol, pero tolera la sombra.

La especie *C. hirta*, caracterizada por ser una planta exótica, cuenta con el mayor número de investigación del género, como consecuencia de su alto potencial de invasión de diferentes zonas, bosque tropical lluvioso continental en Singapur y bosque de Hawái y relacionadas con el control biológico en la interacción con insectos^{47,48}.

En Colombia, es una especie ampliamente distribuida, encontrándose en departamentos como Amazonas, Antioquia, Cauca, Caquetá, Cundinamarca, Chocó, Guainía, Guajira, Nariño, Santander, Meta, Tolima, Risaralda, Valle y Vaupés. Crece desde los 350 m hasta 1800 m sobre el nivel del mar⁴⁹.

2.5.5.3. Morfología general de la especie *Clidemia hirta* (L.) D. Don.

Arbusto desde 1-5 m de altura, de débil crecimiento ascendente, dependiendo del hábitat. Raíces laterales poco profundas pero abundantes. Tallos teretes que se levantan como brotes del tronco y la base del tallo principal, produciendo arbustos densos. Las ramas y brazos son delgados. Las hojas tienen forma obovada y borde dentado, con un ápice acuminado. Su longitud va de 5-18 cm, tienen un pecíolo corto, y pueden tener de 5-7 nervios principales que salen de la base.

La planta entera está cubierta por tricomas setulosos (vellos) suaves, de color pardo o castaño. Tiene inflorescencia en panículas, flores pentámeras, pediceladas de hasta 6 mm de longitud; hipanto 5 mm de longitud, pétalos blancos. Los frutos son elipsoidales, de color morado-púrpura-negro de 0.5-0.7 mm de largo⁴⁹.

GRUPO POLIFENOLES UTP

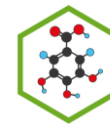


Figura 5. Especie *Clidemia hirta* (L.) D. Don

2.5.5.4. Fitoquímica y Farmacognosia de la especie *Clidemia hirta* (L.) D. Don.

Estudios reportan que *Clidemia cilata*, *Clidemia flexuosa* y *Clidemia hirta* contienen porcentajes de compuestos fenólicos de 80.3%, 75.2 % y 58.3 % para una extracción con acetona acuosa al 70%. De igual forma las tres anteriores especies presentan porcentajes para taninos condensados de 60.8 %, 49.2% y 84.8% respectivamente⁵⁰.

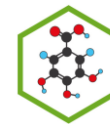
Un contenido en *Clidemia hirta* del 19% en taninos hidrolizables (mezcla de galos y elagitaninos), revela un efecto hepatotóxico por ingestión en cabras en Indonesia⁵¹.

2.6. Descripción de la familia Rubiaceae

Se encuentra distribuida principalmente en el trópico y el subtrópico con algunas especies en zonas templadas y frías, está conformada por aproximadamente 250 géneros y 7000 especies y es considerada una de las familias de plantas más grandes, junto con las Poaceae, Orchidaceae y Asteraceae dentro de las angiospermas.

Las especies de Rubiaceae depositadas en el Herbario Nacional Colombiano, alcanzan 785 especies y 11 subespecies, distribuidas en 107 géneros, que equivalen al 43% de todos los géneros de la familia en el mundo⁵².

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.6.1. Morfología general de la familia Rubiaceae

Árboles, arbustos o hierbas a veces espinosas con hojas simples, opuestas o verticiladas, con estipulas hojosas. El fruto es una capsula, baya drupa o esquizocarpo. Las semillas son a veces aladas. En las regiones templadas predominan especies de habito herbáceo, en tanto que en los trópicos se hallan preferentemente arbustos y árboles de bajo porte y algunos de ellos gigantes⁵³.

2.6.2. Clasificación Taxonómica de la familia Rubiaceae

La *Rubiaceae* son una familia de plantas llamadas normalmente de la nubia, galio blanco, o familia del café, se encuentra incluida dentro de la división *magnoliophyta*, clase *magnoliopsida* y orden *gentianales*⁵⁴.

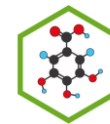
2.6.3. Farmacognosia y Fitoquímica de la familia Rubiaceae

Las especies de la familia Rubiaceae son conocidas por su importancia económica como la “quina” o “casarilla” (tribu Cinchoneae), que presenta varios alcaloides con variadas aplicaciones, el género *Pogonopus* y varios otros son las fuentes de compuestos activos de pruebas y actividad anticancerígena⁵⁵.

En 1993, los Científicos Kisakura, Leewenber y Hesee encontraron que Rubiaceae tiene tres tipos estructurales de alcaloides: indólicos, quinólicos (del tipo de la quinina) e isoquinolíticos (del tipo de la hematina). La tribu Cinchoneae es el único grupo que posee estos tres tipos de alcaloides juntos⁵⁶.

Morinda seibertii (Standl.) Steryerm es conocida con el nombre de “Tigutit niaquit” (Cuna); sus hojas se emplean para combatir la tos y contra afecciones hepáticas y de los ojos. *Morinda citrifolia* L. es una especie ampliamente cultivada y se conoce como “Noni”, la madera es utilizada en la construcción; los frutos y raíces se usan para obtener un colorante magenta; medicinalmente tiene aplicaciones contra dolores de cabeza y de muelas; también se emplea para curar el reumatismo, regular la menstruación, aliviar el

GRUPO POLIFENOLES UTP



dolor en ataques cardiacos y posparto y como anticonceptivo masculino; los frutos son comestibles⁵⁷.

Las dos especies de Rubiáceas llamadas uña de gato, *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin y *U.tomentosa* son utilizadas por tradición en el tratamiento de diversas enfermedades por las tribus de la amazonia Peruana como: Boras, Campas, Asháninkas, Amuehas y Machiguengas⁵⁸. Igualmente la uña de gato se emplea para tratar procesos inflamatorios, diabetes, enfermedades degenerativas como el cáncer, gonorrea, úlcera gástrica, irregularidad en el ciclo menstrual, cirrosis, artritis; adicionalmente estimula el sistema inmunológico⁵⁸.

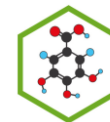
2.6.4. Usos de la familia *Rubiaceae*

La familia Rubiaceae presenta especies con importancia económica ya sea en la producción de tintes, sustancias medicas, productos comestibles o maderables. Merecen mención especial el café, bebida estimulante y tonificante que contiene cafeína y que se obtiene a partir de las semillas tostadas de algunas especies de *Coffea*. La quinina, rica en alcaloides derivados de la quinoleína y empleada en el tratamiento de la malaria, fibrilación auricular y en la profilaxis de las arritmias cardiacas, se obtiene a partir de la corteza de especies de *Cinchona*, *Remijia* y *Landenbergia*. La ipecacuana, que es una droga rica en emetina, cafeína y psycotrina y utilizadas en bajas dosis como balsámica, astrigente⁵⁹.

2.6.5. Descripción del genero *Polycourea*

Género neotropical con más de 200 especies que se distribuyen en Las Antillas y desde México hasta el norte de Argentina y sur del Brasil. Colombia es el país con mayor número de especies del género con cerca de 130, presentes en todas las regiones y altitudes hasta las zonas de páramo; su mayor diversificación se localiza en la región Andina entre los 1.000 y 2.000 m de altitud⁶⁰.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Las flores tienen unos tubos bien desarrollados y generalmente son tubos de colores brillantes, sin olor, y polinizadas por colibríes, generalmente frutos de color azul a violeta-negro son dispersados por aves.

Las especies de *Palicourea* son conocidas genéricamente como “cafecillos” en la zona de La Planada en el departamento de Nariño o “café de monte” en el departamento del Cauca⁶¹.



Figura 6. Especie *Polycourea guianensis*.

2.6.5.1. Descripción de la especie *Polycourea Lirystipula*

Árbol de unos 3.8 m de altura y 3.5 cm de diámetro, ramificados hojas medianas, flores de unos 3 a 4 mm de diámetro y raquis blancos la corteza es blanquizca con pequeñas manchas rojizas longitudinales, se conoce también por el nombre de carcarillo o cafeto de monte^{62,63}.

Se encuentra distribuida en Venezuela, Ecuador y en Colombia en las tres cordilleras, entre 1500 y 3000 m en el Parque Regional ARVI es una especie muy abundante, se halla en el interior de bosques secundarios, plantaciones forestales y robledales⁶³.

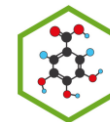


Figura 7. Especie *Polycourea lyristipula*

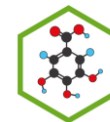
2.7. Metabolitos secundarios de interés en plantas Melastomatácea

2.7.1. Descripción de Taninos

La definición más simple, concisa y aceptable de taninos, o mejor denominados “polifenoles vegetales”, es la propuesta por Bate-Smith y Swain (1962): “*Compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000-5000, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas*”⁶⁴. Además de estas características, los taninos se oxidan al contacto con el aire, son inodoros y de sabor agrio; reaccionan con el cloruro férrico y otras sales⁶⁵.

La acumulación de taninos vegetales se puede producir en casi cualquier parte de la planta: semillas, frutos, hojas, madera, corteza, raíces. El aumento de la producción de estos polifenoles está a menudo asociado a una condición patológica en particular, la más familiar, es la causada por el ataque de insectos⁶⁶.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Se ha identificado aproximadamente 500 especies de plantas que contienen taninos en cantidades variables. Entre las principales familias botánicas con importancia en la obtención de taninos se pueden citar las siguientes: *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Polygonaceae*, *Fagaceae*, *Rhizophoraceae*, *Myrtaceae* y *Melastomataceae*.

2.7.2. Clasificación

Aunque se reconoce que las estructuras químicas de los taninos son muy variables, dos clases mayoritarias se pueden identificar: Taninos Hidrolizables y Condensados, más un tercer grupo minoritario, los Florotaninos. Los tres grupos estructurales se producen por tres vías biosintéticas diferentes⁶⁷, y son ricos en grupos hidroxilos altamente reactivos que se derivan de cada uno de los anillos de benceno y forman complejos con proteínas, incluidas las enzimas⁶⁸ y los polímeros, como celulosa y hemicelulosa⁶⁹. Estos complejos son en general indigestables y reducen el rendimiento en el crecimiento de los animales⁷⁰, debido a la pérdida de peso corporal, la falla renal o hepática, la reducción en el suministro de nitrógeno e incluso pueden causar la muerte⁷¹.

2.7.2.1. Taninos Condensados o Proantocianidinas

Derivan por biosíntesis mixta de las rutas de ácido shikímico y malonilCoA que producen flavan-3,4-dioles (Figura 8) (unidades monoméricas)⁷², las cuales se unen formando polímeros. Los taninos condensados en sus núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo 4 - 8, 4 - 6)⁷³. Al ser calentados con ácido diluido o aún con agua originan productos de condensación macromoleculares, insolubles, llamados flobafenos de color rojo pardo⁷⁴.

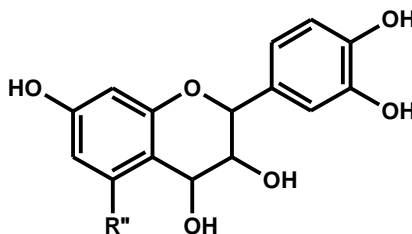
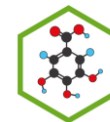


Figura 8. Estructura de Flavan-3,4-dioles.



Los taninos condensados pueden ser beneficiosos en la dieta, pero a ciertos niveles comienzan a afectar el consumo de alimento. Este nivel varía considerablemente, dependiendo de la naturaleza química del compuesto fenólico y de las especies animales estudiadas⁷⁵.

La reacción empleada para detectar taninos condensados en extractos de plantas, consiste en tratarlos con ácido clorhídrico en *n*-butanol, en caliente, rompiendo los enlaces interflavano liberando las unidades superior y de extensión como antocianidinas de color rojo. La unidad inferior se libera como flavan-3-ol⁷⁶.

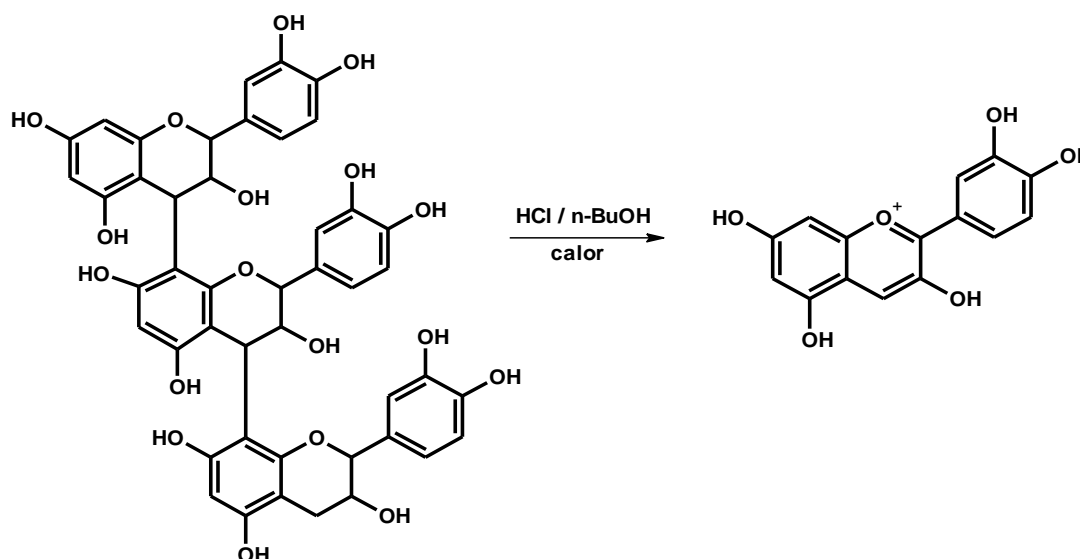
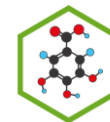


Figura 9. Reacción coloreada para taninos condensados.

2.7.2.2. Taninos Hidrolizables

Se producen por una derivación de la vía del ácido shikímico que conduce a la producción de ácido gálico⁷⁷. Son ésteres formados por una molécula de azúcar (en general glucosa **(a)**) unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico **(b)** o su dímero, el ácido elágico **(c)**). En esta clasificación se enmarcan los ésteres de galoilo y hexahidroxidifenoilo, así como también sus derivados. Además, se hidrolizan con facilidad

GRUPO POLIFENOLES UTP



por la acción de ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de ácido producido por la reacción, se subdividen en: galotaninos y elagitaninos⁷⁸.

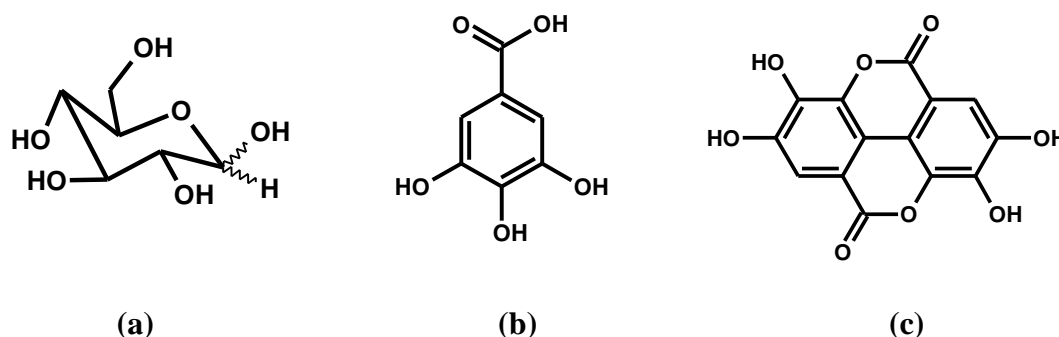


Figura 10. Componentes de un tanino hidrolizable.

Los taninos hidrolizables producen un color intenso con ferrocianuro de potasio y amoníaco. La reacción empleada para detectarlos es⁷³:

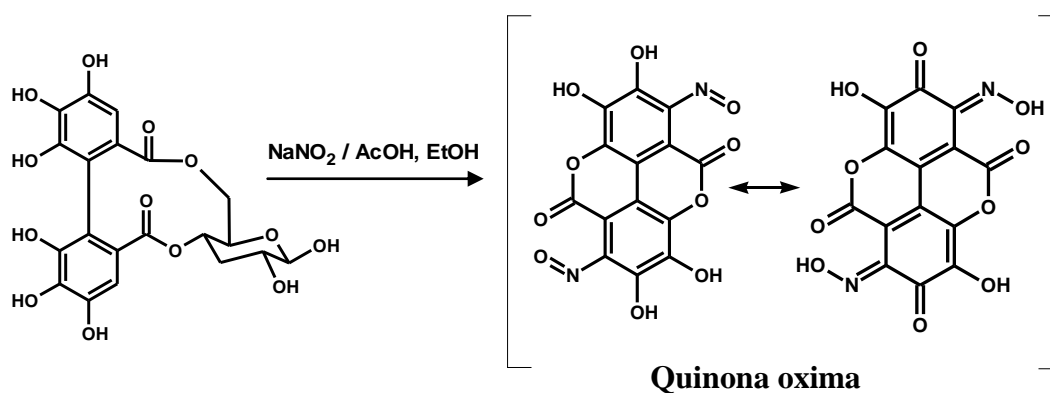
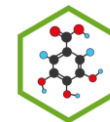


Figura 11. Reacción de los taninos hidrolizables.

2.7.2.2.1. Galotaninos

Son compuestos fenólicos de origen natural, que consisten principalmente de un núcleo de glucosa esterificada con ácido gálico, o sus derivados. Son obtenidos principalmente por el aislamiento de los gallnuts chinos y también se encuentran vigentes en muchas frutas y verduras, como la uva, fresa, frambuesa, etc. En las últimas décadas, los galotaninos han mostrado propiedades contrastantes en los alimentos. Sus actividades antioxidantes y

GRUPO POLIFENOLES UTP



antibacterianas han sido descritas en varios informes, mostrando buenas perspectivas para su utilización como conservantes y antioxidantes en la elaboración de alimentos⁷⁹.

El miembro más simple de este grupo es el 1-*O*-galoil- β -*D*-glucopiranososa (**e**), que ha sido identificado hace más de un siglo como un producto natural. El aumento de la sustitución del monoéster conduce al 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galoil- β -*D*-glucopiranososa (**f**)⁸⁰.

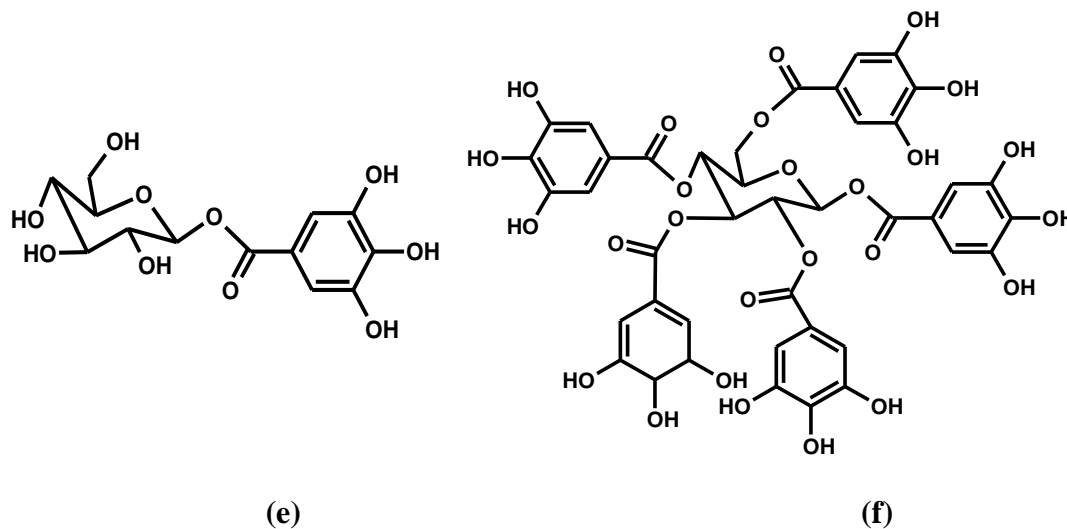
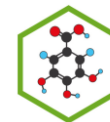


Figura 12. Estructuras de galotaninos

2.7.2.2.2. Elagitaninos

En contraste con la limitada incidencia de los galotaninos en la naturaleza, los elagitaninos son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas superiores que contienen ácido elágico⁸¹. Hace más de 10 años, la existencia de más de 150 elagitaninos dímeros, trímeros y tetrameros han sido reportados⁸². El aumento de interés por la función biológica y farmacológica de estos compuestos polifenólicos, se debe a que la mayoría de las actividades biológicas importantes como antimutagénicas, antivirales, anticancerosas, antioxidantes y antitumorales, junto con el blanqueamiento de la piel se le han atribuido al ácido elágico⁸³. Sin embargo, las aplicaciones de ácido elágico no se han aprovechado plenamente debido a su alto costo de la producción.

GRUPO POLIFENOLES UTP



En una molécula de elagitanino, un grupo hexahidroxidifenoilo (HHDP) (**g**) se encuentra unido por un enlace éster a los grupos hidroxilos de una glucosa (**h**). También se pueden observar grupos galoilo, además del grupo HHDP. Por ésta razón, los elagitaninos pueden liberar ácido elágico y gálico por hidrólisis ácida o básica.

