

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIBACTERIANA Y ANTISAP DE  
EXTRACTOS DE LA PARTE AÉREA DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)**

**TRABAJO DE GRADO**

**Requisito parcial para optar el título de Químico Industrial**

**Presentado por:**

**SANDRA MILENA BONILLA CASTAÑEDA**

**JAIME ALEJANDRO MARTÍNEZ ACOSTA**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**PEREIRA**

**2011**

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIBACTERIANA Y ANTISAP DE  
EXTRACTOS DE LA PARTE AÉREA DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)**

**Presentado por:**

**SANDRA MILENA BONILLA CASTAÑEDA**

**JAIME ALEJANDRO MARTÍNEZ ACOSTA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Requisito parcial para optar el título de Químico Industrial**

**Directora:**

**PhD. Luz Stella Ramírez Aristizábal**

**Asesora:**

**Leidy Johanna Tapias Izasa**

**Grupo Polifenoles UTP**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**PEREIRA**

**2011**

## **NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO**

### **EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIBACTERIANA Y ANTISAP DE EXTRACTOS DE LA PARTE AÉREA DE *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)**

**Presentado por:**

**SANDRA MILENA BONILLA CASTAÑEDA**

**JAIME ALEJANDRO MARTÍNEZ ACOSTA**

**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:**

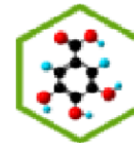
Para la constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy \_\_\_\_ de \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_.

Directora: \_\_\_\_\_

**Nombre:** LUZ STELLA RAMÍREZ ARISTIZÁBAL

Jurado: \_\_\_\_\_

**Nombre:** JAIME NIÑO OSORIO



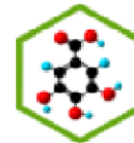
## DEDICATORIA

**A Dios, por ser la fuerza impulsora de nuestra vida y trabajo.**

**A nuestros padres por toda la dedicación y amor brindado durante nuestra vida.**

**A nuestras familias y amigos, por todo su apoyo, cariño, consejos y comprensión incondicional.**

**A nuestros profesores, porque gracias al aporte de su conocimiento hicieron posible la conclusión de éste trabajo.**



## AGRADECIMIENTOS

**A Dios, por ser la luz de nuestro camino.**

**A Luz Stella Ramírez, por toda su ayuda y apoyo, porque siempre fue una guía y un modelo para nosotros.**

**A la Universidad Tecnológica de Pereira y al grupo Polifenoles, por su apoyo financiero para la realización de éste proyecto.**

**A Jaime Niño, por sus consejos y correcciones oportunas.**

**A Oscar Marino y Norma Durán, por su aporte en la parte estadística.**

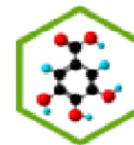
**A Iván Lopera, Hugo Arias, Lina Orozco, René Marín y Johanna Tapias por la ayuda en el manejo del equipo HPLC.**

**A Johanna Tapias y por su apoyo en la extracción de la planta y ser un gran apoyo en el trabajo y a Cristian Arias por sus indicaciones en los inicios del proyecto.**

**A Lina Giraldo por ser parte del estudio de la planta y ser siempre una gran amiga.**

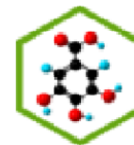
**A Juan Carlos Sepúlveda, Leonardo Beltrán, Lina Escobar e Iván Lopera, por su colaboración en el análisis molecular de *C. albicans*.**

**A Carlos Humberto, Javier, Vicky y Germán que siempre estuvieron dispuestos a prestar sus servicios en laboratorios, materiales, reactivos y equipos. A todos los profesores, por compartir todo su conocimiento y hacernos mejores personas y a todos nuestros amigos y compañeros por estar siempre con nosotros y hacer de nuestro paso por la Universidad algo inolvidable.**

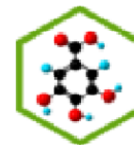


## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
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
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>5</b>
2.1. Características de las bacterias .....	5
2.1.1. Estructura .....	5
2.1.2. Aspectos generales de la infección bacteriana .....	6
2.2.1. Características generales .....	7
2.2.2. Cultivo.....	7
2.3. <i>Candida albicans</i> .....	7
2.3.1. Estructura .....	8
2.3.2 Taxonomía.....	8
2.4. Micología .....	9
2.5.3. Patogenia y virulencia.....	9
2.5.4. Adherencia .....	10
2.5.5. Invasión.....	11
2.6. Candidiasis (aspectos clínicos) .....	11
2.6.1. Manifestaciones.....	11
2.6.2. Antimicóticos más usados en el tratamiento de infecciones de <i>Candida</i> .....	12

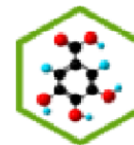


2.6.3. Mecanismos de resistencia.....	13
2.7.1. Izoenzimas.....	13
2.7.2. Patogenia.....	15
2.7.3. Inhibición .....	16
2.8. Descripción de la familia Rubiaceae.....	16
2.8.1. Morfología general de la familia Rubiaceae .....	17
2.8.2. Farmacología y fitoquímica de la familia Rubiaceae.....	18
2.8.3. Descripción del género <i>Palicourea</i> .....	18
2.8.4. Morfología general del género <i>Palicourea</i> .....	18
2.8.5. Distribución y número de especies del género <i>Palicourea</i> .....	19
2.8.6. Usos y nombres vernáculos del género <i>Palicourea</i> .....	20
2.8.7. Productos naturales y farmacognosia del género <i>Palicourea</i> .....	20
2.9. Compuestos químicos de importancia biológica en <i>Palicourea</i> .....	20
Alcaloides (Arango 2008).....	21
2.10.1 Morfología general de la especie <i>Palicourea guianensis</i> .....	22
<b>3. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....</b>	<b>23</b>
3.1. Condiciones instrumentales generales .....	23
3.2. Material vegetal.....	23
3.2.1. Extracción del material vegetal.....	24
3.3. Microorganismos de prueba.....	27
3.4. Controles .....	28
3.5. Determinación de la actividad antibacteriana .....	28
3.5.1. Crecimiento de bacterias e inhibición.....	28
3.5.2. Método de difusión en agar.....	28



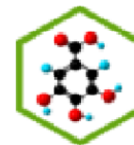
3.6. Determinación de la actividad antiSAP .....	29
3.6.1. Crecimiento de <i>Candida albicans</i> y producción de SAP .....	29
3.6.2. Método fluorimétrico .....	29
3.6.3. Cinética enzimática .....	31
3.6.4. Método por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) .....	31
3.6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	33
3.6.6. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) .....	34
3.6.7. Evaluación de extractos.....	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
4.1. Estudio de los extractos obtenidos .....	37
4.2. Actividad antibacteriana.....	42
4.2.1. Antibiograma.....	42
4.2.2. Evaluación de los extractos .....	43
4.3.1. Crecimiento de <i>Candida albicans</i> y producción de SAP.....	45
4.4. Evaluación de extractos en la actividad antiSAP.....	47
4.4.1. Determinación Fluorimétrica. ....	47
4.4.2. Cinética de inhibición de SAP .....	52
4.4.3. Determinación Electroforetica. ....	54
4.4.4. Determinación Cromatográfica por HPLC .....	55
4.4.5. Estudio genético de inhibición de SAP .....	60
4.4.6. Evaluación fracciones acuosas .....	67
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>



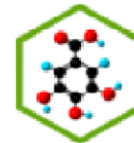


## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las bacterias estudiadas .....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i> .....	8
<b>Tabla 3.</b> Principales manifestaciones de la infecciones de <i>C. albicans</i> .....	12
<b>Tabla 4.</b> Antimicóticos más usados en el tratamiento de candidiasis .....	13
<b>Tabla 5.</b> Características de las isoenzimas de SAP de <i>C. albicans</i> .....	14
<b>Tabla 6.</b> Infecciones más comunes de <i>C. albicans</i> y expresión de SAP .....	15
<b>Tabla 7.</b> Descripción de los órganos de la familia Rubiaceae.....	17
<b>Tabla 8.</b> Descripción de los órganos del género <i>Palicourea</i> .....	19
<b>Tabla 9.</b> Compuestos presentes en el género <i>Palicourea</i> .....	21
<b>Tabla 10.</b> Descripción de la especie <i>Palicourea guianensis</i> .....	22
<b>Tabla 11.</b> Método de HPLC para realizar el perfil cromatográfico de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i> .....	27
<b>Tabla 12.</b> Cepas usadas en el desarrollo de las actividades .....	27
<b>Tabla 13.</b> Parámetros instrumentales para el fluorómetro Cary Eclipse.....	30
<b>Tabla 14.</b> Método para HPLC utilizado para la evaluación de la actividad antiSAP. ....	32
<b>Tabla 15.</b> Voltaje aplicado en la electroforesis SDS-PAGE para el análisis antiSAP.....	33
<b>Tabla 16.</b> Longitudes de onda de máximos de absorción de los extractos y de los metabolitos característicos del género <i>Palicourea</i> .....	38
<b>Tabla 17.</b> Pruebas cualitativas específicas para la identificación de metabolitos presentes en los extractos.....	39
<b>Tabla 18.</b> Unión de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso (PgAcu). .....	40
<b>Tabla 19.</b> Antibiograma para <i>Escherichia coli</i> .....	42
<b>Tabla 20.</b> Controles positivos para el análisis antibacterial. ....	42
<b>Tabla 21.</b> Tamaño del halo de inhibición (mm) de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>E. coli</i> . ....	43
<b>Tabla 22.</b> Datos estadísticos para el porcentaje de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> de PgMeOH. ....	48



<b>Tabla 23.</b> Datos de porcentaje de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> para los extractos.....	50
<b>Tabla 24.</b> Parámetros cinéticos obtenidos.....	53
<b>Tabla 25.</b> Datos obtenidos de la curva de calibración.....	56
<b>Tabla 26.</b> Porcentaje de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> para PgMeOH 500 µg/mL.....	58
<b>Tabla 27.</b> Datos para el histograma de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> por HPLC. ....	58
<b>Tabla 28.</b> Normalización de resultados de la cinética de expresión de SAP. ....	61
<b>Tabla 29.</b> Datos normalizados para la inhibición de la expresión de genes de <i>sap</i> . ....	63
<b>Tabla 30.</b> Porcentaje de inhibición de genes de <i>sap</i> de los extractos.....	67
<b>Tabla 31.</b> Porcentaje de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> para las fracciones del extracto acuoso.....	68



**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Morfología de las bacterias estudiadas, (a) *Bacillus cereus*, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Pseudomonas aeruginosa* y (d) *Escherichia coli* ..... 5

**Figura 2.** Morfología de *Candida albicans* ..... 8

**Figura 3.** Estructura de pepstatina A ..... 16

**Figura 4.** Fotografía de la especie *Palicourea guianensis*, (a) Arbustos, (b) Hojas y flores, (c) Fruto ..... 22

**Figura 5.** Esquema de la extracción inicial de material vegetal ..... 25

**Figura 6.** Esquema de la extracción del extracto metanólico ..... 25

**Figura 7.** Esquema del fraccionamiento del PgAcu ..... 26

**Figura 8.** Variación de la proporción de los solventes A y B del método cromatográfico . 27

**Figura 9.** Esquema de la interacción entre el Fluorexón, el  $\text{Cu}^{+2}$  y los aminoácidos para estudiar el mecanismos de inhibición por fluorescencia ..... 30

**Figura 10.** Espectro UV de PgMeOH. .... 37

**Figura 11.** a. Cromatograma de PgAcu-F6, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,54 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,16 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,96 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min), f. Cromatograma de PgAcu-F7, g. Espectro UV del pico ( $t_R$  6,52 min), h. UV del pico con ( $t_R$  8,35 min), i. Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,02 min), j. Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min) ..... 41

**Figura 12.** Placa de Petri con el ensayo de inhibición de *Palicourea guianensis* contra *E. coli*. 1. Extracto de Acetato de Etilo (PgAcOet), 2. Extracto de diclorometano PgDiClmet, 3. Trimethoprim (Trim), 4. Extracto de *n*-hexano PgHex, 5. Extracto de Metanol PgMeOH ..... 43

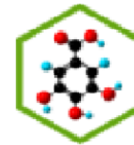
**Figura 13.** Siembra de *C. albicans* (A) y *C. albicans* + PgMeOH (B) ..... 45

**Figura 14.** Medida de la actividad de SAP de *C. albicans* por fluorometría ..... 46

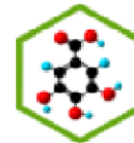
**Figura 15.** Grafico de inhibición de PgMeOH ..... 47

**Figura 16.** Porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* de PgMeOH. .... 49

**Figura 17.** Histograma para la inhibición de SAP de *C. albicans* de los extractos iniciales. .... 51

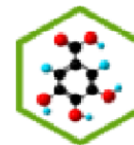


<b>Figura 18.</b> Relación entre $v_0$ y [BSA] para la curva cinética. ....	53
<b>Figura 19.</b> Electroforesis de los extractos; BSA (medio de cultivo con BSA al 0,1%), M (marcador de peso molecular), C ( <i>C. albicans</i> ), P ( <i>C. albicans</i> + Pespstatin A), MeOH ( <i>C. albicans</i> + Extracto metanólico), Di ( <i>C. albicans</i> + extracto de diclorometano), He ( <i>C. albicans</i> + extracto de <i>n</i> -hexano), AE ( <i>C. albicans</i> + extracto de acetato de etilo) y A ( <i>C. albicans</i> + extracto acuoso).....	54
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de HPLC de la curva de calibración para BSA. ....	56
<b>Figura 21.</b> Curva de calibración obtenida por HPLC.....	56
<b>Figura 22.</b> Cromatograma de SAP de <i>Candida albicans</i> + PgMeOH. ....	58
<b>Figura 23.</b> Histograma de Inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> por HPLC- .....	59
<b>Figura 24.</b> a. Expresión de <i>sap1</i> , b. Expresión de <i>sap2</i> y c. Expresión de <i>sap4</i> .....	62
<b>Figura 25.</b> Histogramas obtenidos de la inhibición de la expresión de <i>C. albicans</i> a las 12 h y 24 h. a) <i>sap1</i> , b) <i>sap2</i> y c) <i>sap4</i> . ....	65
<b>Figura 26.</b> Histograma de inhibición de SAP de <i>C. albicans</i> para las fracciones del extracto acuoso.....	68
<b>Figura 27.</b> Electroforesis de las fracciones del extracto acuoso; <b>M</b> (marcador de peso molecular), <b>BSA</b> (medio de cultivo con BSA al 0,1%), <b>C</b> ( <i>C. albicans</i> ), <b>P</b> ( <i>C. albicans</i> + Pespstatin A), <b>(6+7)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 6+7), <b>(8)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 8), <b>(9)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 9), <b>(10-13)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 10-13), <b>(14+15)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 14+15) y <b>(16+17)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 16+17), <b>(18)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 18), <b>(19)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 19), <b>(20)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 20), <b>(21)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 21), <b>(22-27)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 22-27), <b>(28)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 28) y <b>(29)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 29), <b>(30+31)</b> ( <i>C. albicans</i> + Fracción del extracto acuoso 30+31), <b>(32-34)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 32-34) y <b>(36-44)</b> ( <i>C. albicans</i> + fracción del extracto acuoso 36-44).....	69

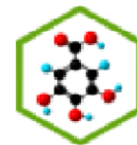


## ÍNDICE DE ANEXOS

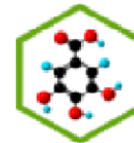
<b>Anexo 1.</b> Metodología de preparación del gel para SDS-PAGE.....	80
<b>Anexo 2.</b> Esquema de extracción de ARNm. ....	82
<b>Anexo 3.</b> Espectros de absorción de los extractos: a) PgAcu, b) PgAcOet, c) PgDiClmet y d) PgHex. ....	83
<b>Anexo 4.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F6+7, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 6,52 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 7,34 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,16 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,35 min). f. Cromatograma de PgAcu-F7, g. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,96 min), h. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,02 min), i. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,12 min).....	84
<b>Anexo 5.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F8, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 6,43 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 7,63 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,20 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,00 min). ....	85
<b>Anexo 6.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidasPgAcu-F9, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 3,95 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 7,19 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,11 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,39 min). ....	86
<b>Anexo 7.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F10-13, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 6,49 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,25 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,70 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,79min), f. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,04 min). ....	87
<b>Anexo 8.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F14+15, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 6,41 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,27 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,39 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,05min).....	88
<b>Anexo 9.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F16+17, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,20 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,35 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,03 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,07min). ....	89
<b>Anexo 10.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F18, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,19 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,31 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,00 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,03min). ....	90



<b>Anexo 11.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F19, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,18 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,32 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,01 min), e. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,00 min). .....	91
<b>Anexo 12.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F20, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,06 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 9,25 min).....	92
<b>Anexo 13.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F21, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,11 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 15,31 min).....	93
<b>Anexo 14.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F22-27, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,12 min).....	94
<b>Anexo 15.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F28, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,09 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 15,90 min).....	95
<b>Anexo 16.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F29, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 8,49 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,12 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 15,97 min). .....	96
<b>Anexo 17.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F30+31, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,17 min).....	97
<b>Anexo 18.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F32-34, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,14 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 15,89 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 14,86 min). .....	98
<b>Anexo 19.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F35, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,26 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 15,93 min).....	99
<b>Anexo 20.</b> a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F36-44, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 10,21 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 18,53 min), d. Espectro UV del pico con ( $t_R$ 19,42 min). .....	100
<b>Anexo 21.</b> Resultados obtenidos para el antibiograma. ....	101
<b>Anexo 22.</b> Resultados de la determinación de la actividad antibacterial. ....	102
<b>Anexo 23.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgHex. ....	103
<b>Anexo 24.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgDiClmet. ....	104
<b>Anexo 25.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcOet. ....	104
<b>Anexo 26.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu. ....	105



<b>Anexo 27.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F6+7. ....	105
<b>Anexo 28.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F8. ....	106
<b>Anexo 29.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F9. ....	106
<b>Anexo 30.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F10-13. ....	107
<b>Anexo 31.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F14+15. ....	107
<b>Anexo 32.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F16+17. ....	108
<b>Anexo 33.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F18. ....	108
<b>Anexo 34.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F19. ....	109
<b>Anexo 35.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F20. ....	109
<b>Anexo 36.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F21. ....	110
<b>Anexo 37.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F22-27. ....	110
<b>Anexo 38.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F28. ....	111
<b>Anexo 39.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F29. ....	112
<b>Anexo 40.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F30+31. ....	112
<b>Anexo 41.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F32-34. ....	113
<b>Anexo 42.</b> Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F36-44. ....	113
<b>Anexo 43.</b> Datos estadísticos para análisis ANOVA para la técnica fluorimétrica. ....	114
<b>Anexo 44.</b> Cromatogramas de HPLC para la determinación del porcentaje de inhibición de SAP. ....	116

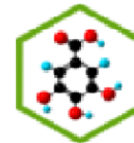


### RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de las actividades antibacteriana y antiSAP (Proteinasa Aspártica Secretada) de *Candida albicans* de los extractos crudos de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua de la parte aérea de *Palicourea guianensis*; adicionalmente, se realizó un perfil fitoquímico por medio de espectrofotometría ultravioleta (UV) y pruebas características de determinados metabolitos secundarios.

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó por medio de la técnica de difusión en agar, frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*; los extractos no mostraron resultados positivos a las concentraciones evaluadas. La evaluación de la actividad antiSAP, se determinó mediante cuatro técnicas diferentes: Espectrofluorometría, HPLC, electroforesis SDS-PAGE y RT-PCR en tiempo real, mostrando porcentajes de inhibición del 50% con relación al control positivo, pepstatina A; siendo los más promisorios el extracto en diclorometano y el acuoso. También se estudió de la cinética de inhibición tanto enzimática como a nivel de expresión de genes usando las técnicas de fluorometría y RT-PCR en tiempo real, respectivamente.

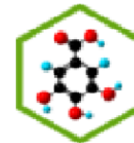




### ABSTRACT

In the present study was conducted evaluating the antibacterial activities and antiSAP (Secreted aspartic proteinases) of *Candida albicans* extracts of n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water from the aerial part of *Palicourea guianensis*, in addition, was performed a phytochemical profile by ultraviolet spectrophotometry (UV) and evidence of certain secondary metabolites features.

Determination of antibacterial activity was performed by the agar diffusion method, against microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*, the extracts showed no positive results at concentrations tested. The assessment of antiSAP activity was determined by four different techniques: spectrofluorimetry, HPLC, SDS-PAGE and RT-PCR in real time, showing inhibition percentages of 50% compared to positive control, pepstatin A; the most promising being the dichloromethane extract and the aqueous extract. We also studied the kinetics of inhibition of both, enzymatic and genetic expression level using fluorometry techniques and RT-PCR in real time, respectively. The most promising extracts against antiSAP activity were the dichloromethane extract and the aqueous respectively.



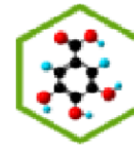
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Surgimiento del problema

El estudio de enfermedades producidas por hongos y bacterias ha tenido un gran desarrollo debido a que en los últimos 30 años se ha mostrado un incremento drástico en las infecciones ocasionadas por estos microorganismos, presentándose fundamentalmente en los pacientes con deficiencia inmunológica (pacientes con SIDA) (Dostál et al. 2003), en los cuales sobresalen las infecciones fúngicas promovidas por el género *Candida* que cada vez adquieren más importancia clínica. De este género, *Candida albicans* es el hongo oportunista más común que infecta a humanos y se ha convertido en la cuarta causa de infecciones nosocomiales en el mundo a nivel oral y vaginal (Naglik et al. 2003; Taylor et al. 2005).

Muchos estudios han demostrado que la virulencia de este hongo está relacionada con la secreción de una enzima conocida como Aspártil Proteinasa Secretada (Secreted Aspartil Proteinase -SAP-) [Chaffin et al. (1998); Ripeau et al. (2001); Schaller et al. (2001)]. De igual manera, las infecciones del tipo bacteriano han sido un problema generalizado a lo largo de la historia, debido al desarrollo evolutivo de muchas bacterias patógenas, llevándolas a ser resistentes a los antibióticos convencionales, razón por la cual se ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas antibacterianas (Valgas et al. 2007), incluyendo los productos naturales, cuyo estudio en un país con tanta biodiversidad como Colombia es muy importante y determinante para encontrar nuevas actividades en contra de los microorganismos infecciosos.

Muchos avances se han logrado en los últimos años en microbiología, aunque no puede decirse lo mismo a nivel fitoquímico, puesto que se sabe muy poco de la actividad química y farmacológica de la mayoría de las plantas presentes en nuestro territorio (Niño et al. 2006).



El estudio de las plantas y del material natural activo requiere la realización de muchos ensayos para identificar el origen de la actividad y en muchos casos los compuestos o mezclas causantes de tal acción (Niño et al. 2006), esta es una de las razones por las cuales se debe actuar pronto, desarrollando nuevas estrategias de análisis para encontrar las sustancias promisorias especializadas para combatir estos agentes patógenos perjudiciales para la salud humana, animal y vegetal. En los extractos de *Palicourea guianensis* se planea estudiar la actividad inhibitoria del crecimiento bacterial y de la secreción de SAP.

## 1.2. Formulación del problema

¿Tendrán los extractos de la parte aérea de *Palicourea guianensis* actividad antibacterial y antiSAP?

Para dar una respuesta parcial a éste problema, la investigación estuvo guiada por los siguientes objetivos:

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana y antiSAP de los extractos acuoso, acetato de etilo, diclorometano y *n*-hexano de la parte aérea de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae).

### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar cual extracto era promisorio para la evaluación de la actividad antibacterial contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- Establecer que extracto era promisorio para la evaluación de la actividad antiSAP de *Candida albicans*.

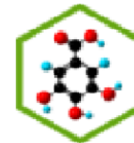


- Realizar un fraccionamiento bio-guiado de los extractos promisorios con actividad antiSAP.
- Evaluar las fracciones obtenidas por su actividad antibacteriana y antiSAP.

### 1.4. Justificación

La incidencia de infecciones fúngicas y bacterianas que afectan la salud de los seres humanos ha tenido un aumento drástico en los últimos años, y esto ha llevado a la búsqueda de nuevos antibióticos y antimicóticos naturales o sintéticos, que permitan combatir estos microorganismos; sin embargo, la administración de estos medicamentos en algunos pacientes no es recomendada, debido a los efectos secundarios que pueden producir, en el caso antibacterial se conocen las penicilinas y las cefalosporinas causantes de hipersensibilidad, alergias y sangrado; en cuanto a los antimicóticos, solo se usan compuestos como la Flucitocina, unos pocos azoles probados y polienos, fundamentalmente Anfotericina B, los cuales, producen efectos adversos intensos; que incluyen, trastornos gastrointestinales, anemia y cefalea, poseen un espectro reducido y escasa penetración en los tejidos (Izasa et al. 2002).

En el caso de la levadura *Candida albicans*, su virulencia es debida a la secreción de 10 isoenzimas de SAP las cuales muestran gran actividad proteolítica (Puras et al. 2000), por lo cual los medicamentos para combatir las son básicamente inhibidores enzimáticos específicos como Pepstatina A; sin embargo, este producto no es seguro al no ser selectivo y ligeramente tóxico en animales, debido a su acción inhibitoria ante las proteasas aspárticas del hospedador (Naglik et al. 2003). Por tal razón, es significativo, realizar la búsqueda de nuevas alternativas naturales para combatir enfermedades e infecciones que los microorganismos originan en los seres humanos; además, en Colombia es muy importante debido a la gran biodiversidad de especies que posee, cuyas familias son reconocidas por tener compuestos activos en el campo biológico, como lo son las Rubiaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Asteraceae, entre muchas otras [Niño et al.



(2006); Villanueva y Arenas (2007)]. Debido a esto, se han incrementado los estudios de extractos de plantas, en la búsqueda de compuestos aislados de origen vegetal para la obtención de productos con capacidad para combatir las infecciones fúngicas y bacterianas.

La familia Rubiaceae es una de las más grandes dentro de las dicotiledóneas y se encuentra en gran abundancia en las regiones tropicales alrededor de la tierra, reportándose el 45% de la distribución total mundial de especies para Colombia, conformada por árboles, arbustos o hierbas; de esta se destaca el género *Palicourea*, encontrándose desde México hasta Brasil (Sánchez 2000), el cual se sabe que biosintetiza 39 alcaloides y en un alto número de casos, estos metabolitos secundarios son responsables por sus actividades biológicas [Sánchez (2000); Niño et al. (2006)].

Por tal razón, se utilizó la planta *Palicourea guianensis* que muestra antecedentes para la cura de las mordeduras de serpientes venenosas, además de presentar a nivel antibacterial actividad contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) y una concentración mínima bactericida (MBC) de 40 µg/mL (Suffredini et al. 2006); estos hechos, sugieren la evaluación de los extractos más promisorios a nivel antibacterial y/o antiSAP, en busca de una alternativa de origen natural para aquellos microorganismos infecciosos que se han convertido en centro de este trabajo con el fin de evitar su proliferación y propagación.

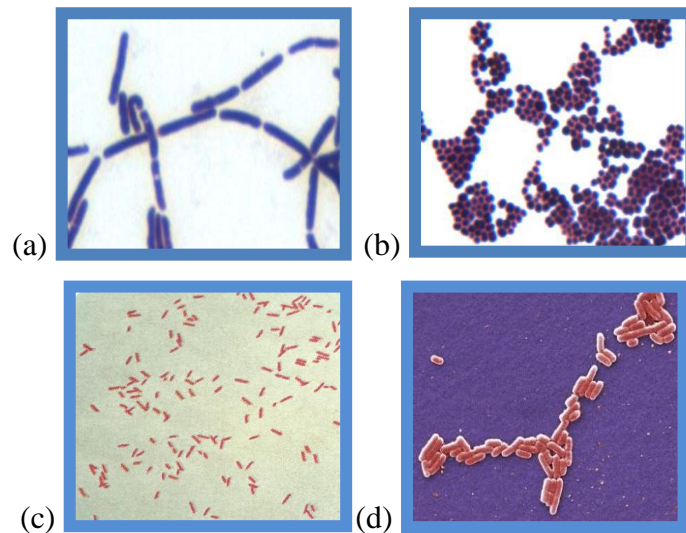


## 2. MARCO TEORICO

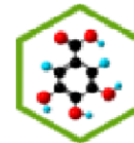
### 2.1. Características de las bacterias

#### 2.1.1. Estructura

Constan de un citoplasma y un material nuclear. Están separadas del exterior por una membrana citoplasmática, que está rodeada por una pared celular. No posee membrana nuclear, ni organelas celulares y el citoplasma está lleno de ribosomas. La membrana citoplasmática es el lugar de obtención de energía por respiración o fotosíntesis; toda la información genética del procariota se encuentra en un solo filamento de DNA. Esta molécula de DNA se presenta como una hebra circular y cerrada; su contorno mide de 0,25 mm a 3 mm. En muchas bacterias se ha encontrado DNA extra cromosómico; los cuales son moléculas pequeñas, igualmente circulares y cerradas, que se denominan plásmidos (Schlegel y Zaborosch 1997). En la **figura 1** se muestran las morfologías típicas de las bacterias estudiadas, y en la **tabla 1** las características más relevantes de éstas.



**Figura 1.** Morfología de las bacterias estudiadas, (a) *Bacillus cereus* (Smith 2005), (b) *Staphylococcus aureus* (Salter y Castro 2009), (c) *Pseudomonas aeruginosa* (Public-Health-Image-Library 1979) y (d) *Escherichia coli* (Haney 2006).



**Tabla 1.** Características de las bacterias estudiadas (Madigan et al. 2009).

BACTERIA	MORFOLOGÍA	CARACTERÍSTICAS GENERALES	ENFERMEDAD PRODUCIDA
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram positivo esporulado	Aeróbios facultativos, hidrolizan caseína y almidón, son termófilos, acidófilos y mesófilos	Intoxicación emética (vómitos y náuseas) e intoxicación diarreica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococo Gram positivo	Anaeróbios facultativos, produce ácidos de glucosa, son mesófilos.	Enfermedades nosocomiales, furúnculos, neumonía, osteomielitis, meningitis y artritis.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos rectos o curvados Gram negativos no esporulados, con flagelo polar	Aeróbico, no fermentativo, son desnitrificantes y mesófilos.	Enfermedades nosocomiales, patógeno oportunista.
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram negativos no esporulados	Anaeróbios facultativos, entérica, fermenta azúcares.	Cuadros epidémicos diarreicos, infecciones cuasi-disentéricas y cuadros febriles agudos, infecciones urinarias.

### 2.1.2. Aspectos generales de la infección bacteriana

Una infección se presenta cuando un microorganismo se establece y desarrolla en un hospedador, causando o no un daño en él; éstos, causan infecciones en pacientes comprometidos, como ocurre con el SIDA y el cáncer. Los animales proporcionan entornos favorables para el crecimiento de muchos microorganismos; son ricos en nutrientes orgánicos y factores de crecimiento requeridos por los quimioorganótrofos, suministrando condiciones de pH y presión osmótica relativamente constantes, y los de sangre caliente mantienen temperaturas elevadas constantes (Prescott y Dunn 1962).



## 2.2. El género *Candida*

### 2.2.1. Características generales

Éstas levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero *C. albicans*, la más frecuente, solo está presente como endosaprófito del tubo digestivo y cavidad bucal de mamíferos y aves; la segunda *C. tropicalis*, se presenta en la zona bucofaringe y *C. glabrata* en la vagina. La mayoría de las levaduras se encuentran en piel sana, excepto *C. albicans* y *C. tropicalis*, que se llegan a aislar en la región perianal, peribucal y dedos. En seres humanos, también se ha aislado *C. lusitaniae*; recientemente, en pacientes con SIDA se ha reportado *C. dubliniensis* (Arenas 2008). Estos, son oportunistas y se convierten en patógenos cuando hay alteraciones de la inmunidad celular, como en pacientes inmunodeficientes, a consecuencia de los cambios fisiológicos de la flora normal.

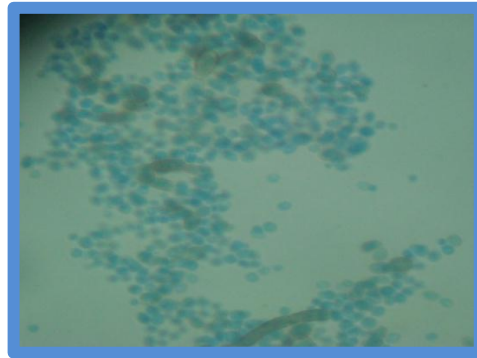
### 2.2.2. Cultivo

*Candida* se desarrolla con bastante facilidad en medios artificiales de cultivo. En 24 horas ya pueden aparecer colonias blancas de consistencia pastosa o cremosa y brillante, pero el máximo desarrollo se obtiene a las 48 o 72 horas. La incubación se hace tanto a 25 °C como a 37 °C, incluso en condiciones de anaerobiosis, aunque en este caso el crecimiento es más pobre. Los medios azucarados son una buena fuente de energía para el crecimiento de estos hongos (Negroni 2009).

## 2.3. *Candida albicans*

Es la especie más importante que conduce a la candidiasis, forma parte de la flora normal de las vías gastrointestinales, la mucosa oral y vaginal, así como también de la piel periorificial de los individuos sanos. *Candida* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, coexistiendo como comensal, pero cuando este balance se pierde, se torna patógena causando afección mucocutánea. Se presenta en el 80 al 90% de los enfermos con SIDA y predominan en boca, esófago y vagina (Arenas 2008). Su morfología se muestra en la **figura 2**.





**Figura 2.** Morfología de *Candida albicans*.

### 2.3.1. Estructura

La pared celular de *C. albicans* está constituida por  $\beta$ -(1,3)-D-glucano (50-70%), manano (20%), quitina (10-20%), proteínas (3-6%) y lípidos (1-5%). Estudios por microscopía electrónica indican diferencias en la organización y la composición de la pared celular en las formas morfogenéticas de ésta levadura. Los hongos que presentan mutaciones se expresan con adherencia disminuida y son menos patógenos (Arenas 2008).

### 2.3.2 Taxonomía

Se trata de un hongo diploide que ha sido clasificado desde el punto de vista taxonómico dentro del orden Cryptococcaceae perteneciente al grupo de los Deuteromycetes u hongos imperfectos. Esta categoría comprende un importante conjunto de hongos en los que no ha sido descrita la fase sexual, pero sí la reproducción asexual mediante la formación de conidios (Carile et al. 1994). Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente como se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Candida albicans* (Ruiz y Alzate 2006).

Reino	División	Clase	Familia	Género	Especie
Fungi	<i>Deuteromycota</i>	<i>Blastomycetes</i>	Cryptococcaceae	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>



### 2.4. Micología

*Candida 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; tales como, temperatura, pH y nutrientes disponibles. Otras formas alargadas con restricciones a intervalos se llaman pseudohifas porque carecen de las paredes paralelas y tabiques de las hifas verdaderas. Hay evidencia de que estas tres formas tienen estímulos y regulación genética distintas, lo que hace a *C. albicans* un hongo polimórfico (Kennet y Ray 2004).

### 2.5. Epidemiología

#### 2.5.1. Patogenia, inmunidad de las infecciones micóticas del género *Candida*.

#### 2.5.2. Aspectos generales de la micosis

Un gran número de enfermedades infecciosas sistémicas pueden ser atribuidas de alguna manera a los hongos y su incidencia aumenta con el uso de antibióticos, citostáticos para el cáncer, enfermedades inmunodepresoras como el SIDA y otros factores que hacen que los hongos, generalmente saprofitos, se comporten como patógenos (Izasa et al. 2002). La posibilidad de invadir los tejidos del organismo y producir enfermedad, depende de la virulencia del agente infeccioso, de la cantidad, la vía de infección, la inmunidad del huésped, el órgano afectado y la coexistencia con otras infecciones o enfermedades (Puras et al. 2000).

#### 2.5.3. Patogenia y virulencia

*C. albicans* puede establecer una infección cuando las defensas inmunológicas y mecánicas del hospedador se ven inmunocomprometidas. Así, existen factores que predisponen para cada tipo de candidiasis; por ejemplo, para la candidiasis oral, existen factores fisiológicos (embarazo, infancia, senectud, etc), alteraciones endocrinas (diabetes, hipotiroidismo, deficiencias nutricionales, etc), defectos inmunológicos, factores locales (dentaduras



postizas, cambios en la composición de la saliva, flora comensal presente, etc), que la favorecen (Budtz-Jorgensen y Lombardi 2000).

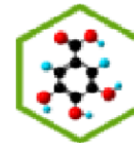
*Candida albicans* es un comensal, la mayor parte de las infecciones son endógenas y el episodio clave parece ser un cambio en la relación entre la levadura y el hospedador. Se han postulado los siguientes mecanismos de virulencia: habilidad de adhesión, transformación de la levadura a hifa (Arenas 2008) y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales juegan un papel central en la patogenicidad de las bacterias, protozoos y levaduras. Aunque muchos microorganismos poseen una variedad de enzimas hidrolíticas, las proteasas son las más frecuentemente asociados con la virulencia (Naglik et al. 2003).

Todas las proteasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas, pero pueden diferir mucho en la especificidad y el mecanismo de acción. Las proteasas se clasifican en función de su mecanismo catalítico, la especificidad de sustrato, o la función fisiológica. Éste estudio se centrará en las proteasas aspárticas que están implicados en una gran variedad de procesos bioquímicos, las más conocidas incluyen la proteasa aspártica del VIH, la pepsina y renina en los seres humanos (Naglik et al. 2003).

#### **2.5.4. Adherencia**

Este factor permite la colonización de los tejidos. La relación entre germinación y adherencia se considera una de las principales causas de virulencia; sin embargo, se demostró que la germinación no siempre es prerequisite para la adherencia. Los receptores de las células del hospedero para las adhesinas de algunos hongos juegan un papel importante; éste es el caso de la fibronectina, trombina, lectinas y el factor G, esenciales para que el microorganismo se establezca en el tejido (Gil 1997).

Varias especies de hongos, sobre todo las levaduras, pueden colonizar las superficies mucosas de los sistemas digestivo y genital femenino. En *C. albicans*, se considera que el proceso de infección comienza con la adherencia del organismo comensal a las células de la



mucosa y queratinocitos, que interactúan en la relación de la pared fúngica de polisacáridos (mananos) con un receptor en la célula epitelial (Mitchell 1998).

### 2.5.5. Invasión

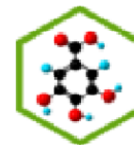
Desencadenados por la temperatura, los hongos dimórficos del ambiente sufren un cambio metabólico similar a la respuesta de golpe de calor y cambian por completo su morfología y crecimiento a una forma patógena. La invasión directa, a través de barreras mucosas por levadura endógena de *C. albicans*, también está acompañada por 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. La producción de enzimas extracelulares (proteasas, lipasas y elastasas), se encuentran en la forma de hifas de *Candida* y de muchos otros hongos dimórficos patógenos. Aunque estas enzimas deben contribuir en algún aspecto de la invasión o diseminación, se desconoce el papel preciso en cualquier hongo (Mitchell 1998).

### 2.6. Candidiasis (aspectos clínicos)

*Candida albicans* puede producir distintos tipos de infecciones conocidas genéricamente con el nombre de candidiasis. La calidad del simbiote no patógeno puede modificarse radicalmente cuando concurren factores microambientales predisponentes (cambios en el pH, defectos en linfocitos T y B, disminución de la microbiota bacteriana por antibióticos, etc). Las candidiasis pueden clasificarse en dos tipos fundamentales, superficiales y sistémicas (Arenas 2008).

#### 2.6.1. Manifestaciones

Se desconoce el periodo de incubación. Hay formas localizadas, difuminadas y profundas, sistémicas y alérgicas. En cada ubicación hay diferentes modalidades clínicas. En la **tabla 3** se muestran las principales manifestaciones de candidiasis.



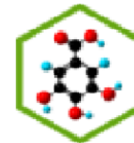
**Tabla 3.** Principales manifestaciones de la infecciones de *C. albicans* (Arenas 2008).

