

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Purificación de proteínas antimicrobianas de
moringa oleifera mediante extracción en fase sólida**

Por:

DANERY LILIAN CAMARGO GUTIERREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Purificación de proteínas antimicrobianas de *moringa oleifera*
mediante extracción en fase solida**

TESIS

Presentada por

DANERY LILIAN CAMARGO GUTIERREZ

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título profesional de

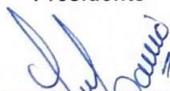
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Presidente



Q.F.B. María del Carmen Julia García

Vocal



Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón

Vocal



Dr. Alberto Antonio Neira Velma

Vocal



Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Purificación de proteínas antimicrobianas de *moringa oleifera*
mediante extracción en fase solida**

TESIS

Presentada por

DANERY LILIAN CAMARGO GUTIERREZ

Y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener
el título profesional de

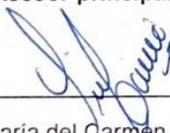
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité



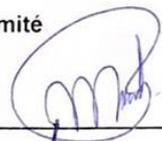
Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón

Asesor principal



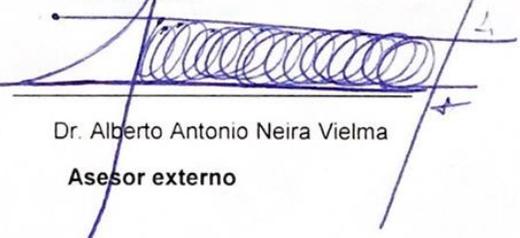
Q.F.B. María del Carmen Julia García

Co-asesor



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Co-asesor



Dr. Alberto Antonio Neira Vielma

Asesor externo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la sabiduría, fortaleza y cariño porque gracias a ello he logrado alcanzar esta meta tan importante en mi vida.

A mi madre Sra. Elodia Camargo por todo su amor, apoyo tanto como físico como emocional hacia mi persona, por ser una guerrera y la muestra viva de que una mamá soltera puede sacar a delante a sus hijos. Eres parte de mis triunfos y fracasos, por siempre darme ánimos para seguir en los momentos más difíciles, gracias mamá por tu esfuerzo y dedicación día a día, hoy todo lo que soy te lo debo a ti.

A mi papá Sr. Andres Camargo, por todo su cariño, sabios consejos y todo su apoyo, que me han servido para ser una buena persona, gracias por ser una de mis motivaciones para seguir día con día y ser mejor.

A mi mamá Gloria León, por sus consejos, por darme todo su cariño y amor de madre y por siempre darme ánimos de seguir por sus regaños que me han forjado para ser la mujer que soy.

A mi abuelo (papá) Sr. Quintín Camargo por el apoyo durante la carrera.

A mi abuela Sr. Irene por el cariño y apoyo brindado.

A mis hermanos, Luis Ángel, Andres, Marisol y Lucero, por haberme dado su apoyo incondicional en los momentos que más necesite, por ser los soportes de mi vida, por enseñarme a ser fuerte en todos los momentos de la vida.

A mis hermanos que se adelantaron Oscar Camargo (+) y Gerardo Camargo (+) por haberme dado todo su cariño y amor en vida. Por siempre tener palabras de apoyo y siempre hacerme sonreír. El término de este sueño llamado carrera profesional también es suyo.

A las personas que han fungido como una figura paterna para mí, mis tíos Ángel W. y Fernando M. gracias por los consejos y apoyo y por creer en mi para lograr esto que significa mucho para mí.

A mis tías Dulce, Griselda e Hilda por el apoyo y sabios consejos sobre todo por el cariño que me tienen.

A mis tíos Tía Lucina, Tío Fernando, Tío Toño, Tía Eugenia, Tía Alicia, Tía Imelda, Tía Eva, Tía Sonia, Tío Javier, Tío Ernesto (+) por el apoyo y la motivación durante toda la carrera.

A la Dra. Sonia Ramírez Barrón por ser una guía durante este trabajo de investigación experimental, y por haber confiado en mí.

A el Dr. Mario Cruz por el apoyo brindado para la realización de este trabajo gracias por el apoyo y los consejos.

Estoy agradecida con el Departamento de Ciencias Básicas, Q.F.B. Carmen Julia García, M.C. Carlos Alberto García, QF. Luis Carlos Olvera Ríos por el apoyo en la obtención de extractos a partir de moringa y determinación de proteínas.

Agradezco a Dios por los amigos que me brindo en estos cuatro años y medio: Ali por su cariño y amistad sincera por los buenos consejos y sobre todo por la buena amistad gracias por enseñarme que tan madura soy. A luz por ser una gran compañera y excelente ser humano, gracias por enseñarme a ser más responsable. A Lucero por el cariño y por ser una gran amiga sincera y verdadera. A Antonia por su buena amistad y buenos consejos. A Antonio (toni) por los consejos y el apoyo durante toda la carrera gracias por tu amistad tan sincera. A Jorge por el cariño y estimo así mismo por el buen apoyo.

A mis amigos Luis G, Mario Lopez, Marco S, Mario Escamilla gracias por el apoyo los buenos consejos y siempre motivarme a estar bien gracias por haberme visto en los peores momentos y quedarse siempre.

En especial a mi **ALMA TERRA MATER UAAAN** por acogerme este tiempo y darme las herramientas necesarias para poderme defender fuera y demostrar que los "Buitres" podemos. Gracias por acompañarme en mis momentos felices y tristes y aun cuando sentía que no podía seguir me dabas motivación al pasar por el arco todos los días me llenaba de inspiración para seguir aprendiendo de todo lo bueno que nos tienes por ofrecer. Te agradezco por las amistades que se quedan para toda la vida por el comedor que nos ofreces, transporte y dormitorios. Solo me queda decirte gracias por todo.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme dar un paso más en la vida, en compañía de mis seres queridos.

A MI MADRE

A mi madre Elodia Camargo por el apoyo moral y económico en toda mi formación académica.

A MIS HERMANOS

Por su motivación y apoyo en todo momento de mi vida como estudiante, y en especial a mis dos ángeles que se nos adelantaron en esta carrera llamada vida.

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	III
1. Introducción.....	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo General.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. Justificación.....	3
4. Antecedentes	4
4.1. <i>Moringa oleífera</i>	4
4.1.1. EL árbol de Moringa Oleífera: Descripción Morfológica	4
4.1.2. Taxonomía.....	5
4.1.3. Propiedades antimicrobianas de la <i>moringa oleífera</i>	6
4.1.4. Aplicaciones antimicrobianas de la moringa oleífera en alimentos.....	7
4.1.5. Proteínas antimicrobianas de la <i>M. oleífera</i>	8
4.1.5. Microorganismos Patógenos	9
Características generales de <i>Salmonella ssp.c</i>	9
4.2. Métodos de concentración de proteínas	10
4.2.1. Cromatografía de absorcion en columna (CC)	10
4.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)	12
5. Metodología.....	14
5.1. Localización del estudio.....	14
5.2. Obtención de extractos antimicrobianos a partir de moringa oleífera	14
5.2.1. Determinación del contenido de proteínas mediante Bradford	15

5.3. Concentración de extractos antimicrobianos de moringa oleífera mediante extracción en fase sólida	17
5.6. Determinación del peso molecular mediante electroforesis (SDS PAGE)	21
6. Resultados.....	28
Cuantificación de proteínas mediante Bradford.....	28
Actividad antimicrobiana.....	30
Determinación del peso molecular por electroforesis (SDS-PAGE)	33
7 Conclusiones.....	36
8. Bibliografía.....	37
ANEXOS.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras de la especie vegetal <i>Moringa Oleifera</i>	6
Figura 2. <i>Salmonella ssp</i> al microscopio y en cultivo	9
Figura 3. <i>Staphylococcus aureus</i> al microscopio y en cultivo	10
Figura 4. esquema de una columna cromatografía.....	11
Figura 5. Método de acondicionamiento de SPE	13
Figura 6. SDS-PAGE de muestras de proteínas y marcador de proteína exposición de color (C1992).	23
Figura 7. Sistema de electroforesis vertical y de transferencia	23
Figura 6. Halos de inhibición bacteriana frente a <i>S. aureus</i> en la muestra M1	30
Figura 7. Halos de inhibición bacteriana frente <i>S. aureus</i> de la muestra M2	31
Figura 8. Marcador de gel de poliacrilamida en electroforesis vertical para obtención de proteínas en extractos acuosos de <i>Moringa Oleifera</i>	34
Figura 9. Esquema de posición de bandas de proteínas en muestra M1 F1R3.....	34