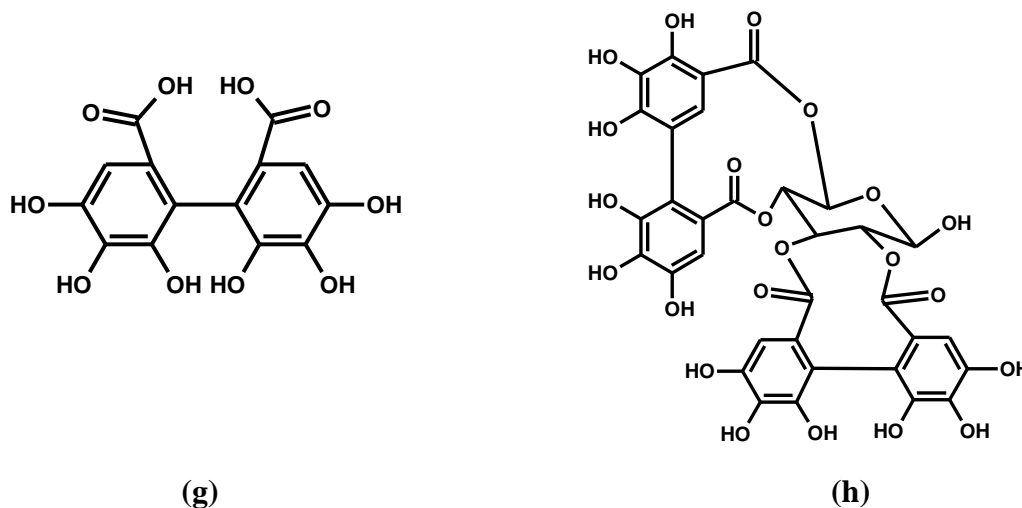
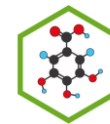


Figura 13. Estructura de elagitaninos

2.7.3. Aplicaciones de los Polifenoles vegetales

Los taninos vegetales se reconocieron en un principio como productos químicos valiosos para múltiples procesos técnicos. Entre éstos, uno de los procedimientos más antiguos y todavía importante en nuestros días, es la curtiembre, es decir, la conversión de los cueros crudos a cueros duraderos. Los taninos de las plantas también son utilizados en la producción de colorantes y tintas, o como tratamiento versátil en medicina tradicional, particularmente en el este de Asia⁸⁴. Otras aplicaciones se dan en las industrias de vino, cerveza, té y cacao. Los antioxidantes, en forma de selenio, la vitamina E (y los tocoferoles), flavonoles como la quercetina y los taninos, han demostrado tener diversos efectos biológicos relacionados con la reducción de los radicales libres⁸⁵. Otras características de los polifenoles vegetales como la actividad antimicrobiana, antiviral y antitumoral, así como muchas otras propiedades médicamente importantes, son actualmente investigadas en muchos laboratorios en todo el mundo⁷⁸.



2.8. METODOLOGÍA FLUOROMÉTRICA PARA EL ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE Sap

Diversos métodos para visualizar la actividad enzimática mediante el uso de sustratos fluorogénicos o cromogénicos han surgido recientemente ⁸⁶. En general, ésteres de fluoresceína a menudo se han empleado para el estudio de diversas actividades de la esterasa ⁸⁷⁻⁸⁹, phosphodiesterasas ⁹⁰ y fosfatasas ^{91,92}, pero su uso en el estudio de la actividad de proteasas ha sido poco estudiado.

La actividad proteolítica ha sido medida usando albúmina sérica bovina (BSA), hemoglobina (Hb) y estrato corneo humano como sustrato; sin embargo, estos métodos carecen de sensibilidad, donde el tiempo de consumo y expresión de la actividad en unidades proteolíticas es arbitrario. La síntesis de sustratos fluorogénicos para proteasas permite el desarrollo de un rápido ensayo de microtitulación fluorescente que define la actividad en términos de la actividad hidrolítica.

Un método fluorescente para el monitoreo de la actividad de la proteasa carboxil (aspártica) secretada de *Cándida albicans* se ha desarrollado usando un sustrato fluorogénico basado en resonancia de transferencia energética³³.

El fluorexón (**1**) forma un complejo no fluorescente con Cu^{+2} , el cual sirve como un quimiosensor fluorescente verde para aminoácidos que puede usarse para monitorear la actividad proteolítica de las proteasas⁹³, como se describe a continuación:

1. Las proteasas son enzimas proteicas que se encargan del rompimiento de los enlaces peptídicos que unen las proteínas, estas rupturas originan la desfragmentación de las proteínas en sus unidades individuales, los aminoácidos.
2. El complejo formado entre el cobre y el fluorexón (Cu.L), es atacado por los aminoácidos que son liberados, los cuales se unen al cobre, desplazando el fluorexón, este una vez liberado emite fluorescencia.

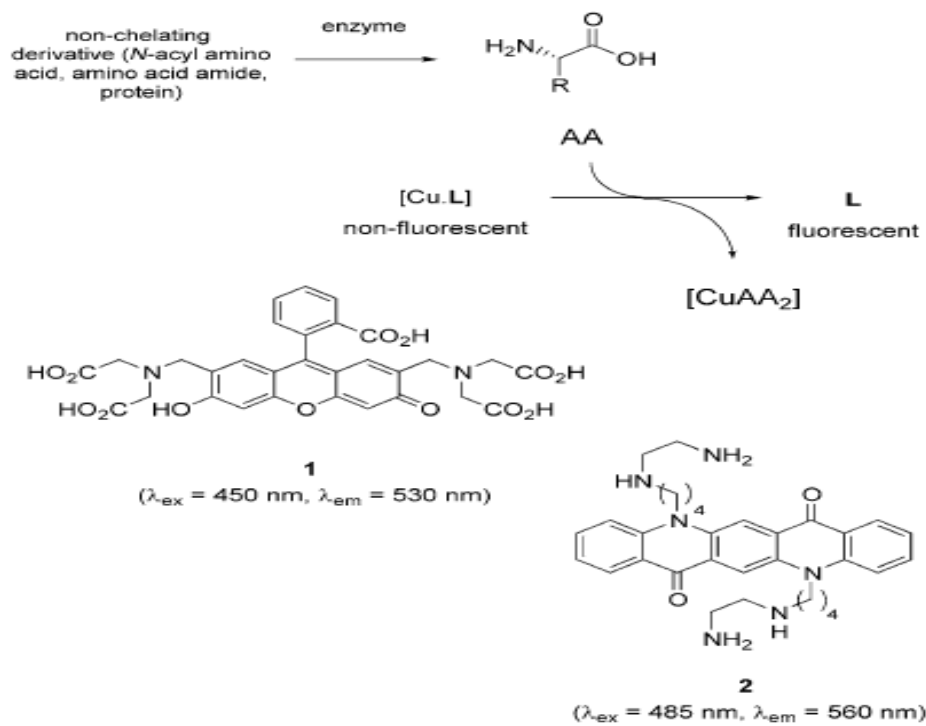
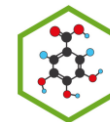
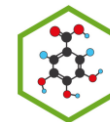


Figura 14. Interacción Cobre-fluorexón-aminoácido⁹³



3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Condiciones instrumentales generales

- Jasco HPLC 2000 Plus. Sistema equipado con una bomba de gradiente cuaternario PU-2089 Plus, un automuestreador inteligente AS-2059 Plus, un horno para columna CO-2065 Plus, un detector inteligente de arreglo de diodos MD-2015 Plus y un LC Net II/ADC, controlado por el Software EZChrom Elite.
- Balanza analítica OHAUS.
- Balanza Explorer Pro OHAUS.
- Ultrasonido Fisher Scientific FS60H.
- Fluorescence Spectrophotometer - Cary Eclipse - Software (Operation manual).
- Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO RAD).
- Cabina de seguridad biológica C4, modelo FLC 120.

3.2 Material vegetal

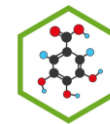
Se evaluaron extractos secos de plantas de la familia Melastomataceae y Rubiaceae (Tabla 2), suministrados por el grupo de investigación Polifenoles UTP.

Familia	Planta	Voucher	Tipo de extracto
Melastomataceae	<i>Miconia coronata</i>	462519	Acuoso, ButOH, EtOAc
Melastomataceae	<i>Clidemia hirta (L.) D. Don</i>	520328	Acuoso, ButOH, EtOAc
Rubiaceae	<i>Polycurea lirystipula Wern L.</i>	519791	Acuoso, ButOH

Tabla 2. Extractos de plantas evaluados contra Sap de *Cándida albicans*

3.3 Levadura de prueba

La cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231 fue comprada a Quimirel, y se replicó en Biggy agar.



3.4 Controles

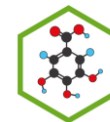
Como control positivo se utilizó Pepstatin A P5318-25 MG (Sigma), un inhibidor específico de Sap de *Cándida albicans*²⁹. Se disolvió pepstatin A en dimetilsulfoxido (DMSO) al 30 % con ayuda de ultrasonido, a una concentración de 100 μM ; como control de actividad se usó solución de pancreatina (enzimas pancreáticas), la cual se preparó disolviendo una pastilla de 3.5 mg de Hydro Tab (limpiador enzimático que contiene pancreatina), en 1700 μL de buffer fosfato 5 μM a pH 7,0, quedando con una concentración de 2058 ppm.

3.5 Estandarización

La estandarización de la técnica espectrofluorométrica se desarrolló con el objetivo de evaluar la actividad de la proteasa aspártica secretada (Sap) de *Cándida albicans* y buscar posibles inhibidores a partir de extractos de plantas, para tal fin se tomó como referencia la metodología descrita por Dean KE *et al*⁹⁴, utilizada para monitorear la actividad hidrolítica de proteasas. Esta metodología comprende el uso de un sustrato fluorogénico llamado fluorexón el cual forma un complejo no fluorescente con cobre (Cu^{2+}), este complejo se utiliza como un quimiosensor fluorescente para seguir reacciones donde los aminoácidos de una fuente proteica (BSA para este estudio) son liberados producto de la actividad proteolítica de las proteasas.

Se trabajó con soluciones de cobre, fluorexón, medio de cultivo (BSA 0.1%) y buffer fosfato 5 μM a pH 7.0. Las mediciones se realizaron sobre cajas de 96 pozos, adicionando en cada pozo 25 μL de las soluciones y la muestra a evaluar, se completó con buffer fosfato 5 μM hasta un volumen de 250 μL .

Una vez identificada la metodología a emplear en las mediciones, se procedió a realizar diferentes ensayos para establecer las condiciones óptimas requeridas para la programación del equipo, como fueron las longitudes de onda de excitación y emisión para el fluorexón, slit de excitación, slit de emisión, filtro de excitación, filtro de emisión y voltaje del detector. Seguidamente se realizaron ensayos haciendo variar las concentraciones de fluorexón y cobre para determinar las ideales y así obtener una mayor sensibilidad (tabla 3).



Fluorexón (μM)	0,34	0,69	1,38	2,75	5,5	11	13,2
Cobre (μM)	0,5	1	2	4	6	8	10

Tabla 3. Concentraciones de fluorexón y cobre ensayadas

Ya establecidas las condiciones para el funcionamiento de la técnica, se realizó un estudio de la cinética de reacción durante 4 horas para el complejo formado entre fluorexón y cobre (Cu^{2+}), con el fin de observar el comportamiento en la señal. También se realizó una medición de la solución de pancreatina como prueba preliminar.

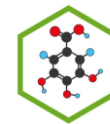
3.6 Crecimiento de *Cándida albicans* y producción de Sap

La estandarización de la técnica espectrofluorométrica comprende también la estandarización de las condiciones del cultivo de *C. albicans*, por tanto se realizó un estudio para determinar el tiempo de mayor producción de Sap y la influencia del pH. El procedimiento desarrollado consistió en la preparación de un inóculo con 1 colonia/ml de un cultivo de *C. albicans* en un medio que contiene YNB (Base nitrógeno levadura) y BSA 0,1%, incubado a 29 °C. De este cultivo se extrajeron muestras cada 2 horas durante 26 horas y se midió el pH para cada una, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min y el sobrenadante se utilizó para las mediciones.

La pureza de la proteasa y su peso molecular se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%, la preparación se muestra en el anexo 1. También se realizaron mediciones utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con las condiciones descritas en la tabla 4.

Columna	PROTEIN KW-804 shodex
Flujo	1 mL/min
Isocrático	Buffer fosfato 50 mM
Tiempo de corrida	20 min
Detector	PDA (200-239 nm)
Volumen de inyección	10 μL
Temperatura	40 °C

Tabla 4. Condiciones y gradiente del HPLC-DAD



Una vez identificados los tiempos en que inicia la producción de Sap, se realizó un nuevo inóculo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se extrajeron muestras en tiempos de mayor producción para ser evaluados por fluorometría siguiendo los parámetros de la técnica estandarizada.

3.7 Inhibición de producción de Sap

Para verificar la acción de Pepstatin A, se evaluó a concentraciones de 1000, 500, 100 y 10 μM , adicionada a un cultivo de *C. albicans* luego de 4 horas de incubación; se extrajeron muestras de 18, 20 y 22 horas a las diferentes concentraciones y se midió sobre gel de electroforesis SDS-PAGE, además se tenía un cultivo al que no se adicionó el inhibidor, utilizado como control para verificar la producción de Sap. De esta manera se pudo visualizar su producción e inhibición, también se realizó una medición por fluorometría a la muestra de 22 horas con pepstatin A 100 μM y su respectivo control.

3.8 Hidrólisis de Sap en medio de hemoglobina (Hb)

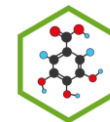
Como método cualitativo para evaluar la producción e inhibición de Sap, se aplicó la prueba de hidrólisis en medio de hemoglobina descrita por Dostál *et al*⁹⁵, para lo cual se tomó una placa de agar ogy suplementado con sangre, se dividió en dos partes, con un hisopo se sembró en una mitad *C. albicans* con inhibidor pepstatin A y en la otra *C. albicans* sola, ambas muestras provenían de cultivos de YNB 1X y BSA 0.1% de 22 horas de incubación, esta placa se incubó por 2 días a 29 °C. La aparición de zonas claras, producto de la hidrólisis de la hemoglobina evidencia la producción de Sap.

3.9 Evaluación de extractos

3.9.1 Preparación de extractos

Los extractos secos se disolvieron en DMSO 30%, y fueron evaluados a 1000 ppm.

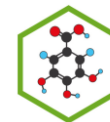
GRUPO POLIFENOLES UTP



3.9.2 Ensayo de inhibición

Para la evaluación de los extractos, se inoculo 1 colonia/ml de *C. albicans* en un medio que contenía YNB 1x y BSA 0,1%, se incubó a 29 °C. Después de 4 horas de incubación, se aplicaron los extractos sobre el cultivo y se continuó incubando hasta completar 22 horas. Como control positivo, se utilizo pepstatin A 100 μ M y como control negativo se preparó un cultivo de *C. albicans* a las mismas condiciones para verificar la producción de Sap. Se comprobó que el solvente (DMSO) empleado para disolver tanto los extractos como la pepstatin A no inhibiera la producción de Sap.

Todas las muestras fueron evaluadas por fluorometría, HPLC y electroforesis SDS-PAGE.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estandarización

Se realizaron múltiples ensayos variando los parámetros en la programación del equipo buscando una mejor respuesta en la señal, finalmente se determinaron las condiciones óptimas las descritas en la tabla 5.

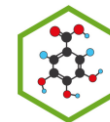
Parámetro	Programación
Ex Wavelength (nm)	486
Em Wavelength (nm)	525
Ex Slit (nm)	5
Em Slit (nm)	5
PMT Detector voltage	Low (400)
Excitacion filter	Auto
Emission filter	Open

Tabla 5. Parámetros hallados para la programación del equipo

Las longitudes de onda máximas de excitación y emisión para el fluorexón se hallaron mediante un barrido espectral, el gráfico trazado se muestra en el Anexo 2.

Con las condiciones óptimas para la programación del equipo establecidas, se procedió a evaluar las concentraciones de fluorexón y cobre ideales para trabajar la técnica, todas las mediciones se realizaron por triplicado y se tomó un valor promedio de las repeticiones.

En todos los casos para las mediciones se dejó constante la concentración de uno de los reactivos haciendo variar la del otro, y se realizaron graficas de concentración contra señal, donde se determinó que la concentración ideal para el fluorexón es 5.5 μM (Fig. 15) en la cual existe un mayor gradiente de señal; en cuanto al cobre se determinó que la concentración optima se encuentra entre 4 μM y 6 μM (Fig. 16), por lo cual se decidió trabajar con una concentración promedio de 5 μM , que facilite el retorno de la fluorescencia como resultado de la acción de proteasas.



Una vez establecidas las concentraciones de fluorexon y cobre, se realizó una medición para estudiar la cinética del complejo que se forma entre estas dos soluciones, se observó una disminución en la señal hasta hacerse constante pasados 120 minutos (Fig. 17), esto indica que se debe dejar transcurrir este periodo de tiempo como mínimo de acoplamiento antes de realizar cualquier medición para asegurar la constancia en la intensidad de fluorescencia permitiendo estabilidad y reproducibilidad en las mediciones

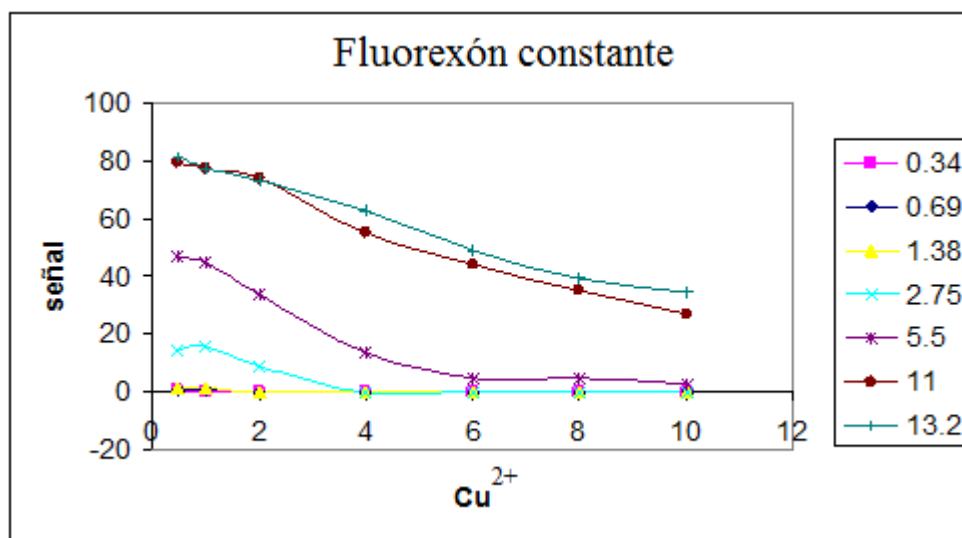


Figura 15. Efecto de la variación en la concentración de cobre

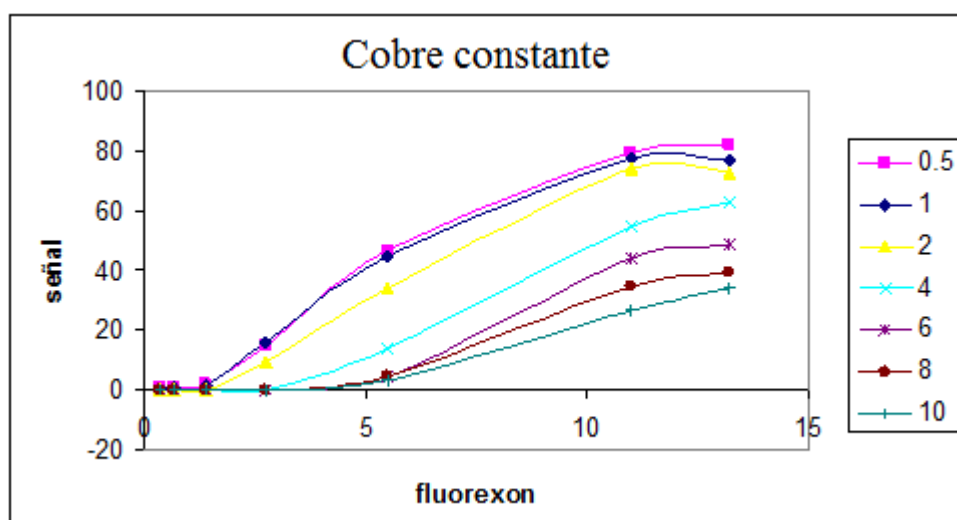


Figura 16. Efecto de la variación en la concentración de fluorexón

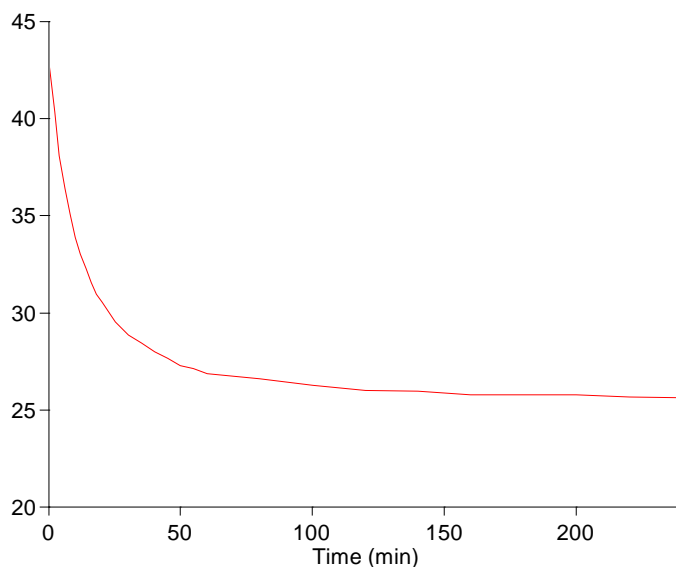
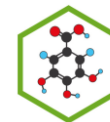


Figura 17. Medicion por fluorometria de acoplamiento de fluorexon $5,5 \mu\text{M}$ y cobre $5,0 \mu\text{M}$ (T° ambiente)

Se realizo un primer ensayo con una proteasa para estudiar la respuesta de la técnica estandarizada, para ello se midió una solución de pancreatina con lo que se pudo observar la restauracion de la fluorescencia producto de la accion de la proteasa que libera aminoácidos del BSA utilizado como fuente proteica y estos a su vez desplazan el fluorexón del complejo formado uniéndose al cobre, lo que ocasiona un aumento en la fluorescencia que dependerá de la cantidad de aminoácidos liberados (Fig. 18).