ÓRGANO	MANIFESTACIÓN
<b>Boca</b>	(Muguet o algodoncillo), afecta velo, paladar, carrillos y encías; aparece enrojecimiento y placas mucosas blanquecinas y adherentes. Es asintomático o se acompañan de sensación de quemadura, sequedad en la boca y sabor metálico.
<b>Vagina</b>	Leucorrea (flujo) blanquecina, espesa y grumosa; prurito intenso, sobre todo premenstrual y extensión de las lesiones a la vulva y perianales. Puede haber dolor y dispareunia. La mucosa vaginal muestra placas blanquecinas, amarillentas o pseudomembranosas.
<b>Pene</b>	La piel del glande es macerada, con placas blanquecinas, vesículas o pústulas y erupciones secundarias; si se acompaña de uretritis, hay eritema del meato con disuria y polaquiuria.
<b>Piel</b>	Se afectan los pliegues axilares, submamarios, inguinales, o el surco interglúteo, o los espacios interdigitales de manos y pies. Se caracterizan por eritema, descamación y piel macerada, bordes marcados por un collarite de escamas y lesiones satélite papulares, vesiculares o pustulosas. Se acompañan de prurito y dolor.
<b>Esófago</b>	Estenosis, disfagia, náusea, vómito y hemorragia del tubo digestivo.
<b>Estómago</b>	Si hay perforación, puede sobrevenir en peritonitis, es poco frecuente.

De éstas patologías, la candidiasis bucofaríngea y gástrica, son las más frecuentes en pacientes con SIDA, leucemia o candidiasis mucocutánea crónica. La candidiasis diseminada constituye una infección multiorgánica (aparato urinario y riñones, endocardio, meninges) (Arenas 2008).

### 2.6.2. Antimicóticos más usados en el tratamiento de infecciones de *Candida*

A pesar del avance que en la terapia antimicótica significó la eficacia de los azoles, tanto para el tratamiento tópico como sistémico, no han sido ajenos a la aparición de microorganismos resistentes y por ello se continúa la búsqueda de nuevos fármacos (Izasa et al. 2002). Algunos de los más usados se muestran en la **tabla 4**.



**Tabla 4.** Antimicóticos más usados en el tratamiento de candidiasis [Rivero (2008); Izasa et al. (2002)].

CLASIFICACIÓN	EJEMPLOS	MECANISMO DE ACCIÓN
<b>Polienos</b>	Nistatina y anfotericina B	Actúan uniéndose al ergosterol de la pared fúngica aumentando la permeabilidad osmótica y la lisis celular
<b>Azoles: Imidazoles y Triazoles</b>	Clotrimazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol	Inhiben las enzimas dependientes del citocromo P-450 fúngico y la síntesis del ergosterol de la pared
<b>Inhibidores de la síntesis de pirimidina</b>	Flucitosina	Inhibe la síntesis de ADN y ARN fúngicos
<b>Equinocandinas</b>	Caspofungina, micafungina y anidulafungina	Inhiben la enzima 1,3-β-glucano-sintasa, involucrada en la síntesis de la pared fúngica

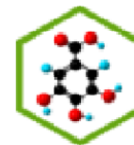
### 2.6.3. Mecanismos de resistencia

La pared celular y la membrana citoplasmática representan una barrera para que los antimicóticos alcancen el interior del hongo. Las cadenas de quitina de la pared celular se disponen de forma antiparalela y se asocian *in vivo* mediante puentes de hidrógeno formando una estructura fibrilar insoluble que confiere a la pared celular gran resistencia (Pedrós 2003). Aunque casi siempre se considera un mecanismo de resistencia innata, hay ejemplos en los cuales los cambios de los esteroides de la membrana parecen limitar la permeabilidad a los azoles (Mitchell 1998).

## 2.7. Proteasa Aspártica Secretada (SAP)

### 2.7.1. Izoenzimas

Las tres enzimas hidrolíticas extracelulares más importantes producidas por *C. albicans* son la Proteasa Aspártica Secretada (SAP), fosfolipasa B y lipasas, de éstas, las proteínas SAP, han sido codificadas en una familia de 10 genes, los cuales han sido los más ampliamente



estudiados como los principales determinantes de su virulencia (Naglik et al. 2003).

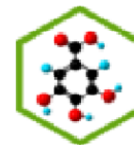
Algunas características de las isoenzimas se muestran en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Características de las isoenzimas de SAP de *C. albicans* (Naglik et al. 2003).

ISOENZIMA	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	MASA MOLAR (kDa)	RANGO DE pH	PUNTO ISO-ELECTRICO	FASE DE EXPRESIÓN GENÉTICA
SAP1	50	38, 40, 40	2,5 – 5,5	4,0	Levadura, cambio fenotípico
SAP2	56	40, 41, 43, 45, 48, 49	2,5 – 5,5	4,25; 4,4	Levadura
SAP3	58	41, 42	2,0 – 5,0	5,7	Levadura, cambio fenotípico
SAP4	75	40	4,0 – 7,0	ND	Hifas
SAP5	76	37	3,0 – 7,0	ND	Hifas
SAP6	76	40	3,0 – 7,0	ND	Hifas
SAP7	211	ND*	ND	ND	ND
SAP8	73	41	ND	ND	ND
SAP9	50	ND	ND	ND	ND
SAP10	38	ND	ND	ND	ND

\*ND: No determinado.

Los estudios estructurales de la familia de proteasas de *C. albicans* han encontrado que SAP2, es la proteína más abundante secretada *in vitro* cuando se cultiva en la presencia de proteínas como la única fuente de nitrógeno; también, son conocidas por su capacidad para degradar una serie de proteínas importantes para la defensa del paciente, como las inmunoglobulinas y citoquinas y ayudar en la adhesión de la levadura al tejido del huésped (Ruchel et al. 1992).



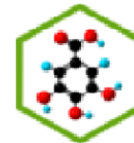
### 2.7.2. Patogenia

Los roles y funciones de la familia SAP se pueden deducir por medio de las siguientes maneras: (i) la correlación entre la producción de SAP *in vitro* y la virulencia de *Candida*, (ii) la degradación de las cadenas pesadas de inmunoglobulina G, queratina, colágeno acidificado y proteínas de la matriz extracelular (Arias y Marulanda 2010), (iii) la producción de proteínas de SAP y respuesta inmune hacia éstas en las infecciones de animales y humanos, (iv) la expresión genética durante las infecciones por *Candida*, (v) la modulación de la virulencia de *C. albicans* por los inhibidores de proteasa aspártica, y (vi) el uso de mutantes de SAP-deficientes para analizar la virulencia de *C. albicans*, en las cuales éstos resultan poco virulentos o avirulentos (Naglik et al. 2003). Algunas infecciones atribuidas a SAP se encuentran en la **tabla 6**, en esta se resume la expresión de las isoenzimas.

**Tabla 6.** Infecciones más comunes de *C. albicans* y expresión de SAP (Naglik et al. 2003).

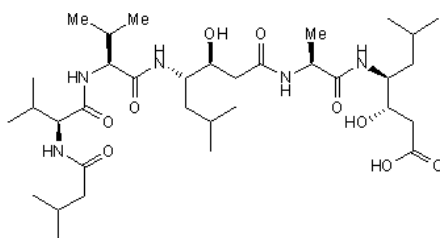
MODELO ESTUDIADO	TIPO DE CANDIDIASIS	GENES DE SAP	ORDEN DE EXPRESIÓN DE GENES
Humano	Oral y Vaginal	<i>sap1</i> a <i>sap8</i>	<i>sap2</i> , <i>sap4</i> y <i>sap6</i> predominan
Epitelio humano reconstruido <i>in vitro</i>	Oral	<i>sap1</i> a <i>sap6</i> , <i>sap8</i>	<i>sap1</i> y <i>sap3</i> > <i>sap6</i> > <i>sap2</i>
Epitelio humano reconstruido <i>in vitro</i>	Vaginal	<i>sap1</i> a <i>sap10</i>	<i>sap2</i> , <i>sap9</i> y <i>sap10</i> seguido de <i>sap2</i> , <i>sap4</i> y <i>sap5</i> y finalmente <i>sap4</i> y <i>sap7</i>
Epitelio humano reconstruido <i>in vitro</i>	Cutánea	<i>sap1</i> a <i>sap6</i> , <i>sap8</i>	<i>sap1</i> y <i>sap2</i> > <i>sap8</i> > <i>sap6</i> > <i>sap3</i> y finalmente <i>sap6</i> con formación de hifas





### 2.7.3. Inhibición

Una de las oportunidades para el desarrollo de nuevos compuestos activos contra especies de *Candida* incluye el desarrollo de fármacos dirigidos contra las proteinasas de ésta. En los últimos años, han emergido dos áreas de interés (el papel de las proteinasas de *Candida* en la patogénesis y la búsqueda de nuevos antifúngicos), las cuales, han impulsado el uso de inhibidores de la proteasa aspártica (IP) en la investigación de *Candida*. Estos estudios realizados con pepstatina A (clásico IP) e inhibidores de la proteasa del VIH (Naglik et al. 2003). Estudios recientes usando inhibidores de proteasa han demostrado que la inhibición de SAP con pepstatina A (**Figura 3**), previene la penetración inicial de *C. albicans* a través de las mucosas superficiales, causante de daños en los tejidos oral y vaginal; pero no evita la difusión una vez las células del hongo hayan alcanzado los vasos sanguíneos (Naglik et al. 2004). Aunque SAP2 es inhibido por pepstatina A, no es un agente ideal para la terapia en vista de su falta de potencia y seguridad (Abad-Zapatero et al. 1996).

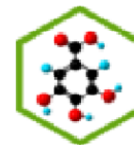


**Figura 3.** Estructura de pepstatina A (Marciniszyn et al. 1976).

No existen reportes de mecanismos de inhibición a nivel genético de compuestos vegetales, el cual es otro mecanismo de inhibición aceptable; por ello, el hallazgo de compuestos que puedan inhibir o afectar la expresión de la familia del gen *sap*, podrían reducir el potencial patogénico de este microorganismo.

### 2.8. Descripción de la familia Rubiaceae

Es una familia que muestra mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Es una de las más diversas a nivel mundial, con alrededor de 10700 especies, algunas se extienden hacia regiones templadas donde predominan las de hábito herbáceo, mientras que



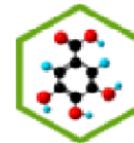
en los trópicos se hallan preferentemente arbustos y árboles de bajo porte y algunos de ellos gigantes (Mendoza et al. 2004). En Colombia, la familia Rubiaceae no sólo es una de las más diversas sino con mayor número de individuos en las regiones Andina, Amazónica y del Chocó Biogeográfico (Mendoza et al. 2004).

### 2.8.1. Morfología general de la familia Rubiaceae

En la **tabla 7** se describen los órganos más importantes de las plantas.

**Tabla 7.** Descripción de los órganos de la familia Rubiaceae [Teran-Aguilar (2006); Mendoza et al. (2004)].

ÓRGANO	DESCRIPCIÓN
<b>Hojas</b>	Son opuestas o aparentemente verticiladas, el tamaño medio es de 10-20 cm de largo por 5-10 cm de ancho, por lo general el margen de la hoja es entero, el número de hojas de un nudo aumenta de tres a más en espiral.
<b>Estípulas</b>	Están dispuestas entre los pecíolos (Interpeciolares), producen resinas y exudados abundantes; la resina probablemente protege los brotes terminales de herbívoros, éstas son connadas envainadas en la base y a menudo caducas y solitarias, es el rasgo vegetativo característico de las Rubiaceae.
<b>Flores</b>	Están dispuestas en inflorescencias determinadas o a veces son solitarias, usualmente están protegidas por brácteas, son actinomorfas o raras veces ligeramente zigomorfas, hermafroditas y frecuentemente son heterostilas, son tetrámeras a pentámeras o raras veces hasta pentámeras con los sépalos totalmente connados al ápice del ovario ínfero, forman un tubo con forma de cilindro, campana o embudo con los lóbulos valvados. Los estambres son en igual número que los pétalos y están alternando con los lóbulos de la corola.
<b>Inflorescencia</b>	Ocurren diferentes tipos de inflorescencia entre las Rubiaceae: a) espiga, b) panícula, c) umbela, d) corimbosa, e) fascículo, f) capítulo, g) cima helicoidal. Son de posición terminal o a menudo axilar.
<b>Frutos</b>	Presentan una gran variedad de tipos de frutos, pueden ser secos (cápsulas o ezquizocarpo) o carnosos (drupa o baya). Las semillas están envueltas por una pulpa carnosa y las drupas contienen 2-5 cavidades duras. Pueden presentar endospermo oleáceo o no.



### 2.8.2. Farmacología y fitoquímica de la familia Rubiaceae

La familia Rubiaceae presenta especies con importancia económica ya sea en la producción de tintes, sustancias médicas, productos comestibles o maderables. Merecen mención especial el café, bebida estimulante que contiene cafeína y que se obtiene a partir de las semillas tostadas de algunas especies del género *Coffea* (Mendoza et al. 2004).

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 cardíacas, se obtiene a partir de la corteza de especies de *Cinchona*, *Remijia* y *Ladembergia*. La “ipecaacuana”, que es una droga rica en emetina, cafeína y psycotrina, es utilizada en bajas dosis como balsámica, astringente, emética, expectorante y antidiarreica, se obtiene de las raíces de *Psychotria ipecuacanha* (Mendoza et al. 2004).

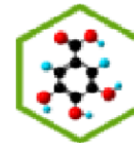
La yohimbina, derivada del indol y que tiene propiedades afrodisíacas, simpaticolíticas e hipotensoras, se obtiene de la corteza de *Pausinytalia yohimbe* (Mendoza et al. 2004).

### 2.8.3. Descripción del género *Palicourea*

El género *Palicourea* es bastante afín al género *Psychotria*; su principal diferencia es el anillo de tricomas en el interior del tubo de la corola. Algunas especies de este género se distinguen vegetativamente por la forma de la estípula con dos lóbulos triangulares a cada lado del nudo y las venas secundarias arqueadas, sobresalientes y que se disipan antes de llegar a la margen de la lámina (Mendoza et al. 2004).

### 2.8.4. Morfología general del género *Palicourea*

La morfología del género se muestra en la **tabla 8**.

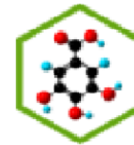


**Tabla 8.** Descripción de los órganos del género *Palicourea* (Mendoza et al. 2004).

ÓRGANO	DESCRIPCIÓN
<b>Hábito</b>	Arbustos o árboles de moderado porte (5-8 m), glabros o pubescentes; tricomas simples; ramas teretes o cuadrangulares, generalmente compactas pero en algunas especies huecas.
<b>Hojas</b>	Opuestas, decusadas, algunas veces verticiladas (3-4 hojas por nudo), pecioladas; lámina elíptica, ovoide, obovoide, oblonga o redondeada, cartácea o papirácea; venación conspicua, venas secundarias arqueadas; venas terciarias generalmente numerosas, paralelas entre sí y oblicuas a la vena media.
<b>Estípulas</b>	Persistentes, unidas inter e intrapeciolarmente formando un pequeño tubo, con dos lóbulos agudos a redondeados en cada lado del nudo.
<b>Flores</b>	Bisexual, heterostila (distila), actinomorfa o zigomorfa, de tamaño pequeño a mediano (0,8-4 cm longitud).
<b>Inflorescencia</b>	Terminal, en apariencia paniculada pero que corresponde a una cima muy ramificada, raras veces en espiga, erecta o péndula; los ejes son de colores llamativos como rojo, amarillo, verde, naranja o lila; generalmente con pequeñas brácteas en las ramificaciones; flores pediceladas o subsésiles, sustentada por un pequeño pulvínulo de 1-2 mm de longitud.
<b>Frutos</b>	Drupáceo, glabro, levemente costillado; la parte carnosa es delgada; color verde, amarillo, azul o morado oscuro; pirenos 1 a 2, planoconvexos, de superficie dura, con una semilla cada uno.

### 2.8.5. Distribución y número de especies del género *Palicourea*

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 1000 y 2000 m de altitud (Mendoza et al. 2004).



### 2.8.6. Usos y nombres vernáculos del género *Palicourea*

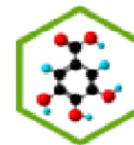
Las especies de *Palicourea* son conocidas genéricamente como “cafecillos” en la zona de La Planada en el departamento de Nariño o “café de monte” en el departamento del Cauca; *Palicourea amethystina*, *Palicourea demissa* Standl., y *Palicourea angustifolia* Kunth se conocen con el nombre de “majua” también en Nariño. En la misma localidad se conoce a *Palicourea acanthacea* con el nombre de “mazamorro”. En el departamento del Cauca, *Palicourea angustifolia* Kunth es conocida como “pepa de pava”, “palo blanco”, “cruz” y “mortiño de montaña”. Pérez (1947) citó el uso medicinal como amargo de *Palicourea lineariflora* Werham, especie común asociada a robledales entre los departamentos de Cundinamarca y Norte de Santander. En la costa pacífica nariñense se conoce a *Palicourea guianensis* Aublet como “cagalera”, “flor amarilla arisca” y se emplea en el tratamiento de las hemorroides (Mendoza et al. 2004).

### 2.8.7. Productos naturales y farmacognosia del género *Palicourea*

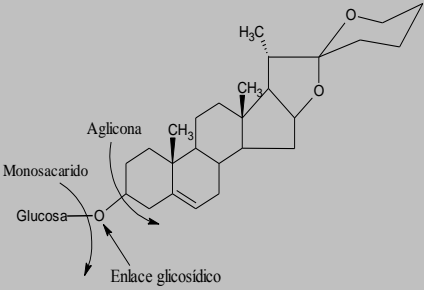
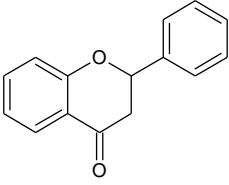
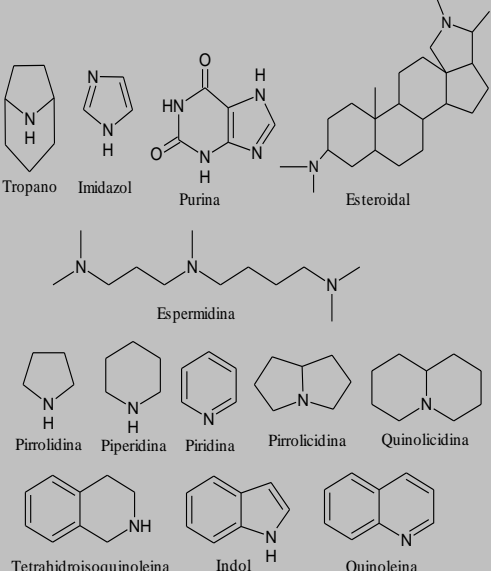
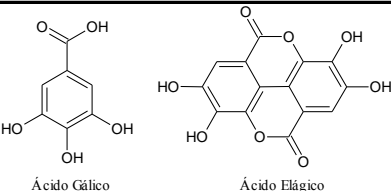
Los miembros del género *Palicourea* se han utilizado en la medicina tradicional para tratar el cáncer y son bien conocidos por su toxicidad hacia los animales. Investigaciones químicas de varias especies han llevado al aislamiento de alcaloides, triterpenos, cumarinas, ácidos fenólicos y un péptido macrocíclico anti-VIH. Las especies del género *Palicourea* parecen estar estrechamente relacionadas con el subgénero *Heteropsychotria* del gran género *Psychotria* L. (Rubiaceae), como lo demuestra la presencia de alcaloides indol monoterpénicos glicosidados en ambos grupos. La especie *Palicourea crocea* mostró el aislamiento de dos alcaloides desconocidos, croceaina A y psychollatina (Narine y Maxwell 2009).

### 2.9. Compuestos químicos de importancia biológica en *Palicourea*

Los compuestos presentes en el género *Palicourea* se muestran en la **Tabla 9**.



**Tabla 9.** Compuestos presentes en el género *Palicourea*.

NOMBRE	ESTRUCTURA BÁSICA	USOS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
<b>Saponinas</b> (Castro 2006)		Fitoterapia, cosmética, propiedades fisiológicas, inmunológicas y farmacológicas	Antiparasitaria, citotóxica y antitumoral, antiviral, antiinflamatoria y antifúngica
<b>Flavonoides</b> (Castro y Orallo 2003)	 <p>2-Fenilcromil-4-ona</p>	Agente terapéuticos frente a una amplia variedad de enfermedades	Antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras.
<b>Alcaloides</b> (Arango 2008)		Farmacos, anésticos y analgésicos.	Antibacterial, antimicótica, alteración del sistema nervioso, estimulante, depresivos.
<b>Taninos</b> [Ruibal et al. (2003), Li et al. (2001)]		Productos farmacológicos	Antiviral, antibacterial y antiSAP, antioxidante.

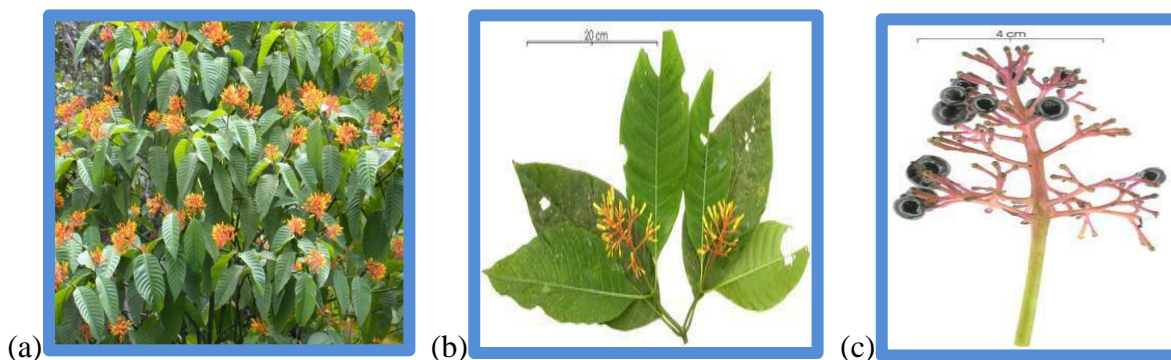
## 2.10. Descripción de la especie *Palicourea guianensis*

### 2.10.1 Morfología general de la especie *Palicourea guianensis*

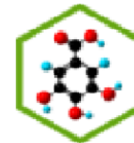
La morfología de la especie se muestra en la **tabla 10** y algunas fotografías de esta se muestran en la **figura 4**.

**Tabla 10.** Descripción de la especie *Palicourea guianensis* (Sánchez 2000).

ÓRGANO	DESCRIPCIÓN
<b>Hábito</b>	Pequeño o arbusto. Hasta de 6 metros de altura; ramas cuadrangulares; glabro, con estípulas interpeciolares, lobuladas cerca de la base, de 0,5 a 1,5 cm de largo, persistentes.
<b>Hojas</b>	Simples, opuestas, de 12-25 cm de largo y 6-18 cm de ancho, ovado - elípticas o elíptico-oblongas, el ápice acuminado o agudo y la base redondeada u obtusa, coriáceas; peciolo hasta de 3 cm de largo.
<b>Flores</b>	En panículas terminales, solitarias, de 8-18 cm de largo, las ramificaciones rojo-anaranjadas o purpúreas, con pedúnculos cuadrangulares; cáliz lobulado; corola tubular, hasta de 2,5 cm de largo, rojo-anaranjada, amarilla o anaranjada.
<b>Frutos</b>	Cápsulas ovoides, de 4-8 mm de largo, purpúreas, apiculadas en el ápice, costilladas; con dos semillas, aplanadas de un lado, redondeadas del otro



**Figura 4.** Fotografía de la especie *Palicourea guianensis*, (a) Arbustos (Top-Tropicals-Plant-Catalog 2011), (b) Hojas y flores, (c) Fruto (Pickering y Wyatt 2006).



## 3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

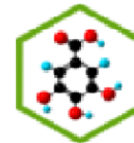
### 3.1. Condiciones instrumentales generales

- Fluorescence Spectrophotometer, Varian, con software Cary Eclipse (Santa Clara, California, USA).
- HPLC Jasco 2000 plus (Mary's Court Easton, Maryland, USA), equipado con bomba de gradiente cuaternario PU-2089 plus, automuestreador inteligente AS-2059 plus, horno de columna CO-2065 plus, detector inteligente de arreglo de diodos MD-2015 plus, un LC Net II/ADC y controlado por el software EZChrom Elite.
- Balanza analítica OHAUS, modelo PA214 (Lindavista, México D.F, México).
- Ultrasonido Fisher Scientific, modelo FS60H (Barrington, Illinois, USA).
- Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetracell, BIO RAD (Berkeley, California, USA).
- Cabina de seguridad biológica C4, modelo FLC 120 (Cali, Valle del Cauca; Colombia).
- Incubadora VELP Scientifica, modelo FOC 225 i (Usmate, Monza and Brianza, Italia)
- RT-PCR SMART CYCLER de CEPHEID, controlado por el software SMART CYCLER (Sunnyvale, California, USA).
- Vortex Fisher Scientific (Barrington, Illinois, USA).
- Centrífuga Eppendorf, modelo Minispin plus (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España).
- Kit de extracción de RNA RNeasy® Mini Kit QIAGEN (Valencia California, USA).
- Kit de RT-PCR en tiempo real SYBR® Green QIAGEN (Valencia California, USA).

### 3.2. Material vegetal

Se evaluaron los extractos secos provenientes de la parte aérea de la planta *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) (**Figura 4**), recolectada en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira y registrada en el Herbario Nacional de Colombia bajo el número COL 519790.





### 3.2.1. Extracción del material vegetal

El material recolectado se secó a temperatura ambiente por 8 días; posteriormente, se secó en una estufa a 50 °C durante dos días, se separaron las hojas de las ramas, se molieron y almacenaron. En el momento de la extracción 600 g de material seco y molido fueron homogenizados, dividiéndolos en 6 porciones iguales de 100 g cada una para facilitar su extracción; a cada porción se le adicionó 6 L de metanol en total y se extrajo por ultrasonido en porciones sucesivas de 1 L durante 20 min, se filtró a gravedad y se redujo el volumen mediante rotaevaporación (**Figura 5**). A éste extracto se le realizó un espectro de absorción UV entre 200 nm y 450 nm usando como blanco metanol, para así determinar que posibles compuestos estaban presentes de acuerdo a sus máximos de absorción; además, a través de pruebas sencillas se estudiaron los metabolitos secundarios presentes en éste, tendientes a identificar fitocompuestos tales como flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos y fenoles (Martínez et al. 2008). El extracto se rotuló como PgMeOH.

Se tomaron 1800 mL del extracto en metanol y se adicionaron 200 mL de agua, se dividieron en 8 porciones, a estas se les realizaron 5 extracciones líquido-líquido con 200 mL de *n*-hexano, para obtener el extracto de *n*-hexano, este se llevó a sequedad y se nombró (PgHex); al residuo se le eliminó el metanol mediante rotavaporación obteniendo 600 mL los cuales se dividieron en 3 porciones, estas se sometieron a 3 extracciones líquido-líquido con 200 mL de diclorometano, para preparar el extracto de diclorometano, el cual se secó por rotavaporación y se rotuló (PgDiClmet); el extracto acuoso se sometió nuevamente a 3 extracciones líquido-líquido con 200 mL de acetato de etilo, y se obtuvo el extracto de acetato de etilo, este se llevó a sequedad y se designó (PgAcOEt); el extracto acuoso también se concentró mediante rotavaporación, y se denominó (PgAcu). De esta manera se adquirieron los diferentes tipos de fitocompuestos presentes en el extracto metanólico y los diferentes extractos a evaluar (**Figura 6**).

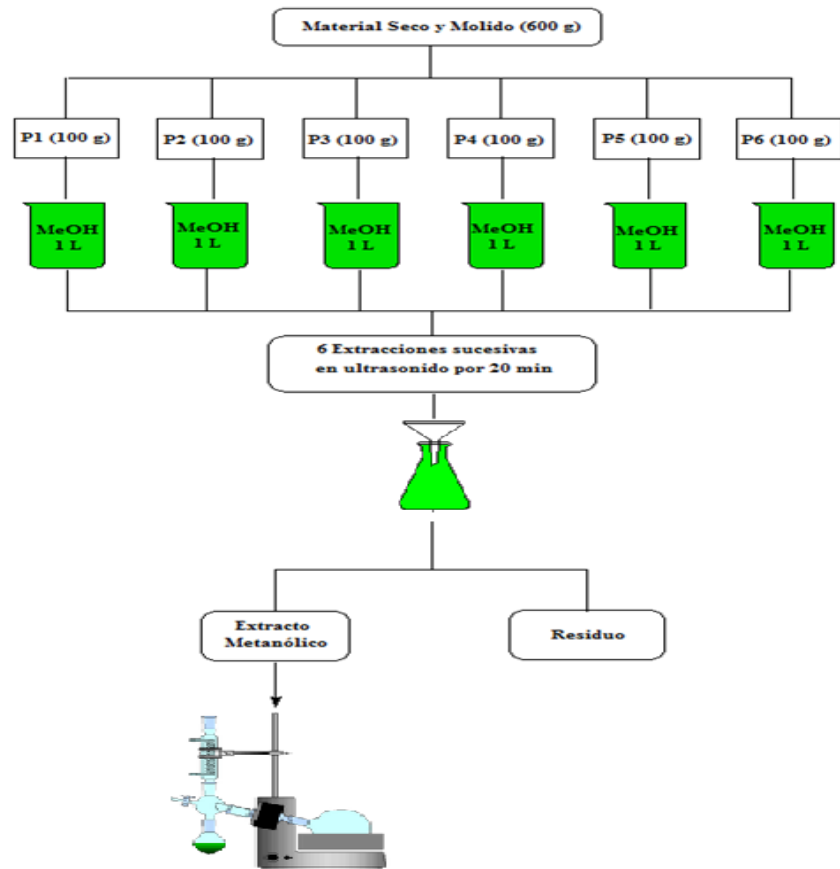


Figura 5. Esquema de la extracción inicial de material vegetal.

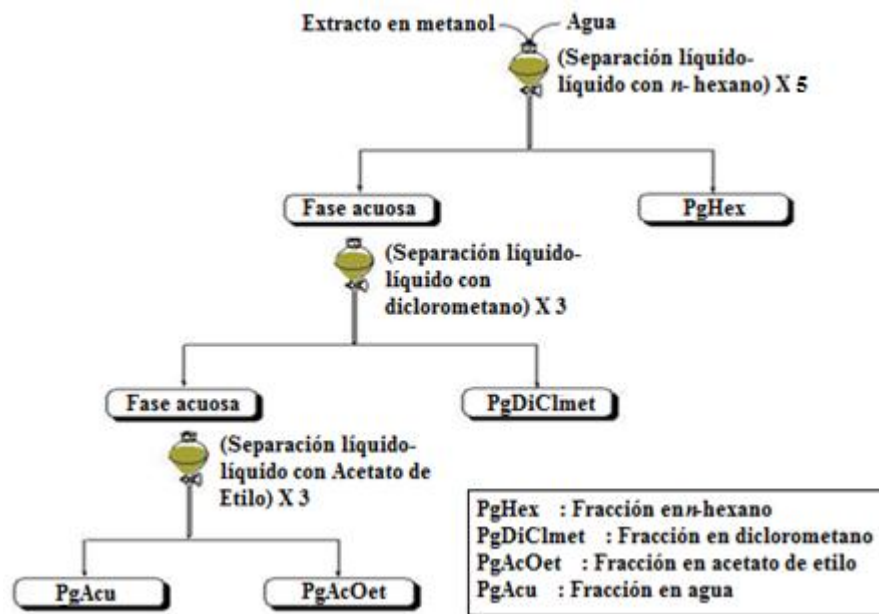
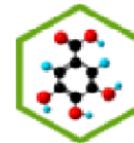
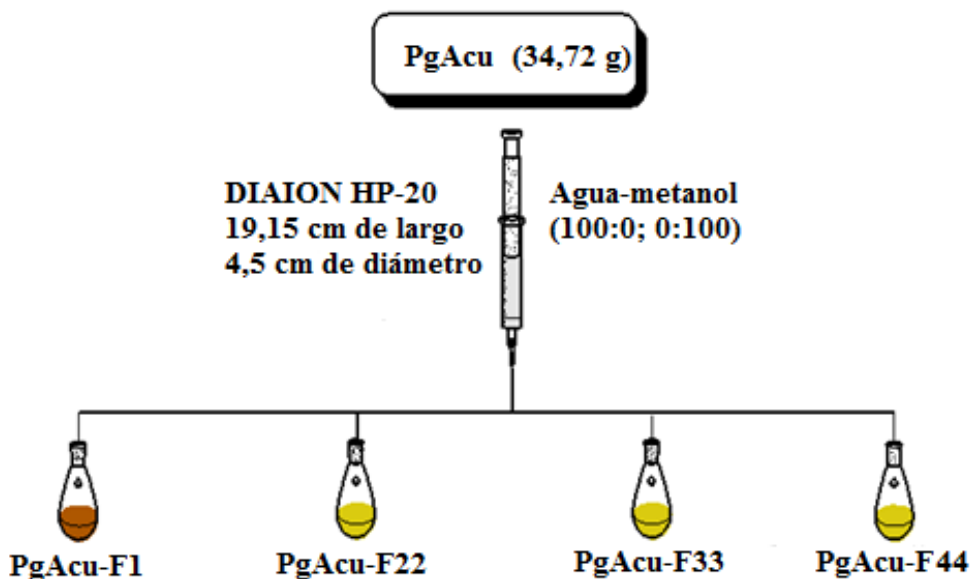


Figura 6. Esquema de la extracción del extracto metanólico.

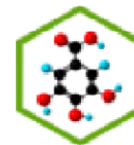


A los extractos resultantes de PgHex, PgDiClmet, PgAcOet y PgAcu se les realizó el mismo estudio del extracto crudo en metanol.

Finalmente, el extracto acuoso se fraccionó debido a que presentó actividad antiSAP favorable, y una gran estabilidad observadas en mediciones fluorimétricas preliminares. El fraccionamiento se realizó sobre DIAION HP-20, empleando un gradiente de agua-metanol, variando la proporción de los solventes en un 5% por etapa, desde un 100% de agua hasta un 100% de metanol; de este fraccionamiento se recogieron 44 fracciones de 500 mL, rotuladas como PgAcuF-1, sucesivamente hasta PgAcuF-44 (**Figura 7**). Finalmente, se realizó una corrida en un HPLC marca JASCO para obtener el perfil cromatográfico y reunir las fracciones que presentaban igual número de picos, tiempo de retención y espectro UV. Los métodos de HPLC están basados en la realización de un procedimiento previo realizado en cromatografía de capa fina la cual se empleó un espectro de polaridades amplio a fin de encontrar el sistema de elución adecuado, constituido por ácido fosfórico 0,05%-isopropanol (7:3), para cromatografía en fase reversa. El método cromatográfico utilizado se muestra en la **tabla 11** y la **figura 8**.

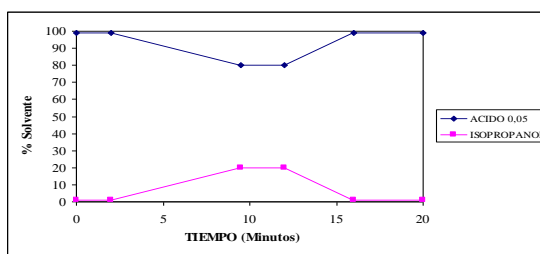


**Figura 7.** Esquema del fraccionamiento del PgAcu.



**Tabla 11.** Método de HPLC para realizar el perfil cromatográfico de los extractos de *Palicourea guianensis*.

<b>Columna</b>	Chromolith Performance RP-18e 100-4.6mm
<b>Flujo</b>	4 mL/min
<b>Gradiente</b>	Ácido fosfórico 0,05%-isopropanol: 0-2 min (99-1); 9,5-12 min (80-20); 16-20 min (99-1)
<b>Tiempo de corrida</b>	20 min
<b>Detector</b>	PDA (200-450 nm)
<b>Volumen de Inyección</b>	20 µL
<b>Temperatura</b>	40 °C



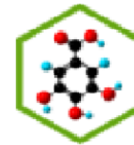
**Figura 8.** Variación de la proporción de los solventes A y B del método cromatográfico.

### 3.3. Microorganismos de prueba

Para la actividad antibacterial y antiSAP se usaron cepas liofilizadas, replicadas en caldo BHI y posteriormente en agar Plate Count para el caso de las bacterias y para el hongo en agar Biggy, éstas se muestran en la **tabla 12**.

**Tabla 12.** Cepas usadas en el desarrollo de las actividades.

TIPO	NOMBRE	REFERENCIA
Levadura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
Bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
Bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923



### 3.4. Controles

Para la actividad antibacterial se utilizó como controles positivos diferentes antibióticos cuya elección se basó en los resultados obtenidos de diferentes antibiogramas realizados, éstos fueron Ampicilina sódica, Ampicilina anhídrica, Amoxicilina y Trimetoprim, para los tres primeros se empleó como solvente agua y para el último agua - etanol (1:1); se prepararon soluciones de 500 µg/mL, 250 µg/mL y 100 µg/mL. Para la actividad antiSAP se utilizó como control positivo pepstatina A P5318-25 MG (Sigma), un inhibidor específico para SAP de *C. albicans* (Naglik et al. 2003); éste se disolvió en DMSO al 30% con ayuda de ultrasonido y se preparó a una concentración de 100 µM. Como control de la actividad por fluorometría se usó un coctel del proteasas (SIGMA), en una disolución de 1/100000.

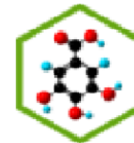
### 3.5. Determinación de la actividad antibacteriana

#### 3.5.1. Crecimiento de bacterias e inhibición

La preparación del inóculo se realizó tomando de 3 a 5 colonias aisladas del microorganismo, de igual morfología; se transfirieron a un tubo con 4 a 5 mL de un medio de cultivo adecuado, tal como infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó durante 24 h a 37 °C; transcurrido este tiempo, 1 mL del inóculo se transfirió a 4 mL de caldo y se midió la absorbancia a 625 nm, dependiendo de este resultado y del tiempo de generación característico de la bacteria, se calculó el tiempo de incubación para obtener una turbidez de 0,100 de absorbancia óptimamente comparable a un estándar de 0,5 Mc Farland, de forma que las bacterias estuvieran en fase exponencial al momento de realizar el ensayo (Ramírez 2008).

#### 3.5.2. Método de difusión en agar

En las cajas de Petri se adicionó 1 mL de la cepa bacteriana y 20 mL de agar Mueller-Hinton a una temperatura de 45 °C, con homogenización. Después de solidificado el agar,



se realizaron 5 perforaciones con un sacabocado de 5 mm, rompiendo el fondo de éste; luego se adicionó a cada uno 15  $\mu\text{L}$  del mismo medio para sellar y garantizar que todos los pozos se encontraran a la misma profundidad. Posteriormente, en cada pozo se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de las sustancias a evaluar. Se incubó a 37 °C durante 24 horas. A continuación, se determinó el halo de inhibición para cada muestra. Como control positivo se usaron los antibióticos ampicilina sódica (100 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ampicilina anhidra (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y trimethoprim (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (concentraciones determinadas por la realización de un antibiograma); para el control negativo se usó el solvente en el cual se encontraban diluidas la soluciones a evaluar y finalmente el control de crecimiento bacteriano, el cual consistió en las bacterias sembradas sin ningún tipo de aditivo (Ramírez 2008).

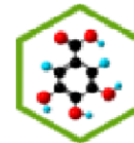
### 3.6. Determinación de la actividad antiSAP

#### 3.6.1. Crecimiento de *Candida albicans* y producción de SAP

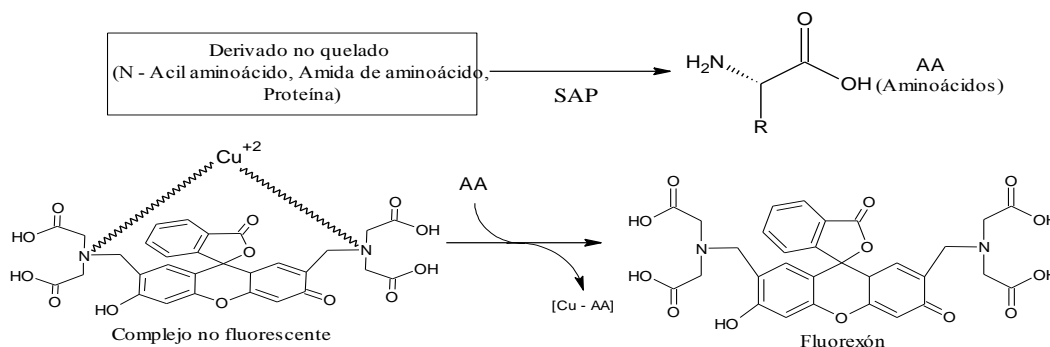
El crecimiento de la levadura se efectuó inicialmente en caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubando a 28 °C por 48 horas; posteriormente, se replicó en agar Biggy, a iguales condiciones; pasado esto, se sembró en una solución de caldo YNB-1X (Yeast Nitrogen Base) con BSA (Bovine Serum Albumin) al 0,1% para inducir la producción de SAP, finalmente, se incubaron a 28 °C, tomando 500  $\mu\text{L}$  de muestra a las 22 h, 24 h y 26 h posteriores (Arias y Marulanda 2010). La concentración de colonias en el YNB-1X fue de 1 UFC/mL de medio.