Índice de tablas

TABLA 1: propiedades descritas de <i>Moringa oleífera</i> en los diferentes estudios realizados en los últimos años.	7
Tabla 2. Material, equipos, reactivos y material botánico para la obtención de extractos de <i>Moringa Oleífera</i>	14
Tabla 3. Diseño de la matriz experimental.	15
Tabla 4. Materiales para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford	15
Tabla 5. Curva de calibración para el análisis de proteínas mediante Bradford	17
Tabla 6. Materiales para concentración de extractos mediante SPE	17
Tabla 7. Materiales requeridos en la determinación de actividad antimicrobiana	19
Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos iniciales para el proceso de electroforesis (SDS-PAGE) cámara vertical.	21
Tabla 9. Materiales para realizar el montaje del equipo	25
Tabla 10. Material para fijación y tinción de proteínas	26
Tabla 11. Medición de halos de inhibición en la muestra M1 frente a las cepas bacterianas <i>Salmonella ssp</i> , <i>Stapylococcus aureus</i>	31
Tabla 12. Medición de halos de inhibición en muestra M2 frente a las cepas bacterianas <i>Salmonella ssp</i> , <i>Stapylococcus aureus</i>	32
Tabla 13. Extractos con resistencia e inhibición a la sepa bacteriana <i>Stapylococcus aureus</i>	32
Tabla 14. Tabla aclaración de proteínas obtenidas por el método SDS-PAGE	35

Índice de graficas

Grafica 1. Determinación de proteínas en la muestra 1 mediante Bradford.....	28
Grafica 2. Determinación de proteínas en la muestra 2 mediante Bradford.....	29
Grafica 3. Determinación de proteínas en la muestra 3 mediante Bradford.....	30
Grafica 4. Determinación de proteínas en la muestra 4 mediante Bradford.....	30

Anexos

A.1.1 Buffer de corrida	39
A.1.2 solución de Acrylamide/bis-acrylamide solution al 30%.....	39
A.1.3 Solución de ácido clorhídrico	39
A.1.4 Buffer Tris 1,5 M pH = 8.8.....	39
A.1.5 Buffer Tris 0,5 M pH = 6.8.....	40
A.1.6 Solución fijadora	40
A.1.7 Solución de trabajo azul brillante de coomasie.....	40
A.1.8 Running buffer de electroforesis para proteínas 1X.....	40

1. Introducción

La proliferación de enfermedades causada por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; esto nos lleva al estudio de plantas en las cuales se han encontrado compuestos bioactivos para tal fin. Esta investigación se ha centrado básicamente en el estudio de la actividad antimicrobiana que presentan algunos péptidos o proteínas de esta especie vegetal frente a los microorganismos patógenos que afectan a la salud en los cuales tenemos a *salmonella ssp*, y *S. aureus*.

La *Moringa oleifera* es un árbol caducifolio, de crecimiento rápido, con raíces tuberosas y gruesas, hoja verde claro, de floración abundante, con frutos en cápsulas alargadas y colgantes y que contienen semillas oscuras. Se asocia a zonas tropicales y subtropicales, bastante resistente a la sequía, con una temperatura de crecimiento ideal de 25-35°C, aunque puede tolerar hasta los 48°C (Doménech-Asensi, G, *et al.* 2017.).

Moringa oleifera es una planta con innumerables propiedades nutritivas y terapéuticas de la cual se puede aprovechar todas sus partes (semillas, raíz, hojas, flores, vainas y frutos). Varios estudios demuestran las propiedades medicinales de la moringa como antioxidante, en enfermedades respiratorias, cardiovasculares, gastrointestinales, endocrinas, en el sistema nervioso central, en el sistema inmunológico y como antibacteriano, (Bonal *et al*, 2012). Reportes sobre composición química revelan la presencia de diferentes fotoquímicos como: glucosinolatos, isotiocintaos, flavonoides, antiocianinas, proantocianidinas y cinamatos. El alto contenido de vitaminas, minerales y otros fotoquímicos como vainilla, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ascorbatos, tocofenoles, β -sitosterol, moringina, moringinina y fitoestrogenos. Compuestos aislados de la planta como el isotiocinato de bencilo y el 4-(L- α -ramnopiranosilox) - glucosinolato de bencilo presentan actividad anticancerígena, hipotensiva y antibacteriana (Benavides, 2019).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Concentrar, caracterizar y evaluar la actividad antimicrobiana de diversos extractos proteicos de hojas de *moringa oleífera*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el método más adecuado para la extracción de biomoléculas antimicrobianas de *moringa oleífera*
- Determinar el contenido de proteínas mediante Bradford
- Concentrar los extractos antimicrobianos mediante extracción en fase sólida
- Determinar actividad antimicrobiana de los diferentes extractos
- Determinar el peso molecular de las proteínas antimicrobianas mediante electroforesis (SDS-PAGE)

3. Justificación

El motivo principal de este proyecto es determinar la mejor fuente de extracción de las proteínas antimicrobianas presentes en las hojas de *Moringa oleifera*, debido a sus agentes antimicrobianos presentes en diferentes partes de su estructura. Las investigaciones en *Moringa Oleifera* han ido incrementado en los últimos años debido a la importancia nutricional, a su poder oxidante y por el sobresaliente contenido de proteínas, minerales y vitaminas.

Los extractos de plantas han constituido por mucho tiempo una fuente natural de compuestos antimicrobianos, los cuales son usados en matrices alimentarias resultando en una mayor vida útil en alimentos procesados, (Amenour *et al.* 2010).

La frecuencia de infecciones potencial mente mortales causadas por microorganismos patógenos ha aumentado en todo el mundo y se está convirtiendo en una importante causa de morbilidad y mortalidad. La creciente prevalencia de cepas multirresistentes de bacterias y la aparición reciente de cepas con susceptibilidad reducida a los antibióticos aumento el espectro de las infecciones bacterianas “intratables” y añade urgencia a la búsqueda de nuevas estrategias de lucha contra las diferentes infecciones (Rohman,2009).

4. Antecedentes

4.1. *Moringa oleífera*

La moringa es un género de arbustos y árboles con múltiples usos: sus hojas, raíces y vainas no maduras se consumen como hortalizas. Todas las partes de moringa – corteza, hojas, vainas, nueces, semillas, tubérculos, raíces y flores – son comestibles (FAO, 2019).

Moringa Oleífera es la especie más conocida del género moringa. Es un árbol originario del sur del Himalaya, el noreste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Se encuentran diseminado en una gran parte del planeta, y en América central fue introducida en los años 1920 como planta ornamental y para cercas vivas (Foidl *et al*, 1999).

4.1.1. EL árbol de Moringa Oleífera: Descripción Morfológica

Moringa oleífera es una especie alcanza de 8 – 12 m de altura y de 20 – 40 cm de diámetro, con una copa abierta tipo paraguas y poco densa, ramas colgantes quebradizas, Aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo, además de protegerlo de factores externos como la erosión, la desecación y las altas temperaturas (José M. *et al*. 2015).

- Las hojas son compuestas de unos 20 cm de largo con hojuelas delgadas oblongas u ovaladas de 1 a 2 cm. De largo de color verde claro.
- Las flores son bisexuales, con pétalos de color crema y estambres amarillos, muy numerosos fragantes, son polinizadas por abejas, otros insectos y algunas aves.
- Los frutos en capsulas tribuladas, dehiscentes, de 20 a 40 cm de longitud. Contienen de 12 a 25 semillas por fruto. Las semillas son de forma redonda y color castaño oscuro, con tres alas blanquecinas. Cada árbol puede producir de

15,000 a 25,000 semillas por año. Las vainas maduras permanecen en el árbol por varios meses antes de partirse y de liberar las semillas, las cuales son dispersadas por el viento, agua y probablemente animales.

- Las semillas son carnosas cubiertas por una cascara fina de color café. Poseen tres alas o semillas aladas de 2,5 a 3 mm de largo. Al quitar la cascara se obtiene el endospermo que es blanquecino y muy oleaginoso. Cuando se almacenan las semillas por más de dos meses disminuye su poder germinativo.
- La raíz principal mide varios metros y es carnosa en forma de rábano. Es pivotante y globosa lo que le brinda a la planta cierta resistencia a la sequía en periodos prolongados. Si se le hacen cortes a la corteza, produce una goma de color rojiza parduzco (Polini, 2011)

4.1.2. Taxonomía

Nombre científico:	<i>Moringa Oleifera</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Eudicotyledoneae</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Brassicales</i>
Familia:	<i>Moringaceae</i>
Genero:	<i>Moringa</i>
Especie:	<i>Moringa Oleifera</i>

(Liñán Tobias, 2010).



Figura 1. Estructuras de la especie vegetal Moringa Oleífera
(Verónica, 2019).