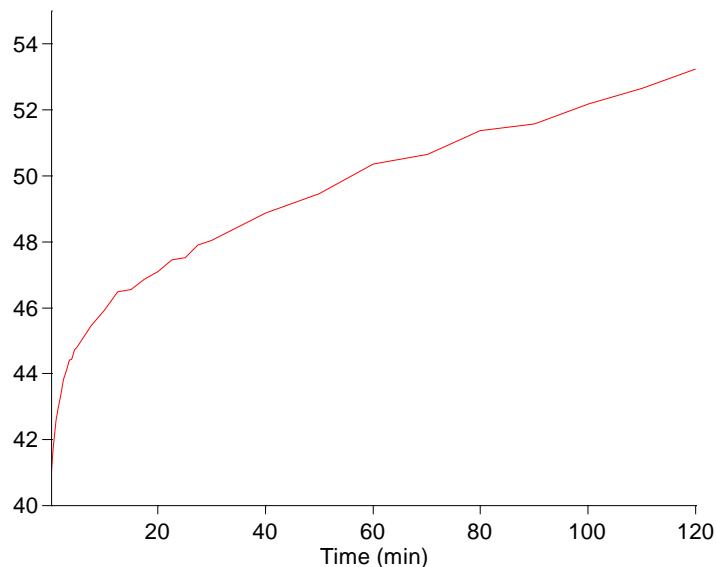
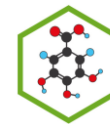


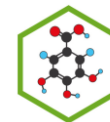
Figura 18. Medición por fluorometría del efecto de la pancreatina (2058 ppm)

4.2 Crecimiento de *Cándida albicans* y producción de Sap

El monitoreo realizado sobre el cultivo de *C. albicans* nos permitió visualizar el proceso de secreción de Sap, se pudo apreciar en los geles de electroforesis SDS-PAGE (Fig. 19 y 20) que durante las primeras 10 horas de crecimiento la banda correspondiente al BSA adicionado al medio de cultivo permaneció intacta, transcurridas 12 horas aparece una nueva banda que se infiere corresponde a Sap según el marcador de peso molecular, puesto que este grupo de enzimas tienen un masa molecular que abarca un rango entre 35 KDa a 50 KDa⁹⁶; más específicamente puede tratarse de Sap2 por su masa molecular de 41 KDa^{24,97}, además es la enzima que más se produce cuando *C. albicans* se cultiva en medios que contiene proteína como única fuente de nitrógeno^{24,25}. A partir de este tiempo ocurre una disminución en el tamaño de la banda de BSA, lo cual evidencia que a medida que se produce Sap, el BSA es hidrolizado.

Según los geles de electroforesis SDS-PAGE, la mayor producción de Sap se obtiene en un periodo de incubación comprendido entre 14 y 26 horas, muy similar a los hallazgos de Capobianco³³, quien muestra que los máximos niveles de enzima se encuentra entre las 10

GRUPO POLIFENOLES UTP



y 24 horas. El pH obtenido se encuentran entre 4.06 y 3.51 (Tabla 6), lo que coincide con el pH ácido óptimo reportado para Sap, el cual se encuentra entre 3,5 y 4,0⁹⁸.

Tiempo (h)	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
pH	5,13	4,90	4,65	4,06	3,86	3,68	3,65	3,55	3,53	3,51

Tabla 6. Valores de pH durante el periodo de incubación

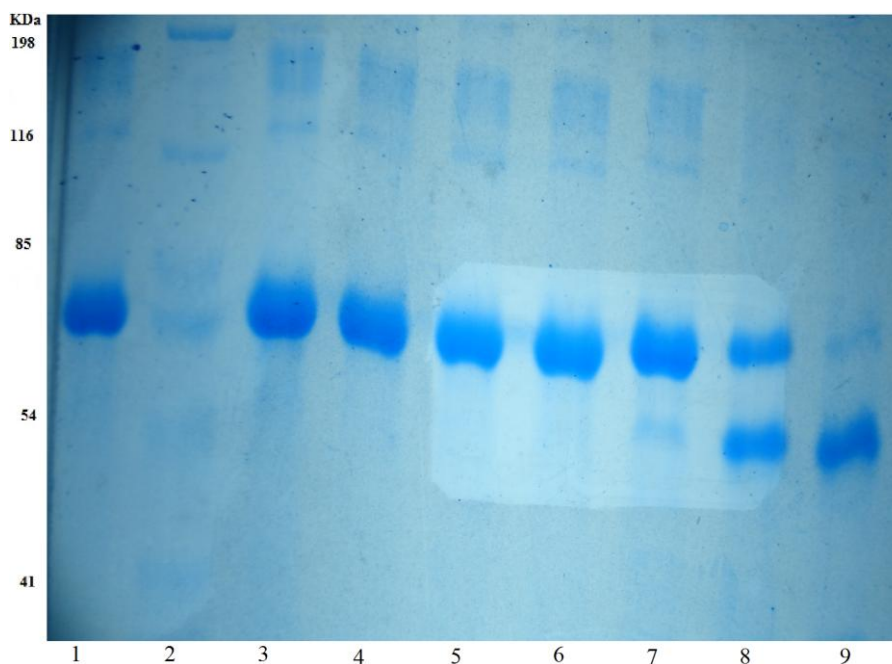


Figura 19. Gel de electroforesis obtenido en monitoreo de producción de Sap para las primeras 14 horas de crecimiento.

1, BSA 0.1 %; **2,** Marcador peso molecular(KDa); **3,** Sap 2 h; **4,** Sap 4 h; **5,** Sap 6 h; **6,** Sap 8 h; **7,** Sap 10 h; **8,** Sap 12 h; **9,** Sap 14 h.

GRUPO POLIFENOLES UTP

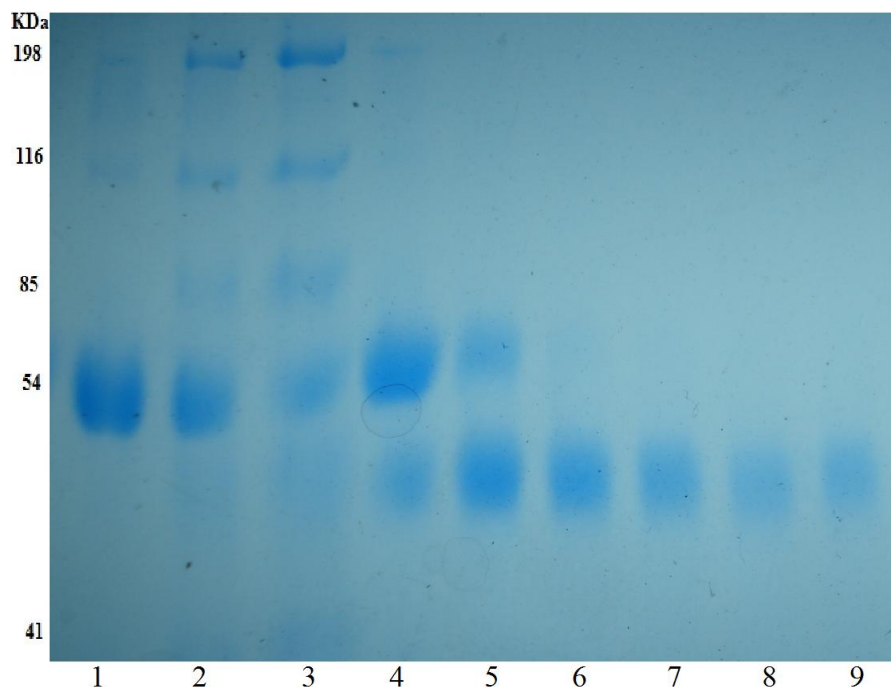
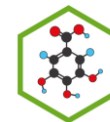


Figura 20. Gel de electroforesis obtenido en monitoreo de producción de Sap para un periodo comprendido entre 16 y 26 horas de crecimiento.

1, BSA 0.1 %; **2,** Marcador de peso molecular (KDa) 15 μ L; **3,** Marcador peso molecular (KDa) 20 μ L; **4,** Sap 16 h; **5,** Sap 18 h; **6,** Sap 20 h; **7,** Sap 22 h; **8,** Sap 24 h; **9,** Sap 26 h.

Con el objetivo de identificar los tiempos de retención a los que aparece cada uno de los picos característicos para el DMSO, BSA y Sap de *C. albicans* en la evaluación por HPLC, se realizaron mediciones de cada una de estas muestras por separado y se compararon en un cromatograma. Como resultado se obtuvo que el DMSO aparece a un tiempo de retención de 12.520, BSA 10.147 y Sap entre 10.827-11.833 (Fig. 21). Además se midió un cultivo de *C. albicans* con pepstatin A donde se verificó la inhibición de Sap, para el cual no se aprecian los picos característicos en el cromatograma (Fig. 21).

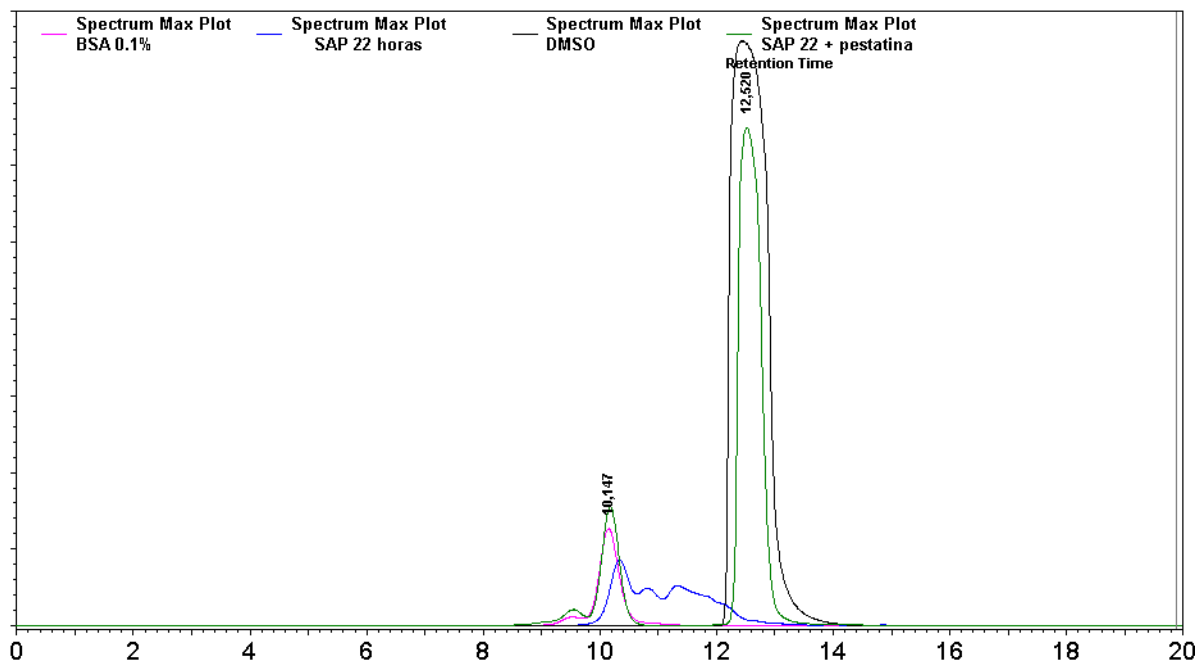
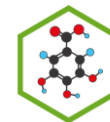
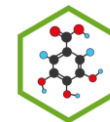


Figura 21. Determinación de tiempos de retención para el DMSO, BSA y Sap e inhibición de Sap, medido por HPLC

Aunque los geles de electroforesis muestran que la secreción de Sap comienza a partir de 12 horas de incubación, no se obtienen resultados similares en la evaluación por HPLC, donde se aprecia que el BSA comienza a degradarse transcurridas 6 horas de incubación como se muestra en la tabla 7. La sensibilidad de la técnica empleada juega un papel importante en la determinación de la cantidad de BSA que es degradado, por lo cual la técnica de HPLC presenta un menor límite de detección que el gel de electroforesis.

GRUPO POLIFENOLES UTP

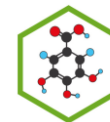


Tiempo	Tiempo de retención	Área	Concentración
0	10,17	4935296	0,114
2	10,17	4935296	0,114
4	10,17	4935296	0,114
6	10,17	3940424	0,091
8	10,17	3300467	0,077
10	10,17	3043130	0,071
12	10,17	2935431	0,068
14	10,17	2935431	0,068
16	10,17	2552882	0,06
18	10,17	2552882	0,06
20	10,17	2204761	0,052
22	10,17	1292440	0,031
24	10,17	887034	0,022
26	10,17	403120	0,011

Tabla 7. Degradación de BSA durante el tiempo de incubación, en medición por HPLC

La concentración de BSA en las mediciones por HPLC se calculó con base en una curva de calibración elaborada que se muestra en la figura 22. Los cromatogramas obtenidos en el monitoreo de la producción de Sap se muestran en los anexos 3-15.

GRUPO POLIFENOLES UTP



BSA (2: 210 nm, 4 nm)
 Average RF: 4,39854e+007 RF StDev: 3,48797e+006 RF %RSD: 7,92985
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)
 Fit Type: Linear
 $y = 4,41516e+007x - 80879,1$
 Goodness of fit (r^2): 0,999484

	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
Area	1242629	2046870	4141001	8767111	17615512
RF	49705160	40937400	41410013,33333	43835555	44038780
			33		
Last Area					
Residual	-0,00497642	0,00180815	0,00437772	-0,000400046	-0,000809398
Rep StDev		107315	56373,9	112026	100077
Rep %RSD		5,24287	1,36136	1,2778	0,568119
Rep 1 Area	1242629	1923556	4091195	8741914	17597271
Rep 2 Area		2097959	4202202	8889590	17723455
Rep 3 Area		2119095	4129607	8669829	17525810

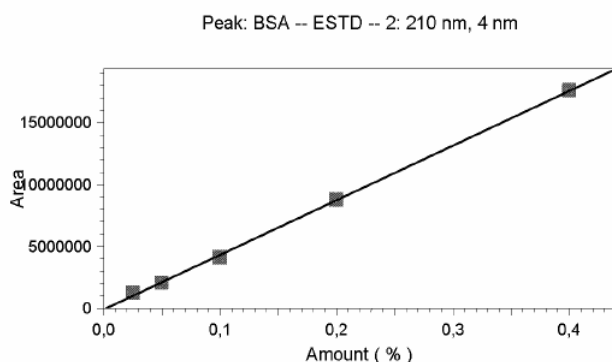
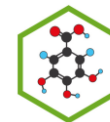


Figura 22. Curva de calibración obtenida para el BSA, medido por HPLC

Se realizó una comparación de los cromatogramas de 8, 14 y 26 horas (Fig. 23), para estudiar los cambios que se producen durante el periodo de incubación, se pudo corroborar que a medida que Sap es secretada (tiempo de retención: 10.967-12.573), la concentración de BSA (tiempo de retención: 10.147) disminuye, producto de la hidrólisis ocasionada por Sap, a mayor tiempo de incubación mayor es el pico de Sap obtenido en el cromatograma y menor el de BSA, lo que demuestra una relación directa entre el consumo de BSA en el medio de cultivo y la producción de Sap. Se puede observar también la aparición de nuevos picos de Sap cuanto mayor es el tiempo de incubación (anexos 3-15), los cuales podrían corresponder a las diferentes isoenzimas de Sap, lo que le da mayor valor a las mediciones



por HPLC ya que por electroforesis las diferentes isoenzimas no se logran definir por la proximidad de sus masas moleculares.

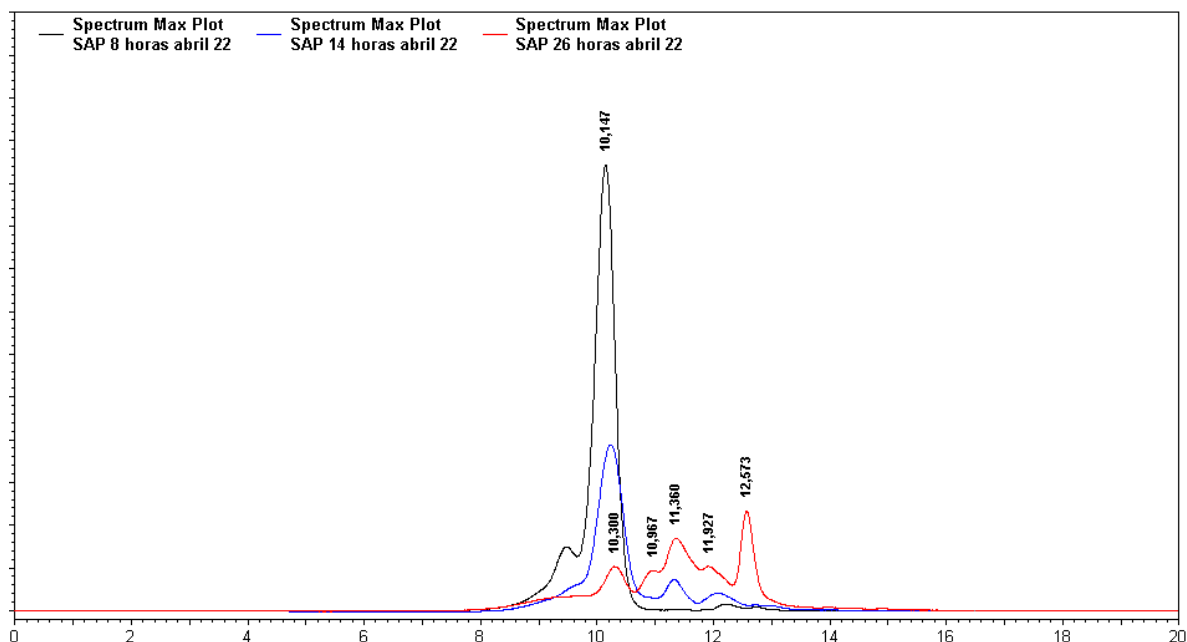


Figura 23. Expresión de Sap a diferentes tiempos de incubación, evaluado por HPLC

Una vez identificadas las muestras que presentaron mayor producción de Sap, las cuales corresponden a los tiempos de incubación de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 horas (Fig. 24), se procedió a evaluar por fluorimetría la cinética de la reacción durante 20 minutos y se calculó las pendientes de las curvas obtenidas para un rango entre 5 y 10 minutos (Tabla 8), de esta forma se determinó que Sap presenta mayor actividad a un tiempo de incubación de 22 horas con una pendiente de 0.5827. Por tanto se toma este tiempo como ideal para la evaluación de extractos.