#### 3.6.2. Método fluorimétrico

La medición de SAP se realizó basándose en la técnica descrita por (Arias y Marulanda 2010), después del procedimiento de inducción se realizó una reacción de acoplamiento entre fluorexón (L) y  $\text{Cu}^{+2}$ , la cual se debe ejecutar como mínimo dos horas antes de la medición fluorimétrica para permitir que la reacción se complete y estabilice. El ensayo se basa en la capacidad que tiene este compuesto para formar un complejo de transición no fluorescente con el  $\text{Cu}^{+2}$ ; el cual es desplazado por los aminoácidos liberados en la



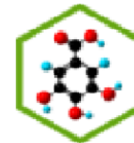
proteólisis del BSA causada por SAP, el compuesto al perder su enlace con el cobre recupera su fluorescencia. La reacción se muestra en la **figura 9** (Capobianco et al. 1992; Dean et al. 2003). Se monitoreó así, la actividad proteolítica de la enzima. El procedimiento básico consistió en agregar 50  $\mu\text{L}$  de complejo cobre-fluorexón ( $\text{CuSO}_4$  50  $\mu\text{M}$  : Fluorexón 55  $\mu\text{M}$  1:1), 25  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (BSA 0,1%) y 25  $\mu\text{L}$  de muestra, finalmente se completó con buffer PBS 5  $\mu\text{M}$  a pH 7,0 hasta un volumen en el pozo de 250  $\mu\text{L}$ . Los parámetros de medición en el equipo se muestran en la **tabla 13**. Para medir la señal producida se utilizó un fluorómetro. El porcentaje de inhibición se determinó por comparación con el control positivo pepstatina A 10  $\mu\text{M}$  y como control negativo de inhibición, se usó una mezcla de proteasas (SIGMA) en dilución 1/100000.



**Figura 9.** Esquema de la interacción entre el Fluorexón, el  $\text{Cu}^{+2}$  y los aminoácidos para estudiar el mecanismos de inhibición por fluorescencia (Dean et al. 2003).

**Tabla 13.** Parámetros instrumentales para el fluorómetro Cary Eclipse.

PARÁMETRO	PROGRAMACIÓN
Longitud de onda de Excitación (nm)	486
Longitud de onda de Emisión (nm)	525
Slit de Excitación y emisión (nm)	5
Voltaje del detector PMT (V)	400 (Bajo)
Filtro de Excitación	Automática
Filtro de Emisión	Abierta
Tiempo de análisis (min)	20
Ciclos de toma de datos (min)	0,5



Para la determinación de la actividad AntiSAP, se usó el cálculo del porcentaje de inhibición, el cual está representado por el cambio en la pendiente de linealización ( $m$ ) de las curvas cinéticas medidas; ésta, se realizó automáticamente en el equipo con el software Cary Eclipse. **La ecuación (1)** muestra la relación para el porcentaje de inhibición (Arias y Marulanda 2010).

$$\% I = \frac{m_{ex} - m_{SAP}}{m_{peps} - m_{SAP}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$\% I$  es el porcentaje de inhibición

$m_{ex}$  pendiente de la linealización de la gráfica del extracto

$m_{SAP}$  pendiente de la linealización de la gráfica de SAP

$m_{peps}$  pendiente de la linealización de la gráfica de SAP + pepstatina A

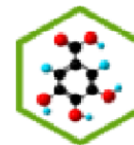
### 3.6.3. Cinética enzimática

El estudio cinético se basó en la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten, esta se realizó por medio del software GraphPad Prism 5.04, el cual calcula las constantes cinéticas importantes como velocidad máxima ( $v_{m\acute{a}x}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_M$ ). También, se utilizó el mismo tratamiento con el inhibidor para hallar su constante  $K_I$ , teniendo en cuenta los efectos de éste sobre la enzima (Campbell y Farrell 2006). Se usó la técnica fluorimétrica con los mismos parámetros de la determinación antiSAP, realizando corridas de las muestras variando las concentraciones del sustrato (BSA) y obteniendo los datos de velocidad inicial calculados en el software del equipo Cary Eclipse.

### 3.6.4. Método por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC es un proceso de separación en el que una muestra líquida se hace pasar a través de una fase estacionaria a alta presión. HPLC utiliza partículas de reparto con tamaños de unos pocos  $\mu m$ ; esto permite obtener un gran





número de platos, pero al mismo tiempo obliga a vencer una elevada contrapresión durante el transporte de la fase móvil a través de la columna de separación (con diámetros entre 0,3 y 10 mm) (Bürkert 2011).

Para la evaluación de la actividad antiSAP por este método, las muestras después de la incubación, se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min con el fin de eliminar células muertas, residuos y demás compuestos no solubles, el sobrenadante se depositó en un vial y su volumen se completó hasta 1 mL, se corrieron en el equipo HPLC, con el método mostrado en la **tabla 14**. La determinación de la actividad antiSAP dependió de la concentración de la proteína (BSA), por lo cual se realizó una curva de calibración por triplicado con concentraciones de 0,0067%, 0,020%, 0,034% y 0,047% de BSA.

**Tabla 14.** Método para HPLC utilizado para la evaluación de la actividad antiSAP.

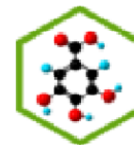
PARÁMETRO	PROGRAMACIÓN
Columna	PROTEIN KW-804 Shodex
Flujo	1 mL/min
Gradiente volumétrico	Isocrático
Solvente A	Buffer PBS 50 mM pH 7,0
Tiempo de Corrida	20 min
Detector	PDA (210 nm)
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura	40 °C

Con ayuda de ésta técnica se obtuvieron las concentraciones de BSA con las cuales se calculó el porcentaje de inhibición por el método de HPLC, usando la **ecuación (2)**.

$$\% I = \left( \frac{[BSA]_{Ex} - [BSA]_{SAP}}{[BSA]_{Peps} - [BSA]_{SAP}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

% I es el porcentaje de inhibición



$[BSA]_{SAP}$  Concentración de BSA (%) en la muestra con SAP

$[BSA]_{Peps}$  Concentración de BSA (%) en la muestra con SAP + pepstatina A

$[BSA]_{Ex}$  Concentración de BSA (%) en la muestra con SAP + Extracto

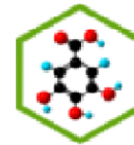
### 3.6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica donde una mezcla de macromoléculas es separada por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en el campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación masa/carga. Debido a que algunas proteínas tienen relaciones masa/carga casi idénticas, la separación es muy escasa y mala; por tal razón, se ha empleado la técnica de SDS-PAGE, la cual utiliza un gel de poliacrilamida, que genera enlaces entrecruzados y poros de tamaño variable, que depende de la concentración de las proteínas; en este gel, las macromoléculas más pequeñas migran más rápido, mientras que el uso del SDS permite la desnaturalización de las proteínas, haciendo que estas formen subunidades proteicas con relaciones masa/carga similares, eliminando el efecto de las diferencias de forma, por lo cual la longitud de la cadena es el único determinante de la velocidad de migración (Lodish 2005). Para el análisis antiSAP, se determinó cualitativamente la degradación del BSA y la presencia de una banda característica de proteínas la cual corresponde a SAP, la presencia de la proteasa determina si hay o no inhibición de la producción de esta enzima.

La electroforesis SDS-PAGE para proteínas se realizó utilizando la metodología sugerida por el kit de BIORAD, usando gel de resolución del 4% en acrilamida, y un gel de concentración del 10% del mismo compuesto. La electroforesis se corrió con un cambio de diferencia de potencial mostrado en la **tabla 15**.

**Tabla 15.** Voltaje aplicado en la electroforesis SDS-PAGE para el análisis antiSAP.

Voltaje (V)	Tiempo (min)
80	30
100	45
120	45

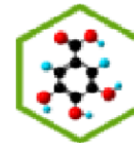


Posteriormente, el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Commassie. La preparación de los geles y las soluciones usadas en la electroforesis se muestran en el **anexo 1**.

### 3.6.6. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (polymerase chain reaction), lo cual permite producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. La PCR, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus requerimientos son: la presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) que contienen cada uno de las bases nitrogenadas usadas con sustrato para la formación de ADN, éstas son: Desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxiguanocina trifosfato (dGTP) y desoxitimidina trifosfato (dTTP), un ADN plantilla, Enzima DNA polimerasa,  $Mg^{+2}$  como cofactor normalmente suministrado como  $MgCl_2$ , buffer para regular el pH óptimo de la enzima; en algunos también traen concentraciones de ion  $Na^+$  o  $K^+$  y primers o cebadores que son cadenas cortas de ADN complementarios que funcionan como localizadores del sitio donde la enzima debe empezar y terminar de copiar [Cultek (2009); Vinueza-Burgos (2009)].

La RT-PCR o reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa es una variante de PCR en la cual una hebra de ARN es retrotranscrita en el ADN complementario usando la enzima llamada transcriptasa reversa (RT); la clave de la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real, la amplificación del genoma de interés ya que esta tiene la habilidad de medir y cuantificar directamente la cantidad de ADN que se produce mientras se lleva a cabo la reacción. Para realizar esta detección existen varios métodos pero casi todos están basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a la parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una



molécula fluorescente y otra molécula que inhibe la fluorescencia (quencher), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (Cultek 2009; Vinueza-Burgos 2009).

Éste último procedimiento de análisis se usó con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria a nivel de la expresión de genes y por tanto la producción de proteínas, valiéndose de la cuantificación del mRNA. Para éste procedimiento se realizó la extracción del mRNA de los cultivos de *C. albicans* puro e inhibido, usando el procedimiento de extracción para levaduras propuesto en el RNeasy<sup>®</sup> mini kit de QIAGEN (**Anexo 2**), este RNA extraído se preparó para la PCR por medio del procedimiento indicado en el catálogo del kit SYBR<sup>®</sup> Green de QIAGEN para RT-PCR en tiempo real. Los valores obtenidos en el equipo fueron el número de ciclos ( $C_T$ ) que necesita el fragmento de ADN para amplificarse, como patrón cuantitativo con el cual se realiza la normalización (N) conocida como  $\Delta C_T$  [**Ecuación (3)**].

$$N = \frac{2^{\Delta C_T(sap)}}{2^{\Delta C_T(act)}} \quad (3)$$

Donde:

$$\Delta C_T(sap) = C_{Tsap_x} - C_{Tsap_0}$$

$$\Delta C_T(act) = C_{Tact_x} - C_{Tact_0}$$

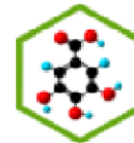
“x” representa el tiempo al que se evaluó la ecuación

“0” representa el tiempo cero

N es un valor adimensional.

Con los datos normalizados se procedió a calcular un porcentaje de inhibición a nivel genético, usando la **ecuación (4)**.

$$\% I = \left( \frac{N_{SAP} - N_{Ex}}{N_{SAP} - N_{Peps}} \right) \times 100 \quad (4)$$



Donde:

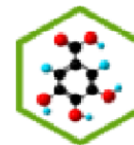
$N_{SAP}$  es el valor normalizado obtenido del cultivo de *C. albicans* sin inhibidores ni extracto.

$N_{Ex}$  es el valor normalizado obtenido del cultivo de *C. albicans* con los extracto.

$N_{peps}$  es el valor normalizado obtenido del cultivo de *C. albicans* con el inhibidor pepstatina A.

### 3.6.7. Evaluación de extractos

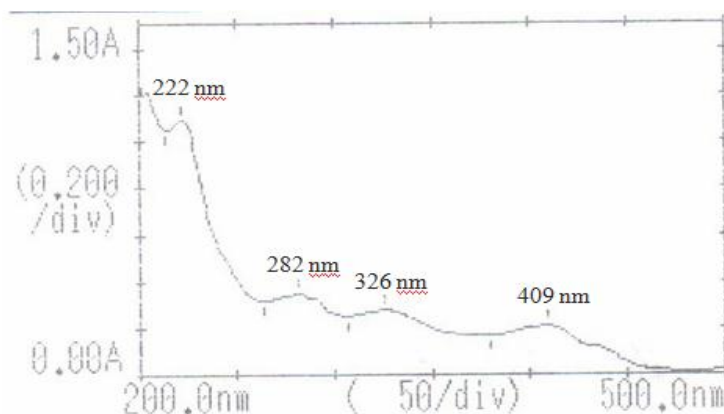
Los extractos se solubilizaron en DMSO al 30%, con ayuda de ultrasonido, obteniendo una solución final de 5000  $\mu\text{g/mL}$ , éstos se agregaron individualmente en los tubos con *C. albicans* en YNB-1X – BSA 0,1% a las 4 h de haberse iniciado la incubación, hasta obtener una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Igualmente, se deben tener dos controles, el control de inhibición positivo que consta de una solución de pepstatina A a 10  $\mu\text{M}$  (6,86  $\mu\text{g/mL}$ ), y uno negativo de microorganismos puros, se vuelven a incubar a 28 °C, y se toman muestras a las 22 h, 24 h y 26 h, para luego ser analizadas.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

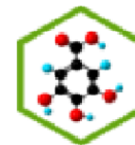
### 4.1. Estudio de los extractos obtenidos

Se realizaron los espectros para los extractos obtenidos, PgMeOH (**figura 10**), PgHex, PgDiClmet, PgAcOet y PgAcu (**Anexo 3**); sus longitudes de onda de absorción máxima ( $\lambda$ ) y las de los metabolitos secundarios característicos del género se muestran en la **tabla 16**.



**Figura 10.** Espectro UV de PgMeOH.

Según las longitudes de onda mostradas en la **tabla 16**, se determinó que los alcaloides y flavonoides (principalmente flavononas, leucoantocianidinas, catequinas, isoflavonas, antocianinas, chalconas y auronas) están presentes en todos los extractos, esto es debido a que estos compuestos poseen grupos funcionales polares y apolares, que fueron disueltos fácilmente por los respectivos solventes utilizados; los taninos no parecen estar presentes en el extracto en diclorometano, debido a que su estructura está constituida por grupos hidróxido lo cual permite la disolución en solventes polares y medianamente polares como es el caso del acetato de etilo, el agua y el solvente del extracto madre, metanol. Las saponinas, por otro lado, solo parecen estar presentes en el extracto en *n*-hexano, debido fundamentalmente a que este tipo de compuestos puede estar presente en forma de sapogenina (núcleo esteroidal hidrolizado), el cual es de carácter apolar, siendo extraídos en mayor proporción por este tipo de solventes.



**Tabla 16.** Longitudes de onda de máximos de absorción de los extractos y de los metabolitos característicos del género *Palicourea* (Domínguez 1973).

Extracto	Extracto Crudo en Metanol (PgMeOH)	Fracción Acuosa (PgAcu)	Fracción de Acetato de Etilo (PgAcOet)	Fracción de Diclorometano (PgDiClmet)	Fracción de <i>n</i> -Hexano (PgHex)
<b><math>\lambda</math> obtenidas (nm)</b>	222, 282, 326, 409 <sup>a</sup>	220, 280, 285, 324	220, 280, 285, 324	282, 310, 409	205, 222, 282, 409
<b><math>\lambda</math> de características de los metabolitos (nm)</b>					
Alcaloides fenil-alquilaminas (260-280 <sup>b</sup> )	282 <sup>c</sup>	280	280	282	282
Taninos (211 y 270) y ácido elágico (255 y 358)	222	220	220	X <sup>d</sup>	222
Flavonoides (200-270)	222	220	220	X	205, 222
Flavononas (250-300)	282	280	280	282	282
Flavonas y flavonones (330-375)	326	324	324	X	X
Leucoantocianidinas, catequinas (280) e Isoflavonas (250-290)	282	280, 285	280, 285	282	282
Antocianinas (500-530, 430-440, 270-280), chalconas y auronas (370-410)	282, 409	280	280	282, 409	282,409
Saponinas insaturadas (205–210)	X	X	X	X	205

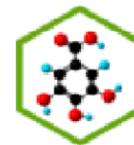
a Longitudes de onda obtenidas en los espectros UV de cada extracto.

b Longitudes de onda reportadas en la bibliografía, específicas para cada compuesto.

c Longitudes de onda que coinciden entre las obtenidas experimentalmente y las reportadas en la bibliografía.

d “X” no hay coincidencia entre las longitudes de onda teóricas y experimentales.

Es muy importante recordar que a pesar de que los espectros UV de los extractos, son un acercamiento al tipo de compuestos presentes, no son del todo exactos, debido a que hay gran cantidad de compuestos con longitudes de onda similares; por tal razón, se realizaron algunas pruebas de clasificación de grupos fitoquímicos, las cuales se muestran en la **tabla 17**.



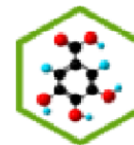
**Tabla 17.** Pruebas cualitativas específicas para la identificación de metabolitos presentes en los extractos (Martínez et al. 2008).

EXTRACTO	PgMeOH	PgAcu	PgAcOet	PgDiClmet	PgHex
Prueba de Dragendorff (Alcaloides)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Prueba de Libermann (esteroides y triterpenos)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Reacción con agua de bromo (taninos)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Reacción con NaOH (Flavonoides)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
Fluorescencia (Cumarinas)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Prueba de espuma (Saponinas y sapogeninas)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Los resultados de las pruebas cualitativas de la **tabla 17**, demuestran que los taninos y las saponinas se presentan en todas las fracciones derivadas del extracto madre en metanol, esto es debido, a que los taninos se clasifican como: hidrolizables, que son hidrosolubles y condensados, que no son solubles en agua, por lo cual son afines con gran cantidad de solventes, permitiendo su extracción con estos; además, las saponinas por ser de naturaleza anfipática, poseen dos grupos funcionales de diferente polaridad, como lo son, un núcleo esteroidal apolar (aglicona) y grupos glicosidados polares (carbohidratos), lo cual les permite estar presentes en forma de saponina, solubles en agua y/o sapogenina, solubles en solventes apolares, facilitando su extracción por medio de los solventes utilizados (Martínez et al. 2008).

El perfil quimio-taxonomico de las plantas de la familia Rubiaceae ha sido poco estudiado, trabajos anteriores revelan que la especie *Palicourea angustifolia*, *Palicourea rigida*, *Palicourea crocea* y *Palicourea coriacea*, tienen un contenido moderado de alcaloides, cumarinas, antocianinas y taninos, ausencia de esteroides, triterpenos y un alto contenido de saponinas [Narine y Maxwell (2009); Passos et al. (2010); da Rosa et al. (2010)]. Compuestos de este tipo están presentes en los extractos evaluados, puesto que se presenta semejanza entre los máximos de absorción característicos de los espectros UV obtenidos para los extractos, las pruebas de identificación y las revisiones realizadas sobre estudios de la familia Rubiaceae. Estos metabolitos, pueden ser responsables de los resultados positivos



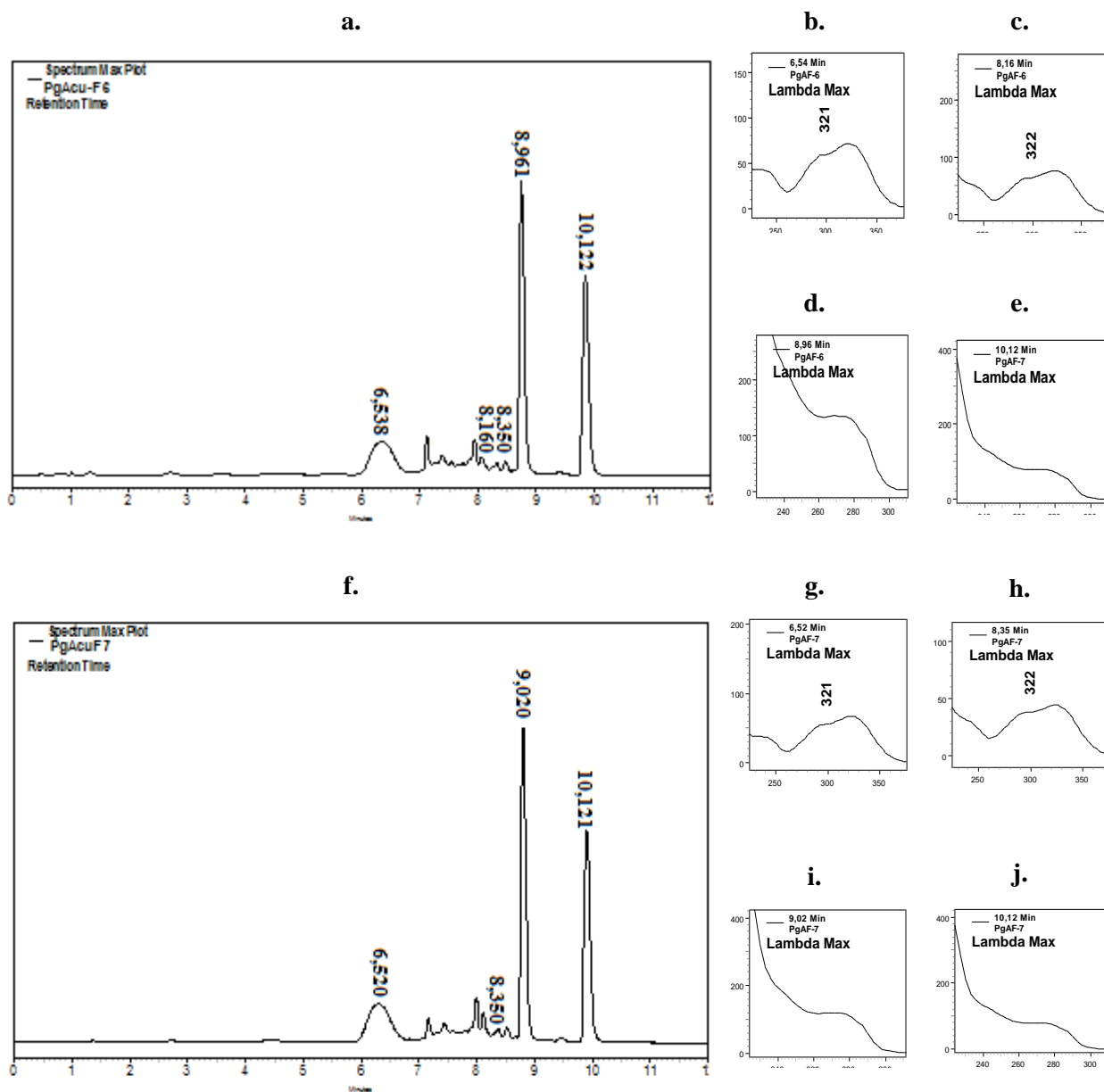
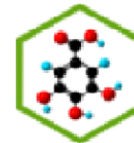


obtenidos a nivel antiSAP; además, demuestra que *P. guianensis* es una fuente de compuestos con actividad biológica. El fraccionamiento del extracto acuoso, se monitoreó por medio de sus cromatogramas correspondientes, con estos datos se determinaron cuales de éstas fracciones podían combinarse al presentar perfiles cromatográficos similares. En la **figura 11** se comparan los cromatogramas de las fracciones 6 y 7, las cuales se reunieron posteriormente.

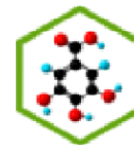
Los cromatogramas de las demás fracciones se muestran en los anexos del 4 al 20. Los extractos de 1 al 5 fueron descartados por la presencia de hongos, los cuales degradaron los compuestos químicos que pueden ser promisorios por su actividad biológica. Las fracciones reunidas por similitud se resumen en la **tabla 18**.

**Tabla 18.** Unión de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso (PgAcu).

FRACCIONES REUNIDAS	ROTULADO	FRACCIONES REUNIDAS	ROTULADO	FRACCIONES REUNIDAS	ROTULADO
6+7	PgAcu-F6+7	18	PgAcu-F18	29	PgAcu-F29
8	PgAcu-F8	19	PgAcu-F19	30+31	PgAcu-F30+31
9	PgAcu-F9	20	PgAcu-F20	32+33+34	PgAcu-F32-34
10+11+ 12+13	PgAcu-F10- 13	21	PgAcu-F21	35	PgAcu-F35
14+15	PgAcu-F14+15	22+23+24+ 25+26+27	PgAcu-F22- 27	36+37+38+39+ 40+41+42+43+44	PgAcu-F36-44
16+17	PgAcuF- 16+17	28	PgAcu-F28		



**Figura 11.** **a.** Cromatograma de PgAcu-F6, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,54 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,16 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,96 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min), **f.** Cromatograma de PgAcu-F7, **g.** Espectro UV del pico ( $t_R$  6,52 min), **h.** UV del pico con ( $t_R$  8,35 min), **i.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,02 min), **j.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min).



### 4.2. Actividad antibacteriana

#### 4.2.1. Antibiograma

Se evaluaron por el método de difusión en agar los siguientes antibióticos: Ampicilina sódica (**Amp - Na**), Ampicilina anhídrica (**Amp - Anh**), Amoxicilina (**Amox**) y Trimetoprim (**Trim**), a concentraciones de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y un blanco que consistió en el solvente en el que se disolvieron los respectivos antibióticos. El antibiograma se realizó por duplicado. Los resultados para *Escherichia coli*, se muestran en la **tabla 19**, los demás se presentan en el **anexo 21**. Los controles utilizados se observan en la **tabla 20**.

**Tabla 19.** Antibiograma para *Escherichia coli*.

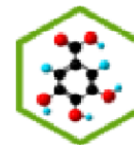
Concentración Antibiótico	500 µg/mL		250 µg/mL		100 µg/mL	
	1	2	1	2	1	2
Amox Pozo 1	14 <sup>a</sup>	15	13	10	0	0
Amp - Anh Pozo 2	14	13	10	11	0	0
Blanco <sup>b</sup> Pozo 3	0	0	0	0	0	0
Amp -Na Pozo 4	16	11	13	8	0	0
<b>Trim Pozo 5</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	<b>16</b>

<sup>a</sup> El valor anotado es el correspondiente al diámetro del halo de inhibición en mm.

<sup>b</sup> El blanco para el Trimetoprim fue H<sub>2</sub>O-EtOH (1:1) y para los demás fue solo H<sub>2</sub>O.

**Tabla 20.** Controles positivos para el análisis antibacterial.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración
<i>Escherichia coli</i>	Trimetoprim	100 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ampicilina Sódica	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicilina Anhídrica	100 µg/mL
<i>Bacillus cereus</i>	Ampicilina Sódica	250 µg/mL

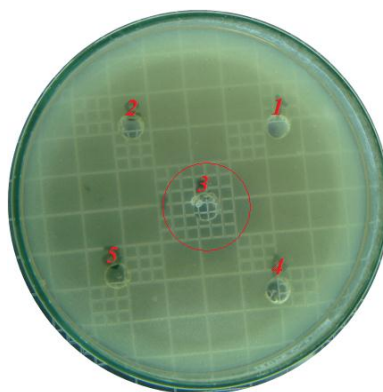


### 4.2.2. Evaluación de los extractos

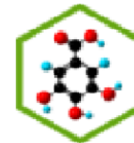
La evaluación de los extractos metanólicos de *Palicourea guianensis* se realizó a concentraciones de 4000 µg/mL y 2000 µg/mL, por medio del método de difusión en agar, por triplicado, comparándolo con el control adecuado. En la **tabla 21** y **figura 12** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo contra *E. coli*; para los demás microorganismos se presentan en el **anexo 22**.

**Tabla 21.** Tamaño del halo de inhibición (mm) de los extractos de *Palicourea guianensis* contra *E. coli*.

Extracto	Concentración			Concentración		
	4000 µg/mL			2000 µg/mL		
	1	2	3	1	2	3
PgMeOH	0	0	0	0	0	0
PgAcu	0	0	0	0	0	0
PgDiClmet	0	0	0	0	0	0
PgAcOet	0	0	0	0	0	0
PgHex	0	0	0	0	0	0
CONTROL PARA LOS ENSAYOS						
Trim 100 µg/mL	22	22	22	22	22	22

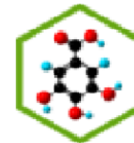


**Figura 12.** Placa de Petri con el ensayo de inhibición de *Palicourea guianensis* contra *E. coli*. **1.** Extracto de Acetato de Etilo (PgAcOet), **2.** Extracto de diclorometano PgDiClmet, **3.** Trimethoprim (Trim), **4.** Extracto de *n*-hexano PgHex, **5.** Extracto de Metanol PgMeOH.



Los resultados obtenidos demostraron que tanto el extracto metanólico, como las fracciones en los solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y agua, no presentaron actividad antibacteriana frente a los microorganismos estudiados. En estudios previos realizados por Suffredini et al. (2006), se determinó que los extractos obtenidos por maceración en diclorometano-metanol (1:1) y en agua, de la parte aérea de esta Rubiaceae, tenían actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, a concentraciones mínimas inhibitorias de 40 µg/mL para ambas especies; pero dichos extractos no mostraron actividad alguna contra *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*. En otro estudio, se demostró la capacidad inhibitoria del extracto etanólico de *Palicourea guianensis* a concentraciones de 40000 µg/mL, 20000 µg/mL y 10000 µg/mL contra *S. aureus*, y ninguna actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* a estas mismas concentraciones (Benítez y Stashenko 2009). Otro estudio reveló que el ácido elágico, el cual pudo estar presente en los extractos evaluados, fue activo frente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 8000 µg/mL (Akiyama et al. 2001).

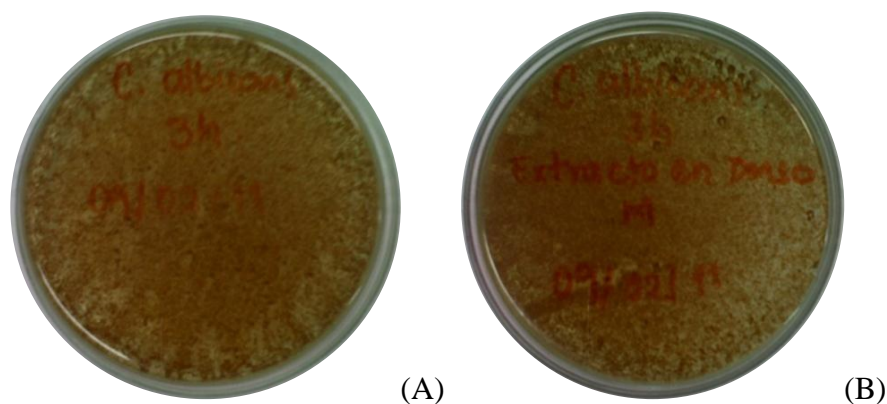
Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con otros estudios realizados anteriormente, se observó que una de las razones por las que no se presentó inhibición bacteriana, puede estar relacionada con la diferencia en los métodos de extracción, puesto que éstos procedimientos, permiten retirar diferentes tipos de compuestos de la matriz vegetal, los cuales muestran resultados muy variados a nivel biológico; además, las concentraciones de los extractos evaluados fueron 10 veces menores a las de éstos estudios, por lo cual se consideró que los metabolitos no estaban presentes o su concentración era muy baja para inhibir el crecimiento bacteriano. Según la discusión anterior, se pudo determinar que la capacidad inhibitoria de esta planta frente a bacterias Gram negativas es nula y contra las Gram positivas es escasa; siendo más favorable para inhibir *S. aureus* utilizan altas concentraciones del extracto. Los extractos presentaron compuestos como son: alcaloides, taninos, flavonoides y saponinas, los cuales poseen actividad antibacteriana; a pesar de esto, en este estudio su presencia no fue suficiente, por lo cual presentaron resultados negativos en la inhibición contra las bacterias utilizadas, difiriendo con los hallazgos de los otros estudios.



### 4.3. Actividad antiSAP

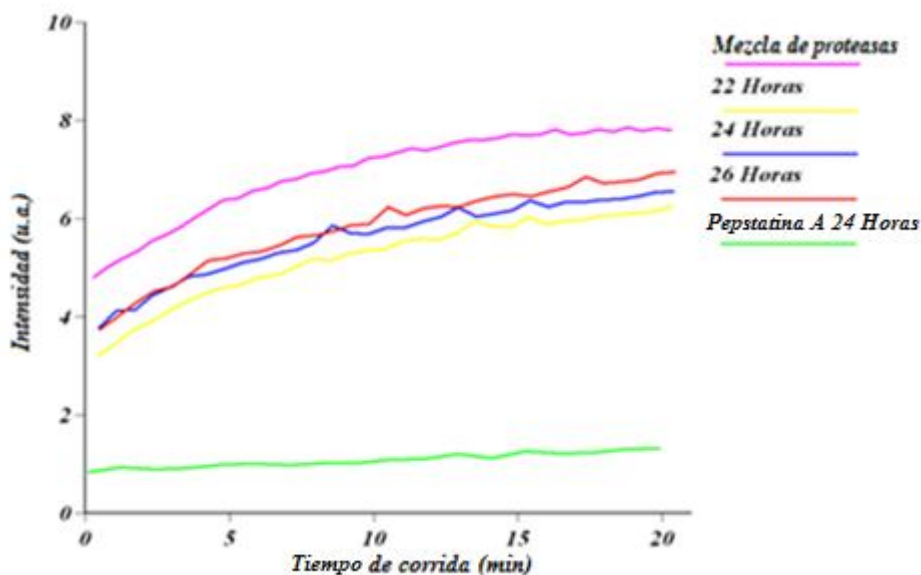
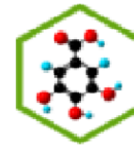
#### 4.3.1. Crecimiento de *Candida albicans* y producción de SAP

Inicialmente se evaluaron los cultivos de *C. albicans* con los extractos estudiados, los cuales mostraron un crecimiento satisfactorio, puesto que presentaron colonias aisladas de forma y color adecuados; comprobando que la presencia de los extractos no inhibía el crecimiento de *C. albicans*, esto se demostró por medio de la siembra en agar Biggy específico para éste microorganismo, obteniendo crecimiento igual, tanto para las muestras de *C. albicans* sin extractos como para las muestras que los contenían. Los cultivos realizados se muestran en la **figura 13**. Los demás resultados fueron similares por lo cual no se muestran.



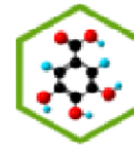
**Figura 13.** Siembra de *C. albicans* (A) y *C. albicans* + PgMeOH (B).

Posteriormente, se evaluó la producción de proteínasa aspártica secretada (SAP) por el método fluorimétrico, el cual permitió el estudio de la reacciones enzimática entre la SAP, un sustrato (BSA) y un inhibidor (pepstatina A y los extractos a evaluar) (**figura 14**); para esto, se compararon dos tipos de controles, uno positivo en proteólisis que se realizó con una mezcla de proteasas (SIGMA) y uno negativo de *C. albicans* mas la adición del inhibidor pepstatina A (6,86 µg/mL).



**Figura 14.** Determinación en el tiempo de la actividad de SAP de *C. albicans* por fluorometría.

Como se pudo observar, el efecto proteolítico de la mezcla de proteasas (Línea rosa) está representado por un aumento en la señal de fluorescencia, tal y como se espera en éste tipo de técnica; al igual que el control de la proteólisis, las muestras ensayadas con *C. albicans* a diferentes tiempos de incubación, mostraron un aumento en la señal; es decir, que hubo producción de SAP. El efecto de la proteólisis de la proteinasa aspártica usando como sustrato BSA, se mostró más claramente en las cepas de *Candida albicans* incubadas por 26 h (Línea roja), demostrando que a medida que aumenta el tiempo de incubación, se incrementa la concentración de SAP, éste tiempo de incubación se utilizó como base para obtener la mayor señal del equipo para la reacción de proteólisis de ésta enzima. También, se pudo determinar que la presencia del inhibidor pepstatina A (Línea verde), disminuyó considerablemente la señal leída en el equipo, lo cual implica, un bloqueo de la proteólisis, ya sea por la inhibición de la producción de SAP o de la actividad enzimática.

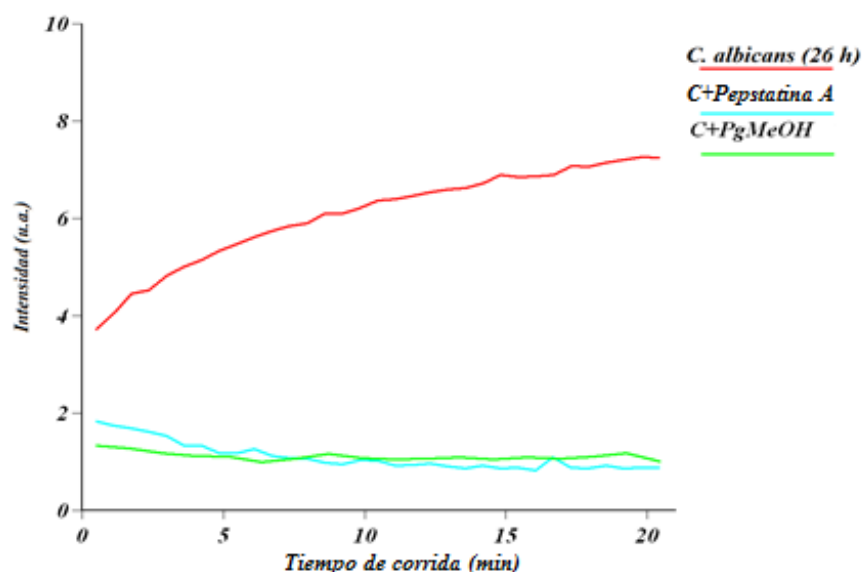


### 4.4. Evaluación de los extractos frente a la actividad antiSAP.

El estudio realizado a los extractos consistió fundamentalmente en buscar un modelo de inhibición de las enzimas SAP, ya sea por medio de una reacción inhibidor-enzima, o por la alteración de la síntesis de proteínas de la levadura a nivel molecular; por tal razón se propuso una secuencia de ensayos con el fin de guiar los resultados hacia un estudio de inhibición adecuado. La técnica fluorimétrica permitió identificar la capacidad de inhibición enzimática de los extractos, mientras que las técnicas de electroforesis y HPLC determinaron la presencia y ausencia de las proteinasas aspárticas (SAP) en el cultivo inducido realizado, lo cual indicó una alteración en la producción de éstas, y finalmente, la técnica de RT-PCR en tiempo real determinó si la inhibición pudo darse a nivel molecular; es decir, que si se perturbó la biosíntesis de las isoenzimas de SAP de *C. albicans*. Todos los extractos fueron evaluados a una concentración de 500 µg/mL.

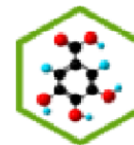
#### 4.4.1. Determinación Fluorimétrica.

Se evaluó inicialmente el extracto metanólico crudo para determinar si se presentaba actividad antiSAP. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento para las fracciones iniciales. En la **figura 15** se muestra el ensayo con el extracto de metanol.



**Figura 15.** Gráfico de inhibición de PgMeOH.





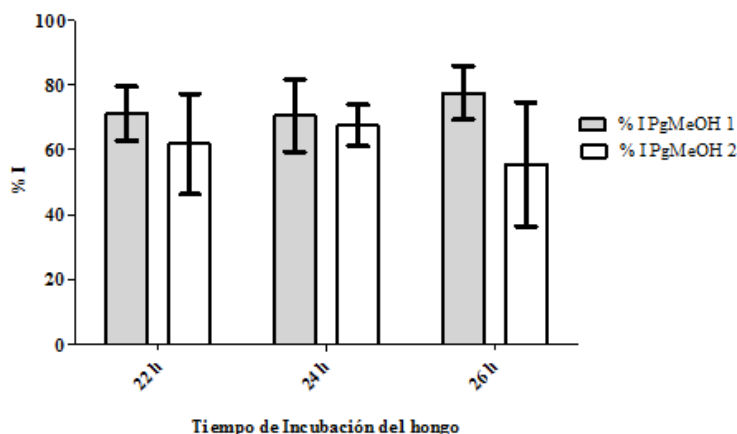
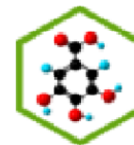
Como se observa claramente en la **figura 15**, la capacidad inhibitoria del extracto metanólico a 500  $\mu\text{g/mL}$  fue ligeramente menor que la de la pepstatina A (6,86  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo este un inhibidor potente de la actividad proteolítica de SAP de *C. albicans*. La presencia de los metabolitos secundarios en los extractos son los que eventualmente pueden inhibir la proteinasa. Las gráficas de inhibición de los demás extractos se muestran en los anexos del 23 al 42.