4.1.3. Propiedades antimicrobianas de la *moringa oleífera*

Los antimicrobianos son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Mediante modificaciones de la estructura química de un agente obtenido naturalmente, es posible producir agentes semisintéticos. Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son: pared bacteriana, membrana bacteriana, síntesis de proteínas, y la síntesis de ácidos nucleicos (=). (Errecalde, 2004).

Los antimicrobianos continúan siendo los aditivos alimentarios más importantes, debido a la capacidad de inhibir o eliminar microorganismos patógenos y alterantes. Actualmente, la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Rodríguez, 2011)

4.1.4. Aplicaciones antimicrobianas de la moringa oleífera en alimentos

El extracto de hojas de *Moringa Oleifera* tiene propiedades antimicrobianas frente a una amplia gama de patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*. Así que este extracto tiene buenas propiedades de curación sien efectos secundarios en comparación con los antibióticos sintéticos (Devendra et al., 2011).

En los últimos años han proliferado los estudios relativos de las distintas actividades de los compuestos presentes en diferentes partes de la *Moringa Oleifera*. En la tabla 1 se muestran los estudios más recientes que demuestran las actividades biológicas de los compuestos de la *Moringa* en el organismo (Guillermo et al, 2017).

TABLA 1: propiedades descritas de *Moringa oleífera* en los diferentes estudios realizados en los últimos años.

<i>Parte del arbol</i>	<i>Efecto descrito</i>	<i>Tipo de estudio</i>
<i>Semillas</i>	Antiinflamatorio en colitis ulcerosa	In vivo (rata)
<i>Hoja</i>	Antioxidante en esteatosis hepatica	In vivo (ratón)
<i>Hoja</i>	Antioxidante directo e indirecto	In vivo (hepatocitos ratón)
<i>Corteza</i>	Inmunomodulador/antiinflamatorio vascular	In vitro (nomocitos humanos)
<i>Hojas</i>	Antiinflamatorio vascular	In vitro (macrófagos ratón)
<i>Semilla</i>	Antioxidante hepático en dietas grasas	In vivo (ratón) e in vitro (hepatocitos ratón)
<i>Semilla</i>	Control de la diabetes mellitus tipo 1	In vivo (rata)
<i>Hoja</i>	Control de la diabetes mellitus tipo 2	In vivo (humanos)
<i>Hoja</i>	Protector en intoxicación por arsénico	In vivo (ratón)
<i>Hoja</i>	Disminuye la fatiga muscular	In vivo (ratas)

<i>Semilla y vaina</i>	Antimicrobiano bacterias multiresistentes	Cultivo (Gram+ y Gram-)
<i>Semilla</i>	Antimicrobiano en biofilms	Biofilms
<i>Hoja</i>	Antimicrobiano bacterias multiresistentes	Cultivo (Gram-)
<i>Hoja, semilla, tallo, vaina y flores</i>	Antimicrobiano (<i>Vibrio spp.</i> Y <i>E. coli</i>)	El agua contaminada
<i>Semilla</i>	Antimicrobiano (<i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	En agua contaminada
<i>Hoja</i>	Antiséptico de manos (<i>E. coli</i>)	In vivo (humanos)

4.1.5. Proteínas antimicrobianas de la *M. oleífera*

Algunas proteínas con bajo peso molecular o péptidos con actividad antimicrobiana o antifúngica han sido aislados en recientes años de diferentes plantas y se cree que están involucrados con un mecanismo de defensa contra hongos fitopatógenos al tener una buena inhibición del crecimiento de microorganismos a través de diversos métodos moleculares como lo es la unión de la quitina o aumentar la permeabilidad de las membranas fúngicas o la pared celular. Las plantas cuentan con un segundo método de defensa que funciona para frustrar a los invasores, este método se basa en producción de metabolitos secundarios antimicrobianos de bajo peso molecular conocidos como fitoalexinas actualmente se reconoce como un mecanismo de protección (Dahot, M.U,1998). La síntesis puede ser inducida por moléculas de origen biótico o abiótico, las cuales suelen ser llamadas inductores o elicitores. Los elicitores de origen biótico, son aquellos que están involucrados en la interacción planta – patógeno. Y los elicitores de origen abiótico agrupan a todos aquellos que no se involucran en la relación normal planta – patógeno.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SMALL PROTEIN OF MORINGA OLEIFERA LEAVES

4.1.5. Microorganismos Patógenos

Características generales de *Salmonella ssp.c*

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, está integrada por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio, pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con un aw de <0.2. Su crecimiento se inhibe completamente a temperaturas inferiores a 7°C, pH <3.8 y un aw <0.94. Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2500 serotipos identificados en el actual sistema de Kauffmann-White, siendo *Salmonella entérica*, serovar *typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport* los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (Gonzalez et al, 2014).



Figura 2. *Salmonella ssp* al microscopio y en cultivo

Características generales de *Staphylococcus aureus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema para la salud, esto es gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la mortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva y a la fecha, se han reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Dicho género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio (Zendejas-Manzo *et al*, 2014).

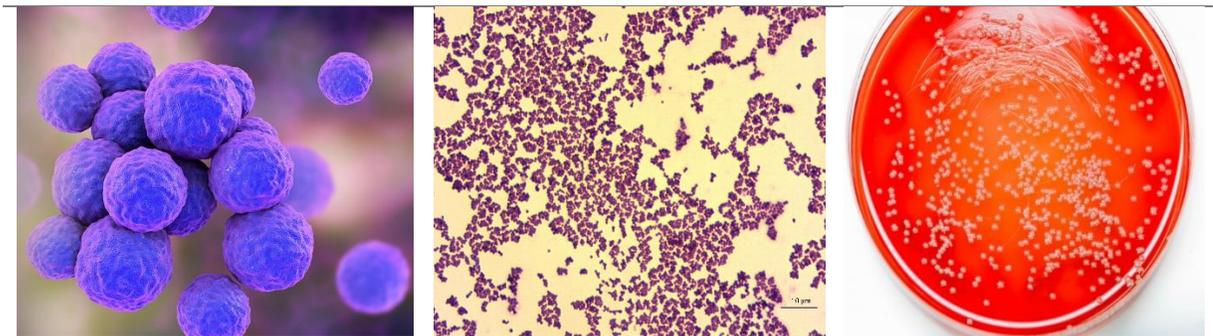


Figura 3. *Staphylococcus aureus* al microscopio y en cultivo

4.2. Métodos de concentración de proteínas

4.2.1. Cromatografía de absorción en columna (CC)

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases; una estacionaria y una móvil. La clave de separación en cromatografía es la velocidad con la que se mueve cada sustancia dependiente de su afinidad relativa por fases. Los componentes que presentan mayor

afinidad por la fase estacionaria van a interactuar por más tiempo con la misma por lo cual se retienen con mayor facilidad, por otro lado, aquellos que tengan mayor afinidad por la fase móvil van a retenerse menos, esto se debe a la polaridad de cada molécula entendiéndose esta como característica de cada enlace y se debe a la diferencia de electronegatividad entre los átomos enlazados (Elsa Lundanes citada por Sussan y Liliana, 2019).

La fase estacionaria consiste en un sólido absorbente empaquetado en una columna de vidrio. La mezcla a separar (muestra) es depositada sobre la superficie superior de la fase estacionaria quedando absorbida en ella. A continuación, se vierte la fase móvil (eluyente) en la parte superior de la columna y se permite su paso a través de la fase estacionaria. Durante el proceso cromatográfico los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil a distintas velocidades efectuándose la separación. La velocidad de arrastre de cada componente depende de su grado de absorcion en la fase estacionaria y de su afinidad por la fase móvil. Como se muestra en la figura 4. Esquema de una CC.

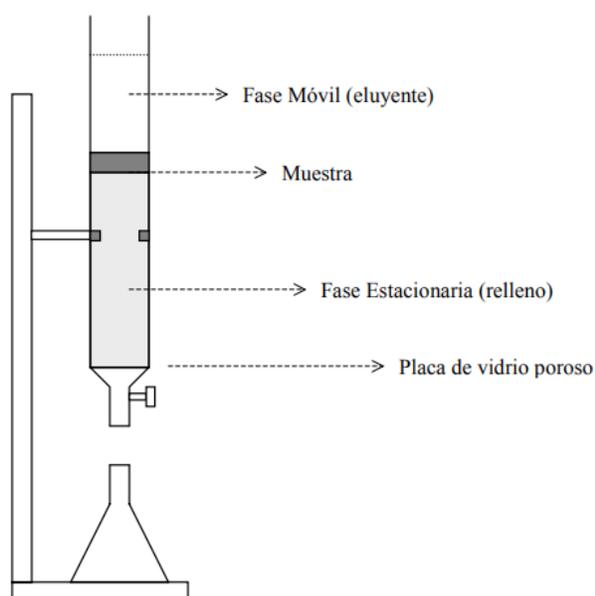


Figura 4. Esquema de una columna cromatografía

Para la separación de los componentes de la mezcla sea efectiva, su velocidad de migración a lo largo de la columna suficiente diferente y la longitud de la columna adecuada. La fase móvil consiste en un disolvente o mezcla de disolventes, seleccionado en base a su polaridad con el fin de optimizar la separación de los componentes de la muestra en la columna. Se puede establecer el siguiente orden de polaridades para los disolventes mayormente utilizados.