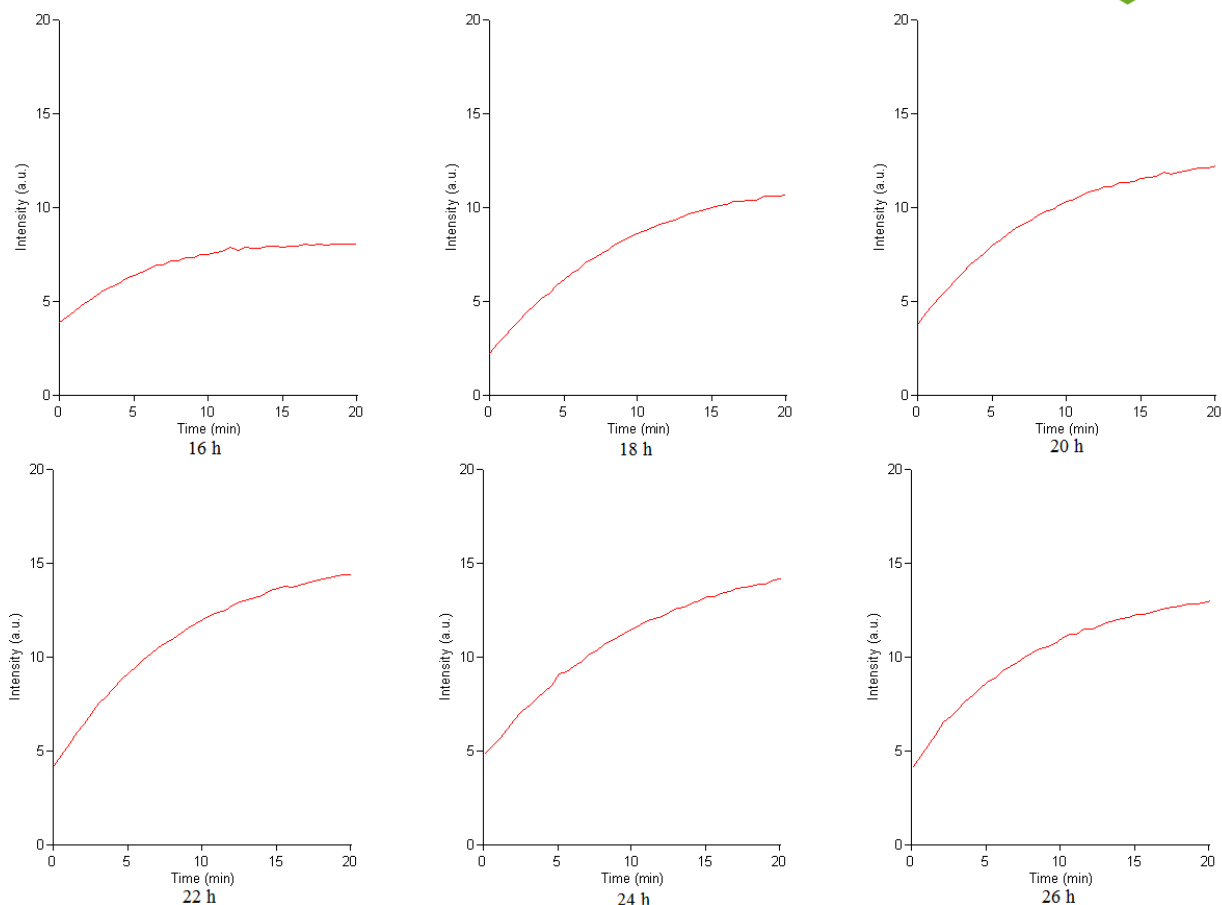
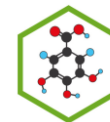


Figura 24. Medición de la actividad de Sap por fluorimetría a diferentes tiempos de incubación

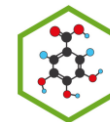
Tiempo (h)	16	18	20	22	24	26
Pendiente	0.2365	0.5003	0.4691	<u>0.5827</u>	0.5102	0.4636

Tabla 8. Cálculo de pendientes para las curvas obtenidas entre 16 y 26 horas en la evaluación por fluorimetría

4.3 Inhibición de producción de Sap

Como se evidencia en los geles de electroforesis SDS-PAGE (Fig. 25 y 26), pepstatin A presentó inhibición de Sap de *C. albicans* a todas las concentraciones ensayadas, muestra de ello es la no degradación del BSA y además no aparecen bandas de Sap. En los controles de producción de Sap el BSA fue completamente degradado. Se observó el mismo grado de

GRUPO POLIFENOLES UTP



inhibición para todas las concentraciones de pepstatin A ensayadas, por lo que se seleccionó la concentración de 100 μM para posteriores análisis.

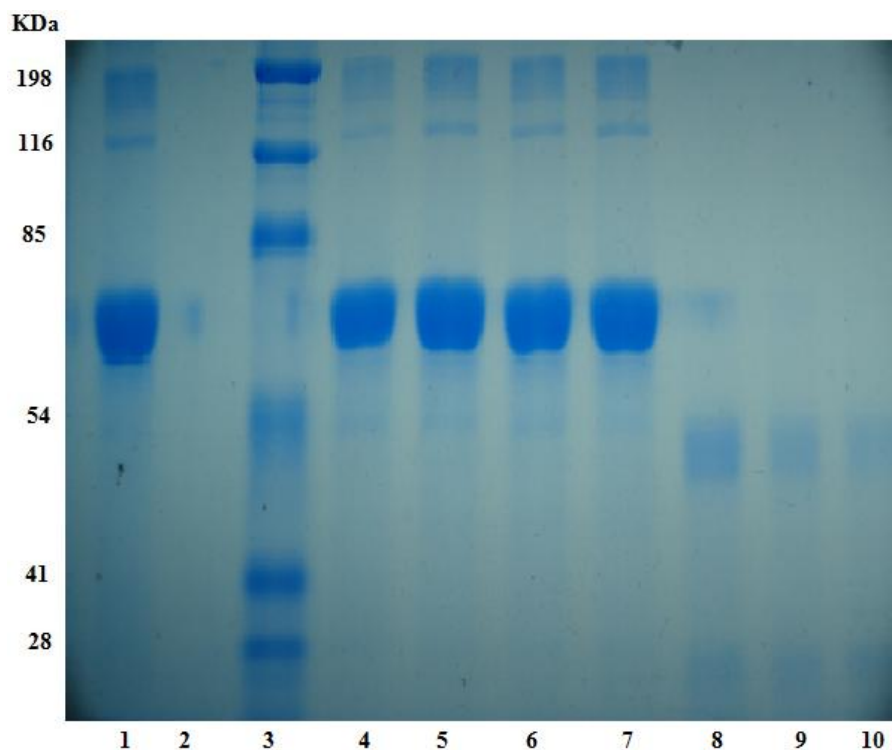


Figura 25. Gel de electroforesis para la evaluación del inhibidor pepstatin A
1. BSA 0.1 %, **2.** Pepstatin A (2000 μM), **3.** Marcador peso molecular,
4. *C. albicans* 18 h + pepstatin A (1000 μM), **5.** *C. albicans* 18 h + pepstatin A (500 μM),
6. *C. albicans* 18 h + pepstatin A (100 μM), **7.** *C. albicans* 18 h + pepstatin A (10 μM),
8. Sap 18 h, **9.** Sap 20 h, **10.** Sap 22 h

GRUPO POLIFENOLES UTP

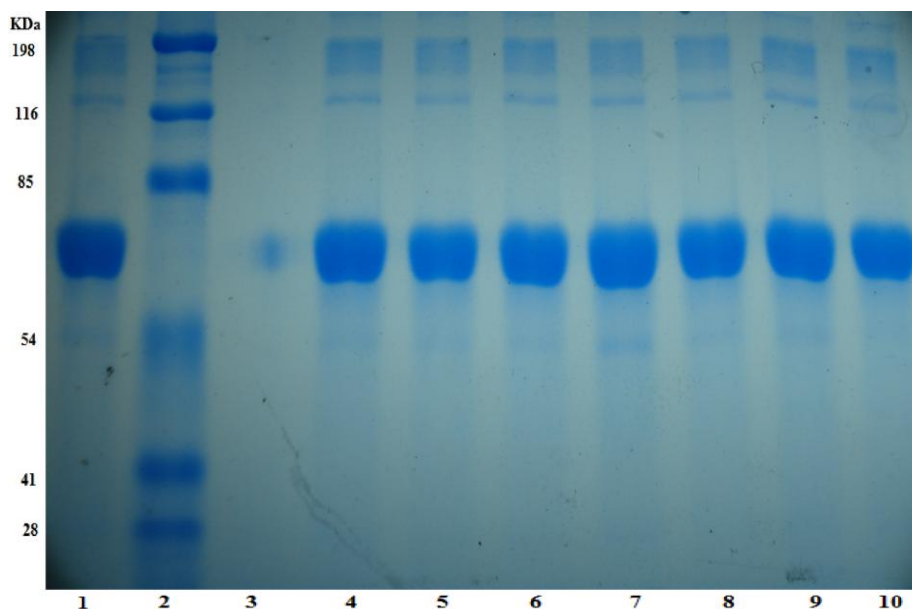
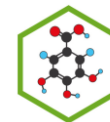


Figura 26. Gel de electroforesis para la evaluación del inhibidor pepstatin A
1. *C. albicans* 20 h + pepstatin A (1000 μ M), **2** Marcador peso molecular (KDa),
3. Pepstatin A 2000 μ M, **4.** *C. albicans* 20 h + pepstatin A (500 μ M), **5.** *C. albicans* 20 h +
pepstatin A (100 μ M), **6.** *C. albicans* 20 h + pepstatin A (10 μ M), **7.** *C. albicans* 22 h +
pepstatin A (1000 μ M), **8.** *C. albicans* 22 h + pepstatin A (500 μ M),
9. *C. albicans* 22 h + pepstatin A (100 μ M), **10.** *C. albicans* 22 h + pepstatin A (10 μ M)

Para observar el cambio en la señal que produce la inhibición de Sap en la evaluación por espectrofluorometría, se realizó una medición a un cultivo de 22 horas de incubación, en la que se aprecia un aumento constante de fluorescencia para el control de actividad (Fig. 27a), ya que Sap producida degrada la cadena de aminoácidos del BSA, permitiendo un aumento en la señal, en cambio al cultivo al que se le adicionó inhibidor la señal es baja (Fig. 27b), puesto que Sap fue inhibida por pepstatin A, logrando que no haya hidrólisis de BSA, se puede cuantificar con la obtención de las pendientes de las curvas (Tabla 9).

GRUPO POLIFENOLES UTP

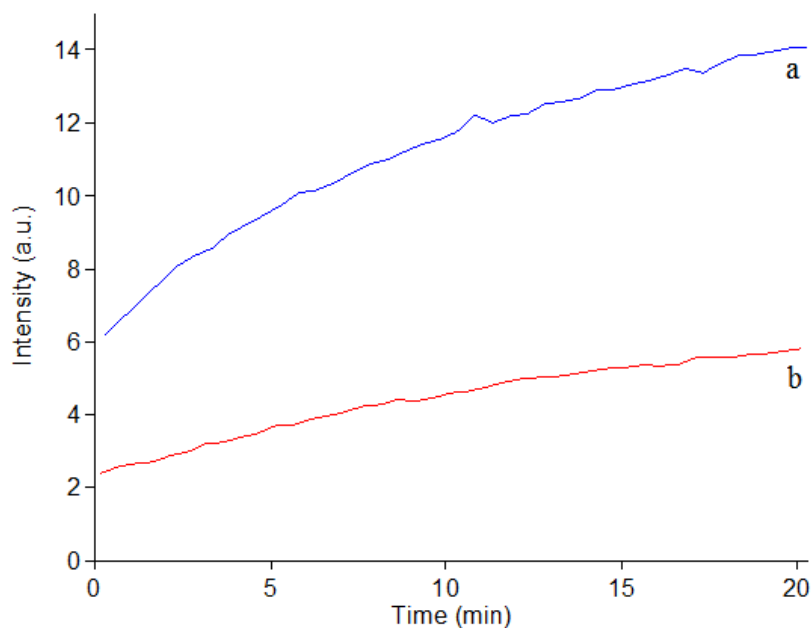
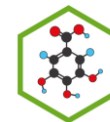
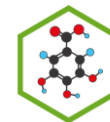


Figura 27. Efecto de pepstatin A evaluado por fluorimetría. **a.** Sap 22 horas incubación sin inhibidor, **b.** Sap 22 horas incubación con pepstatin A 100 μM .

	Pendiente (m)
Sap + Pepstatin A 100 μM	0,1844
Sap	0,4027

Tabla 9. Pendientes obtenidas para las curvas de medición de Sap a 22 horas de incubación con y sin inhibidor pepstatin A, por fluorimetría.

En todos los casos Sap fue inhibida por pepstatin A, estos resultados confirman la información publicada previamente para pepstatin A⁹⁹; al observar los resultado obtenidos por electroforesis SDS-PAGE y fluorimetría, es evidente que la presencia de Sap se encuentra estrechamente relacionada con la degradación de BSA, por lo que la no hidrólisis de BSA indica inhibición de Sap.



4.4 Hidrólisis de Sap en medio de hemoglobina (Hb)

El método alternativo utilizando medio de hemoglobina, permitió visualizar zonas claras de hidrólisis producto de la ruptura de la hemoglobina ocasionada por la acción de las proteasas secretadas⁹⁵, se puede apreciar también que cuando Sap es inhibida no se evidencia zona de hidrólisis. Esta metodología se emplea para corroborar la producción e inhibición de Sap.

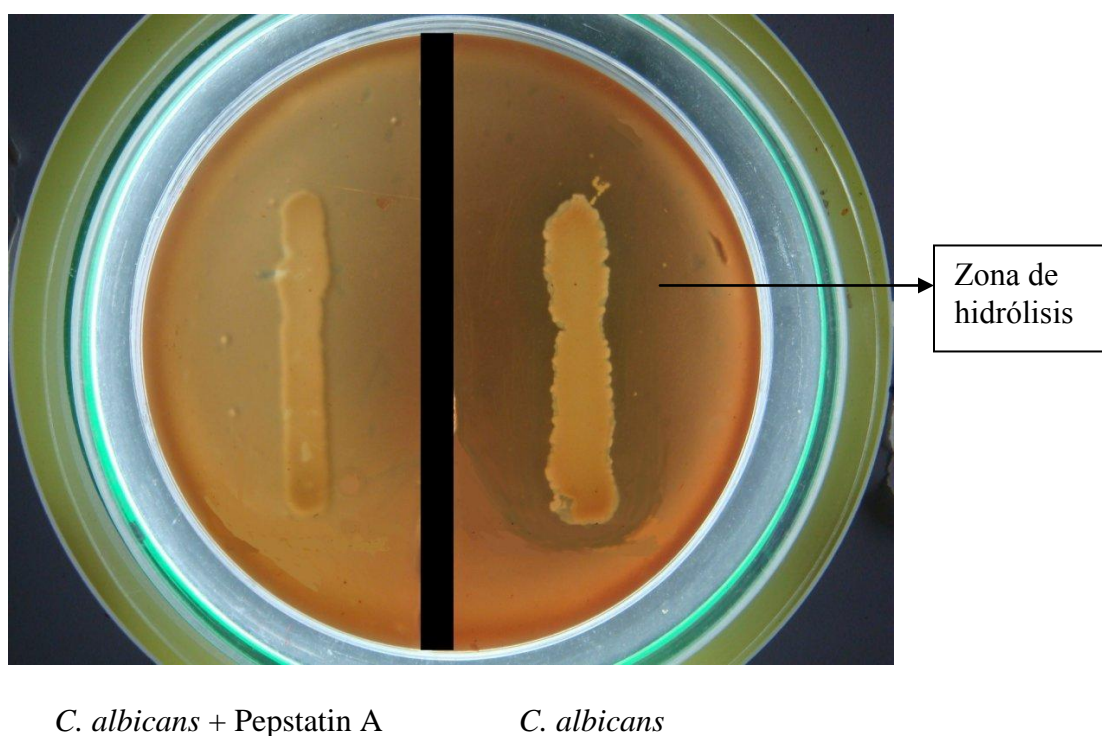
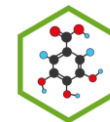
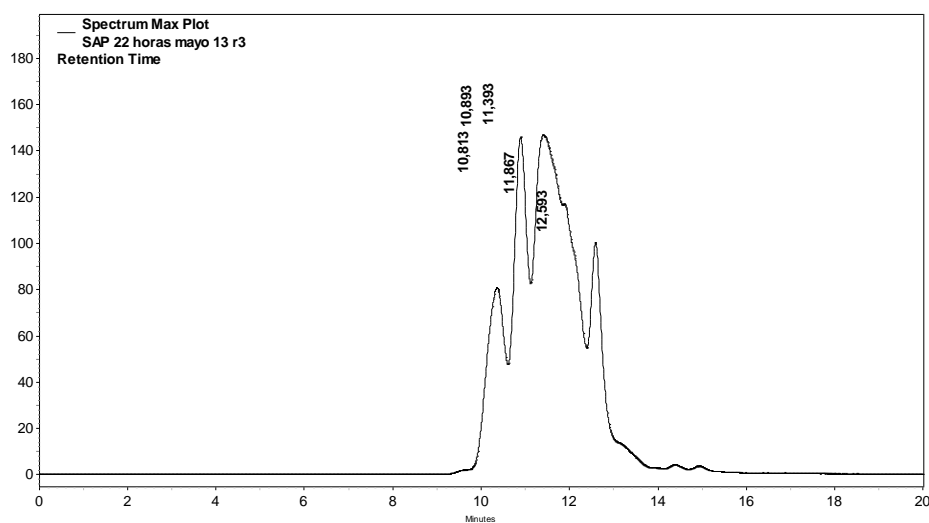


Figura 28. Hidrólisis producida por Sap de *Cándida albicans* (derecha) e inhibición de Sap por parte de pepstatin A (izquierda)



4.5 Evaluación de extractos

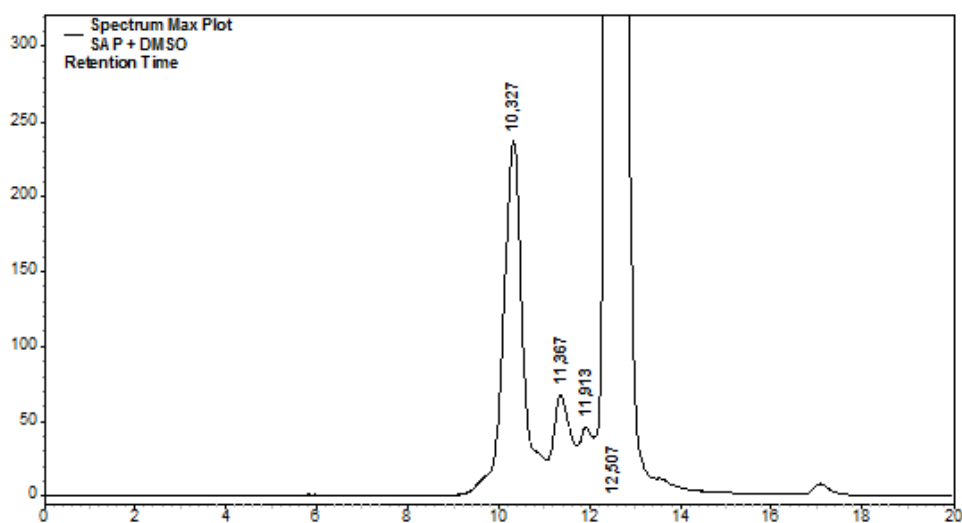
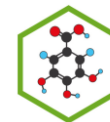
El DMSO utilizado para disolver los extractos, se evaluó sobre un cultivo de *C. albicans* para comprobar que no inhibiera la producción de Sap, para ello se midió una muestra de un cultivo de 22 horas de incubación al que se le adicionó DMSO al 30 % y su respectivo control utilizando HPLC. Se comprobó que tanto la muestra como su control presentaron la misma concentración de BSA final (Fig. 29-30), por lo que el DMSO no inhibió Sap y es apropiado para la disolución de los extractos.



Nombre	Tiempo de retención	Área	Concentración
BSA	10,17	667436	0.017

Figura 29. Cromatograma de Sap de *Cándida albicans*

GRUPO POLIFENOLES UTP



Nombre	Tiempo de retención	Área	Concentración
BSA	10,17	667436	0.017

Figura 30. Cromatograma de Sap de *Cándida albicans* + DMSO

Posteriormente se realizó la evaluación de los extractos empleando los métodos de electroforesis SDS-PAGE, HPLC y espectrofluorometría, obteniéndose inhibición para los extractos acuosos de *Polycurea lirystipula* y *Miconia coronata* y butanólicos de *Polycurea lirystipula* y *Clidemia hirta*, en todos los métodos estudiados.

La inhibición para los extractos con actividad positiva se aprecia en los geles de electroforesis SDS-PAGE (Fig. 31 y 32) con la poca hidrólisis de BSA y la no aparición de bandas de Sap, lo que es comparable con el resultado del control con pepstatin A. Mayor claridad muestran los resultados obtenidos en los cromatogramas de la evaluación por HPLC (Fig. 33-36), para los cuales se aprecia que hubo inhibición de Sap cuando se compara con el control de producción. Los cromatogramas de los demás extractos se encuentran en los anexos 19 a 27.

