

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS EXTRAIDAS DEL FRUTO DE
Crescentia cujete L.



LEIDY JOHANA TORRES BENAVIDEZ.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ÉNFASIS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
POPAYÁN
2010**

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS EXTRAIDAS DEL FRUTO DE

Crescentia cujete L.

LEIDY JOHANA TORRES BENAVIDEZ.

**TRABAJO DE GRADO PARA OBTENER EL
TÍTULO DE BIÓLOGA**

MSc. NELSON BOLIVAR ROJAS MARTINEZ

DIRECTOR

CLARA INES GIRALDO

ASESORA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

ÉNFASIS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

POPAYÁN

2010

Nota de aceptación:

Firma del presidente de jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Popayán 16 de marzo de 2010

DEDICATORIA

A Dios por su divina protección y sabiduría inagotable suficientes para alcanzar cualquier logro propuesto.

A mi madre Esperanza Benavidez por brindarme el milagro de la vida, su amor, sus cuidados y apoyo incondicional.

A mi abuela Luz Marina Vásquez, mi abuelo José Benavidez y mi Tío Fernando Benavidez por ser mi inspiración de superación y esfuerzo inagotable.

A Hugo Fredy Córdoba por su amor, amistad e incondicionalidad.

AGRADECIMIENTOS

Expreso gratitud sincera y perdurable a las personas que por su colaboración y experiencia hicieron posible realizar ésta investigación:

Nelson Bolívar Rojas Martínez, Magister en Biología Celular y Molecular.

Clara Inés Giraldo, Profesora de Microbiología Universidad del Cauca.

Neyla Benítez, Profesora de Microbiología de la Universidad del Valle.

Mi tía Mayelli Omaira Torres, Magister en Educación. Por guiarme y apoyarme con su amor y sabiduría.

Laboratoristas Bethy, Ricardo, Jhon Carlos Melendez y Darwin, por su colaboración en todo momento.

Compañeros y amigos por su amistad sincera.

CONTENIDO

		Pág.
	Introducción	1
1	Marco Teórico	4
1.1	Ubicación taxonómica	4
1.2	Distribución	5
1.3	Usos	6
1.4	Composición química y actividad antimicrobiana	6
2	Proteínas	10
2.1	Clasificación	10
2.2	Proteínas antifúngicas	15
2.2.1	Proteínas PR-1	15
2.2.2	Proteínas PR-2 (b-glucanasas)	15
2.2.3	Proteínas PR-3 (quitinasas)	16
2.2.4	Proteínas PR-4 (bandas de quitina)	16
2.2.5	Proteínas PR-5 (TL):	17
2.2.6	Defensinas	17
2.2.7	Proteínas similares a ciclofilinas	18
2.2.8	Proteínas ricas glicina e histidina:	18
2.2.9	RIPs	18
2.2.10	LTPs	18
2.2.11	Proteínas letales (toxinas letales)	19
2.2.12	Inhibidores de proteasas:	19
2.2.13	Otras proteínas	19
3	Mecanismos de acción de agentes antifúngicos	20
4	Métodos para en análisis de proteínas	22
4.1	Bradford	22
4.2	Electroforesis SDS PAGE	22