Para los datos obtenidos y sus respectivas repeticiones, se realizó un análisis de varianza ANOVA del método de medición; para ello, se estudió cada extracto a diferentes horas de incubación de *C. albicans* siendo éstas, 22 h, 24 h y 26 h; para cada tiempo se realizaron tres repeticiones y de éste se hicieron dos ensayos para observar criterios de repetibilidad y reproducibilidad. Para el extracto en metanol (PgMeOH), se obtuvieron los parámetros estadísticos mostrados en la **tabla 22** y la **figura 16**; éste análisis, determinó la interdependencia entre el tiempo de incubación, el extracto utilizado y el momento de realización del ensayo; esto demostró la reproducibilidad del método y la estabilidad del extracto con respecto a repeticiones múltiples, en ensayos diferentes.

**Tabla 22.** Datos estadísticos para el porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* de PgMeOH.

Horas de incubación	% I PgMeOH 1			% I PgMeOH 2		
	Promedio	SD <sup>a</sup>	% CV <sup>b</sup>	Promedio	SD	% CV
<b>22 h</b>	71,20	8,34	11,71	61,83	15,52	25,11
<b>24 h</b>	70,51	11,13	15,78	67,51	6,35	9,41
<b>26 h</b>	77,62	8,25	10,63	55,60	19,23	34,59
<b>Promedio general por ensayos</b>	73,11			61,65		

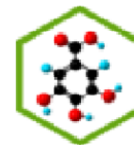
<sup>a</sup> “SD” Desviación estándar. <sup>b</sup> “% CV” Coeficiente de Variación.



**Figura 16.** Porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* de PgMeOH.

El análisis se realizó con el software GraphPad Prism 5.04, el cual hizo un análisis ANOVA basado en la determinación de una sola cola con un límite de confianza del 95%. Los resultados de los extractos PgAcu, PgAcOet, PgDiClmet y PgHex se muestran en el **anexo 43**. El análisis ANOVA demostró que los extractos no parecen ser afectados por el tiempo de incubación; puesto que no hubo una dependencia entre estos períodos y los porcentajes de inhibición obtenidos. Esto permitió calcular un promedio entre los tiempos de incubación para los ensayos.

Los extractos acuoso (PgAcu) y de diclorometano (PgDiClmet), presentaron una mejor reproducibilidad en las mediciones; debido a que poseen resultados con porcentajes de inhibición muy similares entre los ensayos (%I PgAcu 1 = 58,45 y %I PgAcu 2 = 60,84; %I PgDiClmet 1 = 99,83 y %I PgDiClmet 2 = 92,68); además, presentaron coeficiente de variación menores (PgAcu entre 4,91% y 10,89%, PgDiClmet entre 4,11% y 12,35%), esto indicó que fueron los extractos más estables (principalmente el acuoso) al momento de realizar la medición; puesto que, las diferencias entre estos valores obtenidos fueron las más bajas. El extracto en *n*-hexano (PgHex) fue el que siguió en estabilidad, puesto que, a pesar de que mostró poca diferencia entre los resultados para cada ensayo (%I PgHex 1 = 63,63 y %I PgHex 2 = 59,95), los coeficientes de variación estaban muy alejados (entre 4,39% y 29,61%), por lo cual su reproducibilidad fue baja. El extracto metanólico (PgMeOH) presentó menor estabilidad que los mencionados anteriormente, debido a que

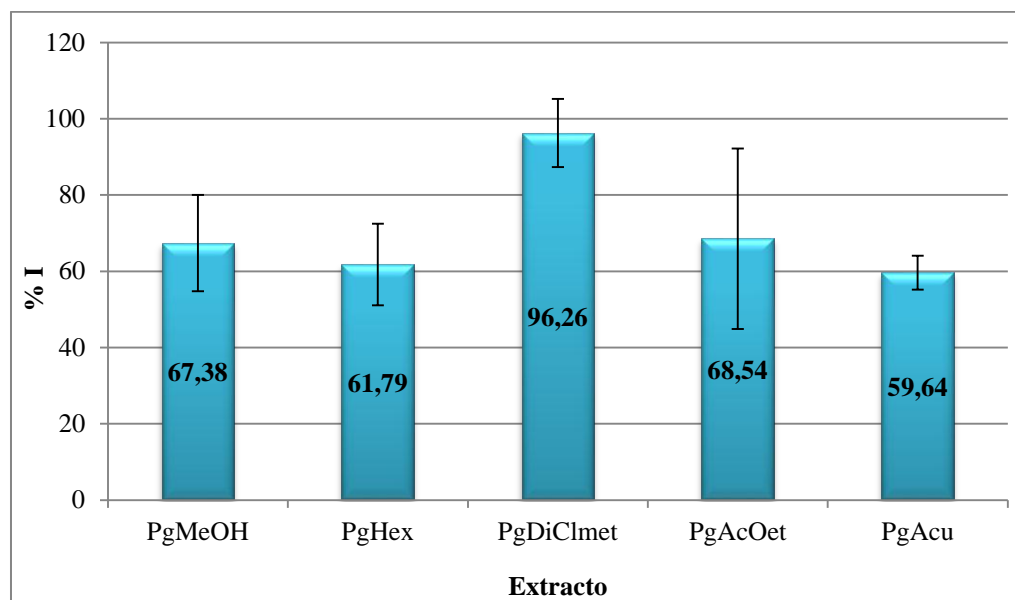
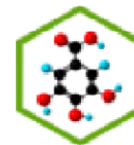


los dos ensayos realizados presentaron diferencias significativas (%I PgMeOH 1 = 73,11 y %I PgMeOH 2 = 61,65) y coeficientes de variación demasiado alejados (entre 9,41% y 34,59%). Finalmente, el extracto que mostró la menor estabilidad fue el de acetato de etilo (PgAcOet), con coeficientes de variación altos (entre 5,89% y 26,81%), y con una gran diferencia entre los dos ensayos realizados (%I PgAcOet 1 = 89,48 y %I PgAcOet 2 = 47,59), lo cual demostró que el método empleado no fue reproducible.

Una posible explicación a este hecho sería que el metanol y el acetato de etilo, son solventes medianamente polares, que tienen facilidad de disolver y extraer gran cantidad de metabolitos; por lo cual, se presentan en estos extractos, interacciones entre varios tipos de moléculas. Se esperaría entonces, una interferencia por parte de compuestos antagonistas que a lo largo del tiempo desestabilicen algunos compuestos activos. También, éste resultado se pudo deber a que variables no controladas (errores aleatorios), tales como la temperatura, pH y la concentración de la enzima en el cultivo, hayan generado cambios en los porcentajes de inhibición; se mostró entonces, que hay diferencia significativa para PgAcOet. Esto indicó que dependiendo de la estabilidad del extracto y del cultivo, los resultados pudieron variar. Finalmente, se realizó un análisis de todos los extractos para definir los porcentajes de inhibición. En la **tabla 23** y la **figura 17** se muestra un histograma comparativo de la actividad antiSAP de los extractos.

**Tabla 23.** Datos de porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* para los extractos.

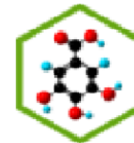
Extracto	%I	SD %I	CV %I
<b>PgMeOH</b>	67,38	12,65	18,78%
<b>PgHex</b>	61,79	10,71	17,34%
<b>PgDiClmet</b>	96,26	8,95	9,30%
<b>PgAcOet</b>	68,54	23,70	34,58%
<b>PgAcu</b>	59,64	4,43	7,43%



**Figura 17.** Histograma para la inhibición de SAP de *C. albicans* de los extractos iniciales.

Como se puede observar el mayor porcentaje de inhibición fue el de PgDiClmet seguido en orden descendente por PgAcOet, PgMeOH, PgHex y PgAcu, mostrando todos una inhibición por encima del 50%; el extracto en diclorometano, contenía compuestos con capacidad inhibitoria de SAP, lo cual se evidenció mediante pruebas de caracterización de metabolitos secundarios, como lo son los taninos, saponinas y alcaloides, los cuales pudieron ser responsables de esta actividad. Las fracciones mostraron una capacidad inhibitoria mayor que la del extracto madre en metanol, debido a que en éste los compuestos posiblemente presentaron fenómenos de antagonismo de la actividad, al estar combinados; en contraste, al realizar el fraccionamiento, la concentración de los metabolitos fue más alta, y el posible antagonismo pudo reducirse al máximo por lo cual su actividad fue mayor. Se presume que los taninos son los responsables principales de la actividad antiSAP debido a que se encuentran presentes en todos los extractos, esta actividad ha sido evidenciada para el ácido elágico el cual es uno de los componentes principales de los taninos (Li et al. 2001).

Los flavonoides, alcaloides y saponinas, también pueden poseer actividad antiSAP o causar un efecto sinérgico que aumente la actividad, como fue demostrado en estudios

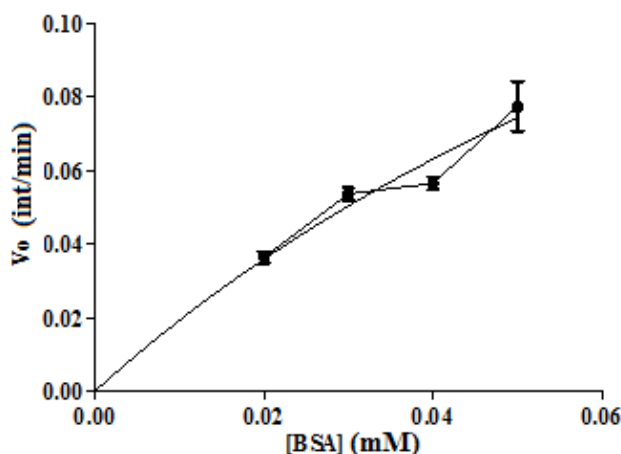
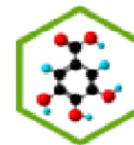


anteriores de determinadas actividades biológicas con este tipo de compuestos (Brown et al. 2009), lo que se evidenció en los extractos de diclorometano, los cuales mostraron tanto la presencia de taninos como de alcaloides y presentó un porcentaje de inhibición mayor. Los máximos de absorción observados en estas fracciones y las pruebas químicas realizadas, indican la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides que podrían ser del tipo de las fenil-alquilaminas (Domínguez 1973). En estudios realizados con *Miconia myriantha* de la familia Melastomataceae, la cual contiene compuestos como el matucinol-7-O-[4'',6''-O-(S)-hexahidroxidifenoil]- $\beta$ -D-glucopiranosido y ácido elágico, se presentó inhibición de SAP con un IC<sub>50</sub> de 8,4  $\mu$ M y 10,5  $\mu$ M, respectivamente (Li et al. 2001); por lo cual, se hipotiza que los derivados del ácido elágico presentes en los extractos y fracciones, sean los responsables de esta actividad.

Según los resultados fluorimétricos, los extractos obtenidos de *P. guianensis* tuvieron una muy buena respuesta ante la inhibición de la SAP de *C. albicans* a nivel enzimático, razón por la cual se procede a estudiar la cinética enzimática.

#### 4.4.2. Cinética de inhibición de SAP

La cinética de inhibición enzimática se realizó por medio de la técnica fluorimétrica con los mismos parámetros señalados anteriormente; se hicieron mediciones variando la concentración del sustrato y observando el cambio en la velocidad inicial ( $v_0$ ), representada por la pendiente calculada por medio del software Cary Eclipse. Teniendo en cuenta que la velocidad de reacción tiene relación con la concentración del sustrato, se utilizó una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 5.04, el cual posee la función de regresión de Michaelis-Menten que permitió calcular las constantes necesarias. Inicialmente se realizó el estudio de la reacción enzimática sin inhibidor y se graficaron datos en el programa (**Figura 18**).



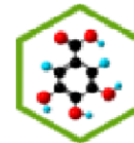
**Figura 18.** Relación entre  $v_o$  y [BSA] para la curva cinética.

Según la **figura 18** se presentó una tendencia de una cinética de primer orden descrita por Michaelis-Menten (Campbell y Farrell 2006); cumpliéndose las condiciones de las enzimas no alostéricas pudiéndose emplear para un análisis cinético. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,9253, el cual está un poco alejado de 1; mostrando una desviación de la tendencia exponencial esperada. Con éstos valores se obtuvieron el  $K_M$  y  $v_{max}$ , los resultados se muestran en la **tabla 24**.

**Tabla 24.** Parámetros cinéticos obtenidos.

Muestra	$K_M$	$K_M$ SD	$v_{max}$	$v_{max}$ SD
SAP	0,1251	0,1277	0,2601	0,2021
SAP + pepstatina A	$4,217487 \times 10^{13}$	$1,517870 \times 10^{24}$	$5,187356 \times 10^{13}$	$1,866925 \times 10^{24}$
SAP +PgDiClmet	$2,600058 \times 10^{22}$	$2,628345 \times 10^{32}$	$2,121648 \times 10^{22}$	$2,144729 \times 10^{32}$

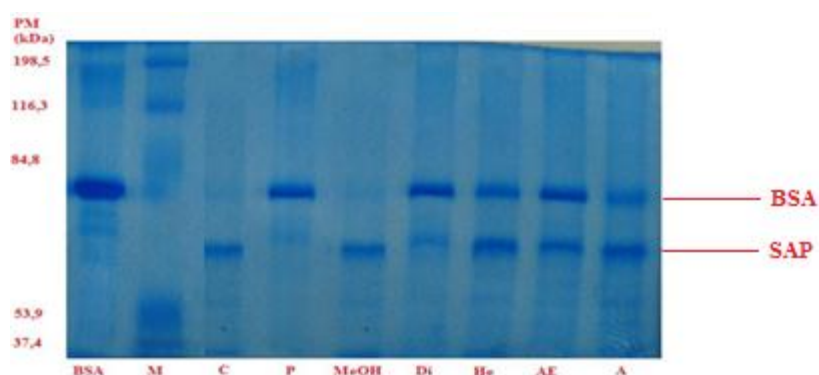
Con los resultados encontrados, se determinó que la cinética de SAP sin inhibidores presentó un valor de constantes adecuado; sin embargo, al compararlos con los datos de los inhibidores, se observó que estos tienen valores demasiado altos (del orden de  $10^{13}$  a  $10^{32}$ ); por lo cual, hubo una alteración debida a la presencia de pepstatina A y el extracto de diclorometano; además, al parecer ambos actúan de manera similar, puesto que tienen la tendencia a presentar resultados muy altos. La razón es que probablemente, la presencia del inhibidor, no interactuó directamente con la enzima SAP, como ocurriría normalmente en la



inhibición enzimática, sino que disminuyó la producción de enzimas a nivel molecular, alterando la síntesis de proteínas de la levadura; éstas características del inhibidor se pudieron detallar más fácilmente en las corrida electroforéticas y en los análisis por HPLC, en las cuales en presencia de pepstatina A, las señales características del sustrato con el cual se induce la producción de SAP, el BSA, no se vieron alteradas, y por tanto no hubo producción de enzimas, confirmando este tipo de hipótesis.

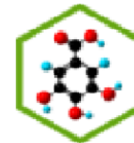
### 4.4.3. Determinación Electroforética.

Los mismos extractos evaluados por medio del fluorómetro también lo fueron por electroforesis, para determinar cualitativamente la presencia de SAP y su inhibición. Los resultados se muestran en la **figura 19**.



**Figura 19.** Electroforesis de los extractos; **BSA** (medio de cultivo con BSA al 0,1%), **M** (marcador de peso molecular), **C** (*C. albicans*), **P** (*C. albicans* + pepstatina A), **MeOH** (*C. albicans* + Extracto metanólico), **Di** (*C. albicans* + extracto de diclorometano), **He** (*C. albicans*+ extracto de *n*-hexano), **AE** (*C. albicans* + extracto de acetato de etilo) y **A** (*C. albicans* + extracto acuoso).

Mediante la técnica de electroforesis se confirmó cualitativamente la actividad antiSAP de los extractos metanólico, diclorometano, *n*-hexano, acetato de etilo y acuoso; esta actividad se evidenció al observar la presencia del sustrato (BSA) y una reducción en el tamaño de la banda de SAP, debido a que la producción de proteasas disminuyó por la acción del inhibidor. En las muestras tratadas con el control, durante un periodo de incubación de 26



horas, la banda del inhibidor pepstatina A (P), mostró inhibición total de SAP; puesto que, solo presentó una banda correspondiente a BSA y ninguna banda característica de SAP; mostrando a este agente activo como inhibidor específico de proteasa aspártica [Naglik et al. (2003); Marciniszyn et al. (1976)].

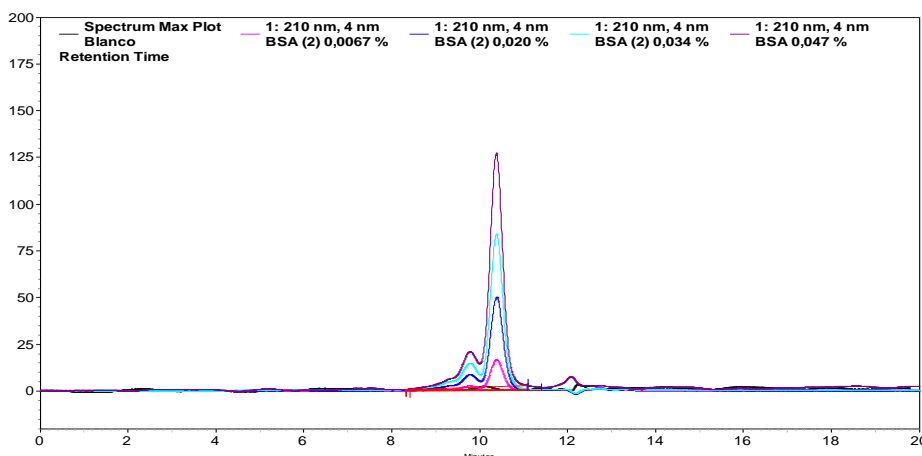
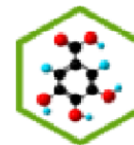
Para las muestras evaluadas con los extractos se pudieron observar ambas bandas presentes, lo cual indicó que a pesar de que se da la producción de SAP, esta fue inhibida parcialmente, observándose así la banda del sustrato BSA, siendo ésta más pequeña en la del extracto metanólico; es decir, hubo mayor producción de proteasa y por tanto menor inhibición (al ser un extracto crudo), mientras que en el de diclorometano, se observó una banda más grande para el BSA y más pequeña para la SAP, mostrando inhibición más alta, coincidiendo con el ensayo fluorimétrico.

Los resultados obtenidos de las corridas electroforéticas fueron positivos para los extractos, por lo tanto son semejantes con lo encontrado en la técnica fluorimétrica, sin embargo, la electroforesis solo se usó como parámetro cualitativo y solo indicó la presencia o ausencia de la proteasa SAP en el gel; es decir, sí se produjo o no la enzima en el cultivo realizado, esto se demostró cuantitativamente por medio de la técnica HPLC.

#### **4.4.4. Determinación Cromatográfica por HPLC**

Para la determinación cromatográfica se realizó inicialmente una curva de calibración por triplicado obteniéndose los resultados de la **tabla 25**; en la **figura 20**, se muestra el cromatograma de las corridas de los patrones de la curva, la curva de calibración se muestra en la **figura 21**.



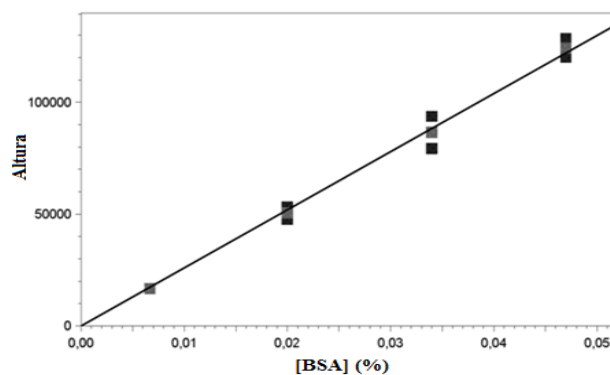


**Figura 20.** Cromatograma de HPLC de la curva de calibración para BSA.

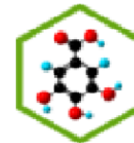
La curva se realizó basándose en la altura y no en el área, debido a un pico constante correspondiente a compuestos presentes en el estándar de BSA, el cual era del 96% de pureza (SIGMA), que eluyó junto a la proteína, y modificó significativamente el área. El tiempo de retención del BSA fue de 10,38 min.

**Tabla 25.** Datos obtenidos de la curva de calibración.

[BSA] ( $\mu\text{M}$ )	1,0	3,0	5,0	7,0
%BSA	0,0067	0,0200	0,0340	0,0470
H prom	16533,5	50365	86432,5	124150
SD	7704,3	197283	297671	124827
%RSD	0,31	7,83	11,71	4,72



**Figura 21.** Curva de calibración obtenida por HPLC.



La ecuación obtenida fue la siguiente:

$$H = 2,5963 \times 10^6 [BSA]$$

$$R^2 = 0,998281$$

$$RF SD = 72988,5$$

$$RF CV = 2,87087 \%$$

Donde:

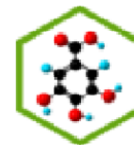
H es la altura.

[BSA] es la concentración del BSA.

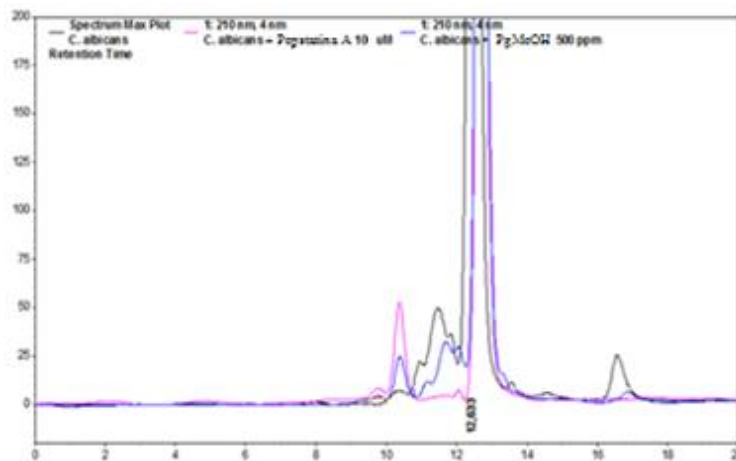
La curva de calibración mostró buena correlación ( $R^2 = 0,9982$ ) y un coeficiente de variación menor al 10%, lo cual indicó poca dispersión en los datos; además, presentó gran sensibilidad debido al valor de la pendiente obtenida; es decir, que tiene buena respuesta Señal/Concentración. Se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ); el cálculo de estos se realizó teniendo en cuenta que el LOD es tres veces el cociente entre la desviación estándar de la línea o error estándar y la pendiente; y que el LOQ fue 10 veces éste mismo cociente. El límite de detección calculado fue de 0,0020% y el límite de cuantificación fue de 0,0066%.

Mediante esta técnica se determinó la inhibición de SAP por medio de la concentración del sustrato BSA en las muestras, mostrando un pico con tiempo de retención de 10,38 min; los cálculos para éstos fueron realizados con la curva de calibración presentada anteriormente.

Como se observa en la **figura 22**, la muestra que sólo incluía *C. albicans* (Cromatograma negro) presentó un pico pequeño, esto indicó, la degradación del BSA; en cambio, la muestra que corresponde a *C. albicans* + pepstatina A (Cromatograma rosa), mostró el pico más alto, indicando una inhibición del consumo del sustrato por parte de SAP. El extracto metanólico, apareció en el cromatograma con un pico a una concentración de BSA más baja que el del control positivo (Cromatograma azul), razón por la cual se demostró que el



extracto tenía una inhibición del 24,92% (**Tabla 26**) para ésta técnica. El pico mostrado a los 12,40 min fue el correspondiente al solvente de los extractos DMSO. Los cromatogramas de los extractos PgHex, PgDiClmet, PgAcOet y PgAcu se muestran en el **anexo 44**. Con los datos de inhibición de la **tabla 27** se realizó un histograma mostrado en la **figura 23**.



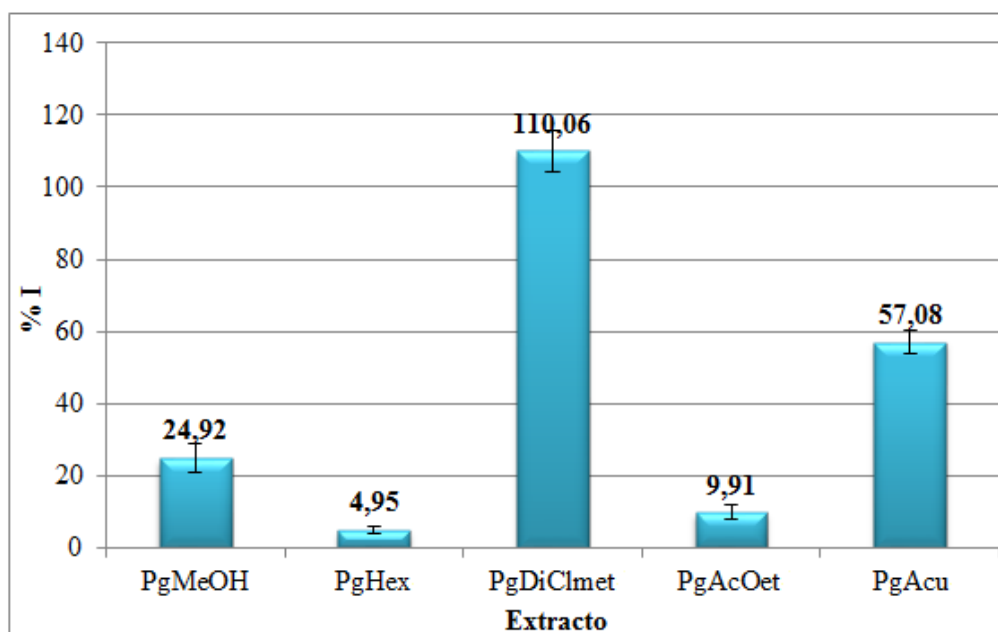
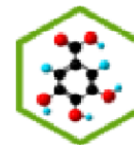
**Figura 22.** Cromatograma de SAP de *Candida albicans* + PgMeOH.

**Tabla 26.** Porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* para PgMeOH 500 µg/mL.

%BSA en <i>Candida albicans</i>	%BSA <i>Candida albicans</i> + pepstatina A (6,89 µg/mL)	%BSA <i>Candida albicans</i> + PgMeOH (500 µg/mL)	% I
0,0067	0,0733	0,0233	24,92

**Tabla 27.** Datos para el histograma de inhibición de SAP de *C. albicans* por HPLC.

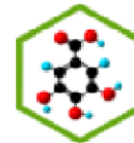
Extracto	% I	SD
PgMeOH	24,92	4,13
PgHex	4,95	1,04
PgDiClmet	110,06	5,78
PgAcOet	9,91	2,01
PgAcu	57,08	3,24



**Figura 23.** Histograma de Inhibición de SAP de *C. albicans* por HPLC.

El análisis de inhibición por el método de HPLC mostró que los extractos que poseían un porcentaje de inhibición mayor fueron los extractos de diclorometano y el acuoso, seguidos en orden descendente por el metanólico, acetato de etilo y *n*-hexano. PgDiClmet, mostró una inhibición de SAP mayor al 100%, esto es debido a que la ecuación con la cual se calcula este parámetro se realizó con relación al control positivo pepstatina A, y el extracto mostró una inhibición mayor que la de éste, a las concentraciones utilizadas.

Ésta técnica al igual que la electroforesis, indicó la presencia o ausencia de la enzima SAP, demostrando que el inhibidor disminuyó la producción de ésta, manteniendo la presencia del sustrato BSA, esto determinó que los extractos PgAcu y PgDiClmet contenían compuestos muy importantes para la inhibición de proteasa aspártica de *C. albicans*, lo cual confirmó los resultados obtenidos por los métodos de fluorimetría y electroforesis; además, se realizó un análisis molecular para confirmar la hipótesis planteada anteriormente sobre la inhibición de la biosíntesis de las isoenzimas de SAP.

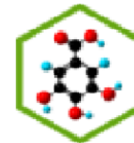


### 4.4.5. Estudio molecular de inhibición de SAP

El análisis por RT-PCR en tiempo real, permitió identificar por medio de técnicas fluorimétricas la cantidad de ciclos (threshold cycle -  $C_T$ ) que necesita el ARNm extraído de *Candida albicans* para retrotranscribirse al ADN, amplificarse y mostrar una señal por encima de una línea base de 30 seleccionada en el equipo, utilizando como agente fluorescente el fluorocromo SYBR<sup>®</sup> Green; éste  $C_T$  es normalizado con la **ecuación 3**.

Se realizó una cinética de la expresión de isoenzimas de *sap* tales como: *sap1*, *sap2*, *sap4* y actina (*act*) como control positivo para las cepas de *C. albicans*, éste control se eligió por ser un gen constitutivo básico del proceso metabólico de los seres vivos; las isoenzimas fueron elegidas por su importancia en el momento de la infección de la levadura, siendo unas de las mas predominantes y mayoritariamente expresadas, en especial *sap2* (Suffredini et al. 2006). Las mediciones se realizaron cada 6 horas por un periodo de 30 horas; además se midió de un punto cero el cual consistió en un cultivo a las mismas condiciones pero por un periodo de incubación de 6 horas asignado como hora inicial del experimento; con esto se obtuvo el tiempo de mayor expresión, para así realizar ensayos posteriores a este tiempo de incubación.

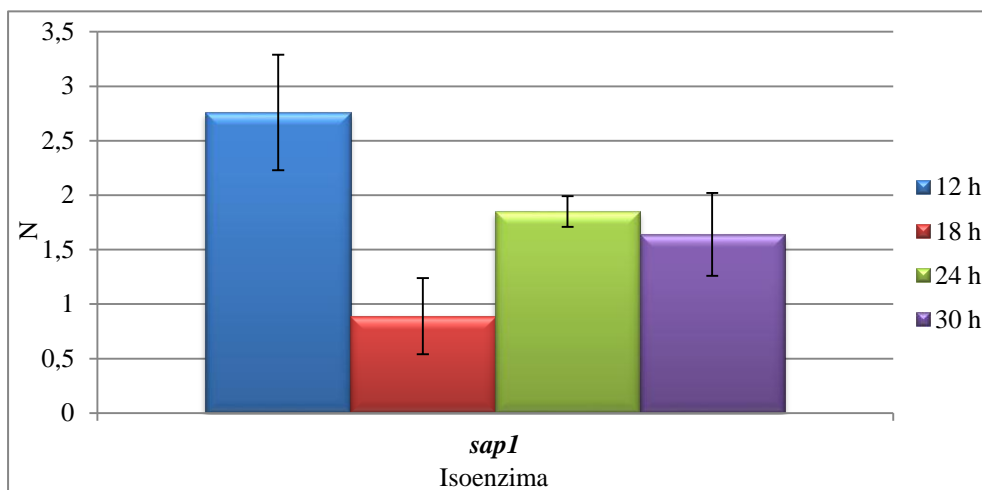
Algunos datos obtenidos tuvieron una buena reproducibilidad, principalmente los de la *sap2*, los cuales mostraron coeficientes de variación menores al 20%; como se pudo observar, los valores no se desviaron significativamente de su promedio; quiere decir, que esta enzima se produjo de manera estable y no hubo alteraciones en su medición. Para los demás resultados se presentaron coeficientes de variación excesivamente altos (sus valores oscilaron entre 6% y 30%), por lo que pueden ser aceptables para la medición. Con éstos resultados, se realizó la normalización de los datos con la **ecuación 3**, obteniéndose los resultados mostrados en la **tabla 28**, con los cuales se realizó el análisis cinético y cuyos histogramas se muestran en la **figura 24**.



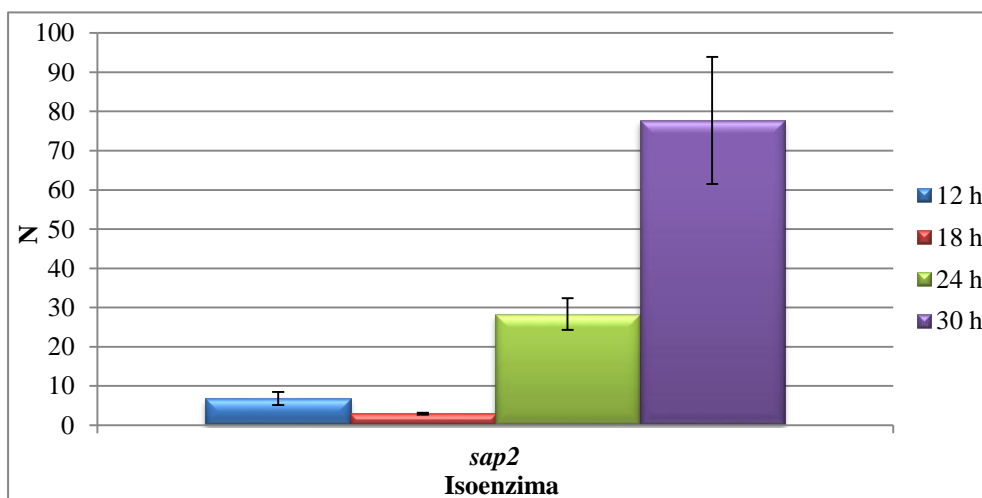
**Tabla 28.** Normalización de resultados de la cinética de expresión de genes de *sap*.

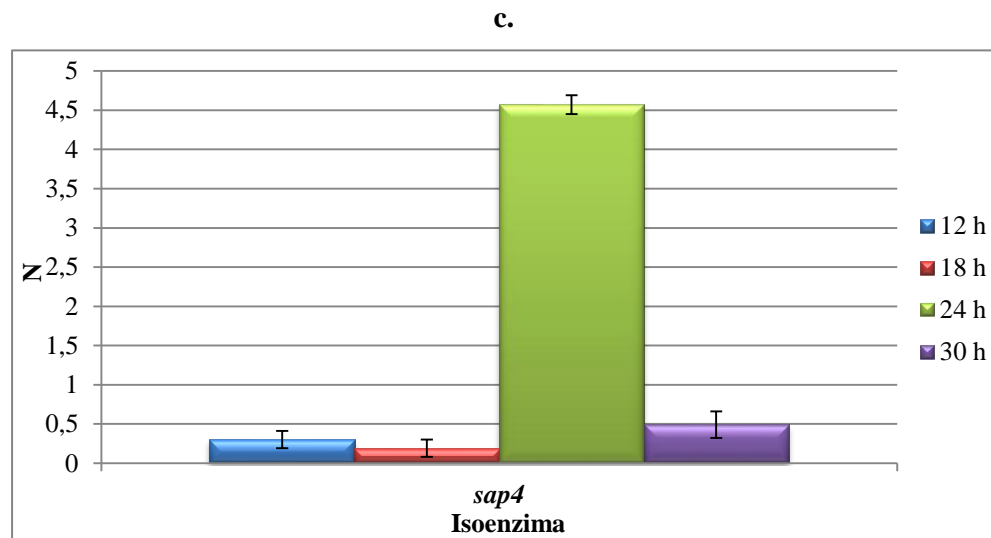
Tiempo de Incubación Muestra	12 h			18 h			24 h			30 h		
	N Prom	SD	%CV	N Prom	SD	%CV	N Prom	SD	%CV	N Prom	SD	%CV
<i>sap1</i>	2,76	0,53	19,20	0,89	0,35	39,33	1,85	0,14	7,57	1,64	0,38	23,17
<i>sap2</i>	<b>6,84</b>	<b>1,67</b>	<b>24,42</b>	<b>2,95</b>	<b>0,26</b>	<b>8,81</b>	<b>28,34</b>	<b>4,05</b>	<b>14,29</b>	<b>77,71</b>	<b>16,16</b>	<b>20,80</b>
<i>sap4</i>	0,30	0,11	36,67	0,19	0,11	57,89	4,57	0,12	2,63	0,49	0,17	34,69

a.



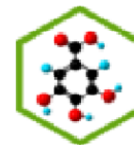
b.





**Figura 24.** a. Expresión de *sap1*, b. Expresión de *sap2* y c. Expresión de *sap4*.

Como se pudo observar al momento de la expresión de las isoenzimas *sap*, *sap2* fue la predominante, puesto que mostró un valor alto de N y por tanto, una mayor expresión en todos los tiempos; esto se confirmó por el hecho de que *in vivo* e *in vitro*, fue la enzima que se expresó mayoritariamente durante la infección (Naglik et al. 2003); además, se observó que su mayor expresión se dio en los tiempos alrededor de las 24 y 30 horas, con resultados de N hasta entre 30 y 80 respectivamente (**Figura 24b.**), confirmando lo reportado en este trabajo mediante la técnica espectrofluorimétrica lo cual indicó su mayor actividad proteolítica a las 24 y 26 horas. También, se pudo confirmar que en etapas tempranas de infección *sap1* tiene una buena expresión (Naglik et al. 2003); según su resultado a las 12 horas de incubación, siendo el más alto en la **Figura 24a.** Para *sap4* (**Figura 24c.**) al igual que *sap2* se demostró que su expresión fue máxima a las 24 horas y su rápida disminución pudo ser debida, a que SAP4 solo es utilizada por la levadura para la realización del cambio fenotípico (de levadura a hifa), el cual ocurre en etapas tempranas de colonización (Naglik et al. 2003), produciéndose pocas cantidades de enzima de la levadura a nivel *in vitro* al no tener tejido (sustrato protéico) para colonizar. Según estos resultados obtenidos, se realizaron las mediciones de inhibición a los periodos de incubación de 12 y 24 horas con el fin de evaluar si la inhibición a nivel de expresión genética varió con respecto al tiempo.



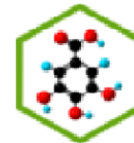
Se hicieron ensayos para identificar si se presentaba inhibición de las isoenzimas a nivel genético por parte de los extractos; para ello, se hicieron extracciones de ARNm de muestras incubadas con el control de inhibición positivo pepstatina A y en los extractos acuoso y de diclorometano, que presentaron un alto porcentaje de inhibición determinado por medio de las demás técnicas; por tanto, se procedió de igual manera, con el tratamiento de los datos, los cuales se normalizaron y sus resultados se presentan en la **tabla 29**; la graficas se muestran en la **figura 25**.

Los datos obtenidos presentaron un coeficiente de variación pequeño, algunas muestras tuvieron buena reproducibilidad puesto que éste criterio estadístico fue muy bajo, con resultados menores al 20%. Sólo 5 datos presentaron coeficientes de variación altos (*act*/24 h PgAcu, *sap1*/12 h, *sap1*/24 h PgAcu, *sap4*/12 h y *sap4*/24 h) evidenciando que estas muestras fueron las menos estables en el tiempo; sin embargo, no sobrepasaron el 30%. Esto indica que los resultados se consideraron aceptables para la realización de los cálculos.