GRUPO POLIFENOLES UTP

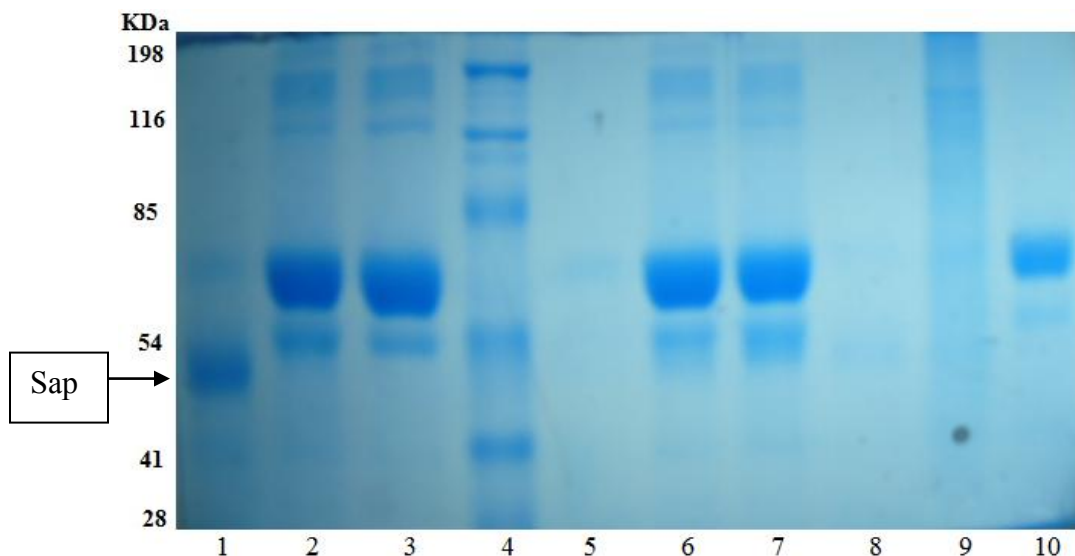
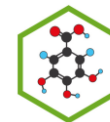


Figura 31. Gel de electroforesis para la evaluación de extractos

1. Sap ,
2. *C. albicans* + pepstatin A 100 μ M,
3. BSA0.1 %,
4. Marcador peso molecular (KDa),
5. *Miconia coronata* EtOAc,
6. *Polycurea lirystipula* acuoso,
7. *Polycurea lirystipula* butOH,
8. *Clidemia hirta* acuoso,
9. *Clidemia hirta* etOH,
10. *Clidemia hirta* butOH

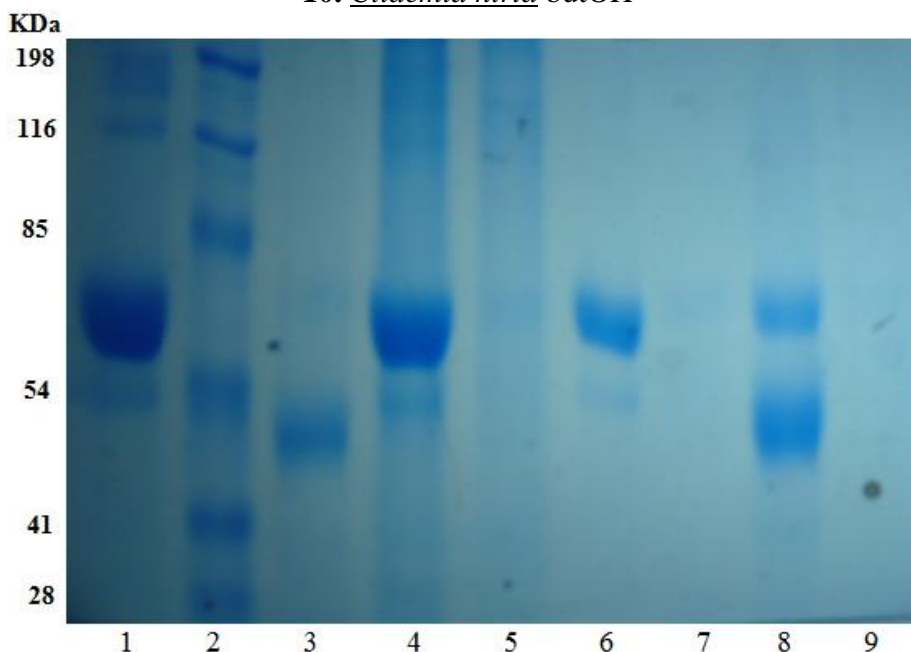


Figura 32. Gel de electroforesis para la evaluación de extractos

1. BSA 0.1 %,
2. Marcador peso molecular (KDa),
3. Sap,
4. Sap + pepstatin A 100 μ M,
5. *Clidemia hirta* etOH,
6. *Clidemia hirta* butOH,
7. *Miconia coronata* butOH,
8. *Miconia coronata* acuoso,
9. *Miconia coronata* EtOAc

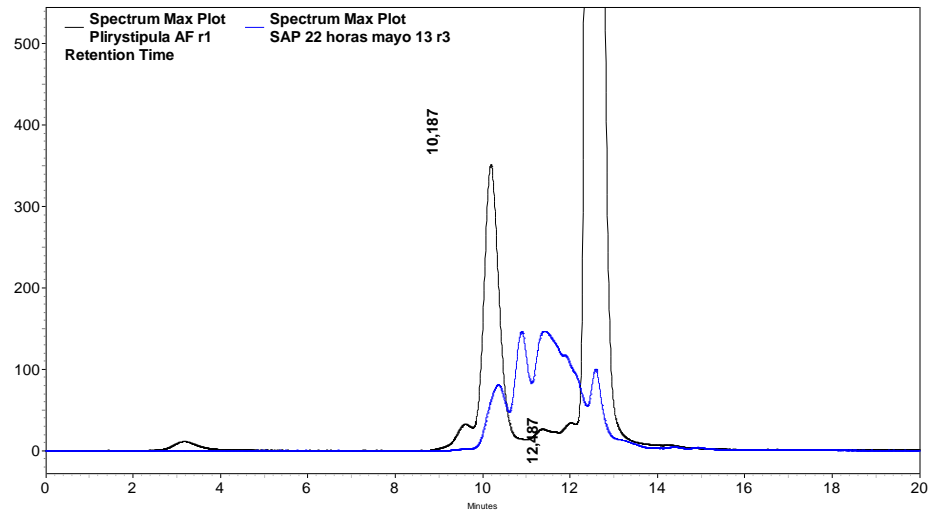
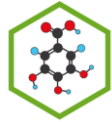


Figura 33. Evaluación por HPLC del extracto de *Polycurea lirystipula* acuoso contra Sap de *Cándida albicans*.

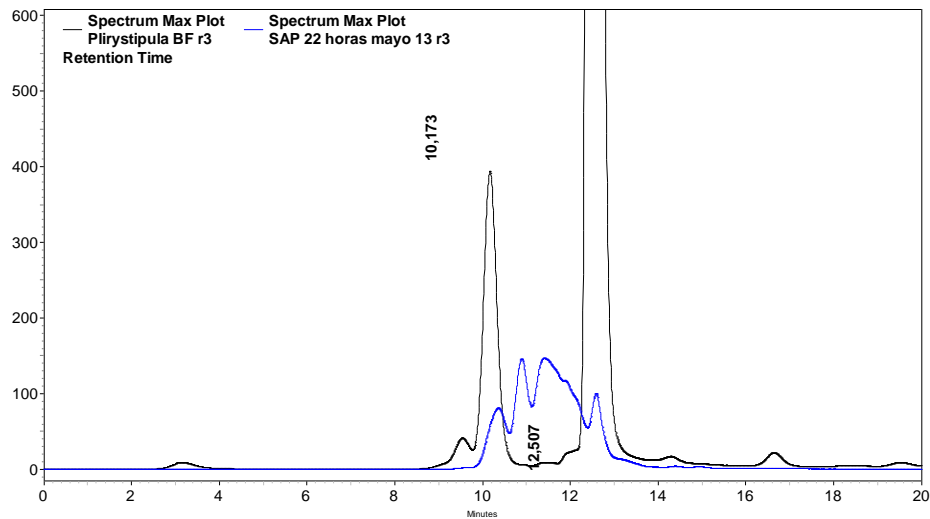


Figura 34. Evaluación por HPLC del extracto de *Polycurea lirystipula* butanólico contra Sap de *Cándida albicans*.

GRUPO POLIFENOLES UTP

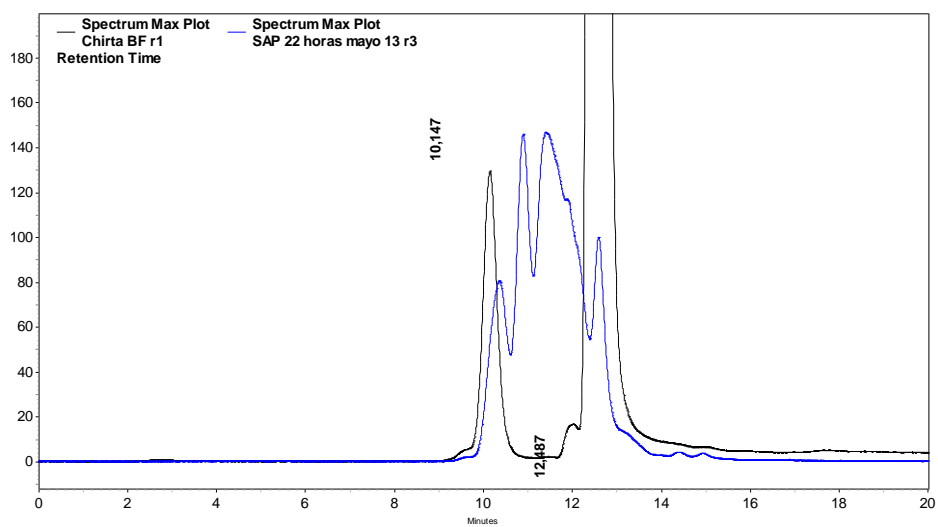
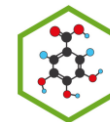


Figura 35. Evaluación por HPLC del extracto de *Clidemia hirta* butanólico contra Sap de *Cándida albicans*.

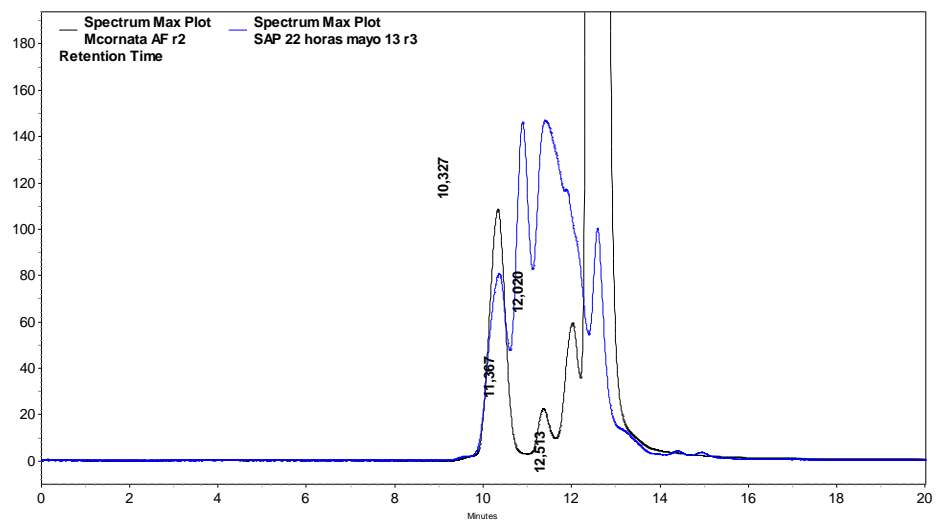
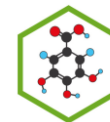


Figura 36. Evaluación por HPLC del extracto de *Miconia coronata* acuoso contra Sap de *Cándida albicans*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Se puede realizar un cálculo aproximado de inhibición, tomando como base la concentración de BSA que se obtiene de la medición, para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \{(BSA_{\text{ext}} - BSA_{\text{Sap}}) / (BSA_{\text{pepst}} - BSA_{\text{Sap}})\} * 100$$

	<i>C. hirta</i>		<i>M. Coronata</i>		<i>P. lirystipula</i>	
	Sap	Pepstatin A	butOH	Acuoso	Acuoso	butOH
% BSA	0,017	0,103	0,045	0,042	0,107	0,109
% Inhibición			67,44	70,93	104,65	106,98

Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los extractos evaluados por HPLC

Los extractos acuoso y etanólico de *Clidemia hirta*, butanólico y en acetato de etilo de *Miconia coronata*, no muestran señal de producción o inhibición de Sap, esto posiblemente se debe a la presencia de taninos en los extractos, los cuales precipitan las proteínas, por lo que no se aprecia el pico de BSA en los cromatogramas (Fig. 37) y tampoco en los geles de electroforesis se aprecia la banda de BSA.

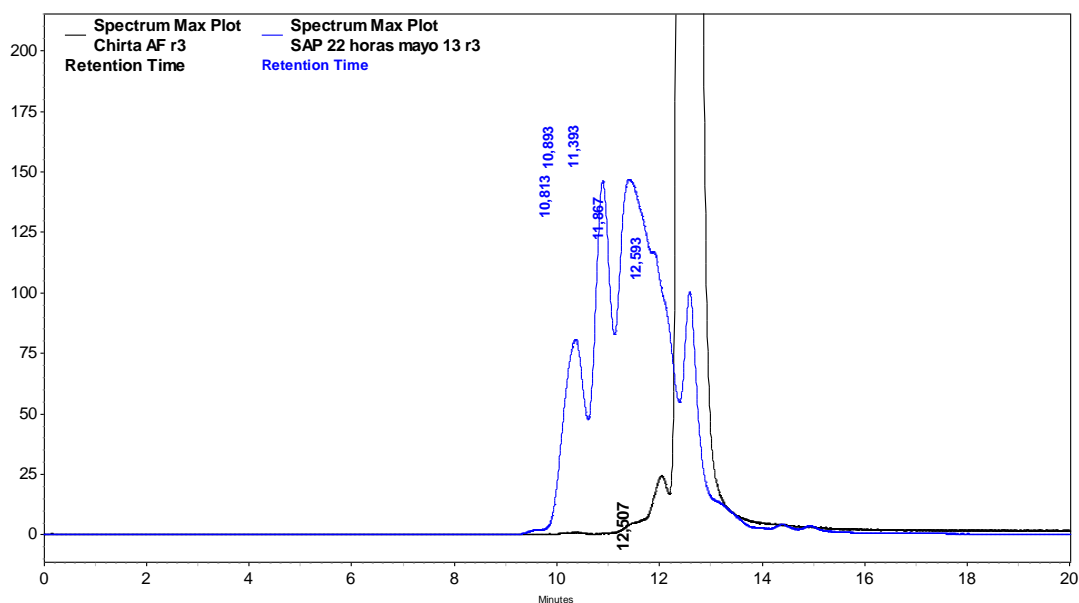
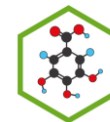


Figura 37. Cromatograma de Sap 22 horas + ChAF en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,17	0	0,000

GRUPO POLIFENOLES UTP



En la evaluación de los extractos por fluorimetría, se realizaron las mediciones para Sap sola (Fig. 38), Sap con inhibidor (Fig. 39), y Sap con los extractos, donde se observa el aumento de la señal que presenta la Sap y la disminución de esta por parte de la Pepstatin A y del extracto butanólico de *Clidemia hirta* (Fig. 40), esta disminución de señal es debida a la acción que presenta tanto el inhibidor como los extractos, los cuales fueron los mismos de la electroforesis y HPLC; el grafico del extracto butanólico de *Clidemia hirta*, es muy similar a la curva obtenida con el inhibidor pepstatin A. Las curvas obtenidas para los demás extractos se encuentran en los anexos 16-18.

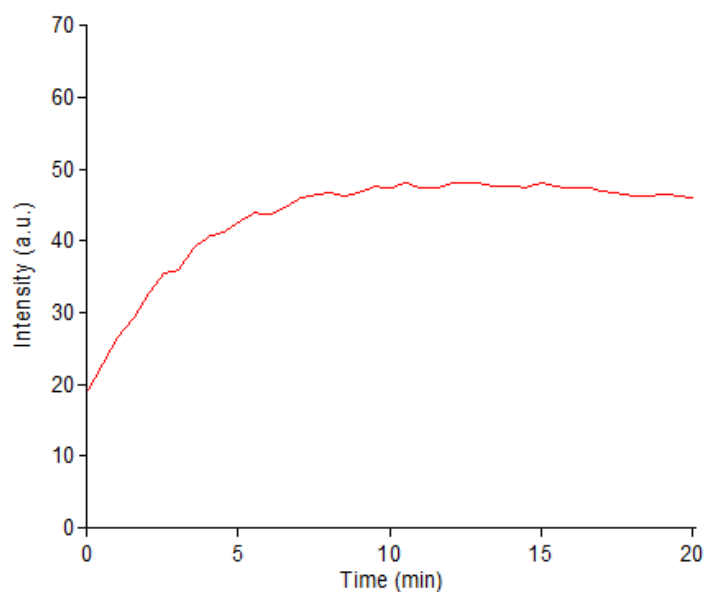


Figura 38. Medición por fluorimetría de Sap

GRUPO POLIFENOLES UTP

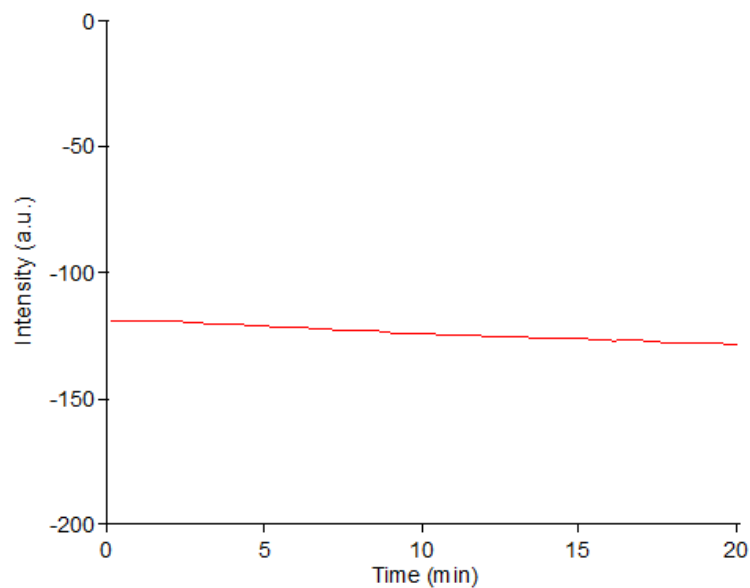
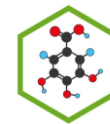


Figura 39. Medición por fluorimetría de Sap con pepstatin A

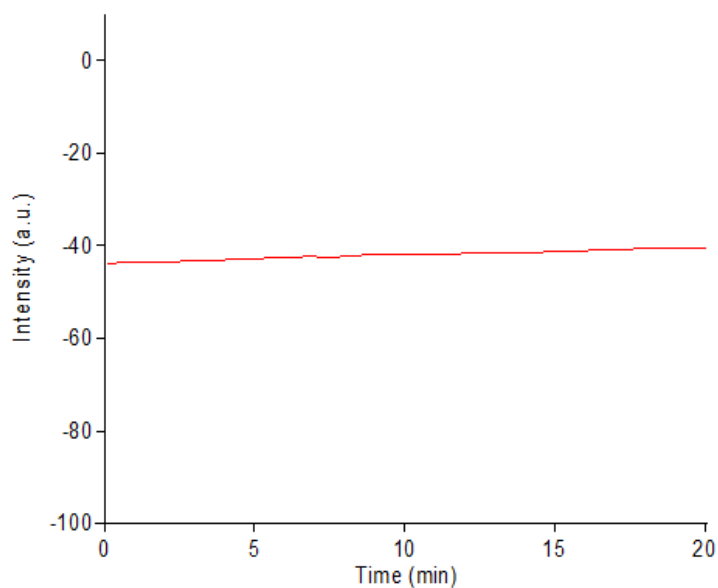
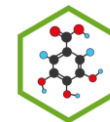


Figura 40. Medición por fluorimetría de Sap con extracto *Clidemia hirta* ButOH

Todas las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados de las pendientes de las curvas para los extractos con actividad positiva se muestran en la tabla 11, se realizó un cálculo aproximado de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \{(m_{\text{ext}} - m_{\text{Sap}}) / (m_{\text{pepst}} - m_{\text{Sap}})\} * 100$$



Dónde m es la pendiente, calculada para la curva comprendida entre un rango de medición de 5 a 10 minutos.

			<i>C. hirta</i>	<i>M. Coronata</i>	<i>P. lirstipula</i>	<i>P. lirstipula</i>
	Sap	Pepstatin A	butOH	Acuoso	Acuoso	butOH
	1,0245	-0,645	0,1578	0,0472	-0,1509	-0,2289
	0,9495	-0,6358	0,1606	0,0677	-0,1047	-0,2056
Prom (m)	0,987	-0,6404	0,1592	0,05745	-0,1278	-0,21725
Desvest	0,05303	0,00650	0,00197	0,01449	0,03266	0,01647
% RSD	5,37315	-1,01583	1,24365	25,23183	-25,56207	-7,58369
% Inhibición			50,87	57,12	68,50	73,99

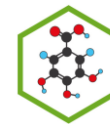
m = Pendiente de la curva

Tabla 11. Porcentajes de inhibición de los extractos evaluados por fluorometría

Los resultados de las mediciones realizadas por fluorometría y HPLC, muestran que los extractos de *Polycurea lirstipula* fueron los más promisorios contra Sap de *C. albicans*, por los altos porcentajes de inhibición hallados.