5	Características del Género <i>Fusarium</i>	24
5.1	Estudios de inhibición realizados en <i>Fusarium</i>	25
6	Metodología	27
6.1	Aislamiento y purificación de proteínas	28
6.2	Hidrólisis enzimática	30
6.3	Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford	31
6.4	Separación de proteínas	32
6.5	Ensayo de esterilidad de proteínas	33
6.6	Evaluación efecto de la proteína sobre <i>Fusarium sp.</i>	34
7	Cromatografía de capa fina (TCL)	39
8	Resultados	40
8.1	Aislamiento y purificación de la muestra	40
8.2	Hidrólisis enzimática	41
8.3	Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford	42
8.4	Separación de proteínas mediante electroforesis	44
8.5	Ensayo de esterilidad de proteínas	48
8.6	Evaluación efecto de la proteína sobre <i>Fusarium sp.</i>	49
9	Cromatografía de capa fina (TLC)	54
10	Conclusiones	56
11	Recomendaciones	58
12	Referencias Bibliográficas	59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1	Taxonomía de <i>Crescentia cujete</i> L. 4
TABLA 2	Compuestos encontrados en <i>Crescentia cujete</i> L. 9
TABLA 3	Taxonomía de <i>Fusarium sp.</i> 24
TABLA 4	Identificación del producto químico Vitavax. 35
TABLA 5	Datos de los tratamientos por caja. 37
TABLA 6	Datos para la elaboración de la curva de calibración. 43
TABLA 7	Base de datos para cálculo de pesos moleculares de las proteínas de <i>Crescentia cujete</i> L. 44
TABLA 8	Datos finales para la elaboración de la curva de calibración de proteínas. 45
TABLA 9	Datos para el experimento en bloques para la evaluación en <i>Fusarium sp.</i> 49
Tabla 10	Porcentaje de inhibición micelial de cada tratamiento frente <i>Fusarium sp.</i> , mediante técnica de difusión en disco. 53

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1	Fotografía del árbol de totumo, semillas flores y frutos	5
FIGURA 2	Fotografía de fruto y semillas de <i>Crescentia cujete</i> L.	27
FIGURA 3	Fruto de Totumo en el liofilizador	28
FIGURA 4	Montaje extracción de proteínas por adición de los solventes cloroformo- metanol- Agua.	30
FIGURA 5	Fotografía Hidrólisis enzimática de celulosa mediante adición de celulasa.	31
FIGURA 6	Montaje y corrida electroforética de proteínas de <i>C. cujete</i> .	33
FIGURA 7	Fotografía de siembra de proteínas en agar nutritivo y PDA.	34
FIGURA 8	Fotografía de cepa de <i>Fusarium sp.</i> a emplear en el ensayo.	34
FIGURA 9	Fotomicrografía de hifas de <i>Fusarium sp.</i>	35
FIGURA 10	Vitavax antifúngico comercial al 71%.	36
FIGURA 11	Fotografía de la siembra de las diferentes concentraciones de proteínas y el control positivo y negativo.	38
FIGURA 12	Fotografía del extracto proteínico al final del proceso.	40
FIGURA 13	Absorbancia vs longitud de onda de fase líquida de la extracción proteínica de <i>Crescentia cujete</i> mediante el protocolo 2 (precipitación y purificación CL-METOH-AGUA)	41
FIGURA 14	Hidrólisis enzimática de celulosa.	42
FIGURA 15	Curva de calibración a partir de la Cantidad de albumina vs absorbancia.	43
FIGURA 16	Absorbancia vs Longitud de onda de proteínas de <i>Crescentia cujete</i> L, mediante el método de cuantificación de Bradford.	44
FIGURA 17	Curva de calibración a partir de los pesos moleculares estándares, logaritmo del peso molecular vs movilidad relativa (RF)	45
FIGURA 18	Electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas extraídas de <i>Crescentia cujete</i> L.	46
FIGURA 19	Fotografía de siembra de extracto proteínico de <i>Crescentia cujete</i> L. (Totumo).	49
FIGURA 20	Fotografía de medición de halos de inhibición micelial <i>Fusarium sp.</i>	50

- FIGURA 21 Fotografía de halos de inhibición de *Fusarium sp.* 50
Obtenidos por la técnica de difusión en disco.
- FIGURA 22 Representación de la variable halo de inhibición vs 52
tratamiento y su cambio en el transcurso de 5 días.
- FIGURA 23 Cromatografía de placa fina (TLC) de *Crescentia cujete* L. 54
(totumo).