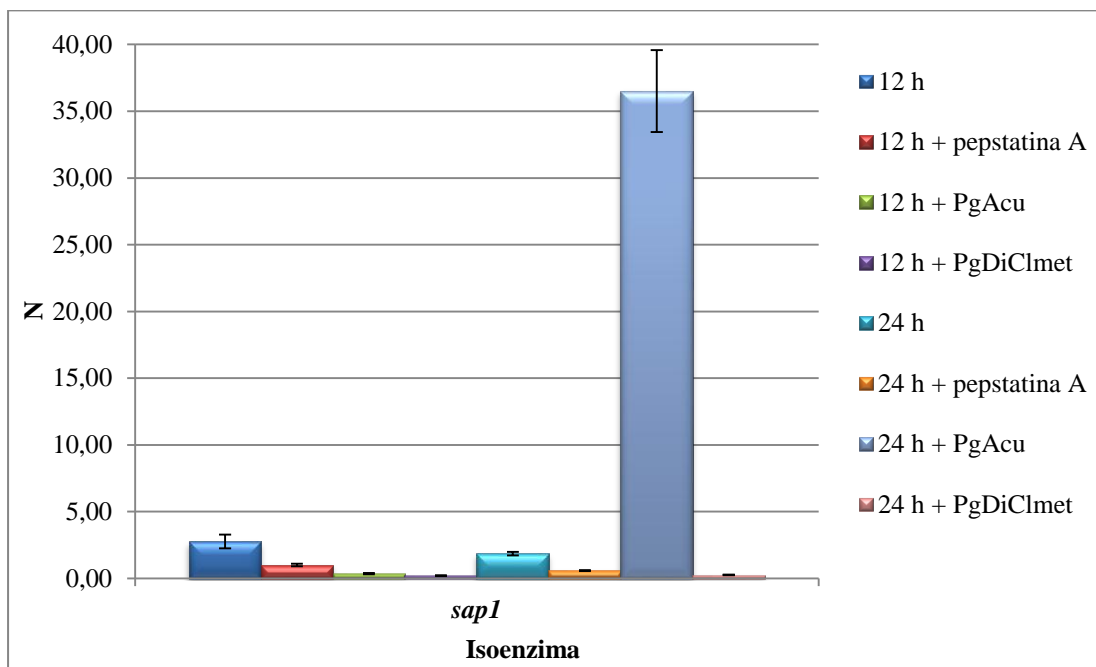
**Tabla 29.** Datos normalizados para la inhibición de la expresión de genes de *sap*.

Tiempo de Incubación	Muestra			Tiempo de Incubación	Muestra				
	<i>sap1</i>	<i>sap2</i>	<i>sap4</i>		<i>sap1</i>	<i>sap2</i>	<i>sap4</i>		
12 h	Prom	2,76	6,84	0,29	24 h	Prom	1,85	28,34	4,57
	SD	0,51	1,68	0,03		SD	0,14	4,06	0,53
	%CV	18,45	24,54	9,97		%CV	7,61	14,31	11,62
12 h + pepstatina A	Prom	1,01	6,19	0,31	24 h + pepstatina A	Prom	0,58	14,88	0,22
	SD	0,09	0,44	0,06		SD	0,04	2,33	0,08
	%CV	9,21	7,17	21,02		%CV	6,62	15,64	38,31
12 h + PgAcu	Prom	0,35	3,90	0,32	24 h + PgAcu	Prom	36,50	24,93	0,45
	SD	0,04	0,44	0,07		SD	3,07	2,35	0,07
	%CV	12,70	11,29	22,58		%CV	8,42	9,41	15,57
12 h + PgDiClmet	Prom	0,20	4,26	0,47	24 h + PgDiClmet	Prom	0,25	4,84	0,08
	SD	0,04	1,90	0,09		SD	0,03	1,07	0,02
	%CV	20,55	44,69	20,07		%CV	11,29	22,11	23,91

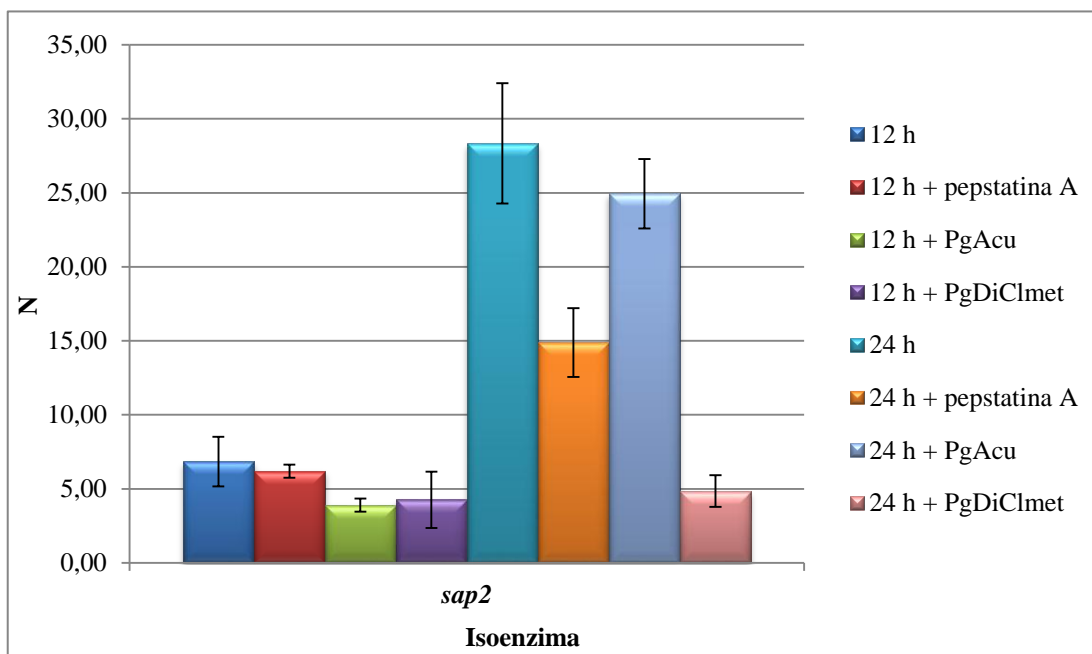


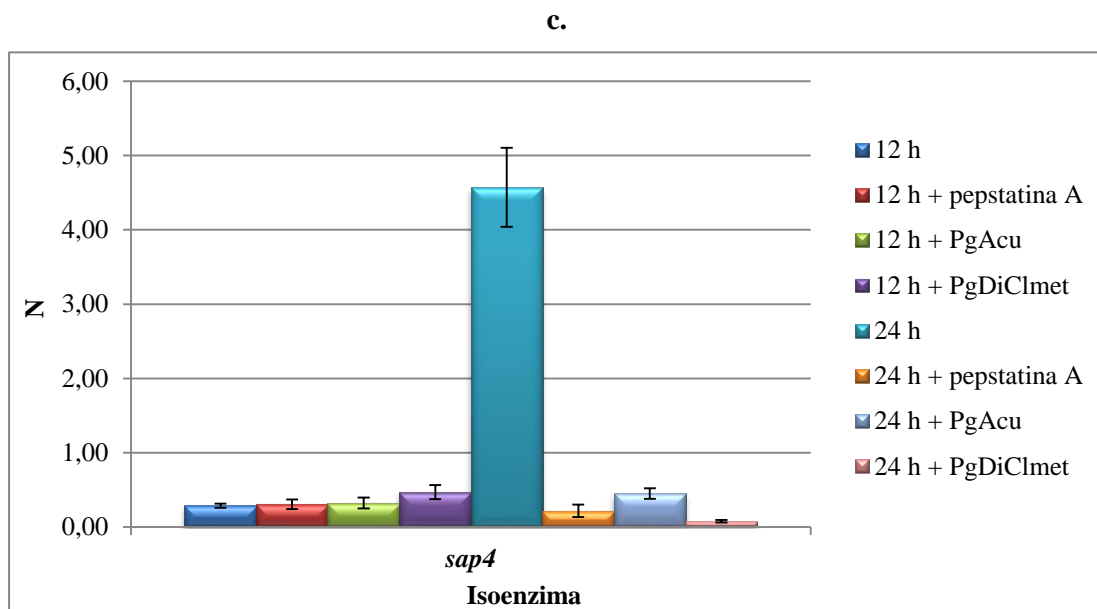
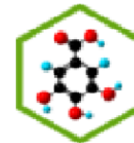


a.



b.

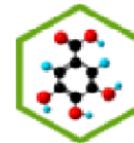




**Figura 25.** Histogramas obtenidos de la inhibición de la expresión de *C. albicans* a las 12 h y 24 h. **a)** *sap1*, **b)** *sap2* y **c)** *sap4*.

Para *sap1* (**Figura 25a**) a las 12 h, se pudo concluir que se presentó una inhibición de la expresión de la isoenzima, puesto que la señal normalizada (N) de los extractos y el inhibidor específico ( $N_{\text{pepstatina A}} = 1,01 > N_{\text{PgAcu}} = 0,35 > N_{\text{PgDiClmet}} = 0,20$ ) fue más baja que la señal del cultivo no inhibido ( $N_{C. albicans} = 2,76$ ), lo cual sugirió que en los compuestos contenidos en los extractos, se presentan efectos que generan alteración a nivel molecular de la síntesis de proteínas de *Candida albicans*; también, se pudo observar que el extracto de diclorometano fue el que mostró menor señal, siendo este el inhibidor más potente; por el contrario, a las 24 h de incubación, el extracto acuoso aparentemente activó el gen, puesto que presenta una señal mayor que la de la muestra sin inhibidor y PgDiClmet ( $N_{C. albicans} = 1,85 \ll N_{\text{PgAcu}} = 36,50$ ); esto pudo deberse, a que este extracto contiene metabolitos que estimulen la síntesis de proteínas.

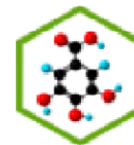
El gen *sap2* (**Figura 25b**) a las 12 horas de incubación, presentó una ligera disminución en la expresión de genes al usar simultáneamente el inhibidor y los extractos ( $N_{C. albicans} = 6,85 > N_{\text{pepstatina A}} = 6,19 > N_{\text{PgDiClmet}} = 4,26 > N_{\text{PgAcu}} = 3,90$ ) siendo el más bajo el del extracto acuoso; a pesar de esto, el cambio fue poco significativo, puesto que las señales se



mantuvieron muy similares; pero a las 24 horas, donde la expresión fue claramente más alta ( $N_{C. albicans} = 28,34 > N_{PgAcu} = 24,93 > N_{pepstatina A} = 14,88 > N_{PgDiClmet} = 4,84$ ), se observó inhibición por parte de pepstatina A y de los extractos, siendo el de diclorometano el más sobresaliente; esto mostró, que el PgAcu tuvo un mejor desempeño a las 12 h, y que el PgDiClmet aumentó su capacidad inhibitoria con el tiempo de contacto con la muestra.

El gen *sap4* (**Figura 25c**) presentó una señal similar de las muestras a las 12 h ( $N_{PgDiClmet} = 0,47 > N_{PgAcu} = 0,32 > N_{pepstatina A} = 0,31 > N_{C. albicans} = 0,29$ ), lo cual indicó un ligero aumento en la expresión genética; sin embargo, sus valores no fueron suficientes para demostrar un cambio significativo; pero a las 24 horas, se notó que la expresión fue detenida por parte de los inhibidores ( $N_{C. albicans} = 4,57 > N_{PgAcu} = 0,45 > N_{pepstatina A} = 0,22 > N_{PgDiClmet} = 0,08$ ); de igual manera, el extracto en diclorometano mostró la menor señal (N) y por tanto la mayor inhibición.

En la búsqueda bibliográfica realizada, existen reportes de la expresión de los genes de *sap*, coincidiendo con este trabajo en el hecho de que *sap2* es la isoenzima predominante (Naglik et al. 2003; Taylor et al. 2005); además, se encontraron reportes de inhibición de SAP a nivel genético por parte de inhibidores específicos de proteasa aspártica de VIH y de pepstatina A, por el método de ELISA, en el cual se demostró que la presencia de éstos compuestos a nivel *in vivo* e *in vitro* disminuye significativamente la producción de isoenzimas de *sap* de *C. albicans* [Cassone et al. (1999); De Bernardis et al. (2004)]; por lo cual, estos resultados son muy importantes, puesto que demuestran que la inhibición de estas proteasas puede darse a nivel de genes, incluso con el control pepstatina A, que es un inhibidor enzimático específico de SAP; se observó que el modo de inhibición de éste, no solo está dado a nivel no-competitivo con las proteasas aspárticas (Marciniszyn et al. 1976), sino que también, parece alterar la síntesis de proteínas de la levadura; los extractos obtenidos de *P. guianensis* presentaron un mecanismo semejante al dado por pepstatina A a nivel de producción proteica.



Con los datos normalizados se procedió a calcular un porcentaje de inhibición a nivel molecular a las 24 h de incubación usando la **ecuación 4**, los resultados se muestran en la **tabla 30**.

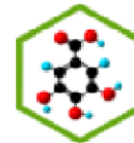
**Tabla 30.** Porcentaje de inhibición de genes de *sap* de los extractos.

gen \ Extracto	% I PgAcu	% I PgDiClmet
<i>sap1</i>	-2740,63	126,38
<i>sap2</i>	25,33	174,53
<i>sap4</i>	94,63	103,20

Estos resultados mostraron que el extracto en diclorometano inhibió en más del 100% con respecto al control pepstatina A y fueron significativos para *sap2*; además, se observó que el extracto acuoso inhibió de forma eficiente la expresión del gen *sap4* y que parece estimular la expresión de *sap1*. Este estudio, presentó un gran avance en la búsqueda de inhibidores naturales de SAP, los cuales ayudarían en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por *Candida albicans*, disminuyendo los efectos secundarios de los medicamentos de primera línea más utilizados.

#### 4.4.6. Evaluación fracciones acuosas

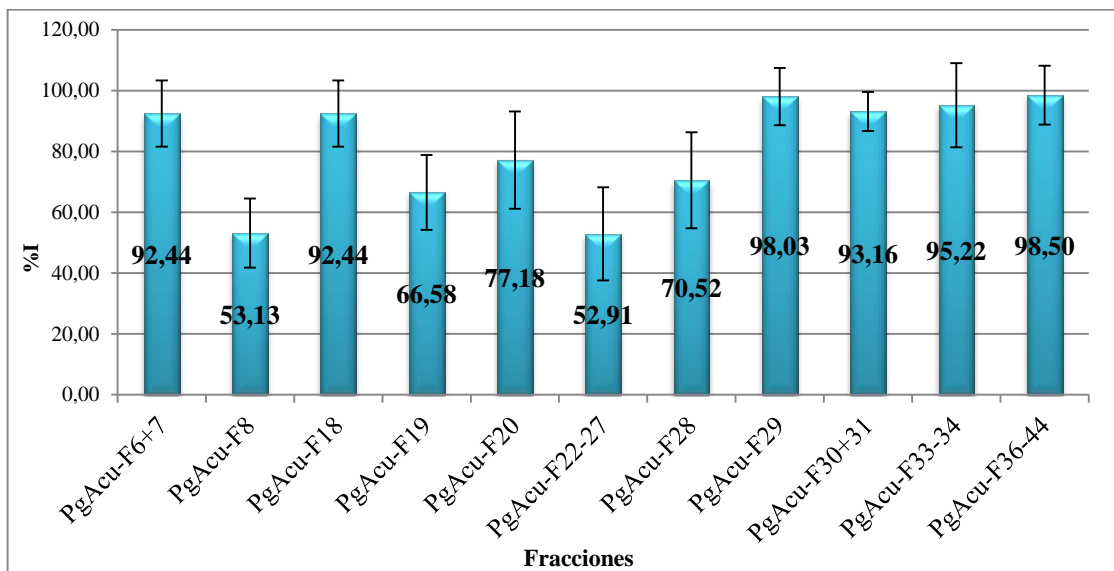
El extracto acuoso, a pesar de que tuvo menor porcentaje de inhibición que el de diclorometano, fue de gran interés para el estudio de compuestos polares presentes en él como polifenoles, a los cuales se les pueden atribuir actividades biológicas; además, éste extracto mostró alta estabilidad y muy bajos coeficientes de variación; por este motivo, se decidió realizar un fraccionamiento bioguiado de PgAcu, por parte del grupo de investigación Polifenoles de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira. A las fracciones del extracto acuoso evaluadas a 500 µg/mL, se les realizó un análisis por fluorimetría y electroforesis para confirmar su modo de inhibición. Para la técnica fluorimétrica, se realizó el mismo análisis de varianza que a la fracción madre acuosa, mostrando mucha dispersión y poca reproducibilidad en algunos datos, los cuales



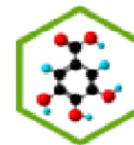
fueron descartados. La **tabla 31** muestra los valores generales de inhibición de las fracciones del extracto acuoso, junto con un histograma comparativo (**Figura 26**).

**Tabla 31.** Porcentaje de inhibición de SAP de *C. albicans* para las fracciones del extracto acuoso.

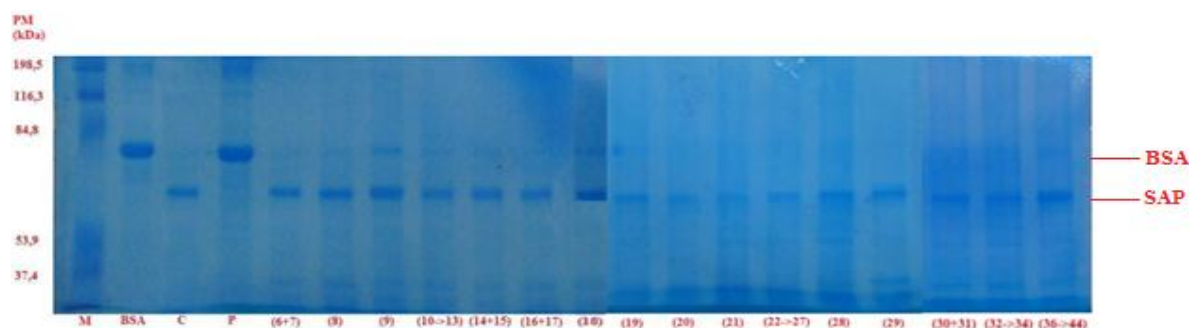
Extracto	%I	SD %I	%CV %I
<b>PgAcu-F6+7</b>	92,44	10,88	11,77 %
<b>PgAcu-F8</b>	53,13	11,36	21,38 %
<b>PgAcu-F18</b>	92,44	10,88	11,77 %
<b>PgAcu-F19</b>	66,58	12,32	18,50 %
<b>PgAcu-F20</b>	77,18	15,99	20,72 %
<b>PgAcu-F22-27</b>	52,91	15,28	28,88 %
<b>PgAcu-F28</b>	70,52	15,81	22,42 %
<b>PgAcu-F29</b>	98,03	9,43	9,62 %
<b>PgAcu-F30+31</b>	93,16	6,44	6,91 %
<b>PgAcu-F33-34</b>	95,22	13,88	15,58 %
<b>PgAcu-F36-44</b>	98,50	9,69	9,84 %



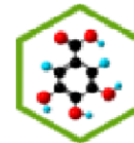
**Figura 26.** Histograma de inhibición de SAP de *C. albicans* para las fracciones del extracto acuoso.



Según los datos obtenidos, las fracciones del extracto acuoso mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 50%, al igual que el extracto madre, donde sobresalían las correspondientes a PgAcu-F29 y PgAcu-F36-44, con un resultado alrededor del 98%, siendo promisorias como inhibidores de SAP, se espera entonces que en estas, las sustancias como taninos, alcaloides, flavonoides y saponinas, sean las que predominen; los máximos de absorción de los cromatogramas realizados a éstas fracciones (**Anexos 4 al 20**), oscilan entre los 230 nm, 270 nm, 280 nm y 320 nm, lo cual confirma la presencia de metabolitos biológicamente activos (Domínguez 1973). También se realizó una medición electroforética para verificar si su inhibición se da de igual manera que en el extracto madre, ésta se presenta en la **figura 27**.

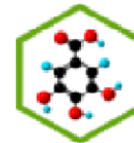


**Figura 27.** Electroforesis de las fracciones del extracto acuoso; **M** (marcador de peso molecular), **BSA** (medio de cultivo con BSA al 0,1%), **C** (*C. albicans*), **P** (*C. albicans* + pespstatina A), **(6+7)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 6+7), **(8)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 8), **(9)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 9), **(10-13)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 10-13), **(14+15)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 14+15) y **(16+17)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 16+17), **(18)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 18), **(19)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 19), **(20)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 20), **(21)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 21), **(22-27)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 22-27), **(28)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 28) y **(29)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 29), **(30+31)** (*C. albicans* + Fracción del extracto acuoso 30+31), **(32-34)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 32-34) y **(36-44)** (*C. albicans* + fracción del extracto acuoso 36-44).



Para éste gel, se pudo apreciar que las fracciones que mostraron inhibición fueron las correspondientes a PgAcu-F8, PgAcu-F9, PgAcu-F10-13 y PgAcu-F18, las cuales presentaron la banda de SAP acompañada de una banda tenue de BSA, indicando una pequeña disminución en la producción de proteasa. Para las demás fracciones no se demostró inhibición de SAP, debido a que solo se observó la banda característica de proteasa, y no hubo presencia de sustrato, lo cual indicó que el BSA es consumido totalmente con la producción de la enzima por parte de la levadura *C. albicans*.

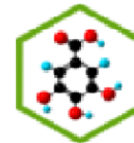
Los resultados obtenidos de las corridas electroforéticas, no coinciden con lo encontrado en la técnica fluorimétrica, esto se debe fundamentalmente a que la electroforesis solo demostró la presencia o ausencia de la proteasa SAP en el gel, lo cual indica que las fracciones con resultados positivos en el gel (PgAcu-F8, PgAcu-F9, PgAcu-F10-13 y PgAcu-F18) parecen inhibir la biosíntesis de proteínas al igual que el extracto madre, y las fracciones con un porcentaje de inhibición de SAP alto (PgAcu-F29 y PgAcu-F36-44) estudiadas por la técnica fluorimétrica inhibieron la actividad proteolítica de la enzima, puesto que, en el gel de electroforesis no presentan la banda característica de BSA que indica la inhibición, es decir, no alteran la producción de SAP.



### 5. CONCLUSIONES

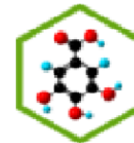
- Los extractos de la planta *Palicourea guianensis* no poseen actividad antibacterial contra *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a concentraciones de 4000 µg/mL y 2000 µg/mL, sin embargo, algunos reportes muestran que a concentraciones mucho más altas si hay actividad biológica para *S. aureus*.
- Los extractos de la planta *Palicourea guianensis* poseen actividad antiSAP, con porcentajes de inhibición por encima del 50% respecto al inhibidor específico pepstatina A determinado por medio de las técnicas utilizadas, siendo los más sobresalientes los extractos acuoso y de diclorometano. Ambos extractos contienen metabolitos secundarios estudiados en fitoquímica por su vasta gama de actividades biológicas; por tal razón, se espera que compuestos como taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides sean los responsables de la actividad de los extractos obtenidos.
- Se demostró que las fracciones del extracto acuoso poseen actividad antiSAP; para PgAcu-F6+7, PgAcu-F8, PgAcu-F18, PgAcu-F19, PgAcu-F20, PgAcu-F22-27, PgAcu-F28, PgAcu-F29, PgAcu-F30+31, PgAcu-F33-34 y PgAcu-F36-44 se logró observar que la inhibición es a nivel de la reacción enzimática por sus resultados positivos mediante la técnica fluorométrica y para PgAcu-F8, PgAcu-F9, PgAcu-F10-13 y PgAcu-F18 se determinó por medio de la electroforesis que inhiben en baja proporción la producción de proteasa.
- Se demostró que el control positivo pepstatina A y los extractos acuoso y de diclorometano poseían una propiedad de inhibición a nivel molecular de la producción de isoenzimas de *sap*, tales como: *sap1*, *sap2* y *sap4*; por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real, con la cual también se logró demostrar que el gen que se expresa en mayor cantidad es el de *sap2* y que su máximo se da entre las 24 y 30 horas de incubación de *C. albicans* en medio específico y que la expresión de *sap1* es estimulada por el extracto acuoso.





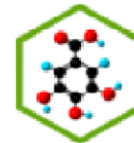
### 6. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de actividad antiSAP más detallado de los extractos en diclorometano, acetato de etilo y *n*-hexano, ya que muestran un buen porcentaje de inhibición y su fraccionamiento brindaría más información acerca de metabolitos con actividad.
- Hacer un estudio de inhibición de las 10 isoenzimas pertenecientes a la proteasa aspártica secretada SAP, con lo cual se reconocería mas el papel de los compuestos al momento de inhibir la síntesis de éstas enzimas.
- Se recomienda realizar una elucidación detallada de los compuestos presentes en los extractos obtenidos de *Palicourea guianensis*, ya que su estructura puede brindar aún mas información acerca de su modo de inhibición para obtener medicamentos naturales más eficientes y sin efectos secundarios que afecten la calidad de vida de los pacientes.

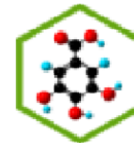


### BIBLIOGRAFÍA

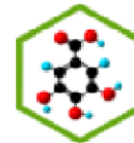
- Abad-Zapatero, C.; Goldman, R.; Muchmore, S.; Hutchins, C.; Stewart, K.; Navaza, J.; Payne, C. y Ray, T. (1996). "Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: Implications for the design of antifungal agents." Protein Science. **5**: 640 - 652.
- Akiyama, H.; Fujii, C.; Yamasaki, O.; Oono, T. y Iwatsuky, K. (2001). "Antibacterial Action of several tannins against *Staphylococcus aureus*." Journal of antimicrobial Chemotherapy. **48**: 487 - 491.
- Arenas, R. (2008). Micología médica ilustrada. México D.F. McGraw-Hill. 3ª edición. 17 - 23, 218 - 238.
- Arias, C. y Marulanda, J. (2010). Estandarización y aplicación de un método espectrofluorométrico para la identificación de inhibidores de la proteasa aspártica secretada (SAP) de *Candida albicans*, a partir de extracto de plantas de la familia Melastomataceae y Rubiaceae. Pereira, Tesis de Tecnólogo Químico de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Benítez, N. y Stashenko, E. (2009). "Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. **8**: 145 - 150.
- Brown, J.; Huang, G.; Haley-Zitlin, V. y Jiang, X. (2009). "Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*." Applied and Environmental Microbiology. **75**: 848 - 852.
- Budtz-Jorgensen, E. y Lombardi, T. (2000). "Antifungal therapy in the oral cavity." Periodontol. **10**: 86 - 106.



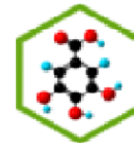
- Bürkert, C. (2011). "Cromatografía líquida." Obtenido el 14 de Mayo, 2011, de <http://www.burkert.es/ESN/336.html>.
- Campbell, M. y Farrell, S. (2006). Bioquímica, Ciencias e Ingenierías. 4ª Edición. 165 - 171.
- Capobianco, J.; Lerner, C. y Goldman, R. (1992). "Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase." Analytical Biochemistry. **204**: 7.
- Carile, M.; Watkinson, S. y Gooday, G. (1994). The Funji, ACADEMIC PRESS. 2ª Edición. 70 - 75.
- Cassone, A.; De Bernardis, F.; Torosantucci, A.; Tacconelli, E.; Tumbarello, M. y Cauda, R. (1999). "In vitro and In vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors." The Journal of Infectious Diseases. **180**: 448 - 453.
- Castro, E. y Orallo, F. (2003). "Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer." Ámbito Farmacéutico. **22**: 130 - 140.
- Castro, S. (2006). Evaluacion de la actividad citotoxica de extractos y fracciones de *Iseritia laevis* empleando lineas celulares derivadas de tumores humanos. Bogotá, Tesis de Biologa de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Cultek. (2009). "PCR en Tiempo Real Introducción " Obtenido el 10 de Marzo, 2011, de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf>.
- Chaffin, W.; López-Ribot, J.; Casanova, M.; Gozalbo, D. y Martínez, J. (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." Microbiology and molecular biology reviews. **62**: 142 - 148.



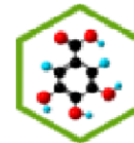
- da Rosa, E.; e Silva, B.; da Silva, F.; Tanaka, C.; Peralta, R.; de Oliveira, C.; Kato, L.; Ferreira, H. y da Silva, C. (2010). "Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae." Brazilian Journal of Pharmacognosy. **20**: 484 - 488.
- De Bernardis, F.; Tacconelli, E.; Mondello, F.; Cataldo, A.; Arancia, S.; Cauda, R. y Cassone, A. (2004). "Anti-retroviral therapy with protease inhibitors decreases virulence enzyme expression *in vivo* by *Candida albicans* without selection of avirulent fungus strains or decreasing their anti-mycotic susceptibility." FEMS Immunology and Medical Microbiology. **41**: 27 - 34.
- Dean, K.; Kleyn, G.; Renaudet, O. y Reymond, J. (2003). "A green fluorescent chemosensor for amino acids provides a versatile high-throughput screening (HTS) assay for proteases." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **13**: 1553 - 1556.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de identificación fitoquímica. México, LIMUSA. 1ª edición. 86, 154, 222 - 223.
- Dostál, J.; Hamal, P.; Pavlícková, L.; Soucek, M.; Ruml, T.; Pichová, I. y Hrusková-Heidingsfeldová, O. (2003). "Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment." Journal of clinical microbiology. **41**: 712 - 716.
- Gil, M. (1997). "Conceptos básicos sobre la interacción del sistema inmune y los hongos causales de micosis sistémicas." IATREIA. **10**: 171 - 176.
- Izasa, C.; Izasa, G.; Fuentes, J. y Marulanda, T. (2002). Fundamentos de farmacología en terapéutica. 4ª Edición. 459 - 466.



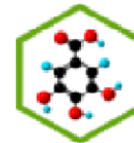
- Kennet, J. y Ray, J. (2004). Microbiología médica, una introducción a las enfermedades infecciosas, Mc Graw Hill. 4<sup>a</sup> edición.
- Li, X.; Jacob, M.; Pasco, D.; ElSohly, H.; Nimrod, A.; Walker, L. y Clark, A. (2001). "Phenolic compounds from miconia myriantha inhibiting *Candida* aspartic proteases." Journal of Natural Products. **64**: 1282 - 1285.
- Lodish, H. (2005). Biología Celular y Molecular, Editorial medica panamericana. 5<sup>a</sup> Edición. 87.
- Marciniszyn, J.; Hartsuck, J. y Tang, J. (1976). "Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin." The Journal of Biological Chemistry. **251**: 7088 - 7094.
- Martínez, A.; Valencia, G.; Jiménez, N.; Mesa, M. y Galeano, E. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. 1<sup>a</sup> Edición. 19.
- Mendoza, H.; Ramírez, B. y Jiménez, L. (2004). Rubiaceae de Colombia, Guía ilustrada de géneros. Bogotá, Colombia, Tesis de de la Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 21 - 23, 31 - 48, 228 - 233.
- Mitchell, A. (1998). "Dimorphism and virulence in *Candida albicans* " Current Biology. **1**: 687 - 692.
- Naglik, J.; Albrecht, A.; Bader, O. y Hube, B. (2004). "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions" Cellular Microbiology. **6**: 915 – 926.
- Naglik, J.; Challacombe, S. y Hube, B. (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis" Microbiology and molecular biology reviews. **63**: 400 - 428.



- Narine, L. y Maxwell, A. (2009). "Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*" Phytochemistry Letters. **2**: 34 - 36.
- Negróni, M. (2009). Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica, Medica Panamericana. 2ª Edición. 400.
- Niño, J.; Narváez, D.; Mosquera, O. y Correa, Y. (2006). "Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight *Asteraceae* and two *Rubiaceae* plants from Colombian biodiversity" Brazilian Journal of Microbiology. **37**: 566 - 570.
- Passos, S.; Ferreira, H.; Vieira, I.; Nunes, W.; Felício, L.; Silva, E.; Vale, C.; Duarte, S.; Silva, E. y Carvalho, S. (2010). "Modulatory effect of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*" Genetics and molecular Research. **9**: 1153 - 1162.
- Pedrós, B. (2003). Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albicans*. Valencia - España, Tesis de PhD en microbiología de la Universidad de Valencia.
- Prescott, S. y Dunn, C. (1962). Microbiología industrial. Valencia.A. S.A. 3ª Edición. 13-15.
- Puras, A.; Montes, M.; Fernández, P. y López, A. (2000). "Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico" Revista iberoamericana de micología. **17**: 34 - 40.
- Ramírez, L. (2008). Manual de microbiología, Universidad Tecnológica de Pereira. 1ª Edición. 83.

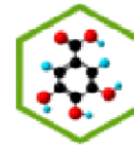


- Ripeau, J.; Fiorillo, M.; Aumont, F.; Belhumeur, P. y de Repentigny, L. (2001). "Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1–transgenic mice." The Journal of Infectious Diseases **185**: 1094 - 1102.
- Ruchel, R.; de Bernandis, F.; Ray, T.; Sullivan, P. y Cole, G. (1992). "*Candida* acid proteinases" Med Vet Mycol. **30**: 123 - 132.
- Ruibal, I.; Dubed, M.; Martínez, F.; Noa, E.; Vargas, L. y Santana, J.(2003). "Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet " Revista Cubana de Farmacia. **37**: 1 - 3.
- Ruiz, L.y Alzate, A. (2006). Actividad *in vitro* anti-*Candida albicans* de las fracciones del homogenizado en isopropanol-agua (65:35) de tibouchina multiflora y sus hidrolizados. Pereira, Tesis de Tecnólogo químico de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Sánchez, P. (2000). Flórula del Parque Nacional Cahuita San José, Costa Rica, Editorial Universidad Estatal a Distancia. 1ª edición. 266, 267.
- Schaller, M.; Januschke, E.; Schackert, C.; Woerle, B. y Korting, H.C. (2001). "Defferent Isoforms of secreted aspartyl proteinases (SAP) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*" Journal of Medical Microbiology. **50**: 743, 744.
- Schlegel, H. y Zaborosch, C. (1997). Microbiología general. Editorial Omega S. A. 7ª edición. 24 - 25.



- Suffredini, I.; Barradas, M.; Varella, A. y Younes, R. (2006). "Antibacterial activity of brazilian amazon plant extracts" The Brazilian Journal of Infectious Diseases. **10**: 400 - 402.
- Taylor, B.; Staib, P.; Binder, A.; Biesemeier, A.; Sehnal, M.; Röllinghoff, M.; Morschhäuser, J. y Schröppel, K. (2005). "Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection" Infection and immunity **73**: 1828–1835.
- Valgas, C.; Machado, S.; Smânia, E. y Smânia Jr., A. (2007). "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products" Brazilian Journal of Microbiology. **38**: 369 - 380.
- Villanueva, J. y Arenas, R. (2007). "Candidiasis mucocutanea una revisión." Revista Mexicana de Micología. **25**: 91 - 104.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). "PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular" Revista electrónica de Veterinaria. **10**: 1 - 13.





## ANEXOS

### Anexo 1. Metodología de preparación del gel para SDS-PAGE.

- **Acrilamida/ Bis-acrilamida(30% T, 2,67% C)**

87,6 g Acrilamida (29,2 g/100mL)

2,4 g N'N'-bis-metileno-acrilamida (0,8 g/100mL)

Mezclar con 300 mL de agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C protegido de la luz.

- **SDS 10% (m/v)**

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

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

27,23 g Tris base (18,15 g/100ml)

80 mL Agua desionizada

Ajustar el pH a 8,8 con HCl 6 N, llevar a un volumen total de 150 mL con agua desionizada y almacenar a 4°C.

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

6 g Tris base

60 mL Agua desionizada

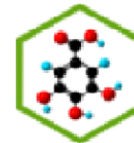
Ajustar el pH a 6,8 con HCl 6 N, llevar a un volumen total de 100 mL con agua desionizada, almacenar a 4°C.

- **Buffer de carga**

3,55 mL Agua bidestilada

1,25 mL Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

2,5 mL Glicerol



2,0 mL SDS 10 % (m/v)

0,2 mL Azul de bromofenol 0,5% (m/v)

Almacenar a temperatura ambiente, al momento de usar, agregar 50  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a 950  $\mu$ L de buffer de carga.

▪ **Buffer de corrida pH 8,3 (10X)**

30,3 g Tris base

144 g Glicina

10 g SDS

Disolver y llevar a un volumen final de 1L con agua desionizada, almacenar a 4°C, al momento de usar diluir 50 mL de la solución stock con 450 mL de agua desionizada.

▪ **APS 10% (m/v)**

Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

▪ **Gel separador al 10%(m/v)**

4,1 mL Agua desionizada

3,3 mL Acrilamida/bis

2,5 mL Tris-HCl 1,5M, pH 8,8

0,1 mL SDS 10% (m/v)

▪ **Gel concentrador al 4%(m/v)**

6,1 mL Agua desionizada

1,3 mL Acrilamida

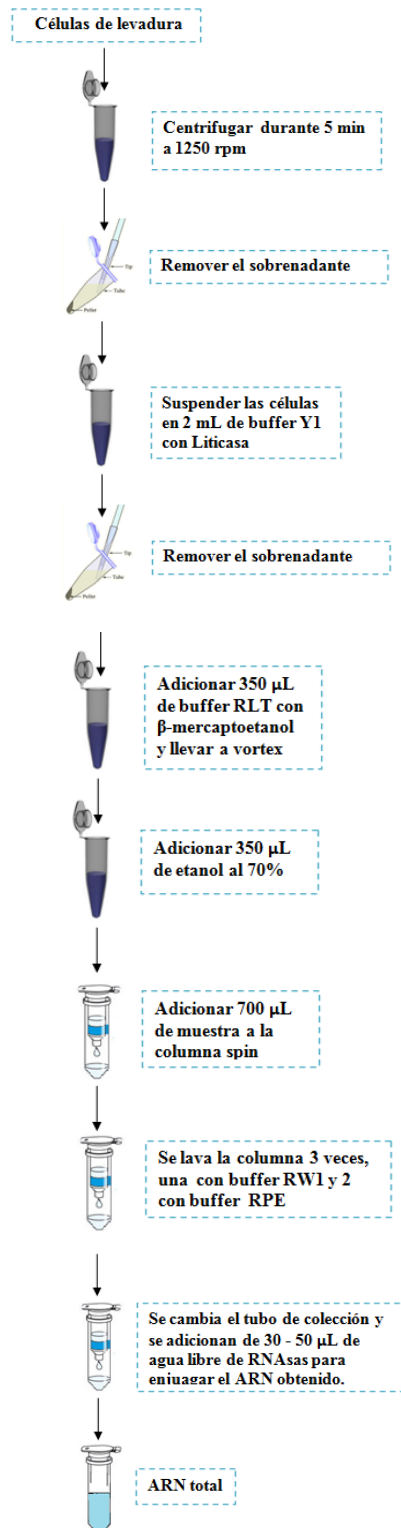
2,5 mL Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

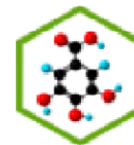
0,1 mL SDS 10% (m/v)

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

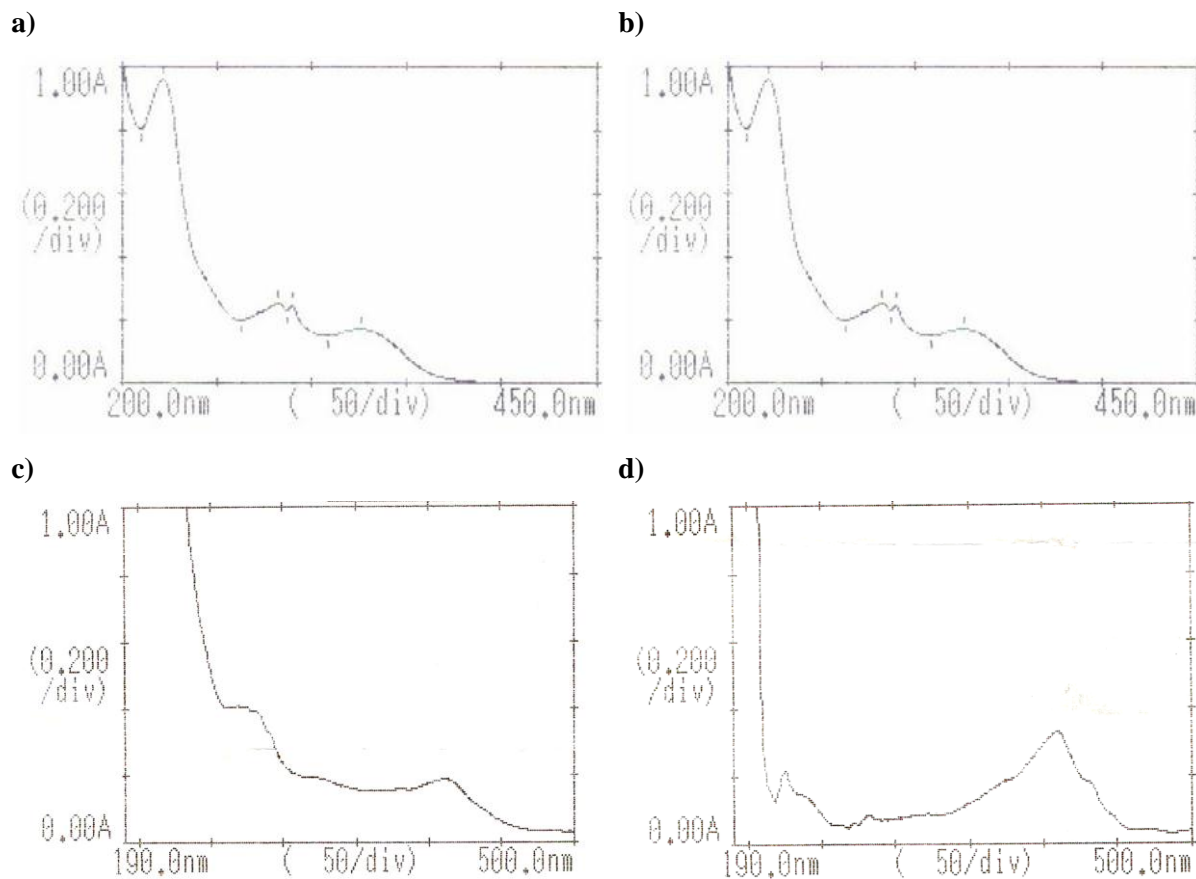


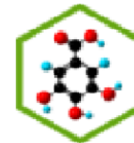
## Anexo 2. Esquema de extracción de ARNm.