Para los extractos evaluados no se tienen reportes sobre los perfiles quimiotaxómicos, sin embargo algunos estudios demuestran que compuestos aislados de plantas Melastomatácea como matucinol-7-*O*-[4'',6''-di-*O*-(*S*)-hexahidroxiidifenoi]-β- D-glucopiranosido y ácido elágico presentan inhibición de proteasa aspártica secretada por *Candida albicans*. Es posible que estos compuestos también estén presentes en las plantas evaluadas y son los responsables de la inhibición de Sap, así como pueden existir otros que no se han identificado y poseen actividad inhibitoria.

El perfil quimiotaxonómico de las plantas Rubiaceae ha sido poco estudiadas, trabajos realizados en la Universidad Tecnológica de Pereira revelan que la especie *Palicourea angustifolia* reportan un contenido moderado de alcaloides y taninos, ausencia de esteroides y triterpenos y un alto contenido en saponinas. Compuestos de este tipo pueden estar presentes en los extractos de Rubiaceae evaluados, de ser así son potentes inhibidores de Sap.



5. CONCLUSIONES

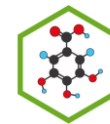
La aplicación de la técnica espectrofluorométrica estandarizada para la evaluación de Sap, hace posible el estudio de un amplio número de muestras como posibles inhibidores en poco tiempo.

Para la evaluación de los extractos, se determinó que un periodo de incubación de 22 horas era apropiado, ya que se obtiene buena producción de Sap según las condiciones estandarizadas y se detecta fácilmente con el empleo de todas las metodologías descritas.

Con el uso de diferentes metodologías se obtuvo mayor certeza en cuanto a los resultados de inhibición, obteniendo siempre los mismos resultados de los extractos, aunque con algunas diferencias en cuanto al grado de inhibición, en parte debido a las diferencias de sensibilidad entre las técnicas utilizadas, siendo la evaluación por HPLC las de preferencia por su alta selectividad y reproducibilidad, así como por su límite de detección muy bajo.

Los resultados obtenidos mostraron que Sap fue inhibida por los extractos acuosos de *P. lirstipula* Wern L. y *M. coronata*, y los extractos butanólicos de *P. lirstipula* Wern L. y *C. hirta* (L.) D. Don., siendo los extractos de *P. lirstipula* los más promisorios.

Aunque no se tienen reportes de evaluación de extractos de la familia Rubiácea sobre actividad anti-sap, de estos se obtuvieron los más altos porcentajes de inhibición, lo que hace de esta familia un importante foco de estudio contra esta actividad.

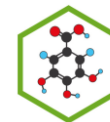


6. RECOMENDACIONES

Realizar un fraccionamiento bioguiado a los extractos de las especies que dieron actividad positiva para identificar las fracciones de mayor actividad y posteriormente realizar un estudio quimiotaxonómico para identificar posibles compuestos responsables de la inhibición.

Debido a los altos porcentajes de inhibición obtenidos por los extractos de *P. lirystipula* Wern L. perteneciente a la familia Rubiácea, se hace interesante un estudio de otras especies pertenecientes a esta familia de plantas en la evaluación anti-sap.

Realizar ensayos de otras actividades biológicas para los extractos ensayados en este estudio, ya que también se conocen reportes sobre actividad ictiotóxica de extractos de *P. lirystipula* Wern L. y *C. hirta* (L.) D. Don.



ANEXOS

Anexo 1. Protocolo SDS-PAGE

- Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)

87.6 g acrilamida (29.2 g/100 mL)
2.4 g N'N'-bis-metileno-acrilamida (0.8 g/100 mL)

Mezclar con 300 mL de agua bidestilada, filtrar y almacenar a 4 °C en la oscuridad.

- SDS al 10%

Disolver 10 g de SDS en 90 mL de agua, agitando suavemente y llevar a 100 mL con agua bidestilada.

- Tampón para el gel separador, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

27.23 g Tris base (18.15 g/100 mL)
80 ml agua bidestilada
Ajustar el pH 8.8 con HCl al 6 N. Llevar a un volumen total de 150 mL con agua bidestilada y almacenar a 4 °C.

- Tampón para el gel concentrador, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

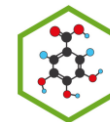
6 g Tris base
60 mL agua bidestilada
Ajustar el pH 6.8 con HCl 6 N. Llevar a un volumen total de 100 mL con agua bidestilada y almacenar a 4 °C.

- Tampón de muestra

3.55 mL agua bidestilada
1.25 mL 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
2.5 mL glicerol
2.0 mL 10% SDS
0.2 mL 0.5% Azul de bromofenol

Almacenar a temperatura ambiente, al momento de usar, agregar 50 µL de β-mercaptoetanol a 950 µL de tampón de muestra.

GRUPO POLIFENOLES UTP



- Tampón de corrida, pH 8.3

30.3 g Tris base
144 g glicina
10 g SDS

Disolver y llevar a un volumen total de 1 L con agua bidestilada. Almacenar a 4 °C. Al momento de usar, diluir 50 mL de la solución stock con 450 mL de agua bidestilada.

- Persulfato de amonio APS al 10%

A 100 mg de persulfato de amonio, disolverlo en 1 mL de agua bidestilada.

- Gel separador al 10%

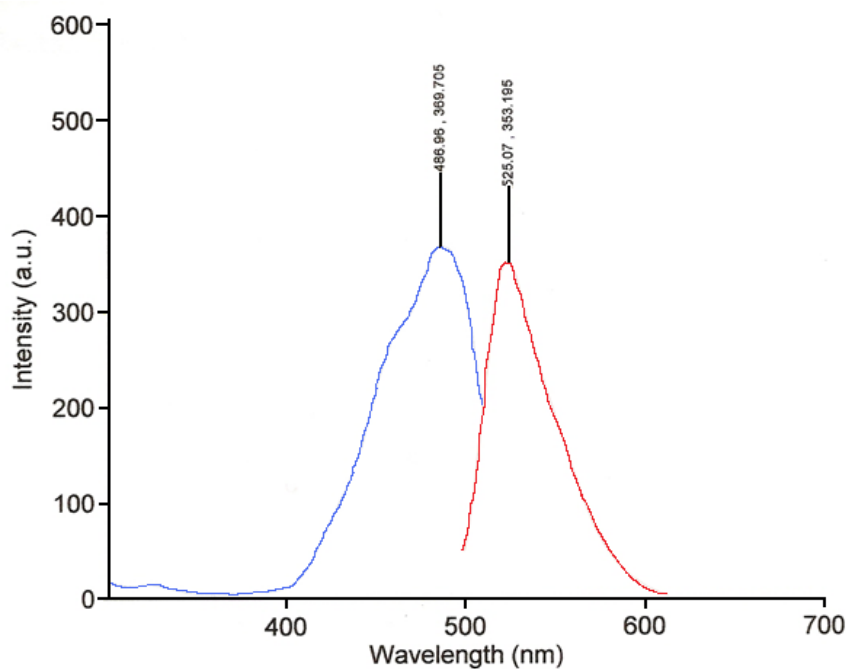
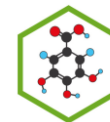
4.1 mL de agua bidestilada
3.3 mL de acrilamida/bis
2.5 mL de 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
0.1 mL de SDS 10%

- Gel concentrador al 4%

6.1 mL de agua bidestilada
1.3 mL de acrilamida/bis
2.5 mL de 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
0.1 mL de SDS 10%

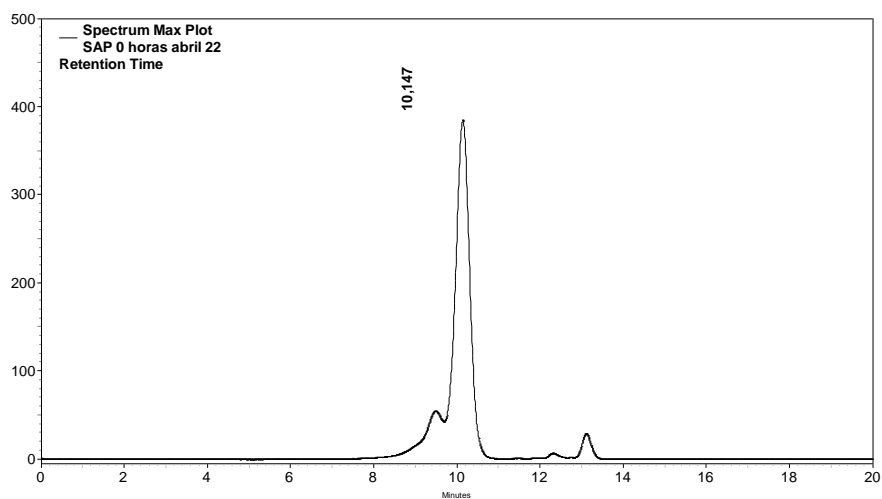
Al mezclar cada compuesto para cada gel, se adiciona, para el gel separador 50 μ L de APS 10% y 5 μ L de TEMED y para el gel concentrador 50 μ L de APS 10% y 10 μ L de TEMED.

GRUPO POLIFENOLES UTP



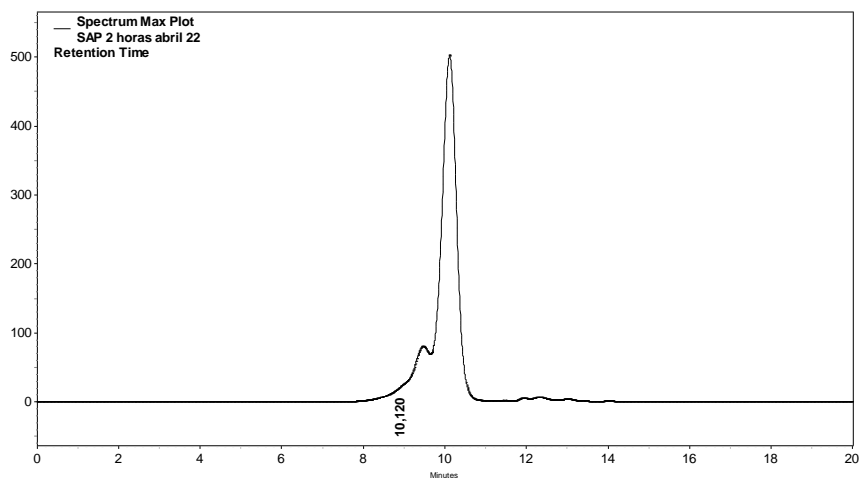
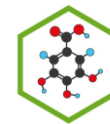
Anexo 2. Longitudes de onda máximas de excitación y emisión halladas mediante un barrido espectral para el fluorexón

Monitoreo Sap - HPLC

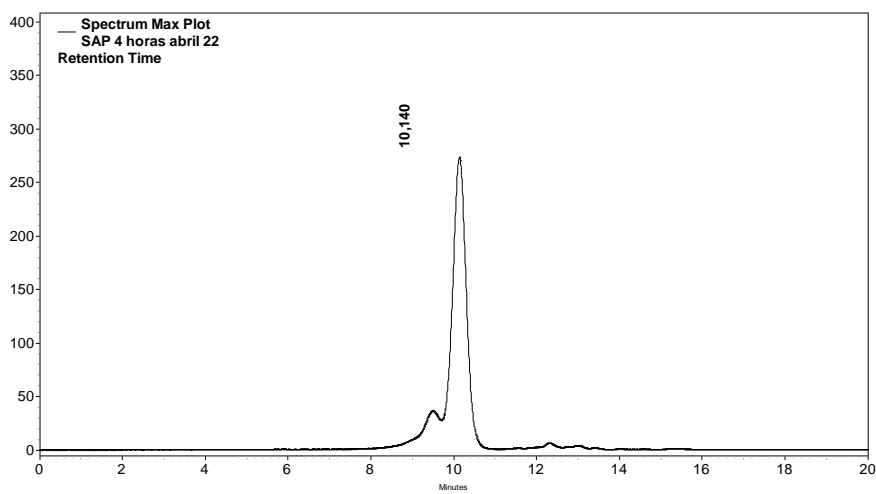


Anexo 3. Cromatograma de Sap 0 horas en max plot

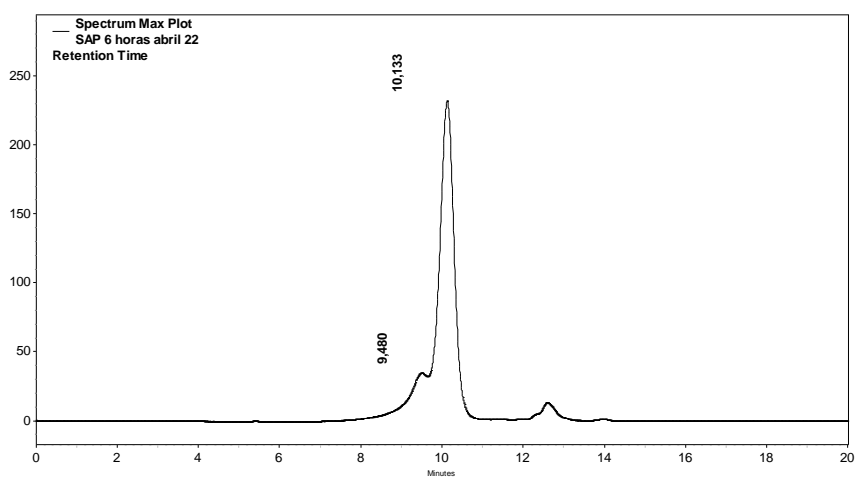
GRUPO POLIFENOLES UTP



Anexo 4. Cromatograma de Sap 2 horas en max plot

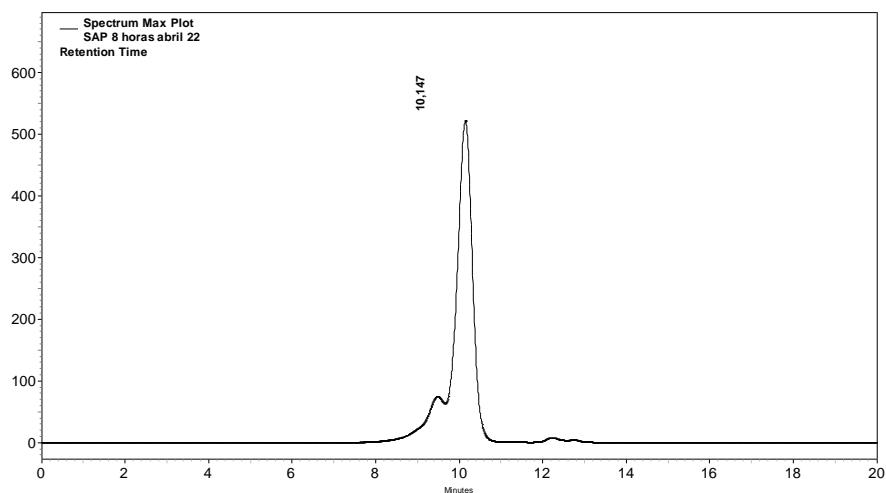
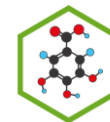


Anexo 5. Cromatograma de Sap 4 horas en max plot

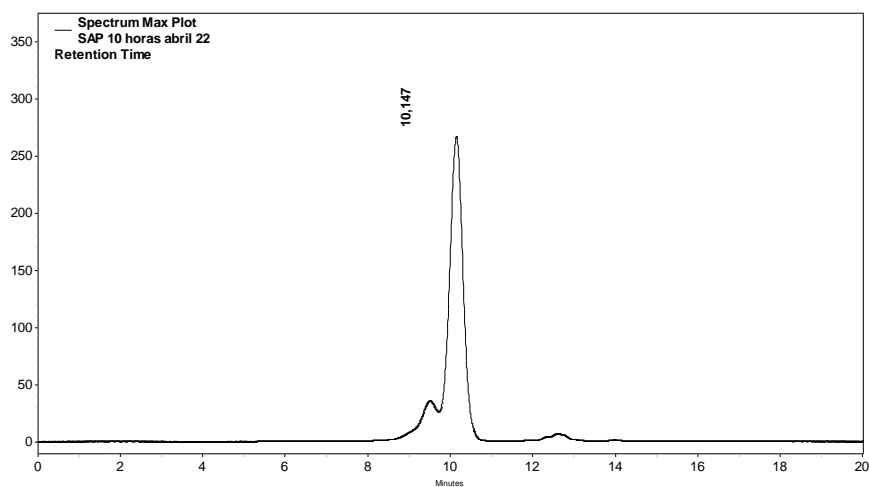


Anexo 6. Cromatograma de Sap 6 horas en max plot

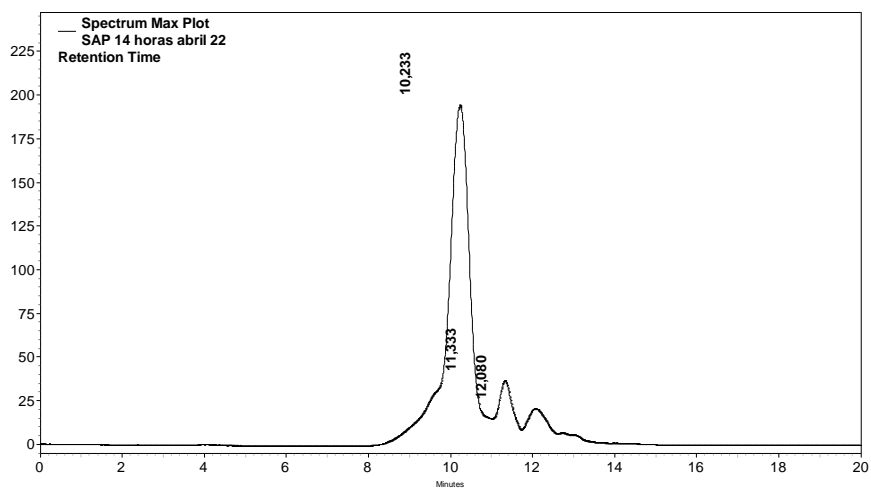
GRUPO POLIFENOLES UTP



Anexo 7. Cromatograma de Sap 8 horas en max plot

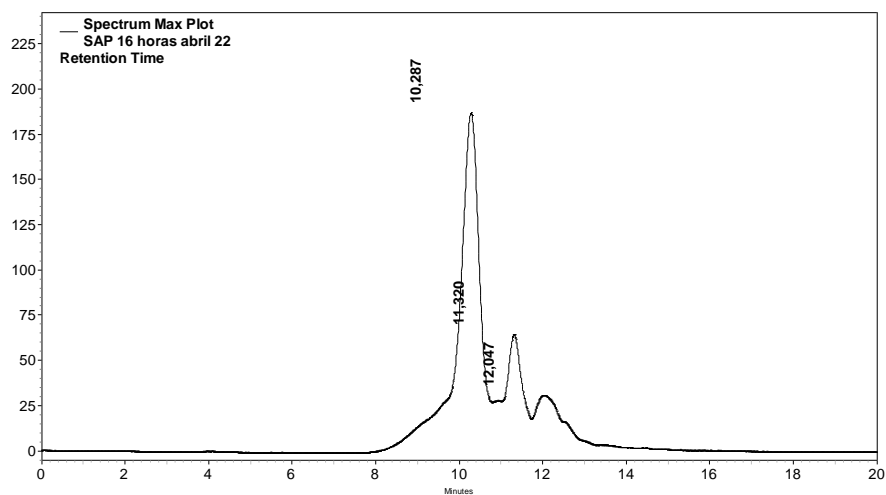
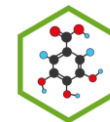