Éter de petróleo < tetracloruro de carbono < ciclo hexano < éter etílico < acetona < benceno < acetato de etilo < cloroformo < etanol < metanol < agua < piridina < ácido acético. La fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria debido a la fuerza de la gravedad.

4.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)

-Fundamentos teóricos de la SPE

La extracción en fase sólida (SEP/SPE) es una tecnología usada para el aislamiento o concentración de una serie de analitos de una mezcla compleja. SPE ofrece una solución efectiva e innovadora para mejorar los límites de detección de determinados elementos mediante una concentración, o conseguir alternativamente eliminar matrices interferentes de forma previa al análisis por ICP-OES o ICP-MS.

EFS (Extracción Fase Sólida) es una técnica que permite conectar y separar un analito, catiónico o aniónico de una matriz compleja, mediante una fase sólida estacionaria. Como resultado, se elimina la matriz interferentemente, no retenida y el analito se puede analizar con la mejor sensibilidad posible, mediante la técnica analítica adecuada, p.e. ICP-OES, evitando el riesgo de las interferencias de matriz. En los últimos años se ha hecho también muy popular la retención de Componentes Matriz. En este caso, el absorbente elegido se utiliza para retener componentes no deseados de una matriz sin afectar los analitos de interés. De nuevo, se consigue una mejora en la sensibilidad del análisis de la muestra al eliminar especies potencialmente interferencias. Es una técnica principalmente utilizada en la industria alimentaria.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), el análisis de HAP en el organismo es particularmente difícil debido a la baja concentración de los compuestos individuales (algunos en ng/g) ya que generalmente la cantidad de materia disponible (algunos gramos) es limitada. El pretratamiento de la muestra antes del análisis cromatográfico es largo, en algunos casos el tiempo de extracción de los HAP dura hasta 56 horas. Por lo que se requieren procesos de purificación y pre-concentración más eficientes, confiables y rápidos. La extracción en fase sólida (EFS) con cartuchos comerciales resulta una alternativa para este procedimiento debido a la reducción del volumen de disolventes, tiempo de análisis, costos del mismo y una mayor variedad de fases estacionarias de diferente polaridad.

-Procedimiento de la SPE

El método principal de la SPE consta principalmente de cuatro etapas: Etapa 1, Acondicionamiento (preparación del absorbente para procesar la muestra). Etapa 2, Retención (filtrar los analitos deseados o los componentes no deseados). Etapa 3, Aclarado (arraste por lavado de cualquier elemento no deseado que haya sido retenido simultáneamente. Etapa 4, Elución (desorción selectiva y recogida del analito de interés).

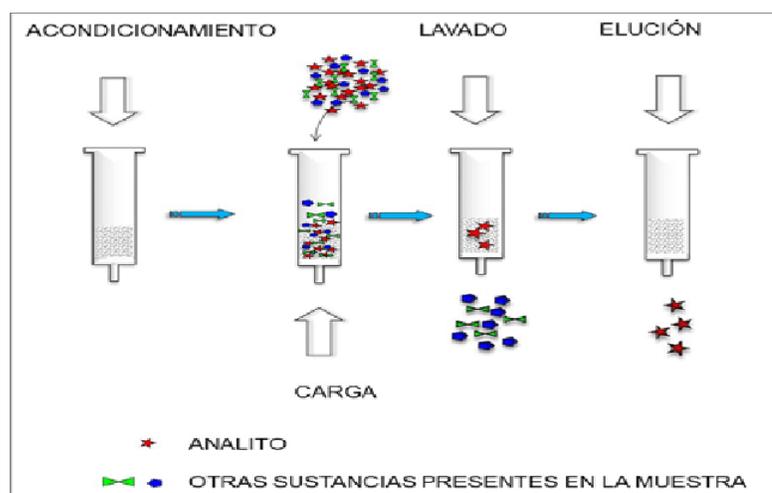


Figura 5. Método de acondicionamiento de SPE

5. Metodología

5.1. Localización del estudio

El presente estudio fue realizado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el laboratorio del departamento de Ciencias Básicas, y en el laboratorio de enzimología localizado en el departamento de Ciencia y Tectología de alimentos.

5.2. Obtención de extractos antimicrobianos a partir de moringa oleífera

Tabla 2. Material, equipos, reactivos y material botánico para la obtención de extractos de *Moringa Oleífera*

<i>Material botánico</i>	<i>Material de laboratorio</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Equipos</i>
<i>Polvo de hojas de la especie vegetal Moringa Oleífera</i>	Matraz bola de dos bocas 500ml	Agua destilada	Balanza analítica marca OHAUS modelo Adventurer Pro AV213
	Condensador	Etanol	Bomba para recirculación
	Aguaitador magnético		Parrilla de agitación y calentamiento
	Termómetro		Bomba de vacío
	Espátula		
	Tampón de plástico		
	Soporte universal		
	Anillo universal		
	Frascos marcados		
	Papel filtro		
	Embudo büchner		
	Matraz tipo Büchner		

Para la obtención de los extractos acuosos de *Moringa Oleifera* se colocaron 200 ml de agua destilada en un matraz bola con dos bocas, en la cual se le agregaron se 2 g de polvo de hoja de moringa con tamaño de partícula de 250 µm. La muestra se puso a una extracción mediante reflujo por un tiempo de 2 h y 4 h como se muestra en la tabla 2. Transcurrido el tiempo se llevó acabo un filtrado al vacío para la separación de la materia vegetal del extracto.

Tabla 3. Diseño de la matriz experimental.

Tratamiento	Muestra	Tiempo
M_1	Agua	2 horas
M_2	Etanol	4 horas
M_3	Agua	2 horas
M_4	Etanol	4 horas

5.2.1. Determinación del contenido de proteínas mediante Bradford

Tabla 4. Materiales para la determinación de proteínas mediante el método de Bradford

Materiales de laboratorio	Reactivos	Equipos
Matraz de aforación	Azul de coomasie G-250	Bascula analítica
Espátula	Etanol	Espectrofotómetro
Tubos de ensayo	Ac. Fosfórico	Bomba de vacío
Celdas para espectrofotómetro	Agua destilada	
Papel filtro	Albumina de huevo	

Tabla 5. Curva de calibración para el análisis de proteínas mediante Bradford

	Blanco	10	20	30	40	50
μl (albumina)	0	10	20	30	40	50
μl (Agua)	300	290	280	270	260	250
μl (Total)	300	300	300	300	300	300

Finalmente se añadió 1000 μl de reactivo de Bradford a todos los tubos. Realizar un Agitado de los tubos y se procede a continuación con la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

En la realización de las muestras de contenido de proteína del extracto de Moringa oleífera el tratamiento se llevó por duplicado. Cambiando la albumina por el extracto, siguiendo el mismo procedimiento. Se agregaron 200 μl de muestra y 100 μl de agua para obtener los 300 μl y se agregaron los 1000 μl de reactivo Bradford. Usando la misma absorbancia en el espectrofotómetro (595 nm).

5.3. Concentración de extractos antimicrobianos de moringa oleífera mediante extracción en fase sólida

Tabla 6. Materiales para concentración de extractos mediante SPE

MATERIALES DE LABORATORIO	REACTIVOS	EQUIPOS
Cartuchos desechables (RIDA C18 Column for solid phase extraction)	Metanol al 80%	Centrifuga

Tubos Eppendorf	Extractos de moringa oleífera
Micro pipeta de 1000 ml	
Puntas desechables	
Tubos de ensaye de plástico	
Gradilla	

La extracción en fase Sólida sigue siendo el procedimiento de preparación de muestras de crecimiento más rápido. Es la técnica más usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis por HPLC, HPLC/MS, GC o GCMS.

Etapa 1; Acondicionamiento, para la activación del absorbente y los grupos funcionales se consigue pasando 2000 μ l de metanol para pasar absorbentes hidrofóbicos. El producto se desecha.

Etapa 2; carga de muestra, aplicar 2000 μ l de muestra en la parte superior del lecho de absorbente. Se recolecta el extracto en tubos de 1.5 mL. Y se almacenan en refrigeración.