RESUMEN

El propósito del trabajo consistió en aislar las proteínas de *Crescentia cujete* L., calcular su masa molecular aparente y evaluar su efecto sobre *Fusarium sp.*

Las proteínas se aislaron del fruto, según el método descrito por (Llewellyn, 1997), se purificaron y precipitaron de acuerdo a los métodos descritos por (Sripad y Narasinga, 1982) y (Riaño y Zamora, 2005) respectivamente. Posteriormente por el método de (Laemmli, 1970) se determinó su masa molecular.

Luego de obtener las proteínas se midió la actividad antimicótica utilizando la técnica de difusión en disco descrita por (Espinel et al., 2007), prueba que permitió medir la susceptibilidad *in vitro* de *Fusarium sp.*, frente al extracto proteínico natural, utilizado tres concentraciones de proteína 5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml, como control positivo Vitavax y agua como negativo. Los resultados se analizaron en el programa estadístico SPSS Versión 11.0.

Las masas moleculares aparentes encontradas fueron de 27 y 15 KDa. En cuanto a la actividad se observa que 24 horas después de la siembra hubo una mayor inhibición, por parte de los tratamientos: fungicida, 15 mg/ml y 30 mg/ml, con halo de inhibición promedio de 2.4, 2.0 y 2.1mm respectivamente, sin embargo ésta disminuyó drásticamente a medida que transcurrieron los días.

Las proteínas de *Crescentia cujete* L., demostraron actividad antifúngica a una concentración de 30 mg/ml, manteniendo una mejor inhibición durante los cinco días de observación en comparación con el fungicida.

PALABRAS CLAVE: *Crescentia cujete* L., proteínas, actividad antifúngica.

INTRODUCCION

Crescentia cujete L pertenece a la familia Bignoniaceae, del género *Crescentia* y es comúnmente llamado como árbol de las calabazas o totumo, originario de América Central que tiene una amplia distribución y usos en Suramérica y por supuesto en diferentes departamentos de Colombia. Este árbol tiene un alto potencial artesanal, maderable y medicinal, por tanto es una planta promisoriosa en el campo de la medicina herbal y farmacéutica, así como en el mercado nacional e internacional. Teniendo en cuenta las ventajas que presenta por ser una planta silvestre, la cual requiere de cuidados mínimos para su germinación y desarrollo, constituye una alternativa importante de comercio sostenible para aquellas comunidades, que cohabitan y disponen de este recurso biológico. (UNCTAD, 2005).

La comunidad se beneficia económicamente de la colecta del fruto, del cual se utiliza el pericarpio seco y leñoso para fabricar vasijas, instrumentos musicales y diversas artesanías. La pulpa del fruto tiene usos medicinales empíricos tales como: laxante drástico, febrífugo, emoliente y expectorante. Especialmente a la pulpa del fruto se le atribuyen muchas propiedades medicinales con la cual se prepara un jarabe expectorante (Patiño, 1967).

El desaprovechamiento de ésta planta no es más que la falta de apoyo de instituciones que promuevan el desarrollo sostenible en el país, que generen buenas posibilidades, que permitan conocer su potencial como recurso natural forestal, sus propiedades medicinales y además admita promover su comercialización.

Esta planta ha despertado gran interés en la investigación de sus compuestos, debido a la utilidad que tiene en la medicina tradicional, pues las comunidades la usan frente a problemas respiratorios propiciando una búsqueda de alternativas

frente al control de bacterias y hongos, siendo esta una de las mayores preocupaciones en la salud humana para el control de éstos patógenos, debido a su crecimiento exponencial y a la resistencia a antibióticos.

Debido al uso antibacterial y medicinal que estas comunidades le dan al fruto, es interesante estudiar un poco más de ésta planta, frente a otras dificultades a nivel mundial como es el caso de los problemas fitosanitarios limitantes de la producción de muchos cultivos, tales como el marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium*, el cual tiene mayor incidencia en regiones de clima cálido ocasionando grandes pérdidas económicas.