Anexo 8. Cromatograma de Sap 10 horas en max plot

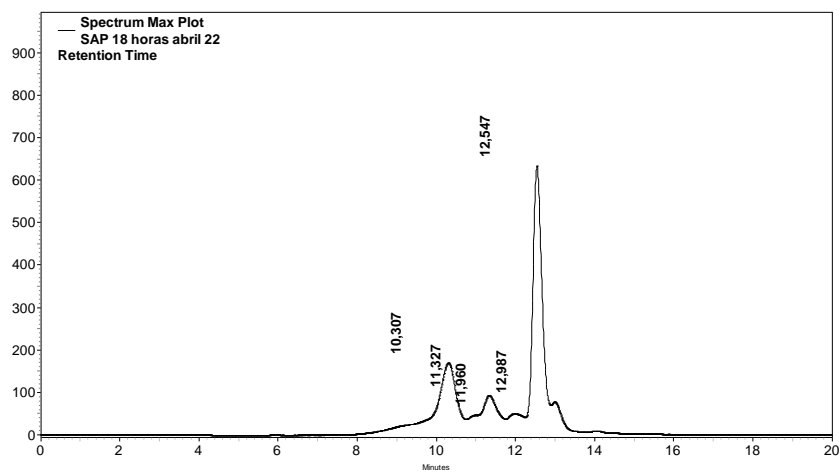


Anexo 9. Cromatograma de Sap 14 horas en max plot

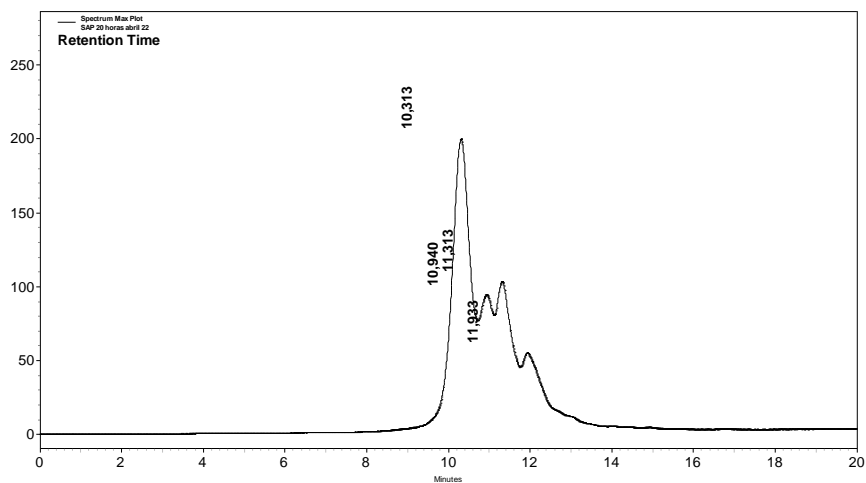
GRUPO POLIFENOLES UTP



Anexo 10. Cromatograma de Sap 16 horas en max plot

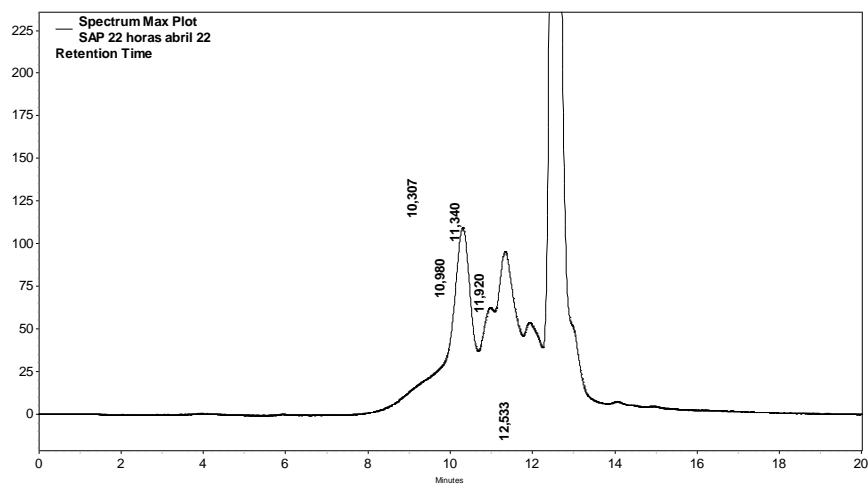
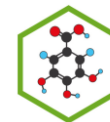


Anexo 11. Cromatograma de Sap 18 horas en max plot

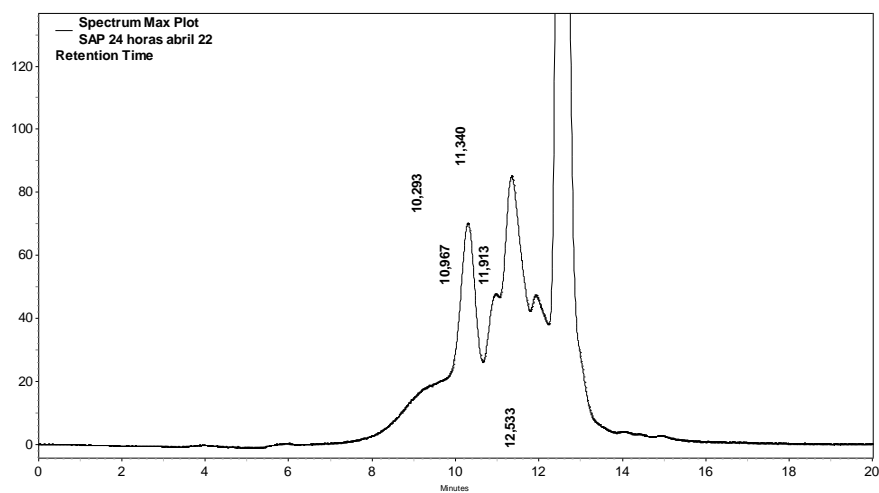


Anexo 12. Cromatograma de Sap 20 horas en max plot

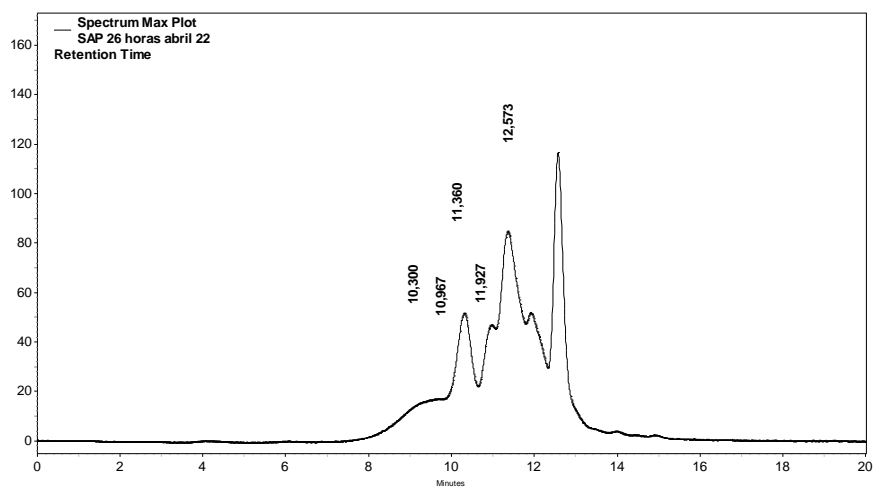
GRUPO POLIFENOLES UTP



Anexo 13. Cromatograma de Sap 22 horas en max plot

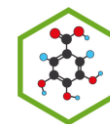


Anexo 14. Cromatograma de Sap 24 horas en max plot

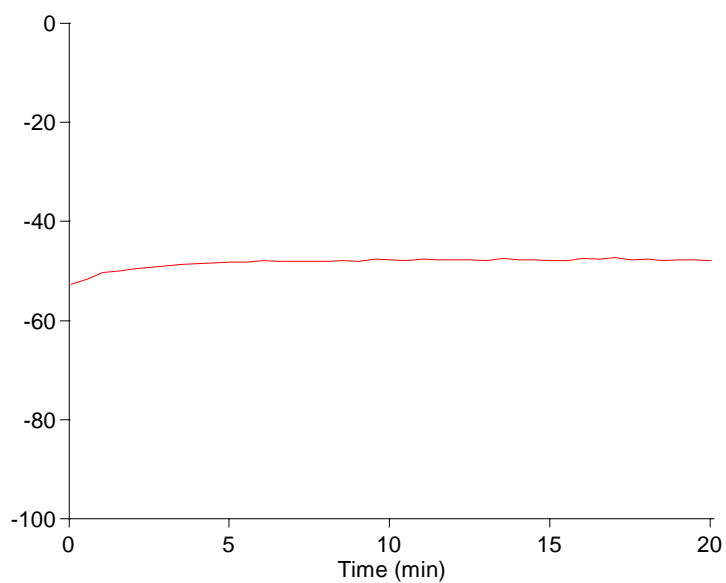


Anexo 15. Cromatograma de Sap 26 horas en max plot

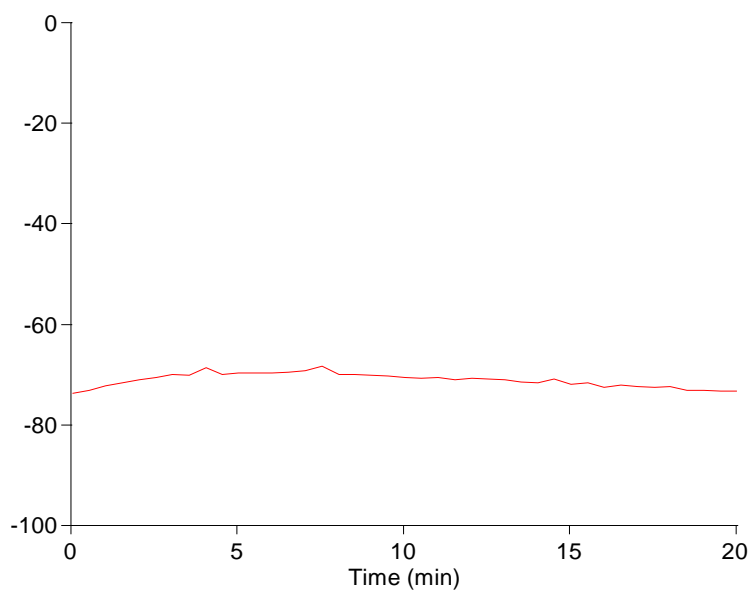
GRUPO POLIFENOLES UTP



Evaluación de extractos - Fluorimetría

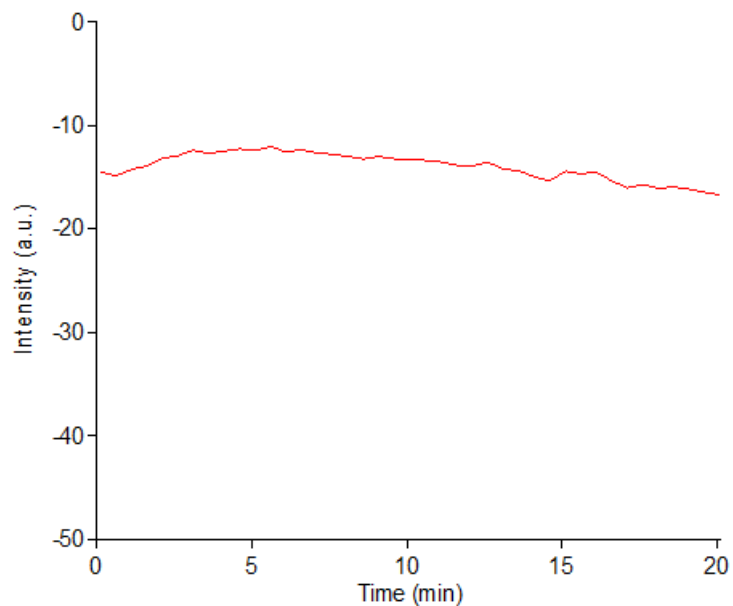
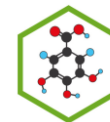


Anexo 16. Medición por fluorimetría de Sap con extracto de *M. coronata* acuoso



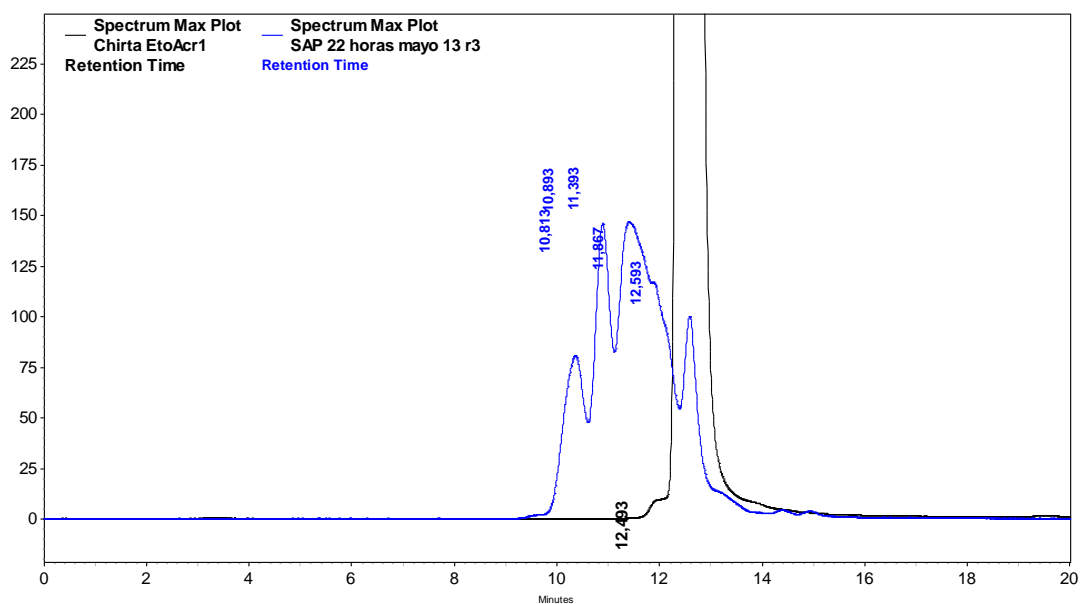
Anexo 17. Medición por fluorimetría de Sap con extracto de *P. lyrastipula* Acuoso

GRUPO POLIFENOLES UTP



Anexo 18. Medición por fluorometría de Sap con extracto de *P. lirytipula* ButOH

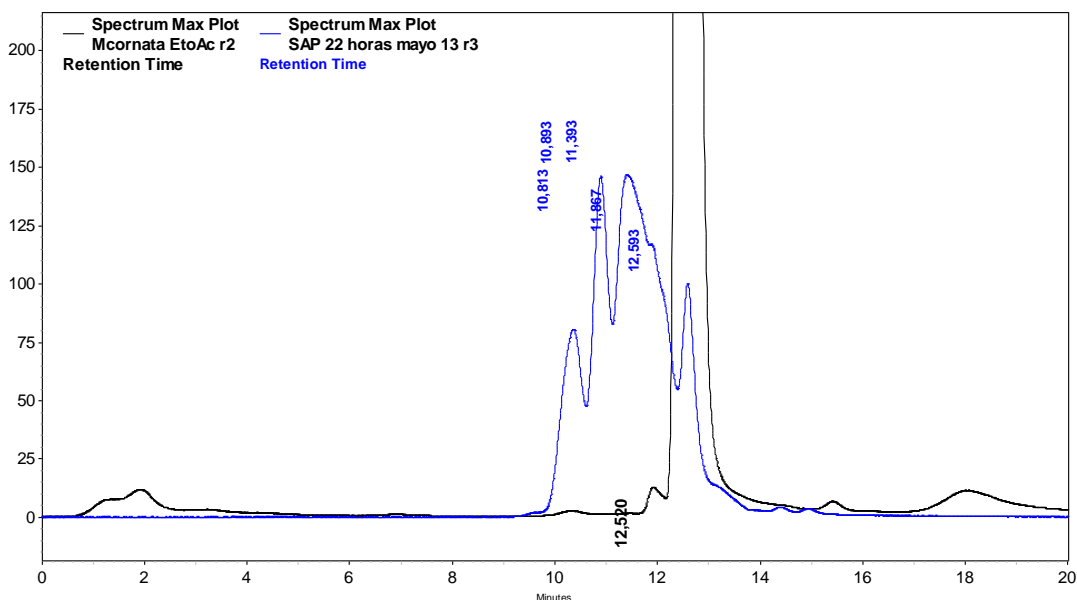
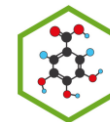
Evaluación de extractos - HPLC



Anexo 19. Cromatograma de Sap 22 horas + Ch-EtoAc en max plot

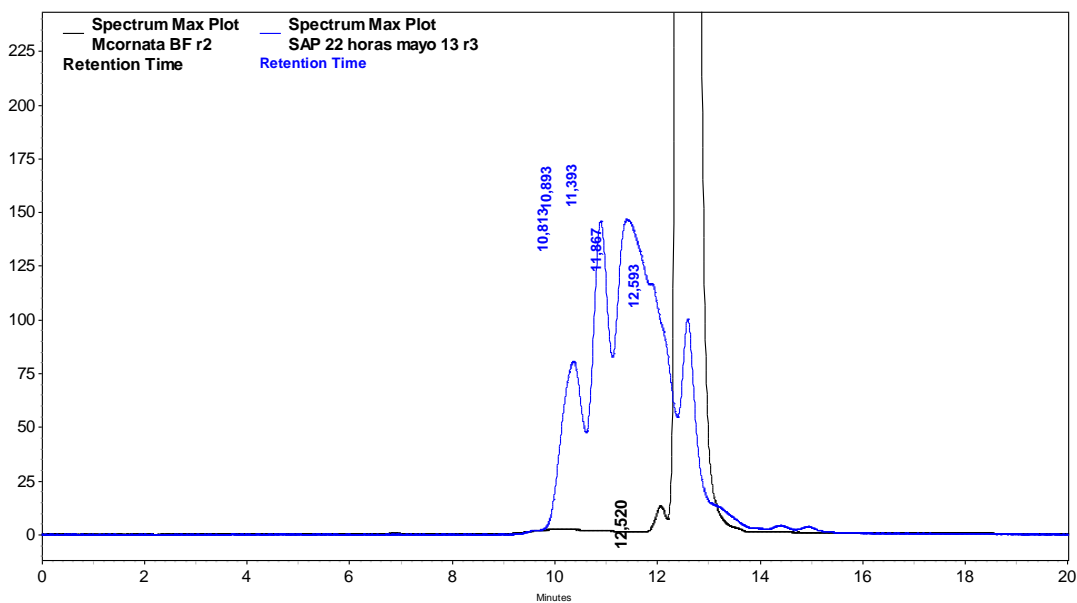
Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,17	0	0,000

GRUPO POLIFENOLES UTP



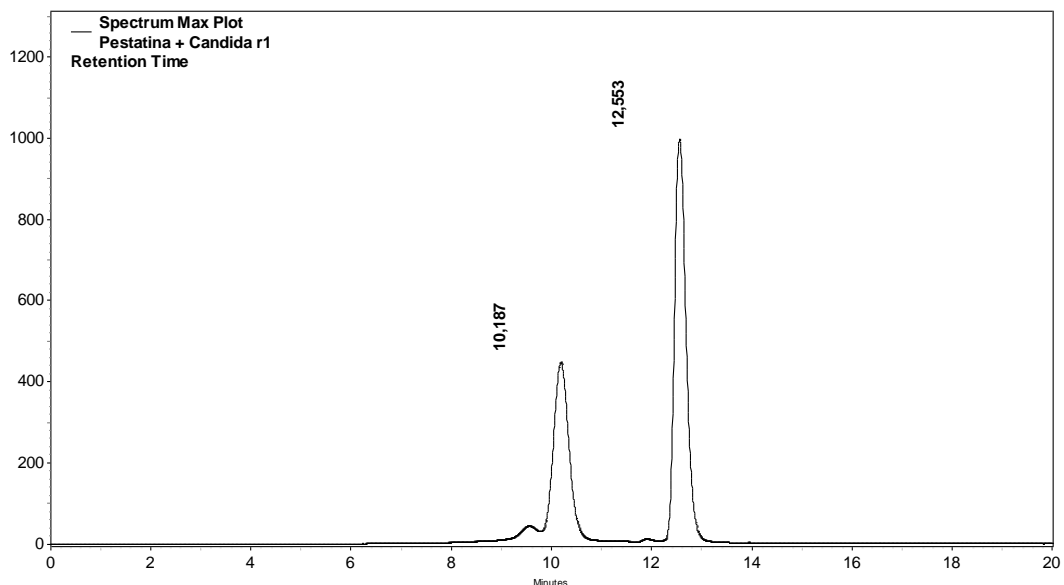
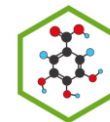
Anexo 20. Cromatograma de Sap 22 horas + Mc-EtoAc en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,17	0	0,000



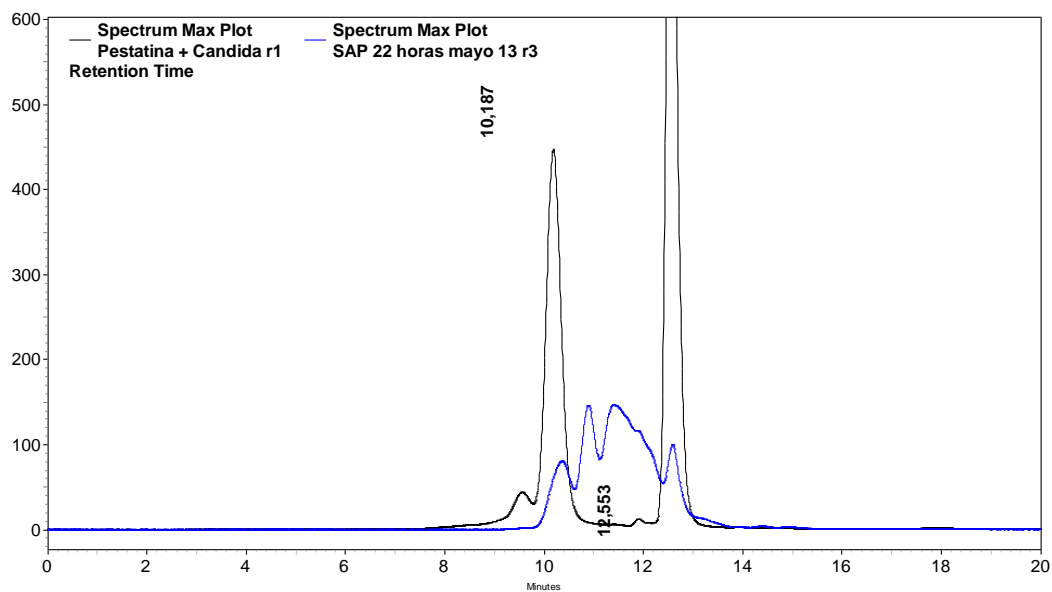
Anexo 21. Cromatograma de Sap 22 horas + McBF en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,17	0	0,000