Etapa 3; Lavado, se realiza un lavado del absorbente haciendo pasar 2000 μ l de metanol el cual se recolecta y almacena.

Etapa 4; secado, después se llevan a centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.

Etapa 5; elución, se vuelve a pasar el solvente Metanol en una cantidad igual para eliminar la interacciona analito- solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El producto recolectado se almacena.

Etapa 6; secado, se realiza un segundo secado con la centrifuga

Etapa 7; se realiza el ultimo lavado pasando el solvente Metanol por el lecho y almacenamos el producto.

5.5. Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos de moringa oleífera

Tabla 7. Materiales requeridos en la determinación de actividad antimicrobiana

Materiales de laboratorio	Reactivos	Equipos
Cajas Petri desechables	Cepa <i>Salmonella ssp.</i>	Espectrofotómetro
Tubos de ensayo con tapa	Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	Autoclave
Aplicadores con algodón de plástico	Alcohol	Campana de flujo laminar
Vasos depresitado	Solución salina al 0.9%	Incubadora a 37°C
Matraz Erlenmeyer	Agar nutritivo	
Lámpara de alcohol	Agua destilada	
Asa de sembrado	Extractos de moringa oleífera de EFS	
Papel filtro		
Micro pipeta de 100 µl		
Puntillas desechables		
Celdas para espectrofotómetro		

Se comenzó con la obtención de los discos de papel filtro esterilizados por 15 min a una temperatura de 121°C. Se continuó realizando el medio de cultivo Agar Nutritivo para crecimiento bacteriano.

Preparación de discos

Para la preparación de los discos a utilizar en la prueba se les agregaron 100 µl de muestra de extracto a cada uno de los discos de papel filtro y se dejaron que se absorbieran por un tiempo de 24 horas para poder ser utilizados.

Agar nutritivo

- Se disolvió 23 g del medio en 1 litro de agua destilada
- Se mezcló completamente
- Se esterilizó en la autoclave a 121°C durante 15 min
- En una temperatura aproximada de 40 °C, todo se llevó a cabo en la cámara de extracción se repartió el medio en las cajas Petri y se dejó solidificar

Cultivo de cepas bacterianas

Una vez preparados los medios de cultivo se procedió a realizar el cultivo de las dos cepas bacterianas a emplear. Se realizó el pase de caja de *Salmonella spp* y de *S. aureus* a una caja nueva con ayuda de un hisopo estéril realizando el sembrado por estría en el medio solidificado. Se incubaron por 24 horas.

Preparación del inóculo

A partir de las cepas obtenidas *Salmonella ssp* y *S. aureus*, se tomaron varias colonias con un hisopo y se inóculo directamente en un tubo con solución salina al 0.9%.

Se ajustó el inóculo a una turbidez de 0.5 de McFarland el cual corresponde a 1.5×10^8 UFC/mL, mediante una medición en el espectrofotómetro a 600 nm.

Se ajustó el inóculo a una turbidez de 0.034 para *S. aureus* y 0.038 para *Salmonolle ssp.* leyendo en el espectrofotómetro a 600 nm

Colocación de discos con extracto en agar nutritivo

Este proceso se llevó a cabo en cajas Petri estériles de plástico con los parámetros anteriormente establecidos.

Se desinfectó toda el área de trabajo utilizando alcohol para que las condiciones de esterilidad sean mejores nos apoyamos de una lámpara de alcohol para tener un área limpia. Se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión bacteriana (0,5 McFarland) y se rotó varias veces sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. Se inoculó mediante estriado cubriendo todas las áreas de la caja de agar se dejó reposar 5 minutos. Pasado el tiempo se llevó a cabo la colocación de 4 discos por caja dejando un espacio de 3 cm entre cada disco con ayuda de un asa de inoculación estéril, esto para poder apreciar el halo de inhibición. Se taparon las cajas y se llevaron a incubación por 24 horas a una temperatura de 37°C.

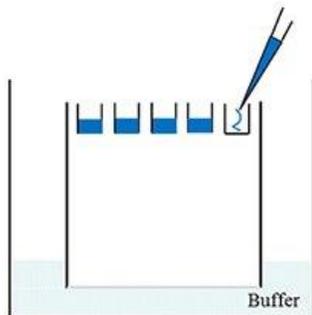
5.6. Determinación del peso molecular mediante electroforesis (SDS PAGE)

Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos iniciales para el proceso de electroforesis (SDS-PAGE) cámara vertical.

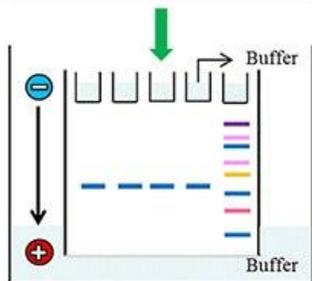
MATERIALES DE LABORATORIO	DE REACTIVOS	EQUIPOS
MICROPIPETAS DE 100, 1000 Y 5000 ML	Agua destilada	Cámara de electroforesis vertical y accesorios
VASO DE PRECIPITADO DE 50 Y 500 ML	Solución de poliacrilamida al 30% Anexo A.1.2	
FLOTADOR PARA MICRO TUBOS DE 1,5 ML	Buffer Tris-HCl 1,5 M pH= 8.8 Anexo A.1.4	
PUNTAS DESECHABLES	Buffer Tris-HCl 0,5 M pH= 6.8 Anexo A.1.5	

GUANTES DE LÁTEX	Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%
	Persulfato de amonio (APS) al 10%
	N'N'N'N-Tetrametiletilendiamina (TEMED solución stock)

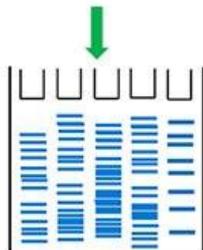
Los geles de poliacrilamida se forman mediante la reacción de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) que da como resultado una matriz del gel altamente reticulada, los compuesto actúan como neurotóxicas por naturaleza. El gel actúa como un tamiz a través del cual se mueven las proteínas en respuesta al campo eléctrico.



Muestras de proteínas y marcador cargado en SDS-PAGE – sistema vertical



Dirección de migración de muestras en sistema SDS-PAGE vertical



Gel SDS-PAGE después de Coomassie tinción azul

Figura 6. SDS-PAGE de muestras de proteínas y marcador de proteína exposición de color (C1992).

Procedemos a limpiar la cámara de electroforesis vertical con fuente de alimentación, placas de vidrio, espaciadores de gel con agua des-ionizada y etanol. El montaje del equipo se llevará a cabo en una superficie uniforme y plana. Donde se cuente con una fuente de energía de 220 W, este proceso fue llevado a cabo en el laboratorio 1 del departamento de ingeniería en ciencia y tecnología de alimentos.

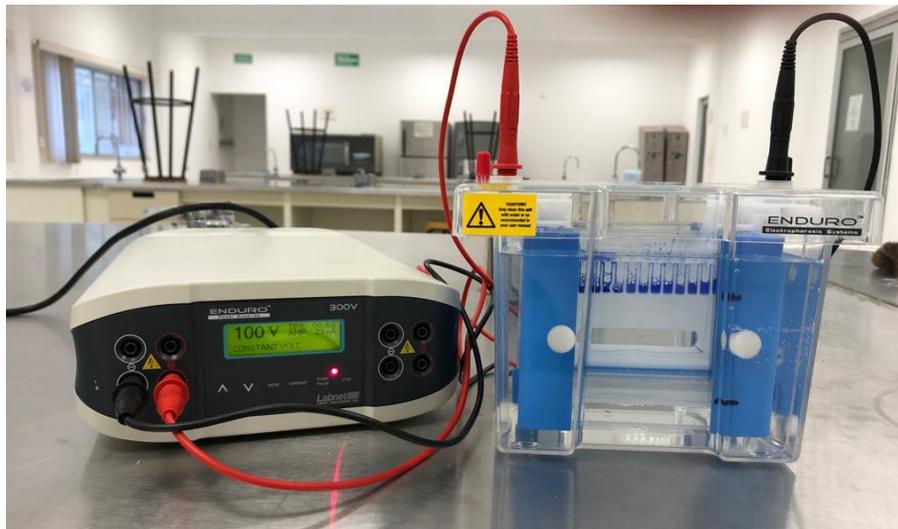


Figura 7. Sistema de electroforesis vertical y de transferencia

Preparación del gel de resolución o separación

Se preparó el gel de separación a una concentración de 12% de acrilamida Bis-acrilamida en 10 mL; se colocaron 3500 μ l de agua destilada, 3700 μ l de acrilamida al 30%, 2600 μ l de Tris-HCL 1.5 M con un pH 8.8, 100 μ l de solución SDS al 10%, 100 μ l de APS al 10% y 10 μ l de TEMED, (el TEMED debe ser el último ingrediente agregado). Todo esto se mezcló sin formar burbujas. Se agregó lentamente por las paredes para

evitar burbujas de aire. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por un tiempo de 15 a 30 min. Una vez formado el gel, se descartó la capa de butanol y se lavó la parte superior del gel varias veces con agua destilada hasta eliminar completamente los restos de acrilamida no polimerizada y butanol.