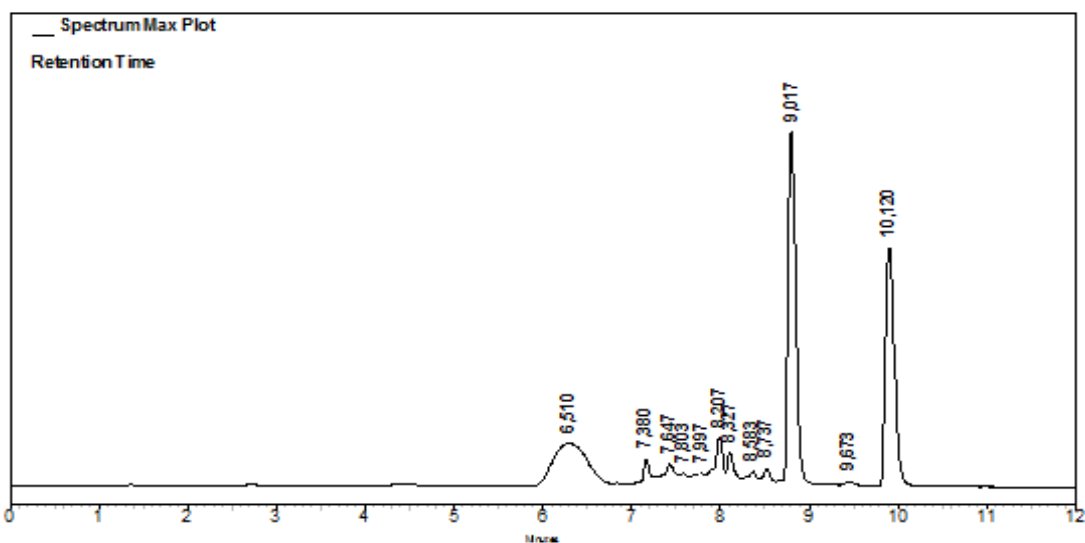
**Anexo 3.** Espectros de absorción de los extractos: **a)** PgAcu, **b)** PgAcOet, **c)** PgDiClmet y **d)** PgHex.



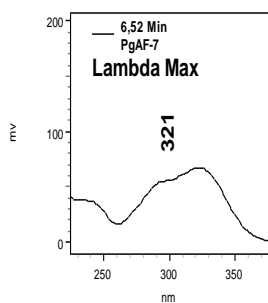


**Anexo 4. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F6+7, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,52 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  7,34 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,16 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,35 min). **f.** Cromatograma de PgAcu-F7, **g.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,96 min), **h.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,02 min), **i.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min).

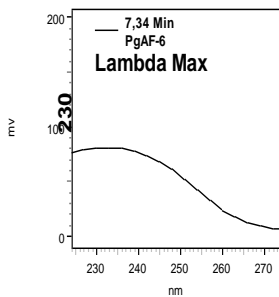
**a.**



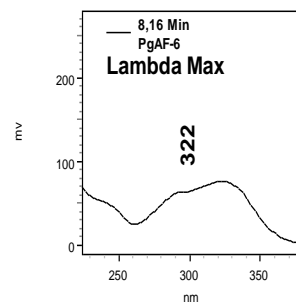
**b.**



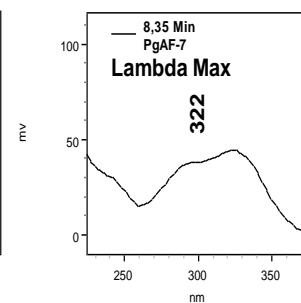
**c.**



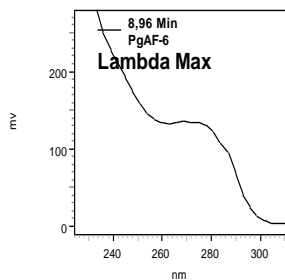
**d.**



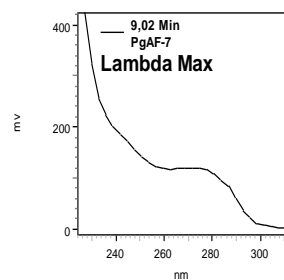
**e.**



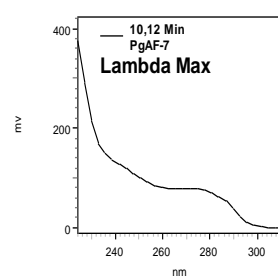
**f.**



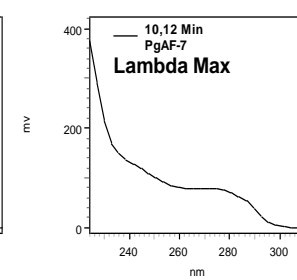
**g.**

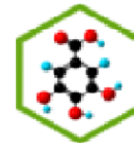


**h.**



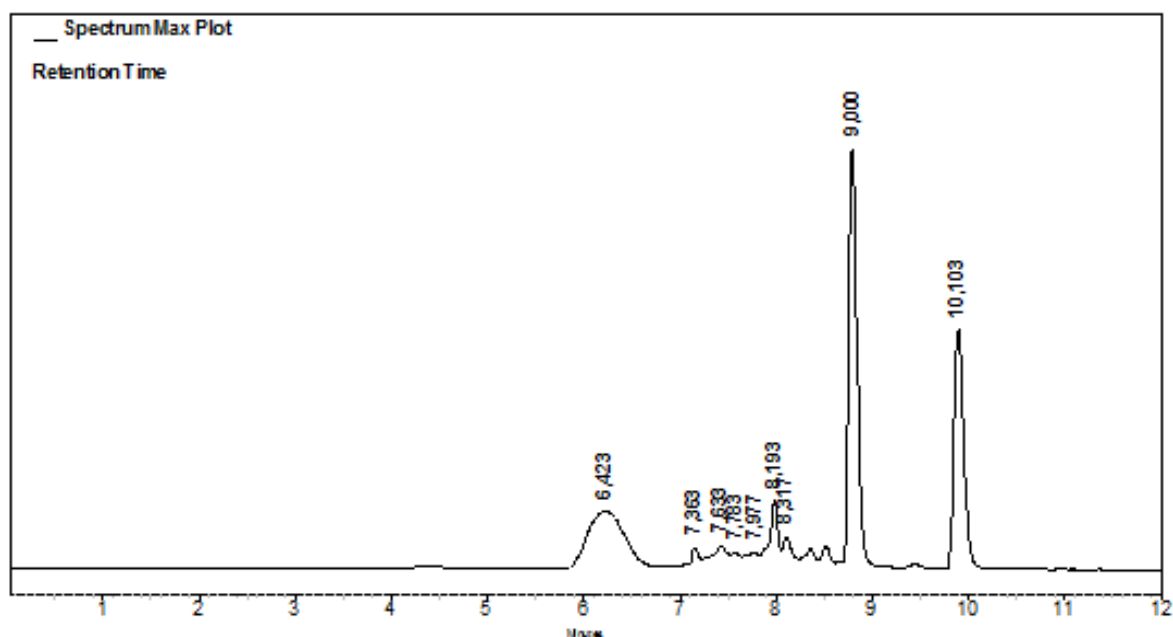
**i.**



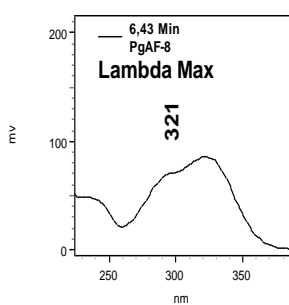


**Anexo 5. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F8, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,43 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  7,63 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,20 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,00 min).

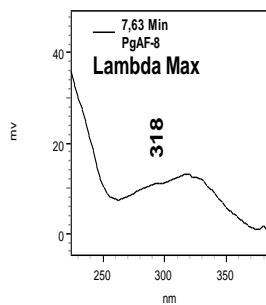
**a.**



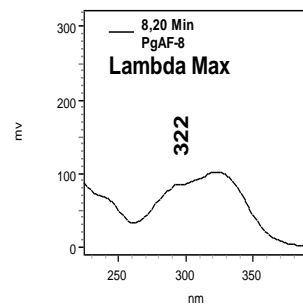
**b.**



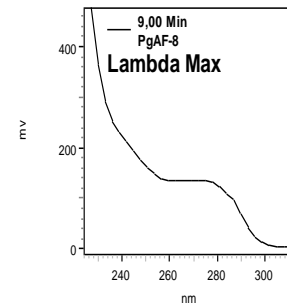
**c.**

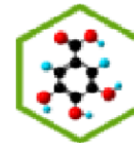


**d.**



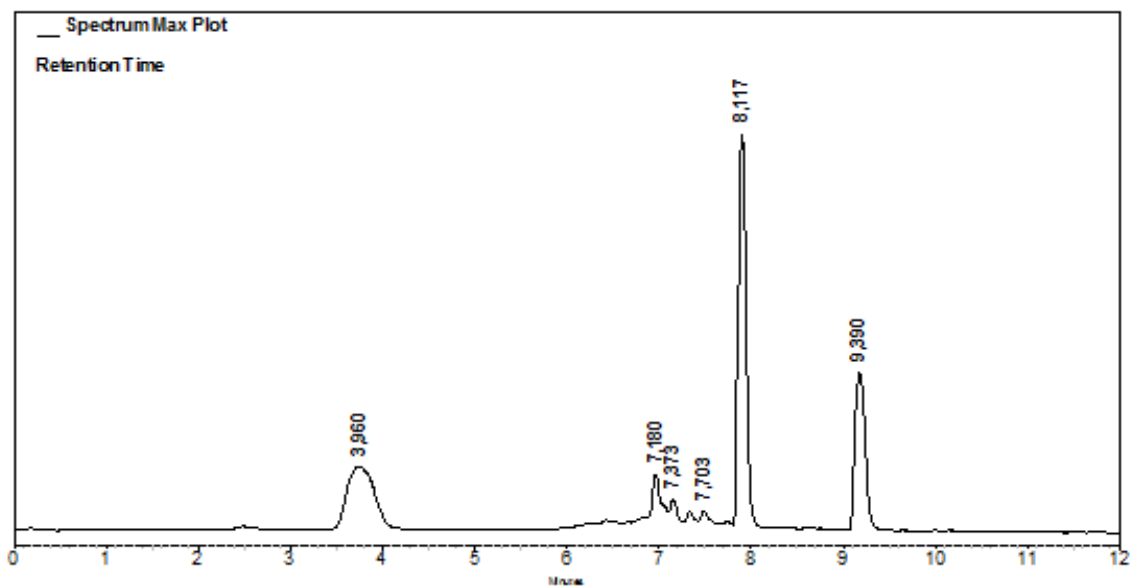
**e.**



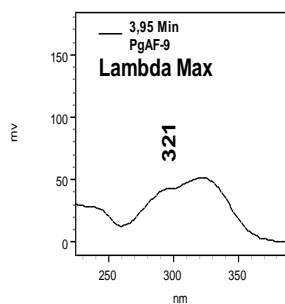


**Anexo 6. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F9, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  3,95 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  7,19 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,11 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,39 min).

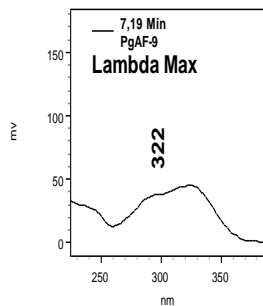
**a.**



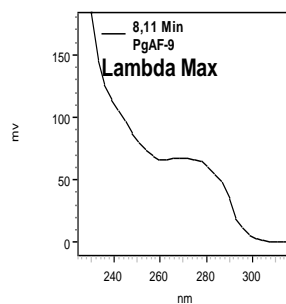
**b.**



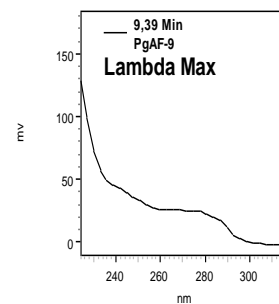
**c.**

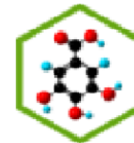


**d.**



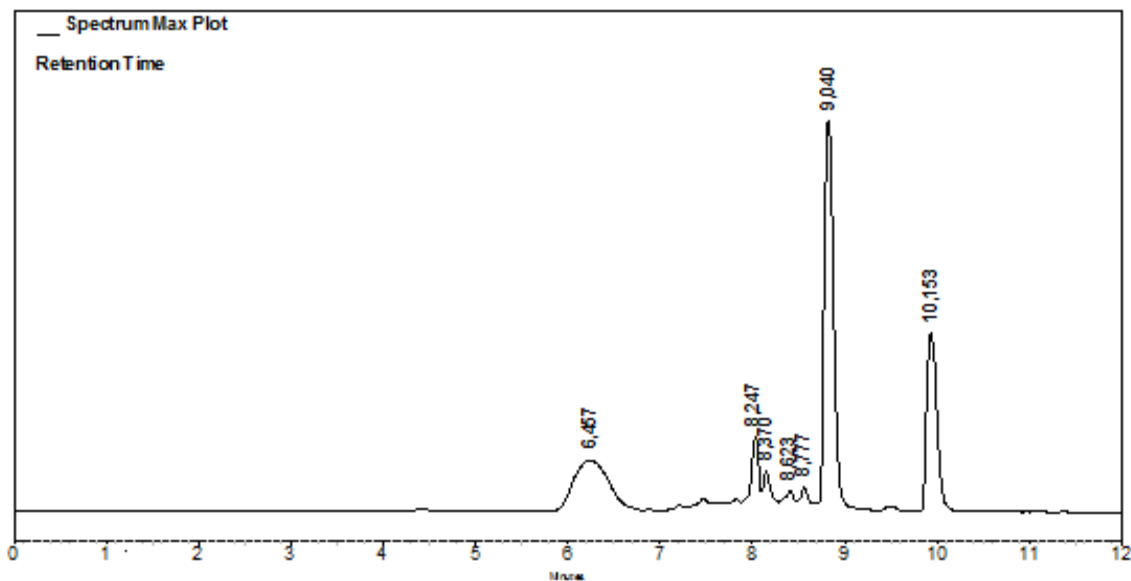
**e.**



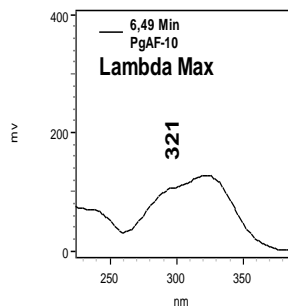


**Anexo 7. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F10-13, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,49 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,25 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,70 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,79min), **f.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,04 min).

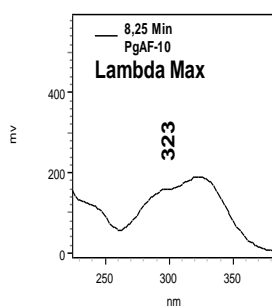
**a.**



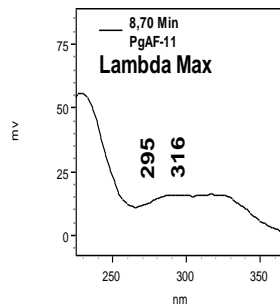
**b.**



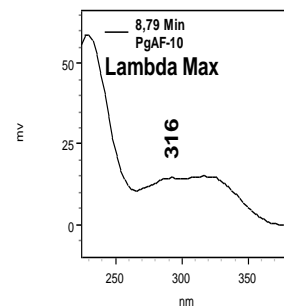
**c.**



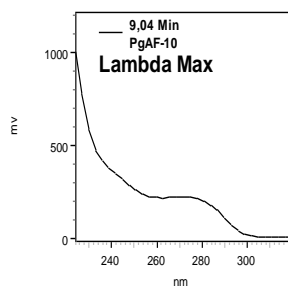
**d.**



**e.**



**f.**

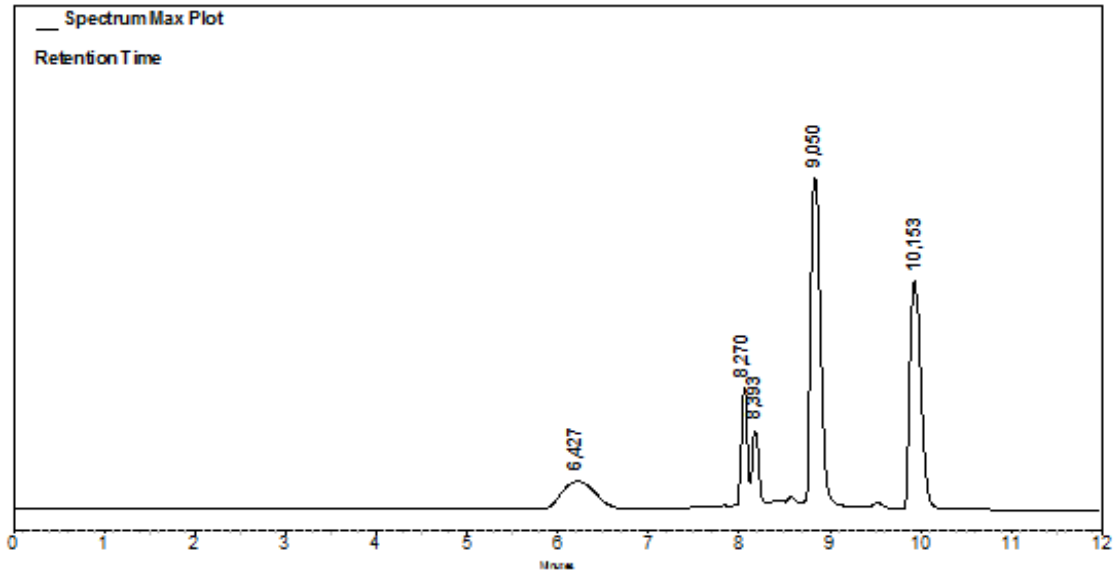




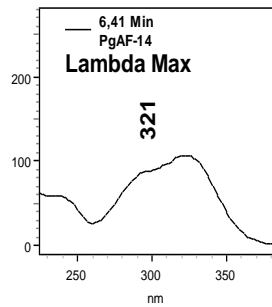


**Anexo 8. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F14+15, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  6,41 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,27 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,39 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,05min).

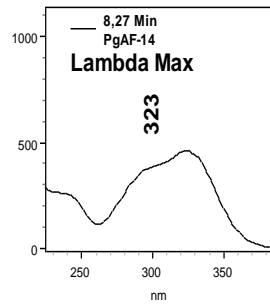
**a.**



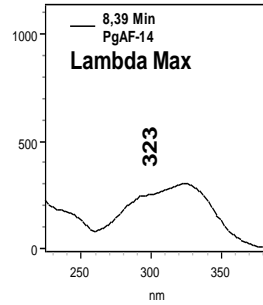
**b.**



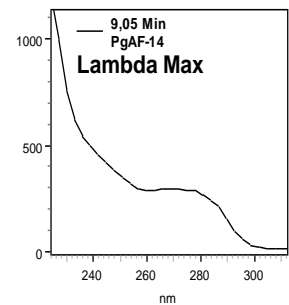
**c.**

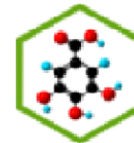


**d.**



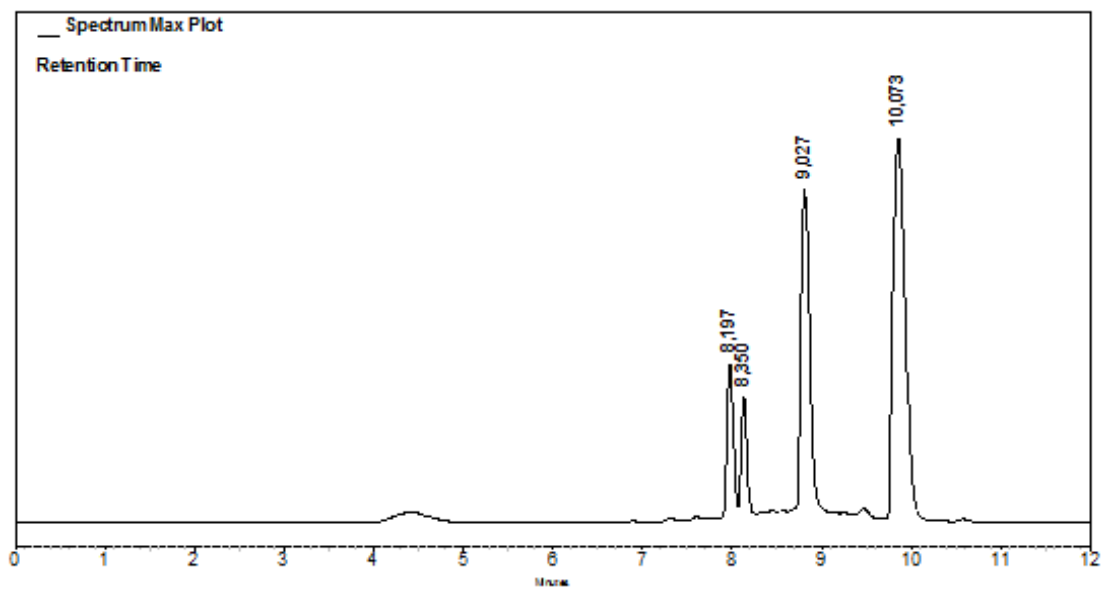
**e.**



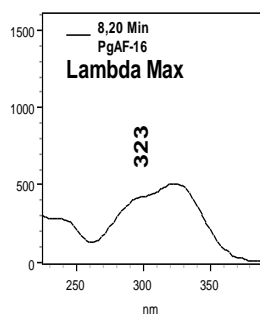


**Anexo 9. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F16+17, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,20 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,35 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,03 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,07 min).

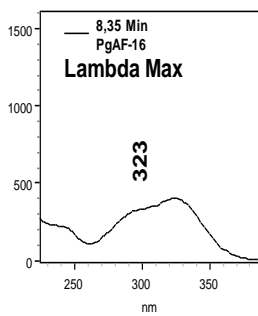
**a.**



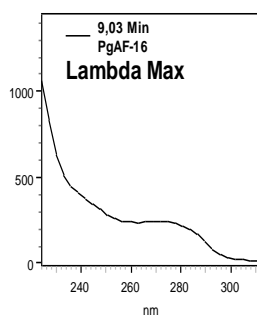
**b.**



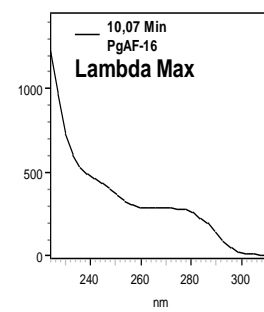
**c.**

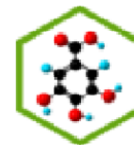


**d.**



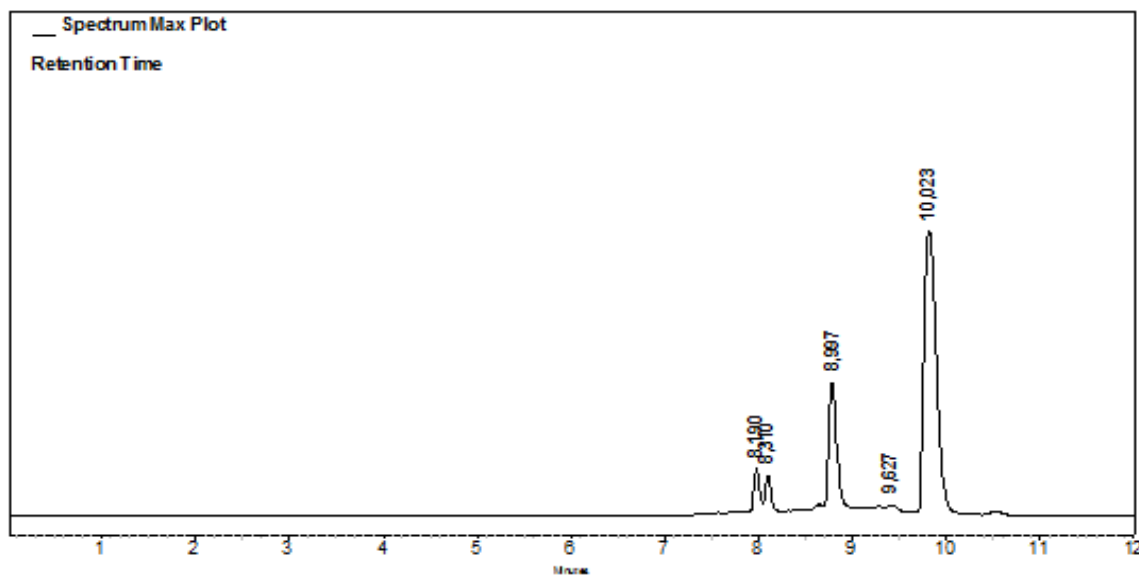
**e.**



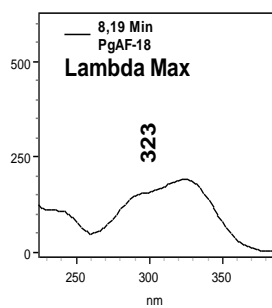


**Anexo 10. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F18, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,19 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,31 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,00 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,03 min).

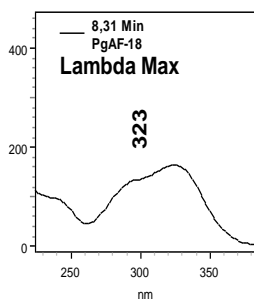
**a.**



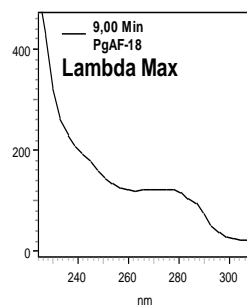
**b.**



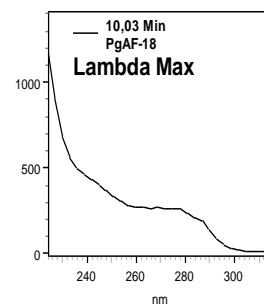
**c.**

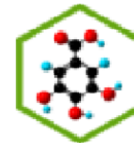


**d.**



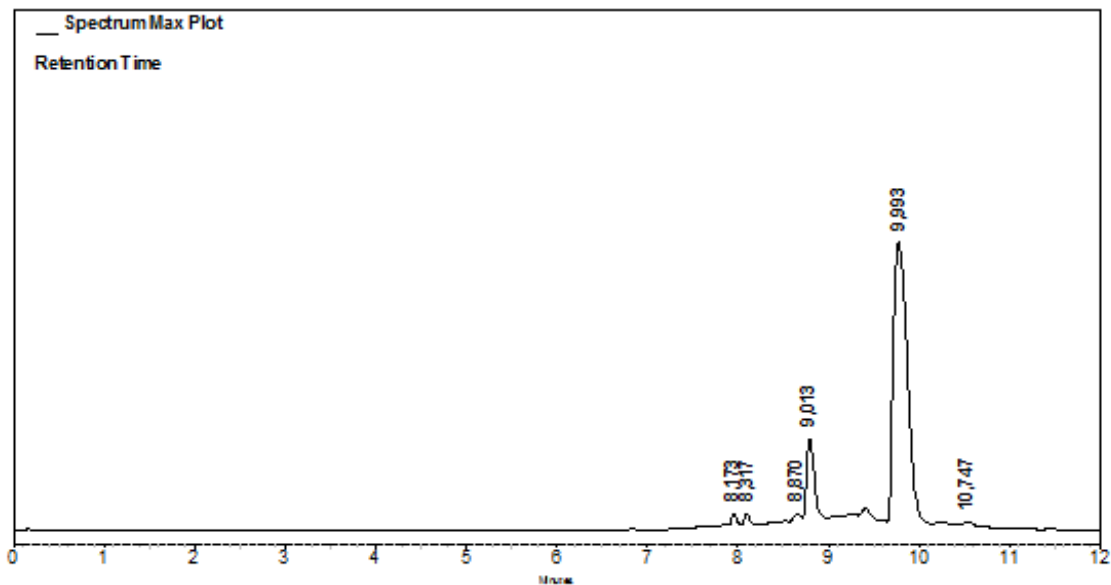
**e.**



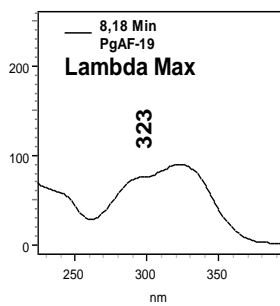


**Anexo 11. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F19, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,18 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,32 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,01 min), **e.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,00 min).

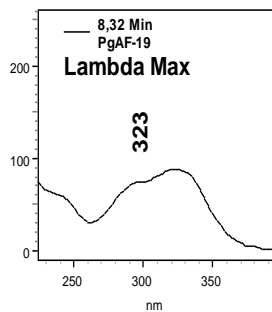
**a.**



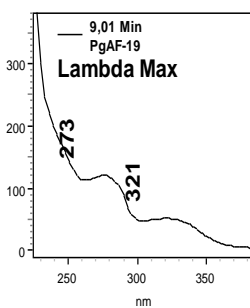
**b.**



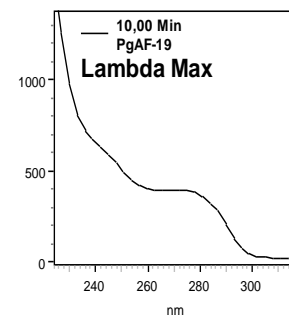
**c.**

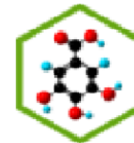


**d.**



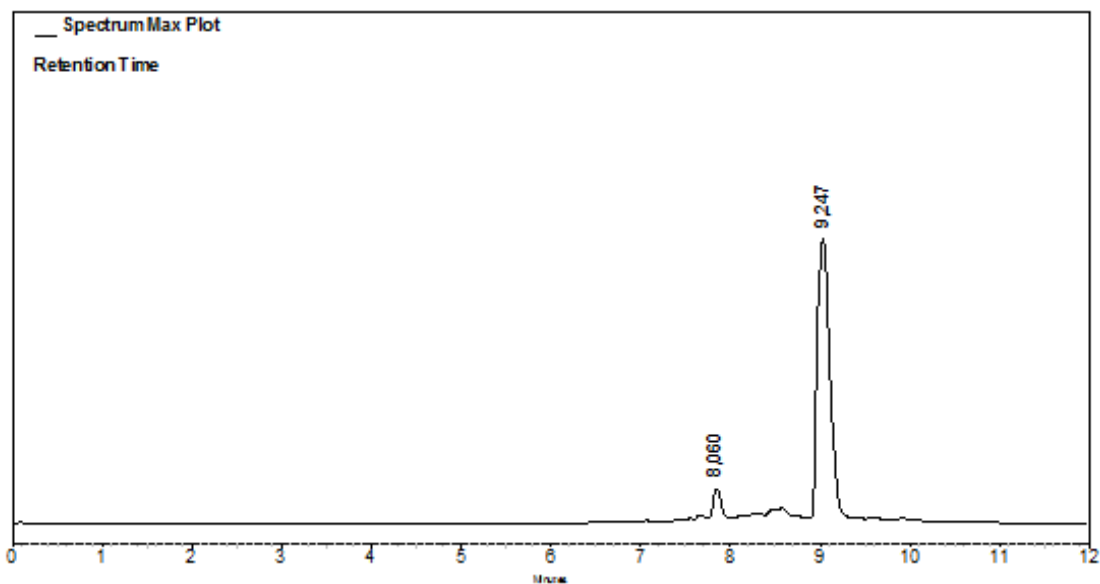
**e.**



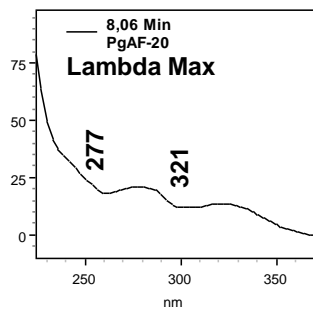


**Anexo 12. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F20, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,06 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  9,25 min).

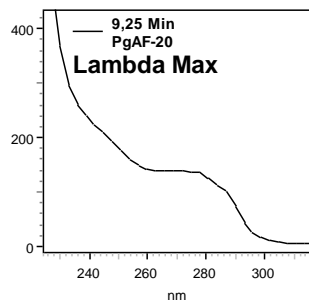
**a.**

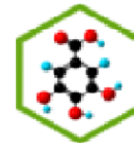


**b.**



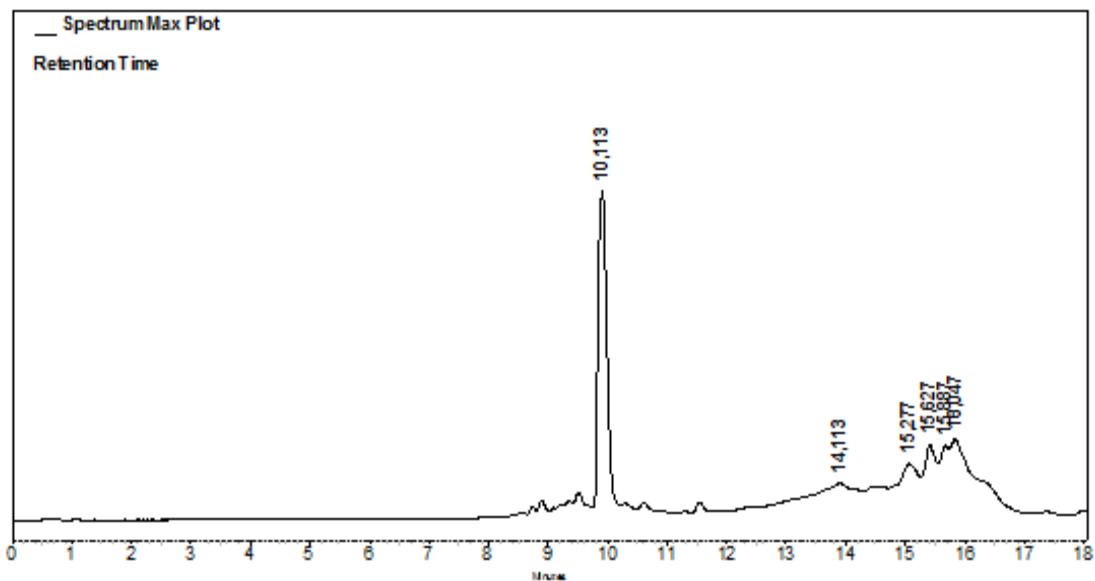
**c.**



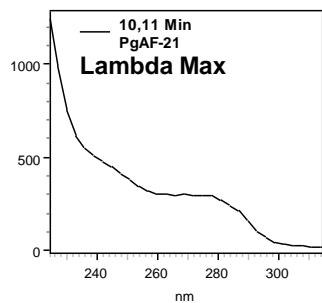


**Anexo 13. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F21, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,11 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  15,31 min).

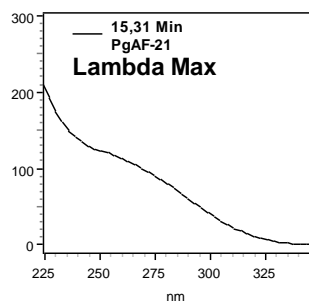
**a.**

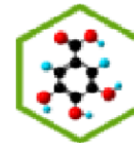


**b.**



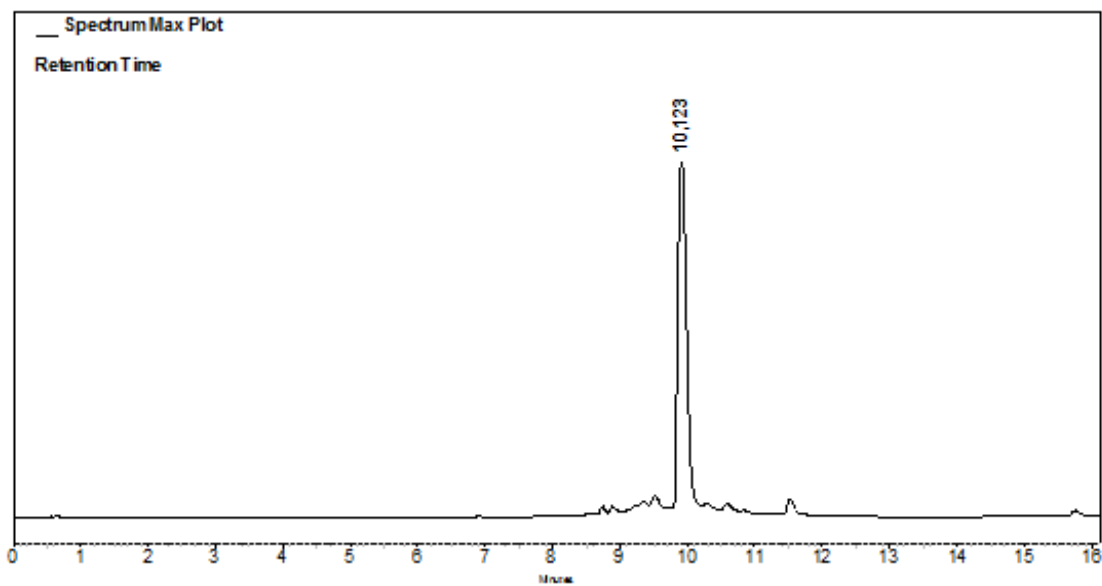
**c.**



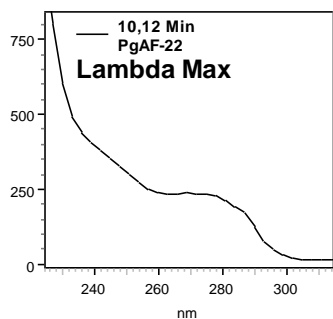


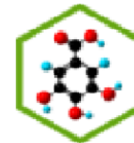
**Anexo 14. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F22-27, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min).

**a.**



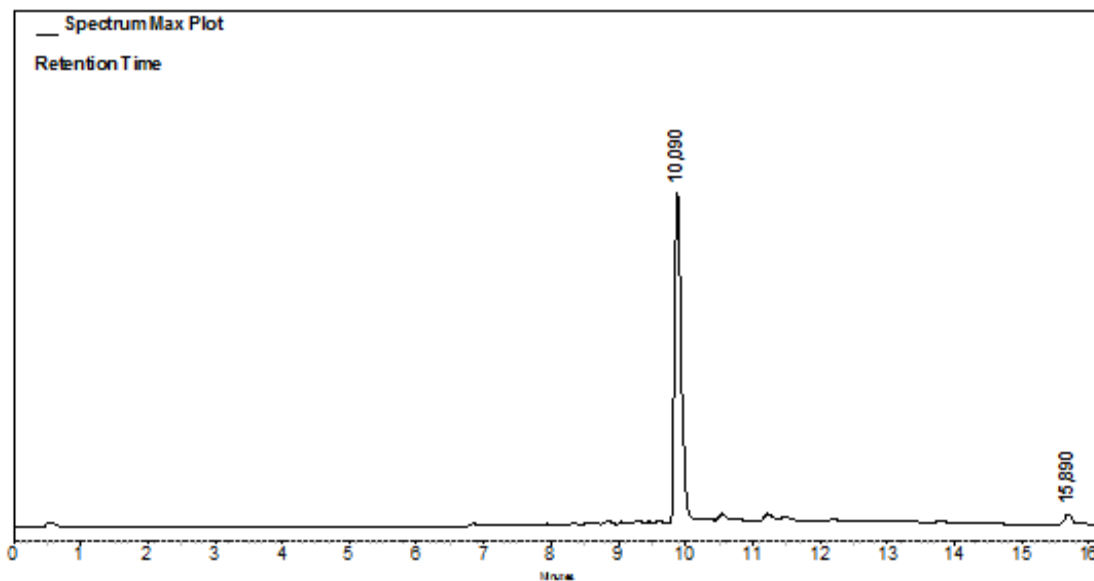
**b.**



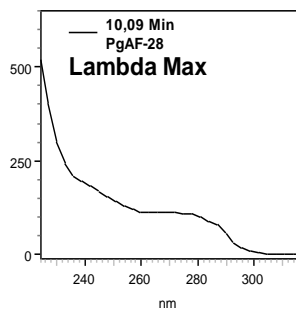


Anexo 15. a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F28, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,09 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$  15,90 min).