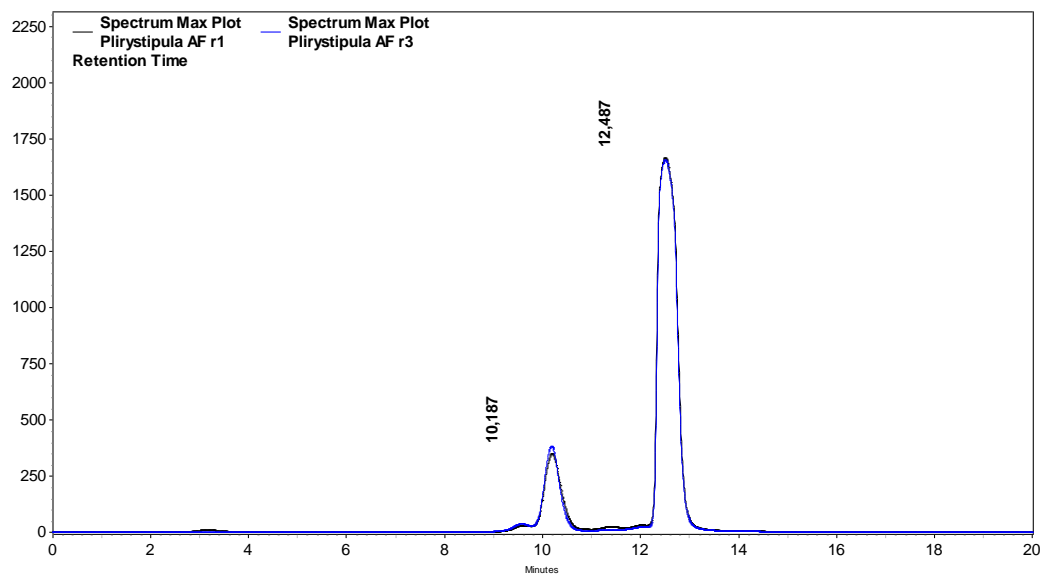
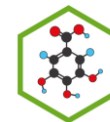
Anexo 22. Cromatograma de Sap 22 horas + pepstatin A r1 en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,333	4638075	0,103



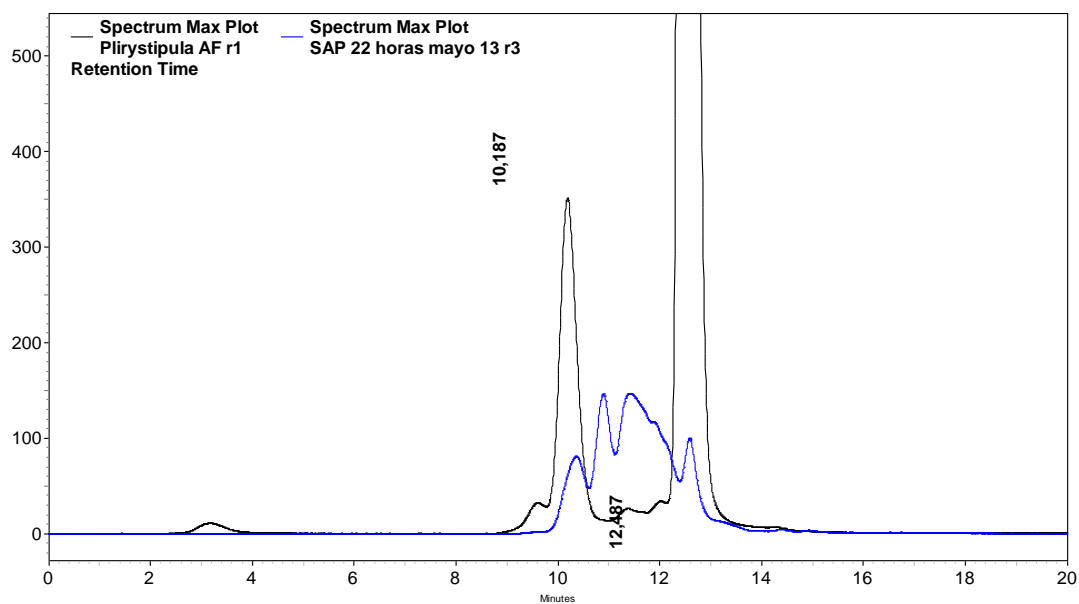
Anexo 23. Cromatograma de Sap 22 horas + pepstatin A en max plot

GRUPO POLIFENOLES UTP



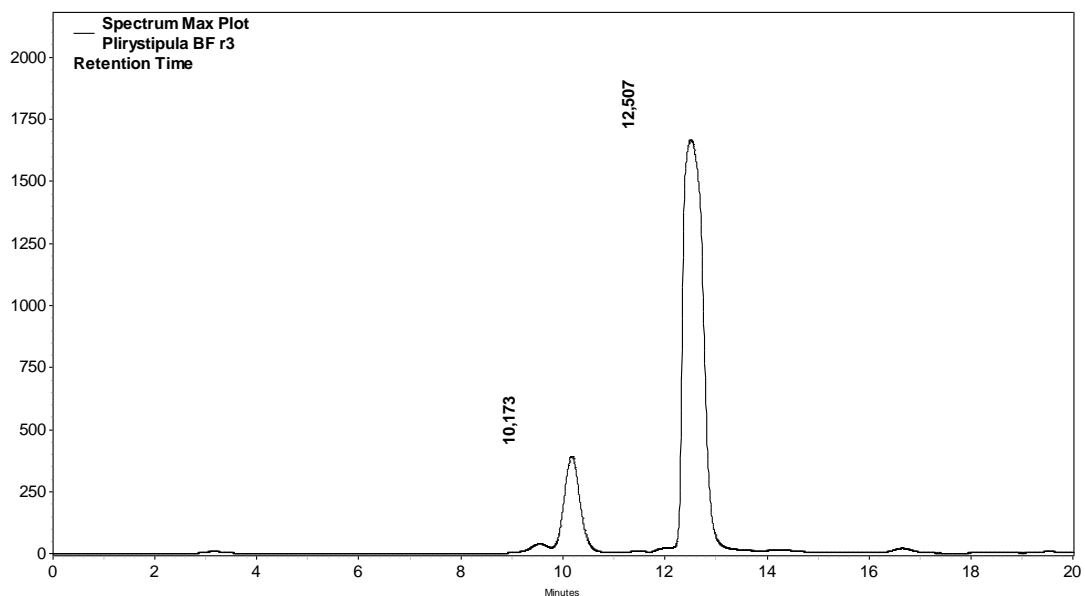
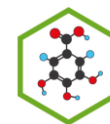
Anexo 24. Cromatograma de Sap 22 horas + PIAF en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,333	4639093	0,107



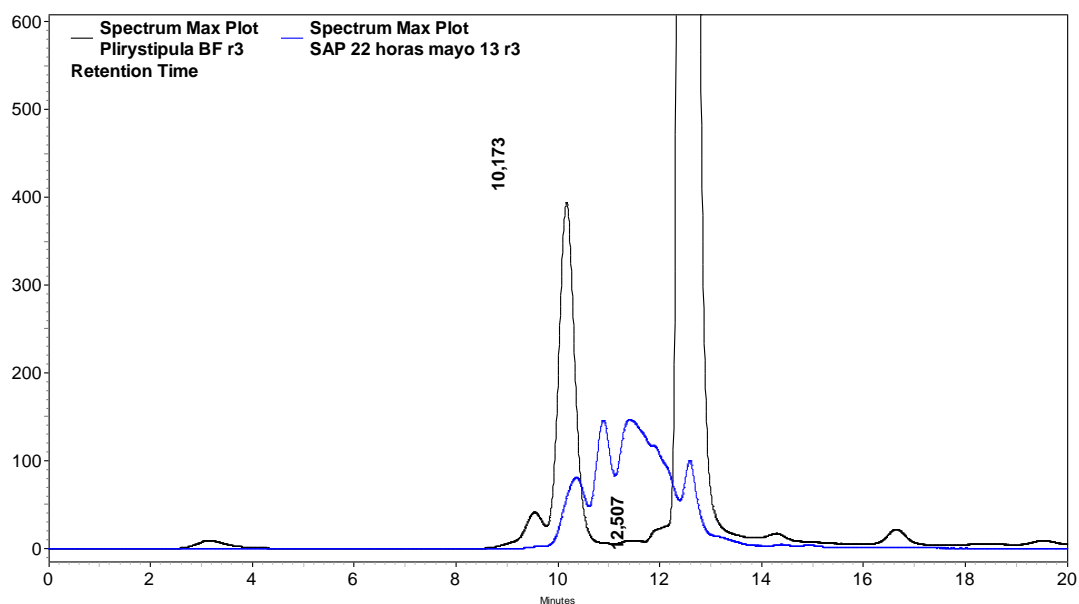
Anexo 25. Cromatograma de Sap 22 horas + PIAF en max plot

GRUPO POLIFENOLES UTP



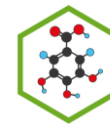
Anexo 26. Cromatograma de Sap 22 horas + PIBF r3 en max plot

Nombre	Tiempo de retención	Area	Concentración
BSA	10,333	4639193	0.109



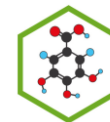
Anexo 27. Cromatograma de Sap 22 horas + PIBF en max plot

GRUPO POLIFENOLES UTP



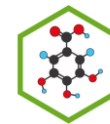
BIBLIOGRAFÍA

1. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3): 400-428, table of contents, 2003.
2. Chong PP, Lee YL, Ian BC, Ng KP. *J Med Microbiol* 52(657-666), 2003.
3. Marrazzo JM. *BMJ* 326(993-994), 2003.
4. Patel M, Coogan MM. *J Ethnopharmacol* 118(1): 173-176, 2008.
5. Gruber A, Berlit J, Speth C, Lass-Flörl C, Kofler G, Nagl M, et al. *Immunobiology* 201(1): 133-144, 1999.
6. Goldman RC, Frost DJ, Capobianco JO, Kadam S, Rasmussen RR, Abad-Zapatero C. *Infect Agents Dis* 4(4): 228-247, 1995.
7. Korting HC, Schaller M. *Hautarzt* 52(2): 91-97, 2001.
8. Staib P, Lermann U, Blass-Warmuth J, Degel B, Wurzner R, Monod M, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1): 146-156, 2008.
9. Perry LM. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*. Cambridge, Massachusetts 1980
10. Li XC, Jacob MR, Pasco DS, ElSohly HN, Nimrod AC, Walker LA, et al. *J Nat Prod* 64(10): 1282-1285, 2001.
11. Sultanova N, Makhmoo T, Abilov ZA, Parween Z, Omurkamzinova VB, ur-Rahman A, et al. *J Ethnopharmacol* 78(2-3): 201-205, 2001.
12. Jiménez G, Chaurra LN. Actividad Ictiotóxica, Antibacterial y Antifúngica de Polifenoles del Extracto en Acetato de Etilo de *Miconia coronata*. In, Escuela de química. Pereira: UTP; 2002
13. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. *Biol Pharm Bull* 27(12): 1965-1969, 2004.
14. Zhang Z, ElSohly HN, Jacob MR, Pasco DS, Walker LA, Clark AM. *Planta Med* 68(1): 49-54, 2002.
15. Kennet JR, Ray CG. *Microbiología Médica, Una introducción a las enfermedades infecciosas*. 4a Edición ed
16. Ruiz LJ, Alzate AF. Actividad in vitro anti *Candida albicans* de las fracciones del homogenizado en isopropanol-agua (62:35) de *Tibouchia multiflora* y sus derivados. In, Tecnología Química. Pereira: UTP; 2006
17. Douglas LJ. *Crit Rev Biotechnol* 8(2): 121-129, 1988.
18. Cutler JE. *Annu Rev Microbiol* 45(187-218), 1991.
19. Ruchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1(123-132), 1992.
20. White TC, Kohler CA, Miyasaki SH, Agabian N. *Can J Botany*: 1995.
21. Ray TL, Payne CD, Morrow BJ. *Candida albicans acid proteinase: Characterization and role in candidiasis*. In: Dunn BM ed, Aspartic proteinase conference on structure and function of the aspartic proteinases: Genetics, structures, and mechanisms California: 173-183, 1990.
22. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Cell Microbiol* 6(10): 915-926, 2004.
23. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. *Mol Microbiol* 13(2): 357-368, 1994.
24. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. *Mol Microbiol* 14(1): 87-99, 1994.
25. White TC, Agabian N. *J Bacteriol* 177(18): 5215-5221, 1995.

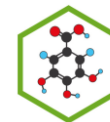


26. Hube B. *Curr Top Med Mycol* 7(1): 55-69, 1996.
27. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, et al. *Infect Immun* 63(3): 984-988, 1995.
28. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, et al. *J Infect Dis* 179(1): 201-208, 1999.
29. Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC. *J Med Microbiol* 52(Pt 3): 247-249, 2003.
30. Ruchel R, Ritter B, Schaffrinski M. *Zentralbl Bakteriologie* 273(3): 391-403, 1990.
31. Zotter C, Haustein UF, Schonborn C, Grimmecke HD, Wand H. *Dermatol Monatsschr* 176(2-3): 189-198, 1990.
32. Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J, et al. *Protein Sci* 5(4): 640-652, 1996.
33. Capobianco JO, Lerner CG, Goldman RC. *Anal Biochem* 204(1): 96-102, 1992.
34. Quiñones M. LM. In, *Diversidad de la Familia Melastomataceae en la Orinoquia Colombiana*. 1 ed. Bogotá D.C.:126, 2001.
35. Isaza JH, Ito H, Yoshida T. *Phytochemistry* 65(3): 359-367, 2004.
36. Lowry JB. *Phytochemistry* 7): 1803-1813, 1968.
37. Hegnauer R. *Birkhauser Verlag Basel Stuttgart*: 506, 1969.
38. Yoshida T, Nakata F, Okuda T. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47(6): 824-827, 1999.
39. Bomfim-Patricio MC, Salatino A, Martins AB, Wurdack JJ, Salatino ML. *Biochem Syst Ecol* 29(7): 711-726, 2001.
40. Umaña Doderó G, Alameda F. *Novon* 5(1): 110-113, 1995.
41. Alameda Fa. *Melastomataceae in Flora del bajo y de regions adyacentes*. In 1-38, 1993.
42. Tapias LJ, López JA. Actividad Antibacterial de las Fracciones Promisorias Obtenidas en columna sobre Toyopearl HW-40 del Extracto en Acetona acuosa de *Miconia coronata*. In. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2006
43. Restrepo JC, Galván JL. Actividad alelopática de algunas especies de los géneros *Miconia*, *Tibouchina*, *Henriettella*, *Tococa*, *Aciotis* y *Bellucia* (Melastomataceae). In. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2006
44. Quiñones M. LM. *Diversidad de la familia melastomataceae en la Orinoquia Colombiana* 2001
45. Schulman L, H. K, Ruokolainen K. Spatio-ecological niche segregation of two sympatric species of clidemia (Melastomataceae) in western amazonian non-flooded rainforest. In; 2004:143-160
46. Hernandez MM. *Plantas colombianas y su aplicación medicinal*. 6ª 2002
47. Teo Debbie H, Tan Hugh TW, Corlett T, Wong C, Shawn KY. *Journal of biogeography* 30(305-310) 2003.
48. Evans HC. Biological control of weed and insect pests using fungal pathogens, with particular reference to Sri Lanka. In, *Biocontrol/news and Information*; 1999
49. Renner SS. *Nord. J. Bot* 13(p. 519-593, 1993.
50. Amelot A, Oliveros ME, Arellano E. *Ciencia* vol.13(no.4): p.429-439, 2005.
51. Murdiati TB, McSweeney CS, Campbell RS, Stoltz DS. *J Appl Toxicol* 10(5): 325-331, 1990.

GRUPO POLIFENOLES UTP



52. Jiménez B LC. *Instituto de ciencias naturales Universidad Nacional de Colombia. Bogota Colombia* . 24(21): p 41-64, 2002.
53. *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico*. In, National, C., for, clinical, Laboratory, Standards7. 18-17.21, 1998.
54. Garcia H. *Flora Medicinal de Colombia*1992
55. Teran A JJ. *Diversidad de la familia Rubiaceae en el parque Nacional Carrasco (Limbo Palmar y Guacharos)*. Fundación CHRISTENSEN. Cochabamba Bolivia ed2006
56. Robbrecht E. 1:1-271., 2001.
57. Taylor CM. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. In: http://www.humboldt.org.co/humboldt/homeFiles/inventarios/Rubiaceae_02_02.pdf ; 2001
58. Bardales V J, Mejia K, Couturier G. Ent 39(pp:121-124, 1996.
59. *Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar*. In, National, C., for, clinical, Laboratory, Standards 1999.
60. Taylor CM. *Ann. Missouri Bot. Gard*: 84: 224-262., 1997.
61. Taylor CM. *Systematic Botany Monographs* 26(1989).
62. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/diccionario/consultar.html>. Herbario nacional de colombia. In; 2009
63. Toro M. JL. pp: 158, 166, 223, 2000.
64. Haslam E. *Practical Polyphenolics From structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge1998
65. Trejos VM, Villegas GP. Química de los ácidos gálico, elágico y valonéico. In. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2003
66. Waterman PG, Mole S. *Analysis of Plant Phenolic Metabolites*. Blackwell, London, Edinburgh and Boston1994
67. Isaza JH. *Scientia Et Technica* XIII(33): 13-18, 2007.
68. Khanbabaee K, Van Ree T. *Nat. Prod. Rep* 18(641-649, 2001.
69. Haslam E. *Reversible polysaccharide complexation. In: Plant Polyphenols*. In, Vegetable Tannins RevisitedCambridge University Press, Melbourne:192-196, 1989b.
70. Priolo A, Waghorn GC, Lanza M, Biondi L, Pennisi P. *J. Anim. Sci* 78(810-816, 2000.
71. Shimada T, Saitoh T. *Population Ecology* 48(341-352, 2006.
72. Xie D-J, Dixon RA. *Phytochemistry* 66(18): 2127-2144, 2005.
73. Haslam E. Plant Polyphenols. In, ED. R. W. Hemingway y P.E. Laks. New York; 1992
74. W. GJ.
75. Mueller-Harvey I. *J. Sci. Food Agric* 86(13): 2010-2037, 2006.
76. Karamil. *Natural Products Reports*: 641-649, 2001.
77. Ossipov V, et a. . *Biochemical Systematics and Ecology* 31(1): 3-16, 2003.
78. Gross GG, Yoshida T, Hemingway RW. *Plant Polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. New York1999



79. Hong CY, Wang CP, Huang SS, Hsu FL. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 47(138-142), 1995.
80. Niemetz R, Gross GG. *Phytochemistry* 66(2001-2011), 2005.
81. Tanaka T. *Foods Food Ingrid. J. Jpn* 180(64-70), 1999.
82. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. *Phytochemistry* 32(507-521), 1993.
83. Xu Y, Deng JZ, Ma J, Chen SN, Marshall R, Jones SH. *Bioorg. Med. Chem* 11(1593-1596), 2003.
84. Haslam E. *Journal of Natural Products* 59(2): 205-215, 1996.
85. Demeyer D, Raes K, Fievez V, De Smet S. *Commun. Appl. Biol. Sci. Ghent University* 69(75-91), 2004.
86. Goddard JP, Reymond JL. *Trends Biotechnol* 22(7): 363-370, 2004.
87. Breeuwer P, Drocourt JL, Bunschoten N, Zwietering MH, Rombouts FM, Abee T. *Appl Environ Microbiol* 61(4): 1614-1619, 1995.
88. Lomolino G, Lante A, Crapisi A, Spettoli P, Curioni A. *Electrophoresis* 22(6): 1021-1023, 2001.
89. Kierat RM, Kramer R. *Bioorg Med Chem Lett* 15(21): 4824-4827, 2005.
90. Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, Sakamoto S, Yamaguchi K, Nagano T. *J Am Chem Soc* 124(8): 1653-1657, 2002.
91. Wang Q, Scheiget J, Roy B, Ramachandran C, Gresser MJ. *Biochim Biophys Acta* 1601(1): 19-28, 2002.
92. Gee KR. *Bioorg Med Chem Lett* 9(10): 1395-1396, 1999.
93. Kathryn Dean ES, Gerard K, Olivier R, Jean-Louis R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(1653-1656), 2003.
94. Dean KE, Klein G, Renaudet O, Reymond JL. *Bioorg Med Chem Lett* 13(10): 1653-1656, 2003.
95. Dostal J, Hamal P, Pavlickova L, Soucek M, Ruml T, Pichova I, et al. *J Clin Microbiol* 41(2): 712-716, 2003.
96. Consolaro ME, Gasparetto A, Svidzinski TI, Peralta RM. *Mycopathologia* 162(2): 75-82, 2006.
97. Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. *Mol Microbiol* 28(3): 543-554, 1998.
98. Ruchel R, Tgegeler R, Trost M. *Saboraud* 20(233-244), 1982.
99. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8): 2038-2042, 1999.