Preparación del gel de empacamiento o compactación

Preparación del gel de compactación con una concentración de 5% de acrilamida y Bis-acrilamida en 10ml, se agregan 5860µl de agua destilada, 1340µl de acrilamida al 30%, 2600µl de Tris-HCl 0,5 M con un pH 6.8, 100µl de SDS al 10%, 100µl de APS al 10% y se añade el TEMED 10µl. Se mezcla uniformemente sin hacer burbujas. Procedemos a agregar el gel de poliacrilamida entre los vidrios y sobre el gel de resolución ya polimerizado. Inmediatamente después, colocar el peine o espaciador entre ambos vidrios. Dejar polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 min. Una vez formado el gel, retirar el peine cuidadosamente.

Preparación de muestra biológica

La preparación de la muestra de proteína consiste en un proceso físico-químico, en el cual se rompen los enlaces peptídicos y puentes de disulfuro gracias a la acción de detergentes iónicos, reductores y altas temperaturas, los que en conjunto desnaturalizan la proteína hasta su estructura primaria. Se mezclan los extractos con el buffer de corrido en proporción 1:1 (una de muestra y una de buffer) en tubos eppendorf, asegurar bien las tapas de los tubos y someter la muestra a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. Para este efecto colocamos los flotadores en la cámara de baño maria.

Control de la temperatura, finalizado el procedimiento, retirar los tubos de la cámara y mantenemos en una gradilla hasta su uso.

Procedimiento de electroforesis

Tabla 9. Materiales para realizar el montaje del equipo

MATERIAL	DE	REACTIVOS	EQUIPOS
LABORATORIO			
MICROPIPETAS 100ML	DE	Buffer de electroforesis para proteínas 1X Anexo A.1.8	Cámara de electroforesis vertical y accesorios
GUATES DE LÁTEX			Fuente de poder
PUNTAS DESECHABLES PARA MICRO PIPETA	PARA		

En el proceso de la electroforesis se realiza la separación de las proteínas a analizar, de acuerdo a su peso molecular. Dicha distribución dependerá de la concentración del gel de resolución con el que se esté trabajando. Todo el procedimiento debe de ser realizado con guantes de látex a fin de evitar la degradación de las moléculas por la acción de las proteasas presentes en la mano. Sumergir el sistema contenido en los geles polimerizados en un tanque conteniendo buffer de electroforesis o resolución para proteínas 1X. Dicho tanque lleva dos electrodos; uno positivo y uno negativo (representados por colores rojo y negro respectivamente) que serán conectados a una fuente de poder. Al momento de sumergir los geles en el tanque, asegurarse que los pasillos del gel estén totalmente cubiertos por el buffer. Con el uso de puntas de 20 µl de capacidad proceder a depositar las muestras cuidadosamente la muestra en los pasillos evitando la contaminación del pocillo continuo. El marcador estándar de proteínas para la medición del peso molecular. Dicho marcador será sometido a los mismos tratamientos que las muestras. Una vez finalizada la colocación de las muestras en el gel, cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. Seleccionamos el voltaje correspondiente para la muestra. Para el cálculo del voltaje es necesario conocer la distancia en centímetros

del gel desde la parte superior hasta la parte inferior de la matriz. La distancia multiplicada por voltios (8V – 15V) permitirá determinar el voltaje total. El voltaje óptimo dependerá de la naturaleza de la molécula de ADN que se necesita separar. Se termina la electroforesis hasta que la fuente de corrida (una línea azul por el colorante del buffer) haya llegado casi al final del gel. Desmontamos del equipo de electroforesis, se remueve el gel de las placas de vidrio lentamente para evitar que se rompa al ser una lámina muy frágil.

Coloración y visualización de las proteínas (usando azul brillante de coomasie)

Tabla 10. Material para fijación y tinción de proteínas

Material de laboratorio	Reactivos
Recipiente para colocar el gel	Solución de trabajo azul brillante de coomasie
Frascos para las soluciones	Agua destilada
Guantes de látex	Solución fijadora

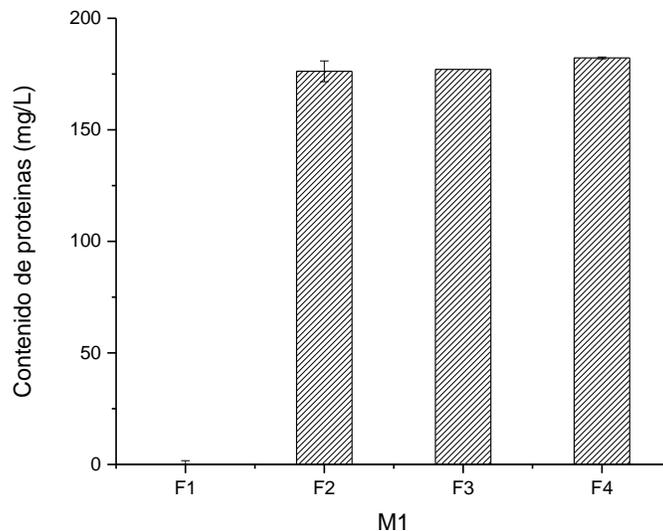
El proceso de coloración se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfúrico que son los que tiñen la proteína de color azul. Asimismo, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Con este tipo de tinción se permite la visualización de proteínas en un rango de sensibilidad entre 0,5µg y 2µg. Todo el procedimiento debe ser realizado con guantes para evitar contacto con los reactivos. Se procede a lavar bien el gel con agua destilada unas 4 o 6 veces para retirar los excesos del buffer de corrido. Sumergir el gel de poliacrilamida

en un envase de plástico, vidrio o teflón, conteniendo solución de fijación de proteínas, en un volumen que permita cubrir completamente el gel. Dejar incubado las proteínas durante 2 horas. Pasado el tiempo se retira de la solución y se hacen lavados suaves con agua destilada para eliminar los excesos. Se agrega el gel en el envase y se agrega colorante azul brillante de coomasie para la tinción de las proteínas presentes en las muestras por un tiempo de 2-4 horas. Después del paso de tinción con colorante retiramos el gel y realizamos lavados para eliminar excesos del colorante.

6. Resultados

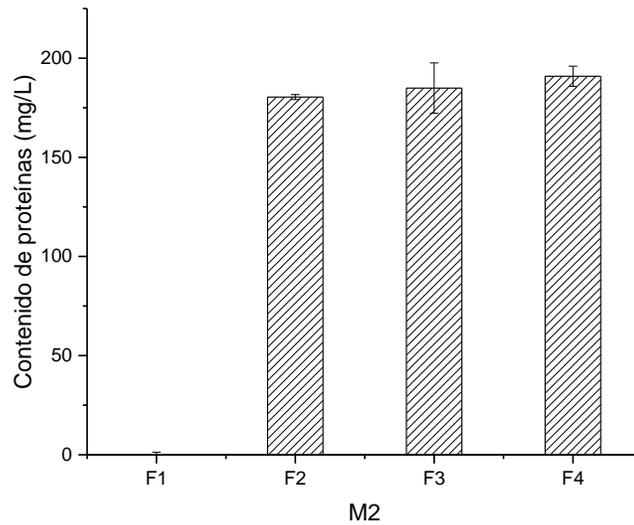
Cuantificación de proteínas mediante Bradford

Las gráficas 1, 2, 3, 4, muestran las fracciones obtenidas después del tratamiento en la columna de extracción en fase sólida, en cada una de las muestras analizadas. La grafica 1, que corresponde a la muestra 1 (extracción con agua 2h), en este gráfico se muestra el contenido de proteínas obtenido para cada una de las fracciones, observándose que se la fracción 1 no contiene proteínas, esto debido a que en esta fracción se obtienen las interferencias (Andrade-Eiroa y col. 2016). Las fracciones F2, F3 y F4, tienen un contenido de proteínas de alrededor de 176 a 184 mg/L.