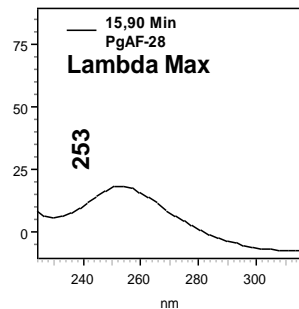
a.



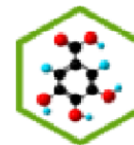
b.



c.

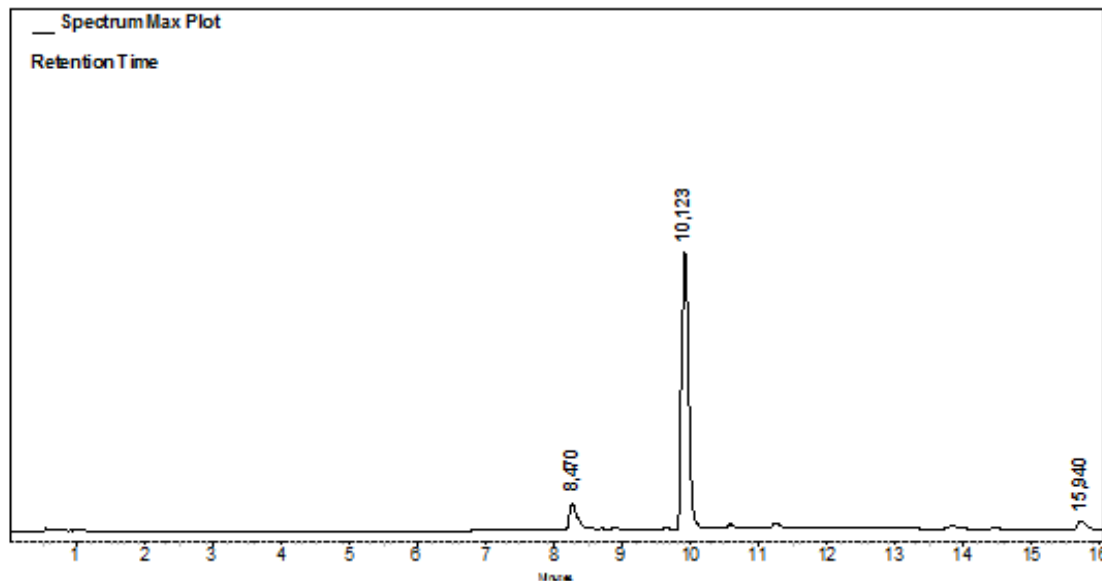




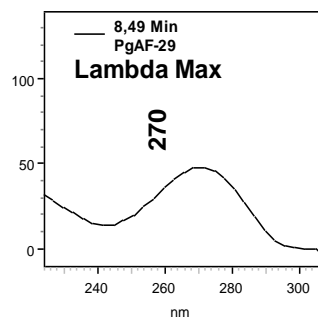


Anexo 16. **a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F29, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  8,49 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,12 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  15,97 min).

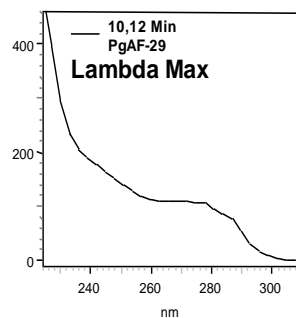
**a.**



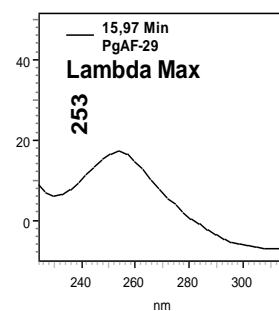
**b.**



**c.**



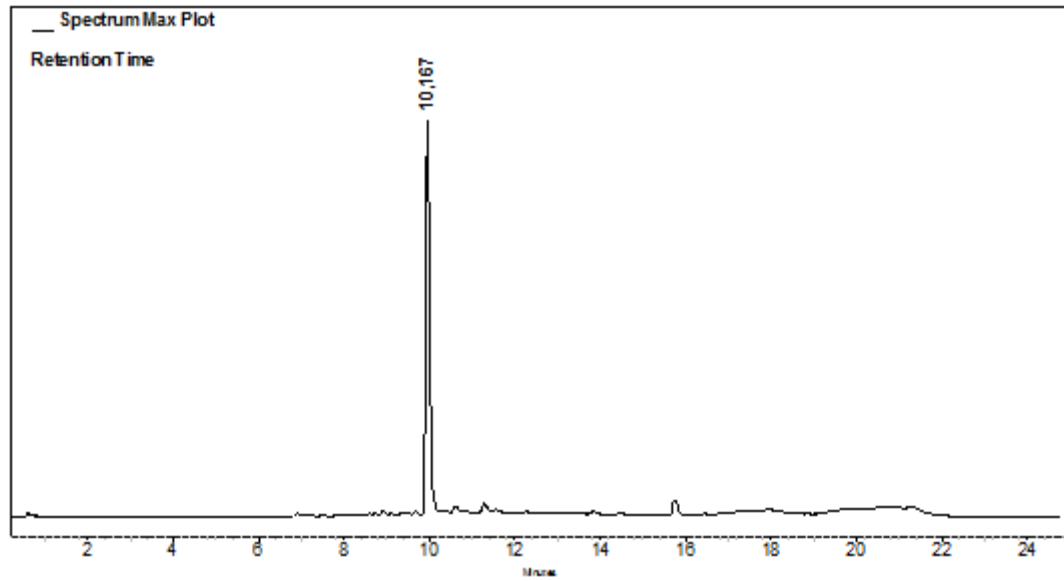
**d.**



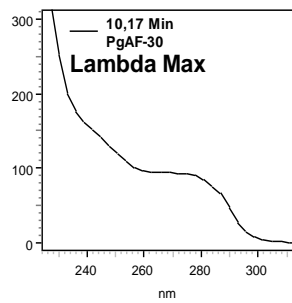


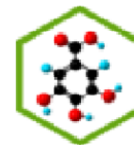
Anexo 17. a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F30+31, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,17 min).

a.



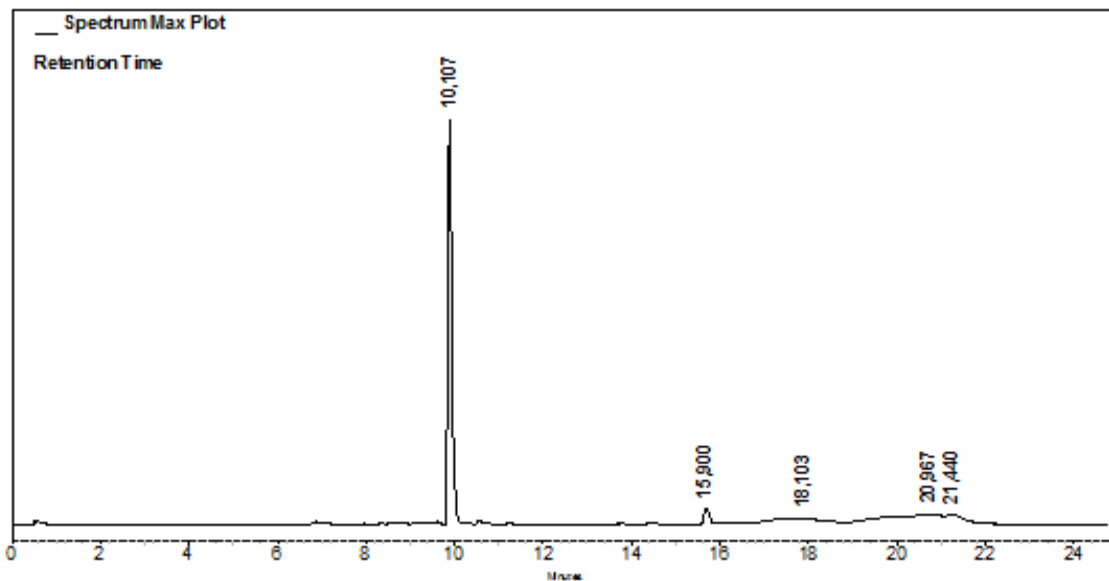
b.



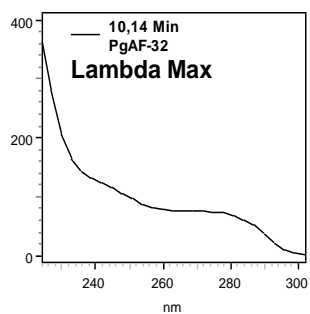


**Anexo 18. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F32-34, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,14 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  15,89 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  14,86 min).

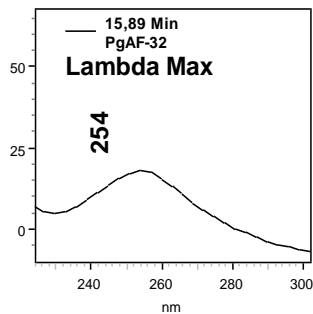
**a.**



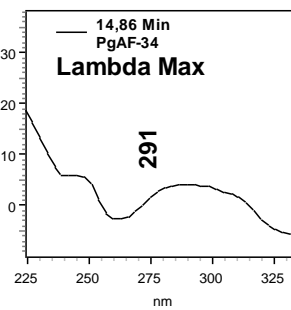
**b.**

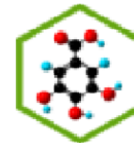


**c.**



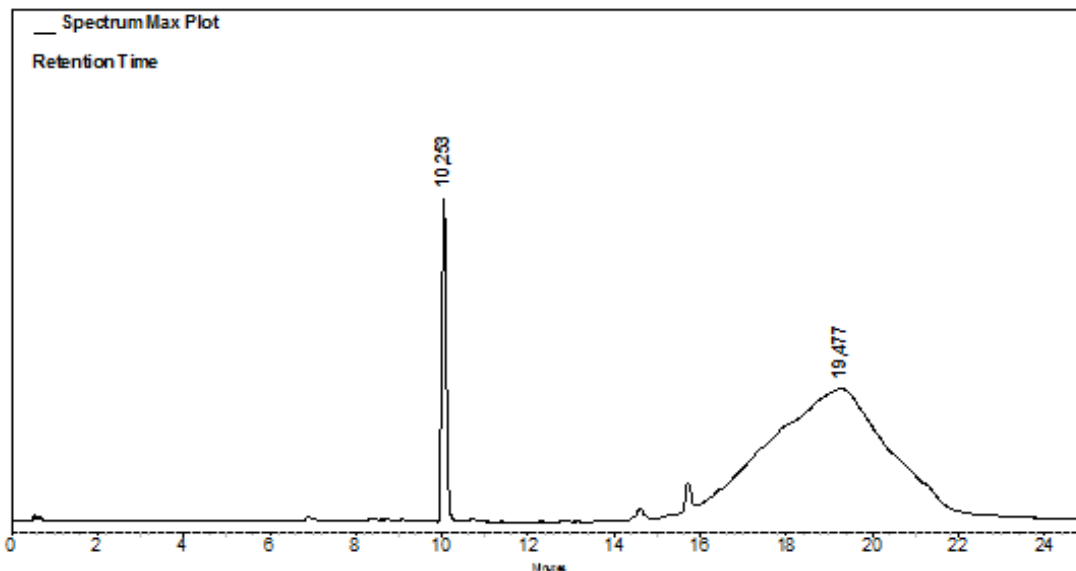
**d.**



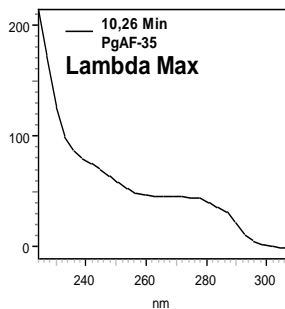


Anexo 19. a. Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F35, b. Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,26 min), c. Espectro UV del pico con ( $t_R$  15,93 min).

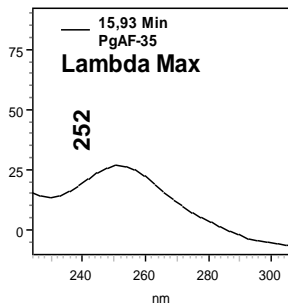
a.

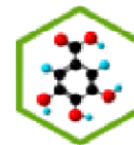


b.



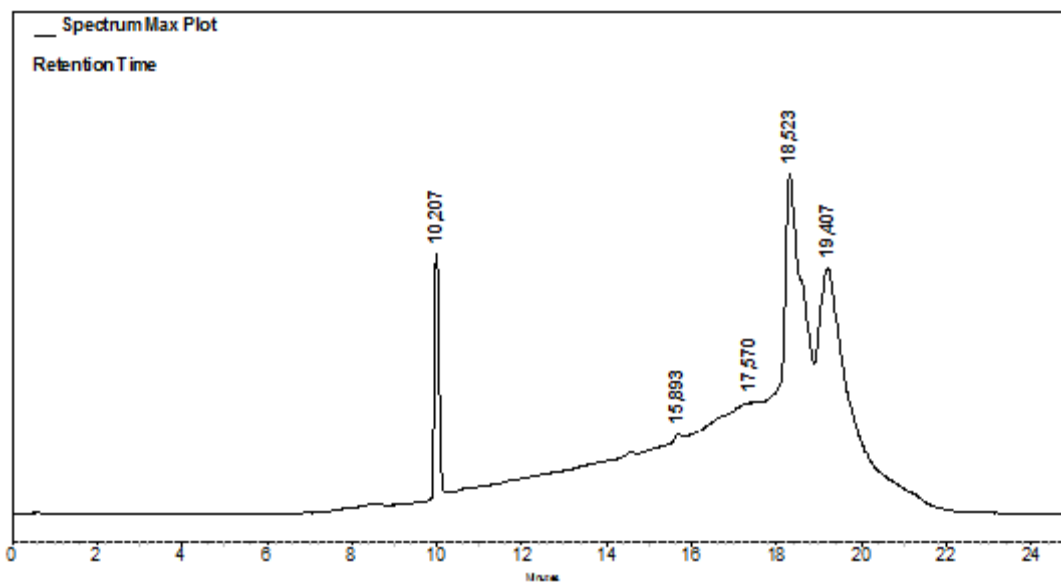
c.



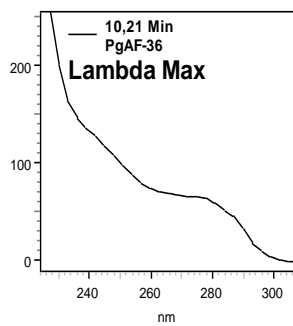


**Anexo 20. a.** Cromatograma de las fracciones reunidas PgAcu-F36-44, **b.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  10,21 min), **c.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  18,53 min), **d.** Espectro UV del pico con ( $t_R$  19,42 min).

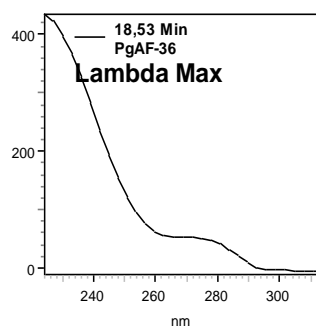
**a.**



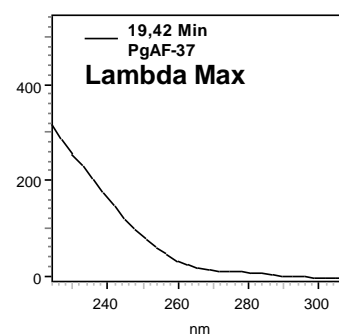
**b.**

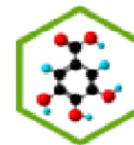


**c.**



**d.**





### Anexo 21. Resultados obtenidos para el antibiograma.

#### A. Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración Antibiotico	500 µg/mL		250 µg/mL		100 µg/mL	
	1	2	1	2	1	2
AmoxPozo 1	25	25	24	24	0	0
Amp anhPozo 2	22	24	18	22	15	20
BlancoPozo 3	0	0	0	0	0	0
Amp NaPozo 4	20	24	22	20	15	18
TrimPozo 5	0	0	0	0	0	0

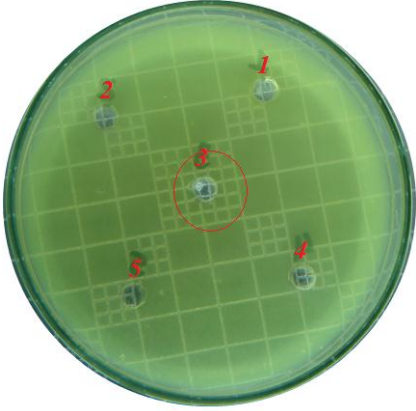
#### B. Antibiograma para *Staphylococcus aureus*.

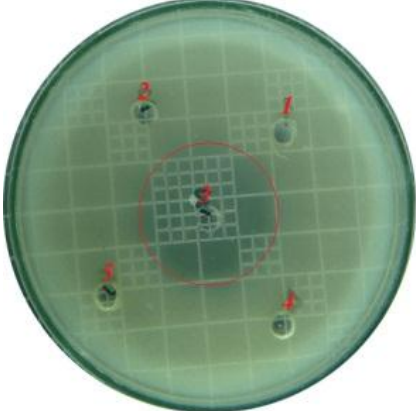
Concentración Antibiotico	500 µg/mL		250 µg/mL		100 µg/mL	
	1	2	1	2	1	2
AmoxPozo 1	20	20	20	20	0	0
Amp anh Pozo 2	26	24	22	24	22	22
BlancoPozo 3	0	0	0	0	0	0
Amp Na Pozo 4	24	24	24	24	22	22
TrimPozo 5	28	28	24	24	22	20

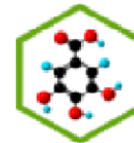
#### C. Antibiograma para *Bacillus cereus*.


Concentración Antibiotico	500 µg/mL		250 µg/mL		100 µg/mL	
	1	2	1	2	1	2
AmoxPozo 1	14	12	12	11	0	0
Amp anhPozo 2	11	12	8	12	0	0
BlancoPozo 3	0	0	0	0	0	0
Amp NaPozo 4	12	12	10	11	0	0
TrimPozo 5	0	0	0	0	0	0

### Anexo 22. Resultados de la determinación de la actividad antibacterial.

A. Resultados de obtenidos de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>P. aeruginosa</i> .							B. Placa de Petri con ensayo de inhibición de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>P. aeruginosa</i> . 1. PgAcOet, 2. PgDiClmet, 3. Amp Na, 4. PgHex, 5. PgMeOH.						
Extracto \ Concentración	4000 µg/mL			2000 µg/mL									
	1	2	3	1	2	3							
PgMeOH	0	0	0	0	0	0							
PgAcu	0	0	0	0	0	0							
PgDiClmet	0	0	0	0	0	0							
PgAcOet	0	0	0	0	0	0							
PgHex	0	0	0	0	0	0							
CONTROL PARA LOS ENSAYOS													
Amp Na 100 µg/mL	18	18	20	32	22	24							

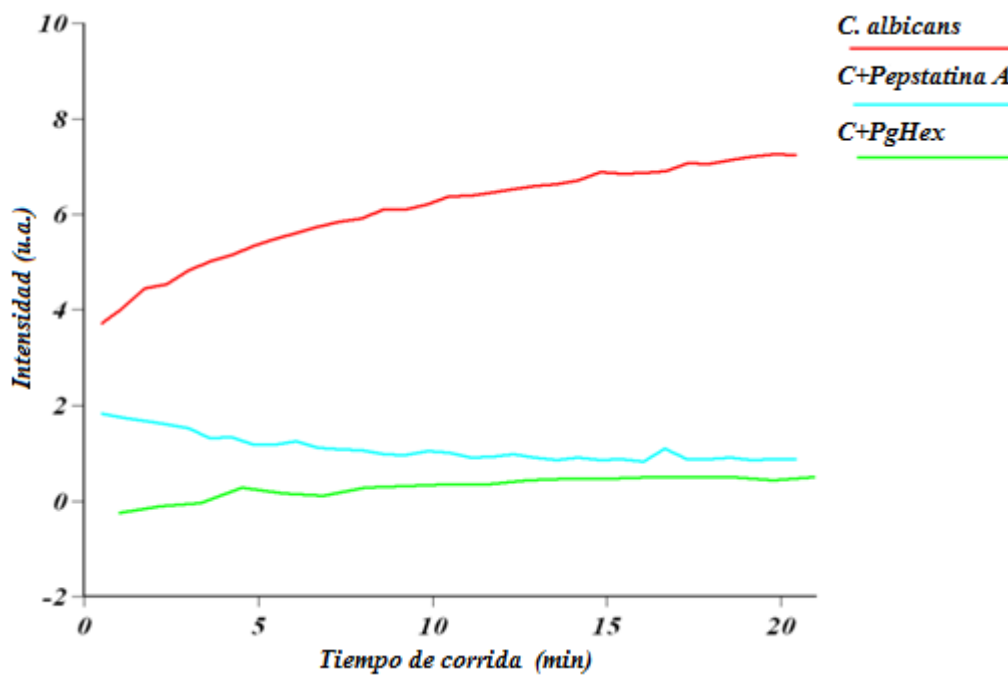
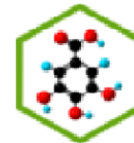
C. Resultados obtenidos de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>S. aureus</i> .							D. Placa de Petri con ensayo de inhibición de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>S. aureus</i> . 1. PgAcOet, 2. PgDiClmet, 3. Amp-anh, 4. PgHex-F, 5. PgMeOH.						
Extracto \ Concentración	4000 µg/mL			2000 µg/mL									
	1	2	3	1	2	3							
PgMeOH	0	0	0	0	0	0							
PgAcu	0	0	0	0	0	0							
PgDiClmet	0	0	0	0	0	0							
PgAcOet	0	0	0	0	0	0							
PgHex	0	0	0	0	0	0							
CONTROL PARA LOS ENSAYOS													
Amp Anh 100 µg/mL	36	34	36	32	30	32							



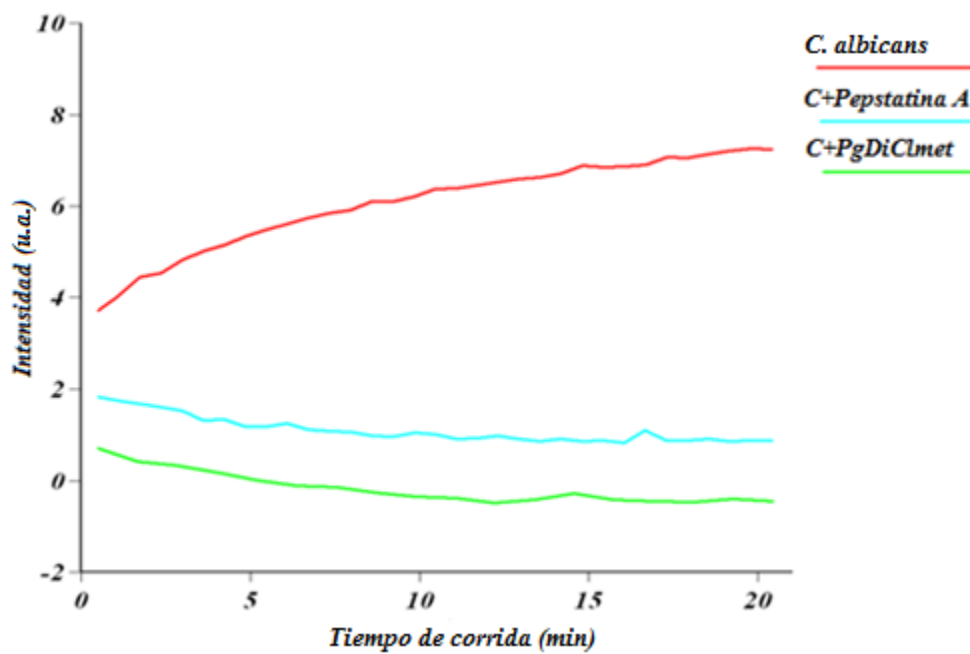
E. Resultados de obtenidos de los extractos de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>B. cereus</i> .							F. Placa de Petri con ensayo de inhibición de <i>Palicourea guianensis</i> contra <i>B. cereus</i> . 1. PgAcOet, 2. PgDiClmet, 3. Amp Na, 4. PgHex, 5. PgMeOH.						
Extracto \ Concentración	4000 µg/mL			2000 µg/mL									
	1	2	3	1	2	3							
PgMeOH	0	0	0	0	0	0							
PgAcu	0	0	0	0	0	0							
PgDiClmet	0	0	0	0	0	0							
PgAcOet	0	0	0	0	0	0							
PgHex	0	0	0	0	0	0							
<b>CONTROL PARA LOS ENSAYOS</b>													
Amp Na 250 µg/mL	14	12	14	16	14	14							

**Anexo 23.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgHex.

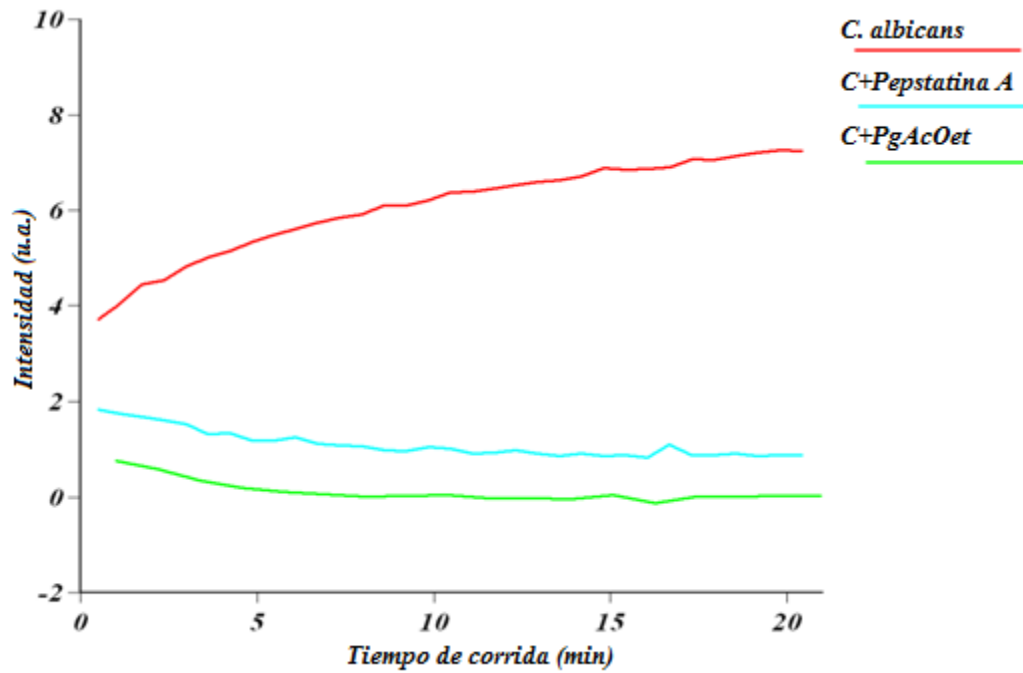




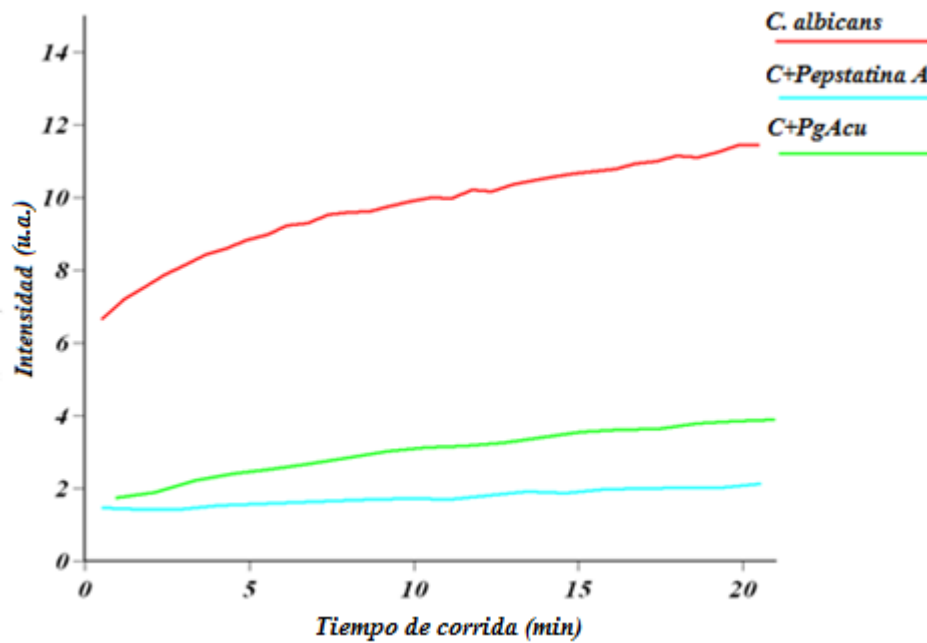
Anexo 24. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgDiClmet.



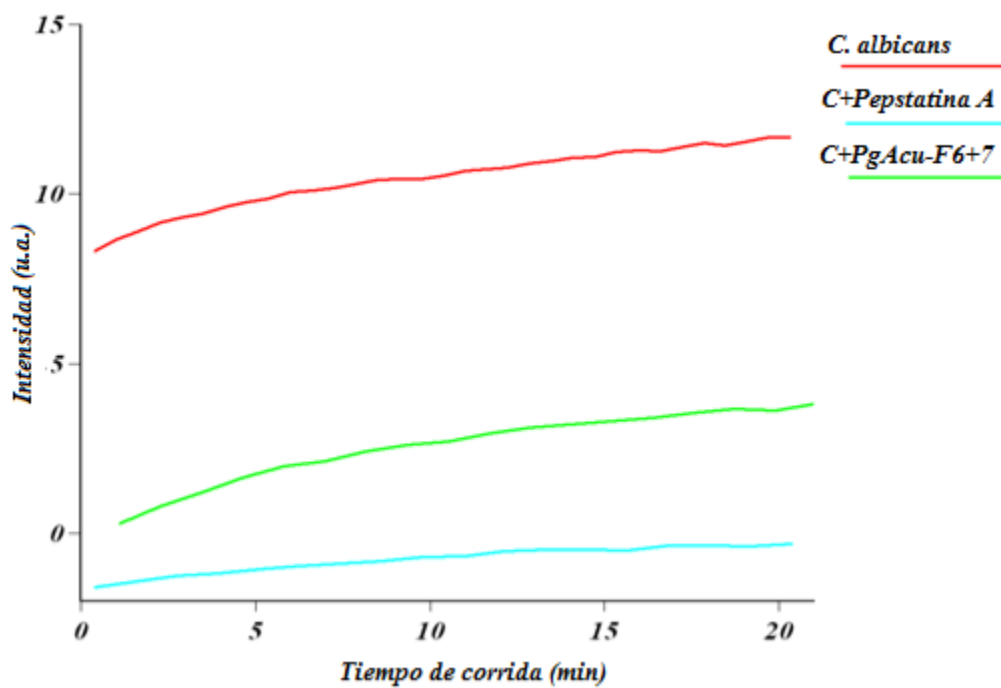
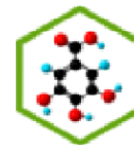
Anexo 25. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcOet.



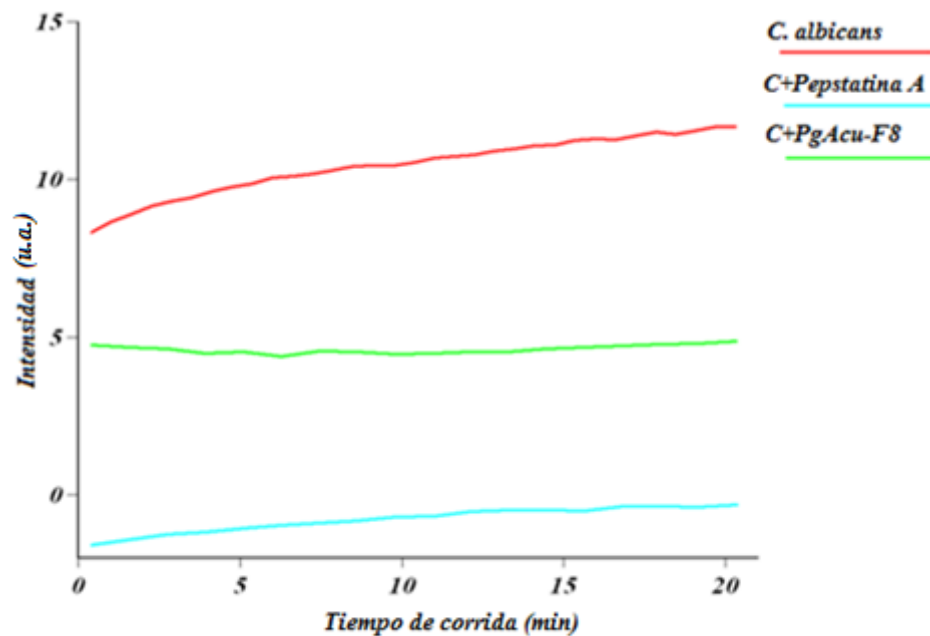
Anexo 26. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu.



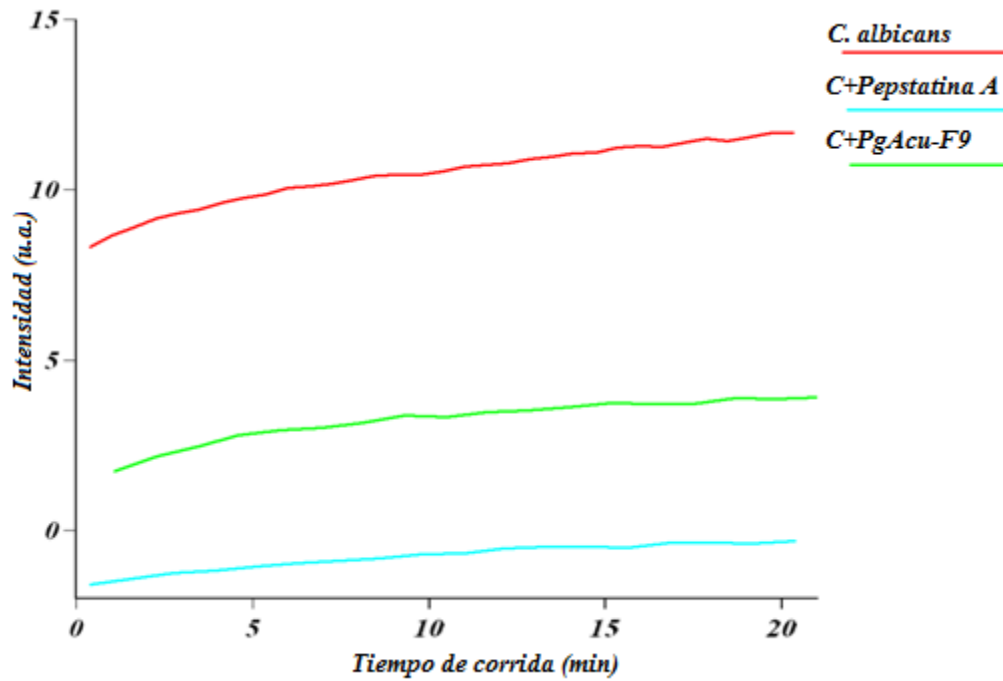
Anexo 27. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F6+7.



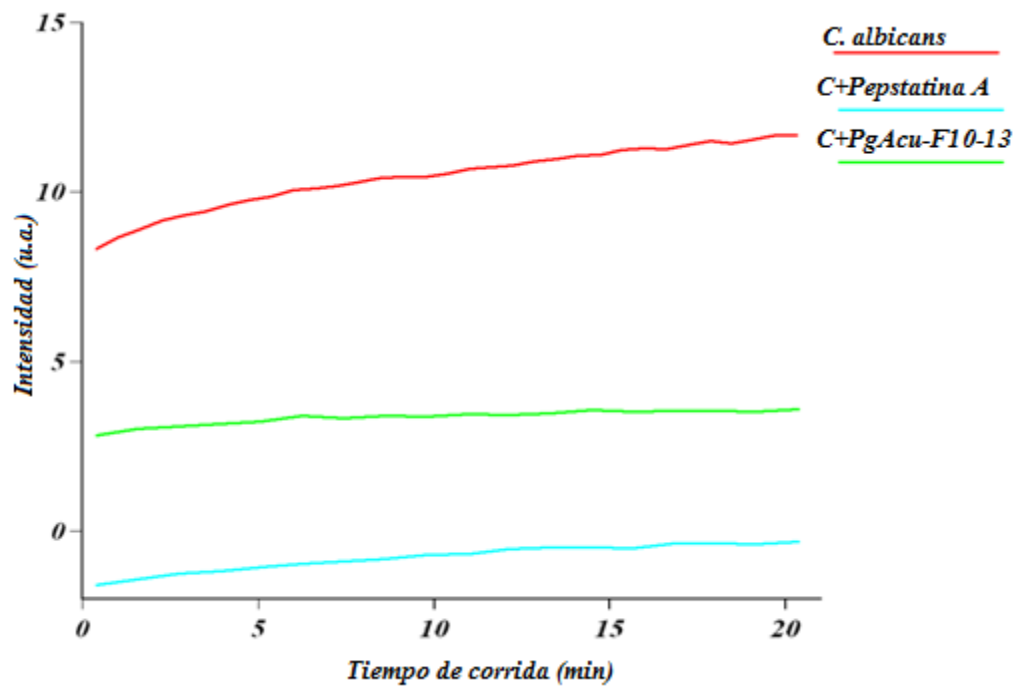
**Anexo 28.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F8.



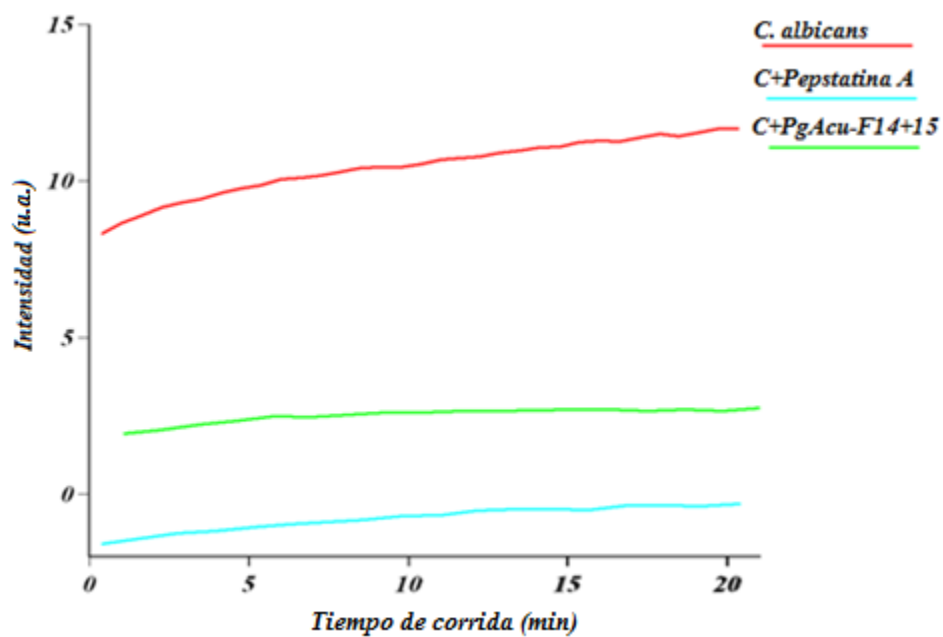
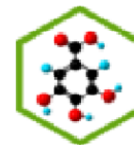
**Anexo 29.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F9.