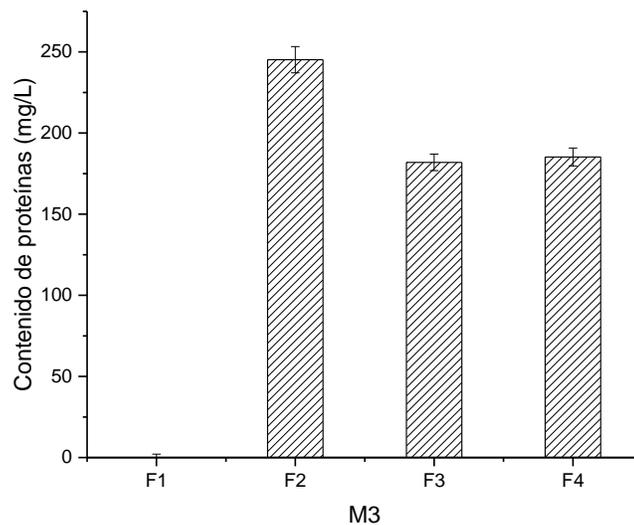
Grafica 1. Determinación de proteínas en la muestra 1 mediante Bradford

En la figura b, se observa el contenido de proteínas en la muestra 2 (extracción con agua 4h), en la cual se observa un comportamiento similar que, en la figura anterior, en la cual, a pesar que se incrementó el tiempo de extracción, se obtuvo un contenido similar en las fracciones F2, F3 y F4 que van desde 180 a 191 mg/L.

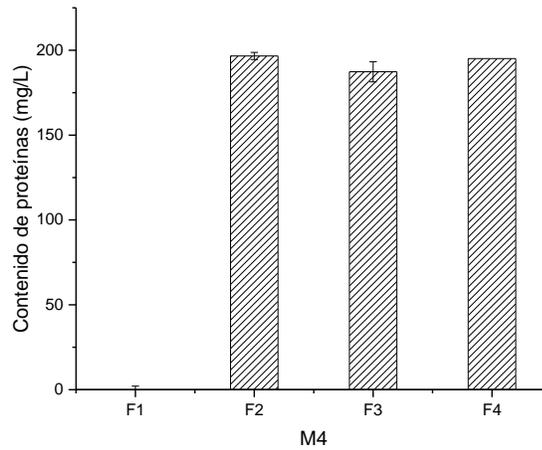


Grafica 2. Determinación de proteínas en la muestra 2 mediante Bradford

En las gráficas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos en las muestras 3 y 4 que corresponden a los extractos obtenidos con etanol a 2 y 4 h, respectivamente. Se muestra que a las 2 y 4 h de extracción se logra la extracción mayor de proteínas en comparación a los extractos obtenidos con agua, obteniéndose una mayor concentración de proteínas en la fracción F2, de la muestra M3.



Grafica 3. Determinación de proteínas en la muestra 3 mediante Bradford



Grafica 4. Determinación de proteínas en la muestra 4 mediante Bradford

Actividad antimicrobiana



Figura 6. Halos de inhibición bacteriana frente a *S. aureus* en la muestra M1



Figura 7. Halos de inhibición bacteriana frente *S. aureus* de la muestra M2

Halos de inhibición según el tipo de cepa bacteriana con el extracto de *Moringa Oleifera*

Tabla 11. Medición de halos de inhibición en la muestra M1 frente a las cepas bacterianas *Salmonella spp*, *Stapylococcus aureus*

Extracto agua M1	Cepa bacteriana	Diámetro (mm)
Extracto agua F1	<i>Salmonella spp</i>	0
	<i>S. aeurus</i>	0
Extracto agua F2	<i>Salmonella spp</i>	0
	<i>S.aureus</i>	0
Extracto agua F3	<i>Salmonella spp</i>	0
	<i>S. aureus</i>	0,8
Extracto agua F4	<i>Salmonella spp</i>	0
	<i>S. aureus</i>	0

Tabla 12. Medición de halos de inhibición en muestra M2 frente a las cepas bacterianas *Salmonella ssp*, *Stapylococcus aureus*

Extracto	agua	Cepa bacteriana	Diámetro (mm)
M2	Extracto agua F1	<i>Salmonella ssp</i>	0
		<i>S. aureus</i>	0
Extracto agua F2	Extracto agua F2	<i>Salmonella ssp</i>	0
		<i>S.aureus</i>	0,9
Extracto agua F3	Extracto agua F3	<i>Salmonella spp</i>	0
		<i>S. aureus</i>	0
Extracto agua F4	Extracto agua F4	<i>Salmonella spp</i>	0
		<i>S. aureus</i>	0

Tabla 13. Extractos con resistencia e inhibición a la sepa bacteriana *Stapylococcus aureus*

Extracto total		Cepa bacteriana	Diámetro (mm)
Extracto M1 F3	agua	<i>Salmonella ssp</i>	0
		<i>S. aureus</i>	0,8
Extracto M2 F2	agua	<i>Salmonella ssp</i>	0
		<i>S.aureus</i>	0,9

En la tabla 13, encontramos cuales fueron los extractos con mayor inhibición bacteriana frente a las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*). Se observó inhibición en los extractos de agua F1R3 y F2R2. Las diferencias en los halos de inhibición de las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Salmonella ssp*) son debidas a las diferencias estructurales de la pared celular de

cada bacteria las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, cuenta con otro compuesto importante en su pared celular. Presenta ácidos lipoteicoicos y teicoicos unidos por polímero de glicerol. Las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas. Este tipo de bacterias cuentan con una segunda membrana de fosfolípidos y esta es muy impermeable a los compuestos por su carga negativa (Patricia.2018). Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos M1 (F1R3) y M2 (F2R2) dichos extractos puros obtenidos a base de agua destilada en variación de tiempo entre una y otra muestra. Se obtuvo que los extractos de etanol no mostraron capacidad inhibitoria en ninguna de las muestras, en cuanto a la bacteria Gram (+) *S. aureus* de las cuales se obtuvieron las inhibiciones en diferentes extractos, esto lo podemos relacionar a que la estructura de las proteínas presentes en la bacteria fue degradada para poder llegar al principio activo de la célula bacteriana (Mateos, R. G., 2003).

Determinación del peso molecular por electroforesis (SDS-PAGE)

En la figura 8 se puede observar la banda de corrido con un peso molecular estandar para poder ser comparado con los resultados de las muestras en analisis. En el gel de policralamida se obtivieron ligeramente bandas de alto peso molecular, se obtuvo la lectura de la muestra M1 (tratamiento de 2gr de muestra en dos horas por reflujo).

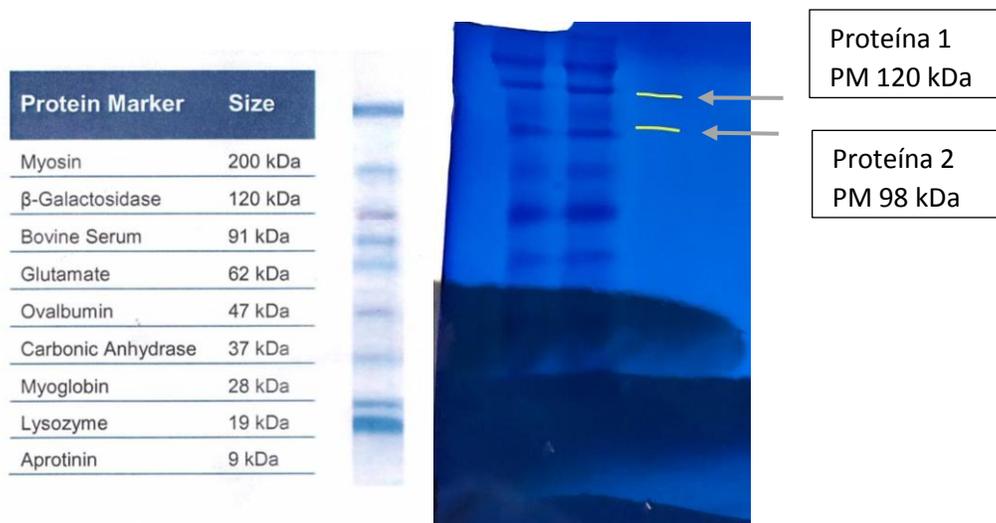


Figura 8. Marcador de gel de poliacrilamida en electroforesis vertical para obtención de proteínas en extractos acuosos de *Moringa Oleifera*