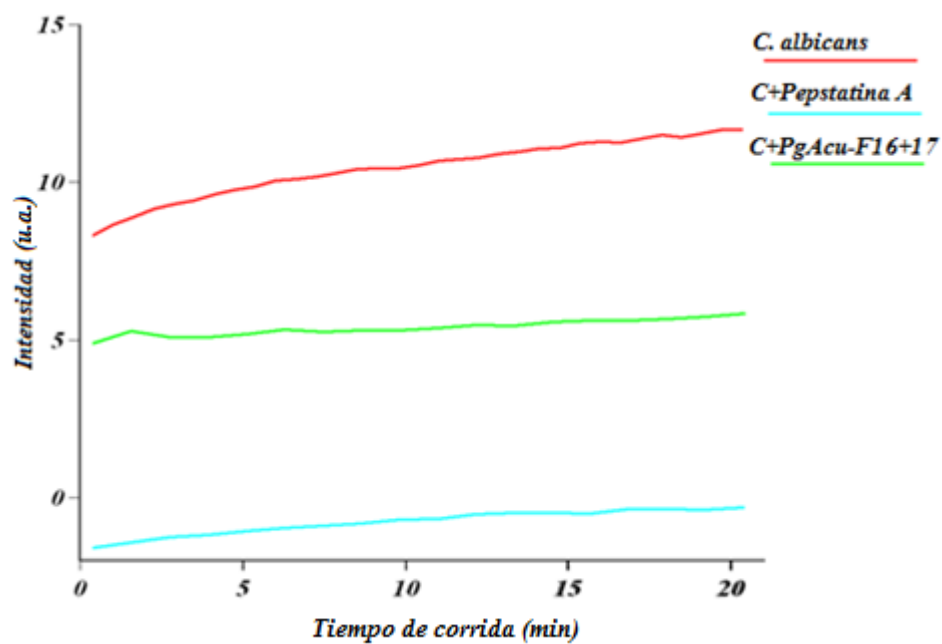
Anexo 30. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F10-13.



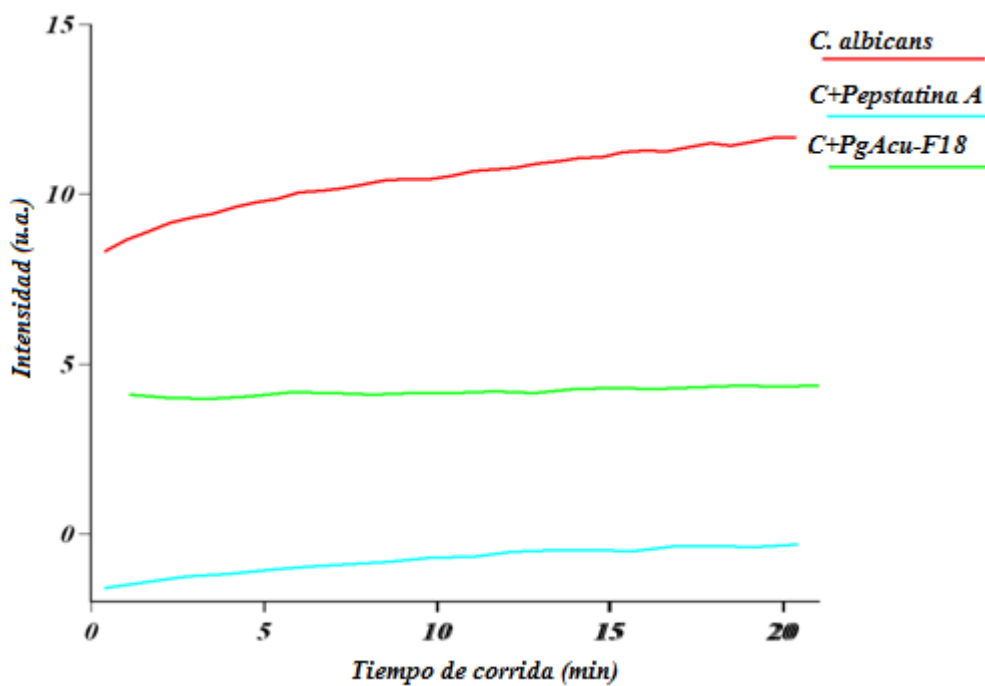
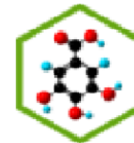
Anexo 31. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F14+15.



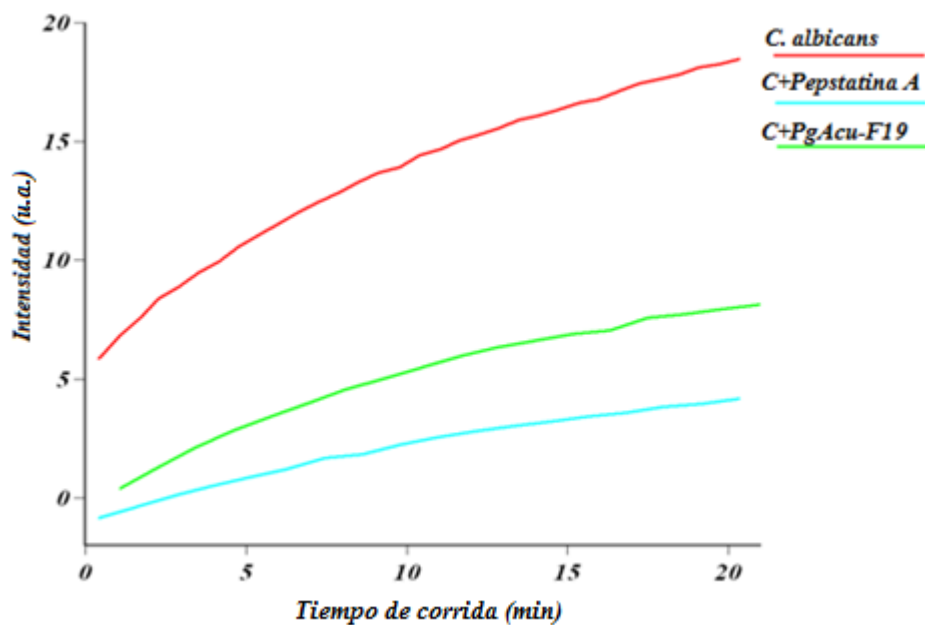
**Anexo 32.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F16+17.



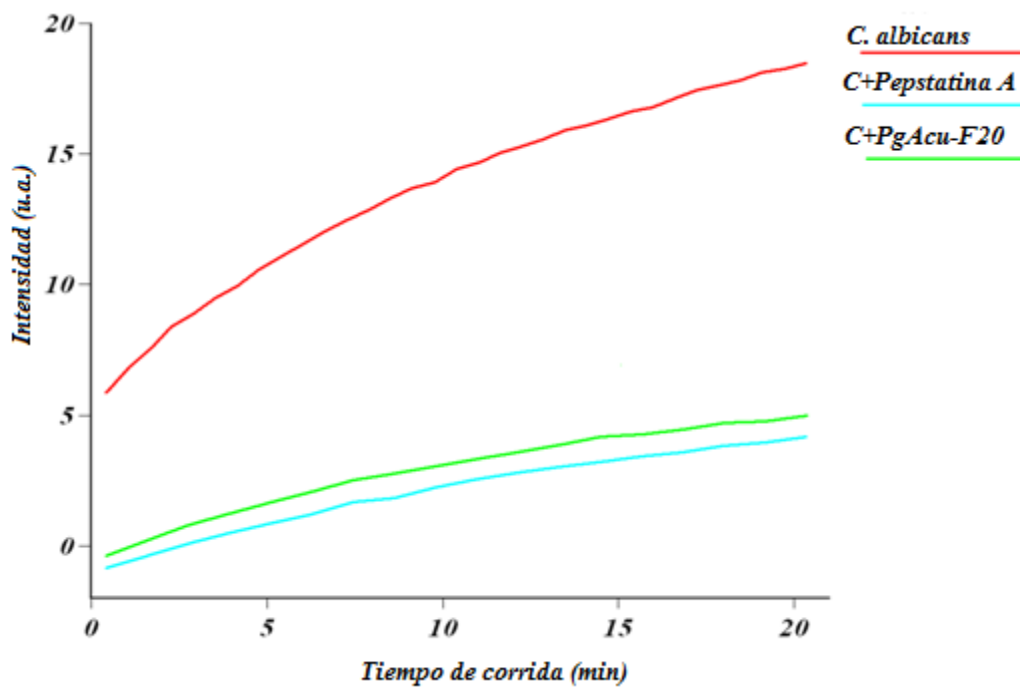
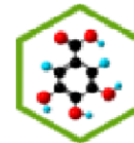
**Anexo 33.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F18.



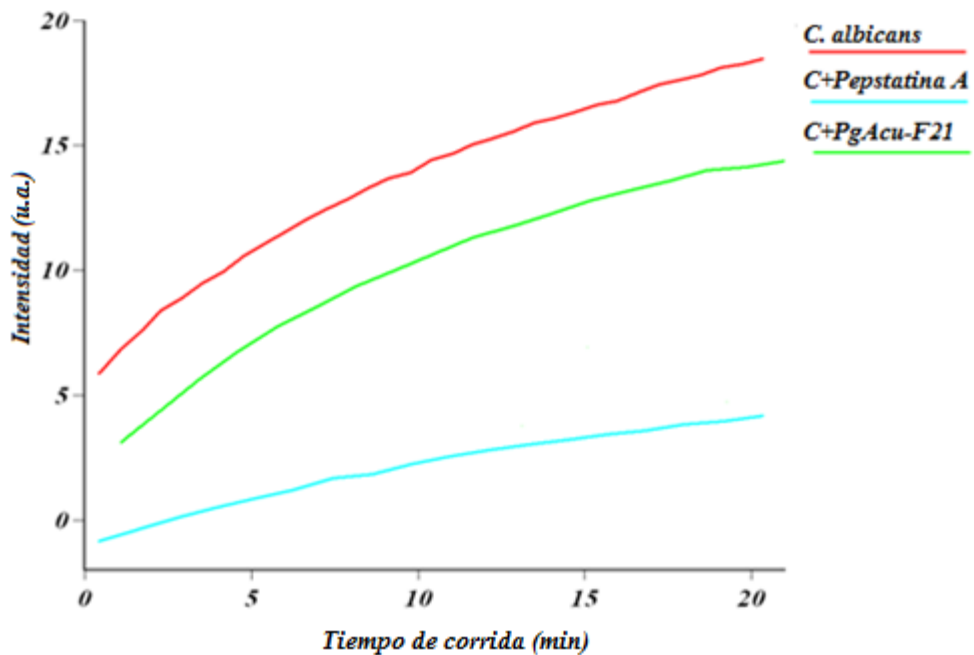
**Anexo 34.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F19.



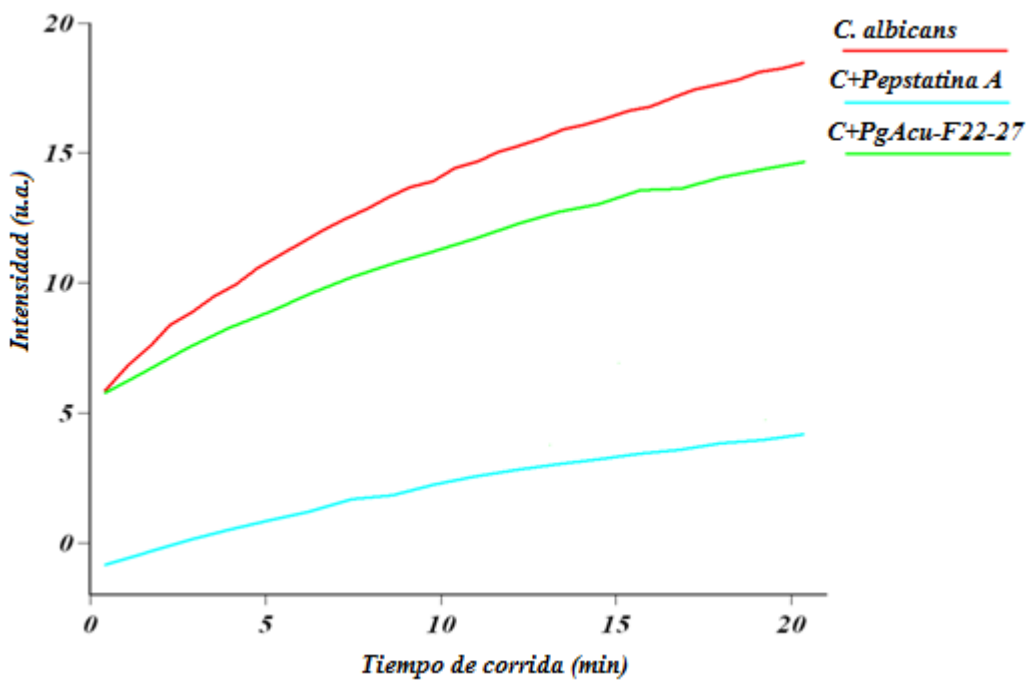
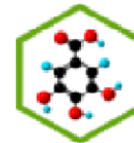
**Anexo 35.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F20.



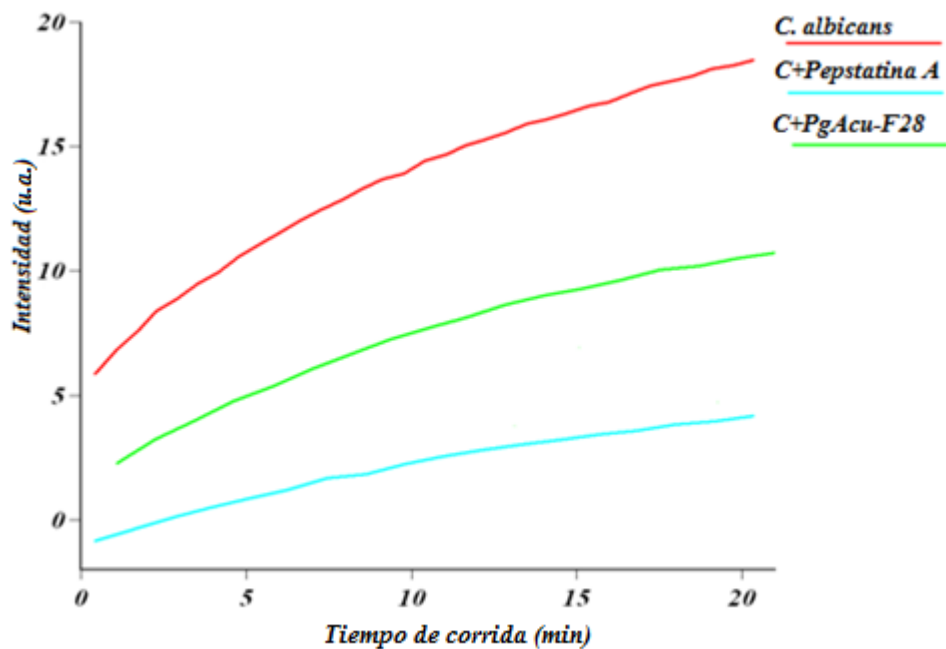
Anexo 36. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F21.



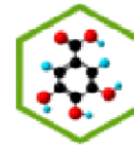
Anexo 37. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F22-27.



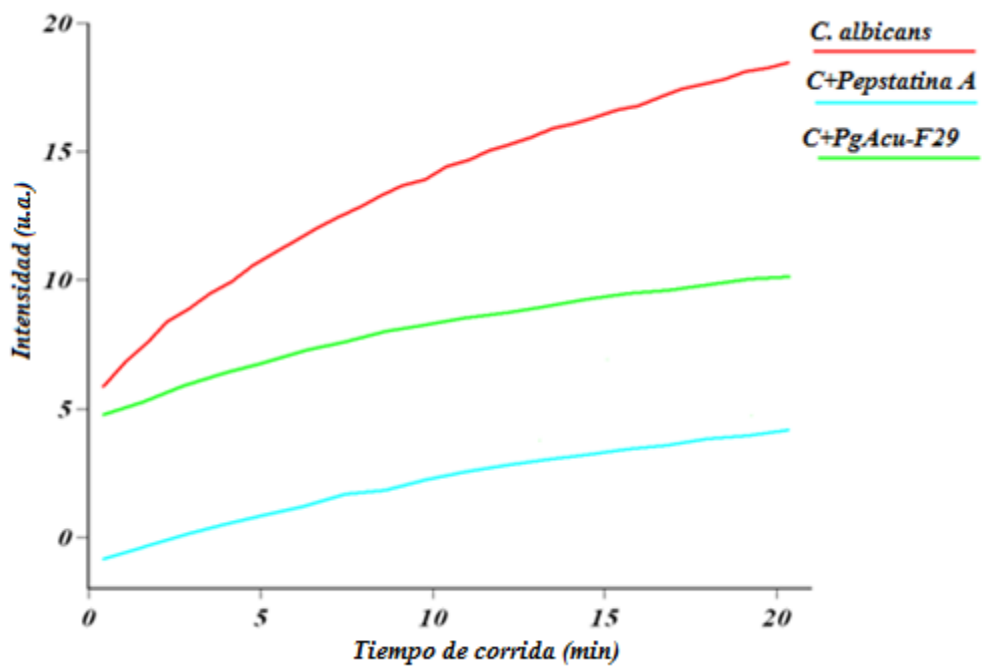
Anexo 38. Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F28.



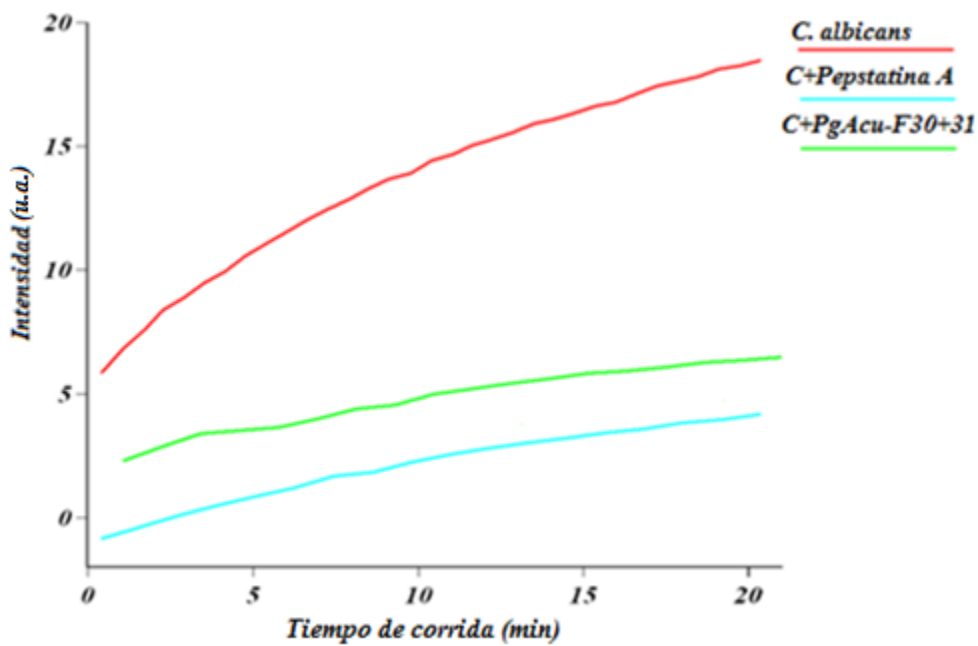




**Anexo 39.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F29.

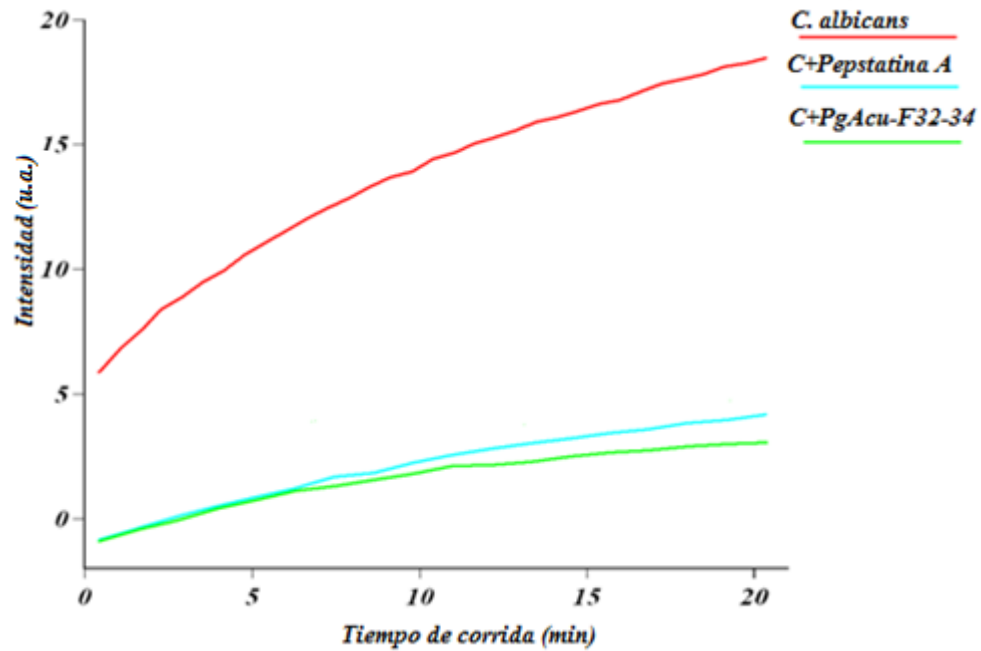


**Anexo 40.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F30+31.

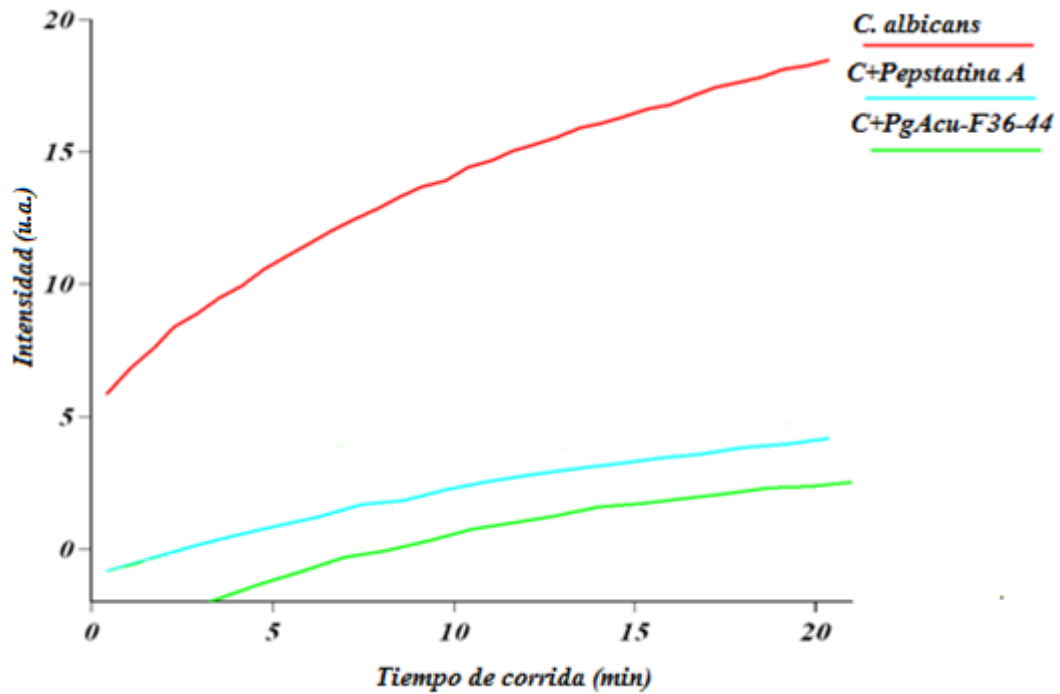


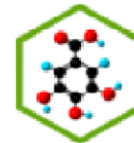


**Anexo 41.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F32-34.



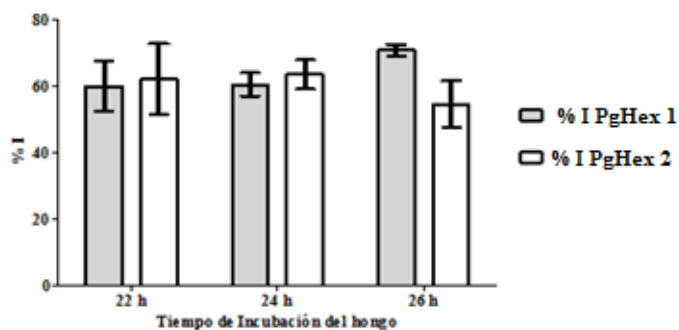
**Anexo 42.** Medición fluorimétrica de la capacidad antiSAP de PgAcu-F36-44.





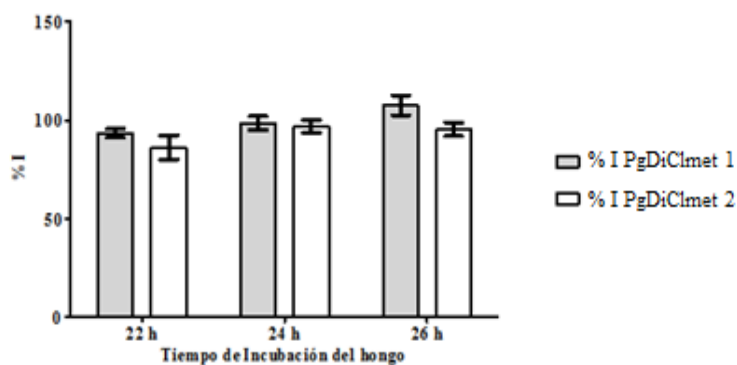
### Anexo 43. Datos estadísticos para análisis ANOVA para la técnica fluorimétrica.

A. PgHex	% I PgHex 1			% I PgHex 2		
	Horas de incubación	Promedio	SD	% CV	Promedio	SD
22 h	59,85	13,18	22,02	62,01	18,36	29,61
24 h	60,33	6,08	10,08	63,34	7,67	12,10
26 h	70,72	3,11	4,39	54,49	12,16	22,32
Promedio general por ensayos*	63,63%			59,95		

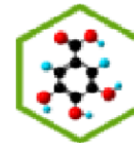


### B. Histograma de los datos estadísticos de PgHex.

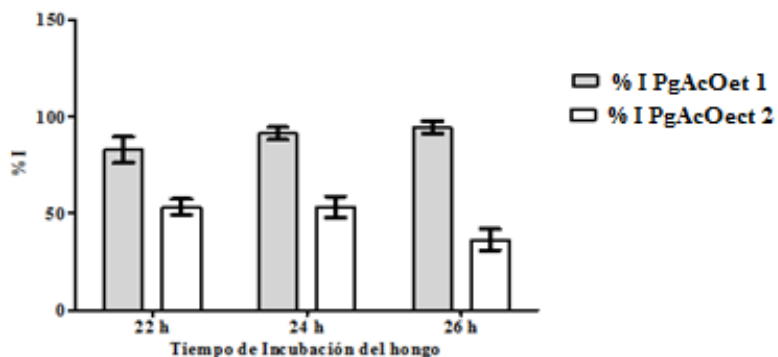
C. PgDiClmet	% I PgDiClmet 1			% I PgDiClmet 2		
	Horas de incubación	Promedio	SD	% CV	Promedio	SD
22 h	93,39	3,84	4,11	86,02	10,62	12,35
24 h	98,54	5,98	6,06	96,76	5,70	5,89
26 h	107,56	8,79	8,17	95,27	6,13	6,43
Promedio general por ensayos*	99,83			92,68		



### D. Histograma de los datos estadísticos de PgDiClmet.

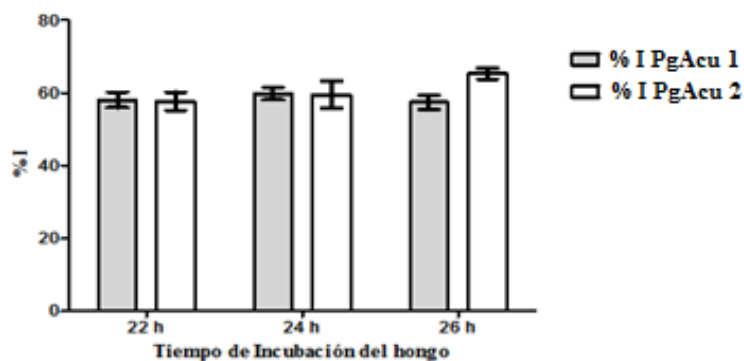


E. PgAcOet	% I PgAcOet 1			% I PgAcOet 2		
	Horas de incubación	Promedio	SD	% CV	Promedio	SD
22 h	82,81	11,53	13,92	53,18	7,24	13,61
24 h	91,27	5,62	6,16	53,25	9,51	17,86
26 h	94,37	5,56	5,89	36,34	9,74	26,81
<b>Promedio general por ensayos*</b>	89,48			47,59		

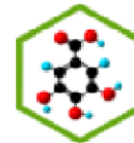


F. Histograma de los datos estadísticos de PgAcOet.

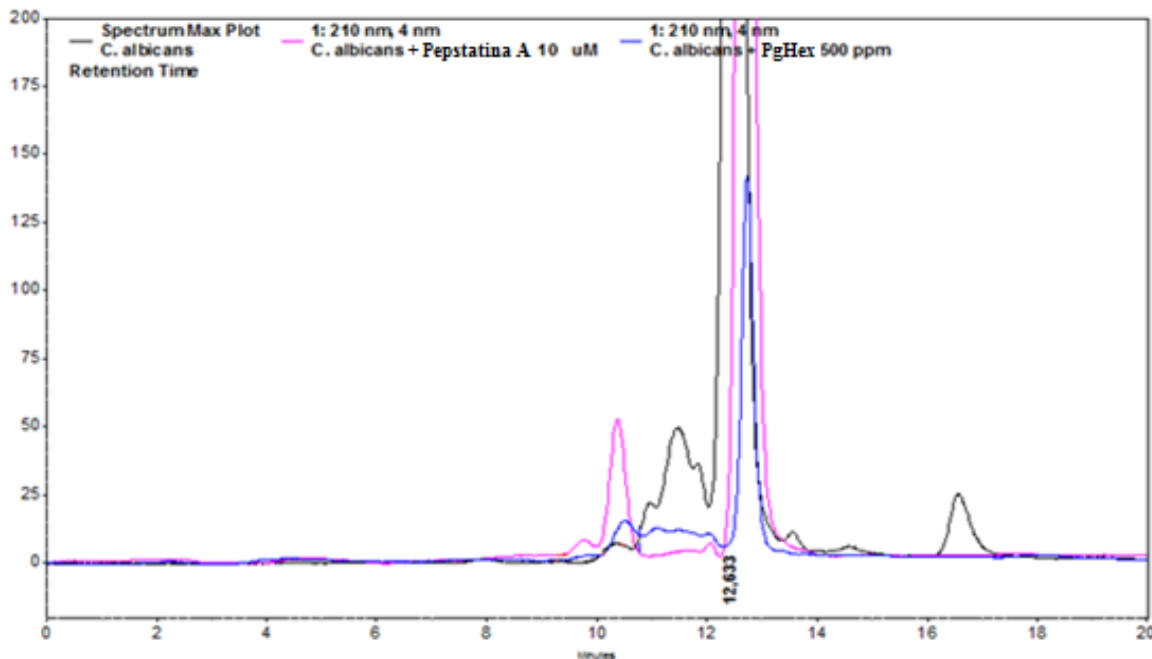
G. PgAcu	% I PgAcu 1			% I PgAcu 2		
	Horas de incubación	Promedio	SD	% CV	Promedio	SD
22 h	58,10	3,65	6,29	57,72	4,37	7,57
24 h	59,82	2,94	4,91	59,50	6,48	10,89
26 h	57,42	3,50	6,09	65,29	2,68	4,11
<b>Promedio general por ensayos*</b>	58,45			60,84		



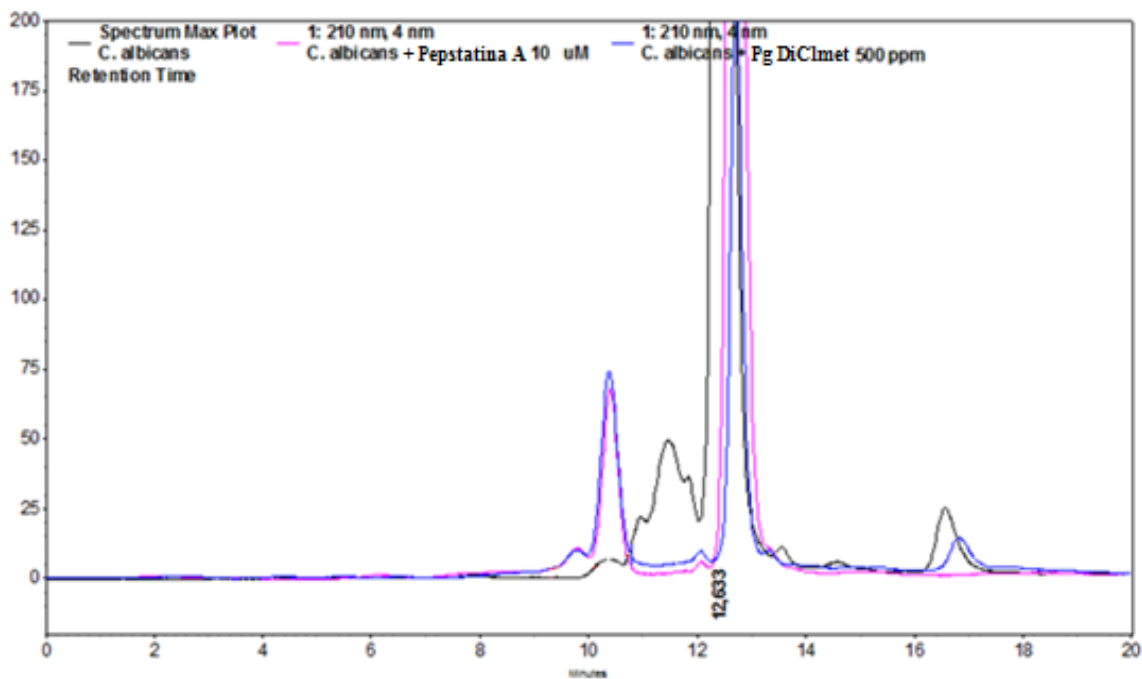
H. Histograma de los datos estadísticos de PgAcu.



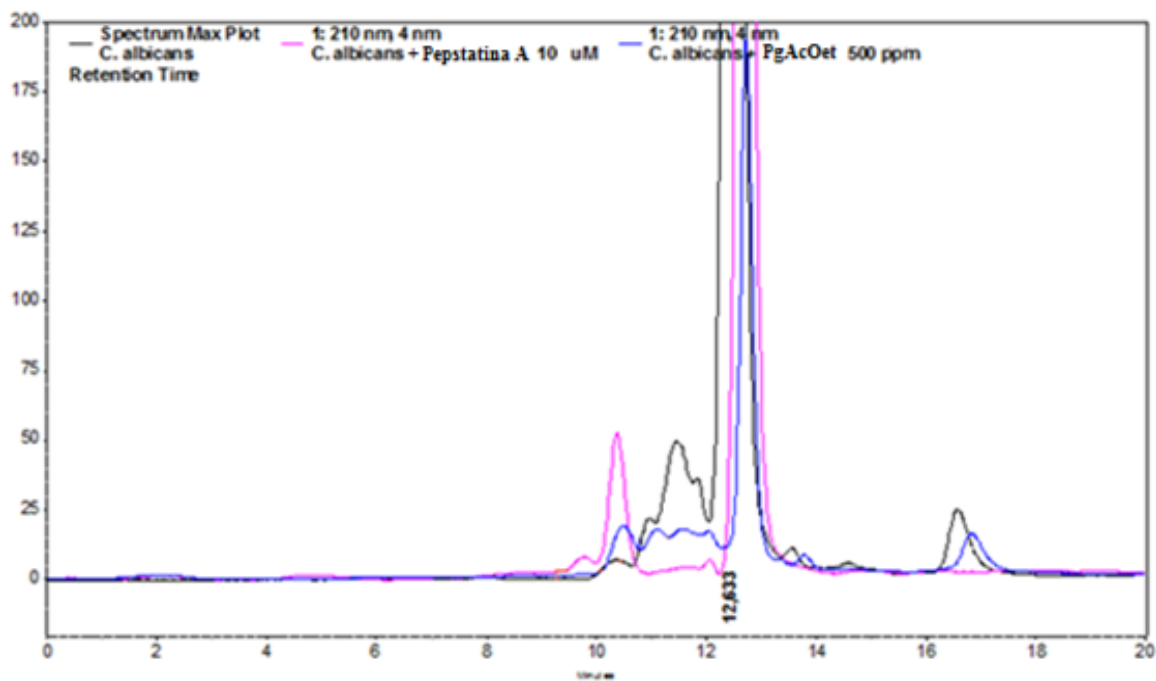
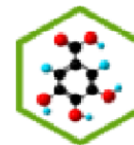
Anexo 44. Cromatogramas de HPLC para la determinación del porcentaje de inhibición de SAP.



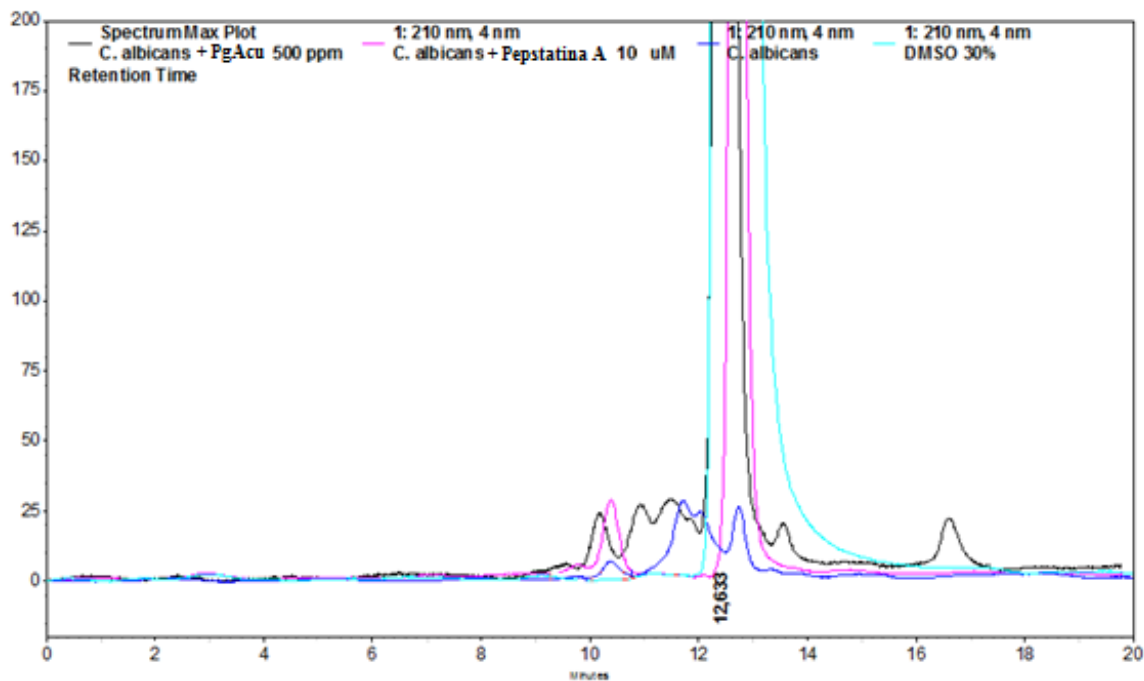
A. Cromatograma de SAP de *Candida albicans* + PgHex



B. Cromatograma de SAP de *Candida albicans* + PgDiClmet



C. Cromatograma de SAP de *Candida albicans* + PgAcOet



D. Cromatograma de SAP de *Candida albicans* + PgAcu