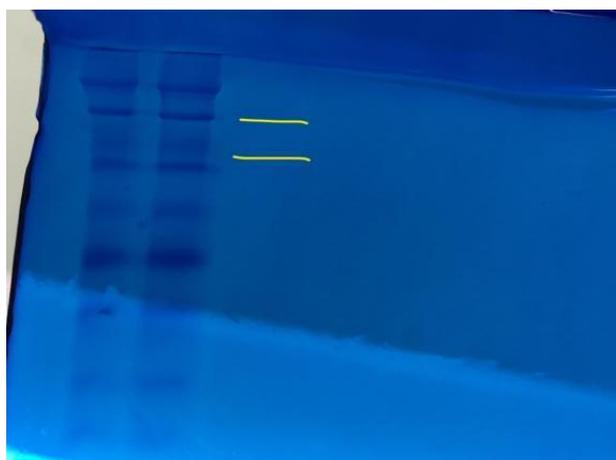


Figura 9. Esquema de posición de bandas de proteínas en muestra M1 F1R3

En el estudio SDS-PAGE del extracto acuoso de *Moringa Oleifera* se obtuvo una banda de la muestra M1 F3. De proteínas que van de 90 a 120 kDa (figura 8). Con el análisis de electroforesis en las muestras se mostraron dos tipos de proteínas en la muestra 1 cuyo peso molecular se encuentra entre 90 a 100 kDa para la proteína 2 para la proteína 1 se encuentra por los 120 kDa. En las pruebas antes realizadas antimicrobianas se obtuvo respuesta en esta muestra se revelo una zona de inhibición

frente a la cepa bacteriana *Stapylococcus aureus*. Podemos coincidir en que la fuente de inhibición se debe al contenido de proteínas concentradas en la muestra. Aun siendo una sepa sensible ante el extracto. No logramos esclarecer que tipo de proteína es la que se encuentra realizando la inhibición bacteriana. Para efectos inmunomoduladores de las proteínas en extractos de semillas de moringa se han obtenido bandas con proteínas con valores de 9 kDa a 18 kDa que son equivalentes a la unión de una proteína de unión a quitina con una secuencia N-terminal que contiene una masa molecular similar a 18 kDa y esta misma proteína da en condiciones no reductoras y la proteína 9 kDa es en condiciones reductoras (Anudeep *et al.* 2016).

Tabla 14. Tabla aclaración de proteínas obtenidas por el método SDS-PAGE

Muestra	Pocillo	Proteína	Peso molecular
Buffer estándar	1 y 2	Estándar	Figura 8
M1 F1R3	3	Proteína 1 desconocida	120 kDa
M1 F1R3	3	Proteína 2 desconocida	98 kDa

7 Conclusiones

- ❖ Se realizó el proceso de extracción a partir de hojas secas de la especie vegetal *Moringa Oleifera* por el método de extracción mediante reflujo, usando como solvente agua destilada y etanol al (98°) y variación en tiempo.
- ❖ Se realizó una extracción de fase sólida para la purificación de las proteínas presentes en el extracto de *Moringa Oleifera* para proceder a realizar la prueba de contenido de proteínas mediante el método de Bradford dando como resultado mayor cantidad proteica en los extractos M1 y M2, dichas muestras con un solvente de agua destilada con porcentajes que va de 176 a 191 mg/L en cuento a su concentración proteica, y para las muestra M3 y M4 con solvente de etanol van de 181 a 245 mg/L. Dando como resultado un mayor contenido de proteínas en la muestra 3 F2 con un valor de 245 gm/L.
- ❖ Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de sembrado por estría y difusión en discos, dándonos los siguientes halos de inhibición en la bacteria *Stapylococcus aureus* en dos diferentes muestras los resultados para la muestra 1 F3 fue de 0,8 mm y para la muestra 2 F3 fue de 0,9 mm.
- ❖ Se conoció el peso molecular aproximado en kDa de las proteínas presentes en el extracto de *Moringa Oleifera* mediante el método d SPS-PAGE, el cual fue de 120 kDa para la proteína 1 y 98 kDa en la proteína 2 las dos fueron obtenidas de la muestra 1 F3, no pudimos conocer cuáles fueron las proteínas presentes en el extracto.

8. Bibliografía

Amensour, Bouhdid, Fernández, Idaomar, Senhaji & Abrini (2010). Antibacterial activity of extracts of *myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Properties*. (13) :1215–1224.

Auréa Andrade-Eiroa. 2016 Moisés Canle Valérie Leroy-Cancellier Víctor Cerdà. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I).

Benavides, J. & Ramírez, V. (2019). Evaluación de actividad antimicrobiana de MORINGA (Moringa oleífera). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12749/11864>. 13p.

Bonal Ruiz, Rolando, Rivera Odio, Regina Mercedes, & Bolívar Carrión, María Emilia. (2012). Moringa oleifera: una opción saludable para el bienestar. *MEDISAN*, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012001000014 (22, noviembre, 2008).

Dahot, M. U. (1998). Antimicrobial activity of small protein of *Moringa Oleifera* leaves. *Journal of the Islamic Academy Of Sciences* 11p.

Doménech-Asensi, G, *et al.* 2017. Moringa Oleifera: Revisión sobre aplicaciones y uso en alimentos.

Foidl, N. *et al.* Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco paraganado. En: *Agroforestería para la alimentación animal en Latinoamérica*. (Eds. M.D. Sánchez y M. Rosales). Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal No. 143, p. 341. 1999

Guadalupe Socorro Zendejas-Manzo *et al.* Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 2014.

Jose Gonzalez Pedraza *et al.* Microbiological Isolation of *Salmonella spp.* And Molecular tolos for detection. Artículo de revisión Volumen 30. 2014. 94 p.

José M. Egea Fernández, Jose M. Egea Sánchez, Isabel Egea Sánchez y Diego Rivera Núñez. 2015. Cultivos promisorios para enfriar el clima y alimentar al mundo. Integral. Paraje de la rafa s/n Brullas. 210p.

Liñán Tobias, F. (2010). Moringa oleifera el árbol de la nutrición. *Ciencia Y Salud Virtual*, 2(1), 130–138. <https://doi.org/10.22519/21455333.70>

Mateos, R. G., & Leal, R. P. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1), 5-10.

Polini, G. (Julio de 2011). Cooperación Internacional . Obtenido de La Moringa oleífera: <http://www.desaprender.org/fileSendAction/fcType/5/fcOid/447440695142977788/fodoid/447440695142977787/Moringa%20Oleifera>

Rahman, M. (2009). Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of Moringa oleifera Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. 219-226.

Sandanamudi Anedeepea, Vaddin K. Prasanna b, Shruthi M. Adyaa, Caracterización de fibra dietética soluble de semillas de Moringa Oleífera y sus efectos inmunomoduladores. *Jornal* 2016.

Sussan Xilena Angulo A.. Liliana Patricia Jaimes G. 2019. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) para la caracterización de especies de la familia *ASTERACEAE*. Tesis de Químico Farmacéutico.U.D.C.A. Bogotá D.C. 64p.

Verónica C. Castañeda Matute. 2019. Evaluación in vitro de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de moringa (*Moringa oleífera Lam.*) y altamisa (*Ambrosia arborescens Mill.*) frente a la bacteria *klebsiella pneumoniae ATCC 70693*. Tesis de ingeniería. Universidad Politécnica Salesiana sede cuenca. Ecuador. 95 p.

ANEXOS

A.1 Preparación de soluciones para electroforesis

A.1.1 Buffer de corrida

Reactivo		Concentración final
Tris 0.5 M, pH 6.8	5 mL	0,125 M
SDS AL 10%	1 mL	20%
Glicerol	1 MI	20%
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/mL

Realizar la mezcla en orden como se encuentran mencionados.

A.1.2 solución de Acrylamide/bis-acrylamide solution al 30%

Reactivos		Concentración final
Acrylamide	29.2 gr	29,2 %
Bis-acrylamide	0,8 gr	0,8 %
Mezcla total	30 gr	30 %

A.1.3 Solución de ácido clorhídrico

Medir 32.6ml de agua destilada y aforar a 50 ml de agua destilada para una concentración del 38%.

A.1.4 Buffer Tris 1,5 M pH = 8.8

Pesar 1.815 gr de tris base y aforar a 10 ml de agua biodespilada ajustar a un pH = 8,8 con HCl.

A.1.5 Buffer Tris 0,5 M pH = 6.8

Pesar 0.6 gr de tris base y agregar 8 ml de agua biodespilada y ajustar a un pH = 6.8 con HCl.

A.1.6 Solución fijadora

Reactivo	
Metanol	250 ml
Ácido acético	50 ml
Agua destilada	200 ml
Mezcla total	500 ml

A.1.7 Solución de trabajo azul brillante de coomasie

Reactivos		Cantidad	Concentración final
Azul brillante de coomasie R-250	0.1 gr	100 ml	0.1 %
Metanol	40 ml	100 ml	40 %
Ácido acético	10 ml	100 ml	10 %

A.1.8 Running buffer de electroforesis para proteínas 1X

Reactivos		Concentración final
Tris-HCl	3.0285 gr	25 mM
Glicina	15.014 gr	200 mM
SDS	1 gr	0.1%
Mezcla total		1 litro