Debido a la importancia económica, ambiental y sanitaria de esta enfermedad, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el control de organismos patógenos que sustituyan el uso indiscriminado de fungicidas y productos químicos. Debido a que estos productos alteran la naturaleza del suelo, el agua el ambiente y por su puesto los cultivos. De ésta manera la búsqueda constituye una de las prioridades actuales en el manejo de cultivos y protección del ambiente.

En ese sentido, los productos naturales y los extractos de plantas demuestran efectos positivos, gracias a que estos poseen compuestos activos y proteínas antifúngicas que constituyen una respuesta fisiológica frente a patógenos, implicando el estudio de extractos naturales como una excelente alternativa para el control de organismos patógenos de interés agrícola.

En *Crescentia cujete* L., se ha evaluado actividad inhibitoria de los polifenoles, especialmente en bacterias gram positivas y gram negativas de interés clínico, encontrando resultados positivos para esta actividad.

También se ha evaluado la alelopatía del extracto de ésta planta frente a hongos de interés agronómico. De igual manera se ha estudiado la actividad anti

inflamatoria del extracto crudo de hojas, así como el efecto antiviral y anti tumoral frente a tejidos tumorales, encontrando resultados favorables para este problema.

Si bien en lo referente a proteínas se ha encontrado que la fruta contiene aproximadamente un 7.67% en peso seco (Ogbuagu, 2008), no se conoce qué tipo de proteínas contiene, así que esta investigación se realizó con el objetivo de aislar las proteínas del fruto de *Crescentia cujete* L., determinar su masa molecular y evaluar el posible efecto inhibitorio de la solución proteínica de ésta planta, frente al hongo de interés agronómico *Fusarium sp.*

MARCO TEORICO

1.1 UBICACIÓN TAXONÓMICA

Etimología: *Crescentia*, dedicado a Pietro Crescenzi, autor italiano de un trabajo sobre la naturaleza. Cujete, de su nombre popular nativo.

Sinonimia: *Crescentia acuminata* HBH, *Crescentia angustifolia* Willd. Ex Seem, *Crescentia arbórea* RAF., *Crescentia kujete* Linneo var. *Puberula* Bur. &k. Shum, *Crescentia cuneifolia* Gardner, *Crescentia fasciculata* Miers, *Crescentia ovata* N.L. Burm, *Crescentia plactantha* Miers., *Crescentia spatula* Miers. (Almenares, 2004)

Tabla 1. *Ubicación Taxonómica de *Crescentia kujete* L.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (Dic.)
Familia	Bignoniaceae
Genero	<i>Crescentia</i>
Especie:	<i>Crescentia kujete</i> L.
Nombres comunes:	Calabacero, Jícaro, totumo.

* (Garcia H. B., 1975)

El árbol tiene entre 8-10m de altura, posee una copa abierta subredondeada, emitiendo brotes alternos de hojas dispuestas en fascículos, las cuales son algo variables, normalmente obovadas, de 4-26 x 1-7 cm, con el ápice agudo u obtuso y la base atenuada, sin pecíolo. Su consistencia es algo dura y tienen el nervio central destacado, pudiendo ser pubescentes en el haz y el envés o más o menos glabras. Inflorescencias formadas por 1-2 flores caulifloras que aparecen a lo largo de las ramas o del tronco, sobre un pedúnculo pubescente de 1,5-3 cm de largo. Cáliz bilabiado, generalmente glabro; corola tubular-acampanada, amarillenta, pubescente, de unos 3-4,5 cm de diámetro, con nervios purpúreos en los lóbulos y líneas igualmente purpúreas en el tubo. Fruto de esférico a elíptico-ovoide, de 13-

20 cm de diámetro y hasta 30 cm de longitud, de corteza lisa y verdosa. Semillas pequeñas, de unos 7-8 mm de longitud (Gentry, 1973).

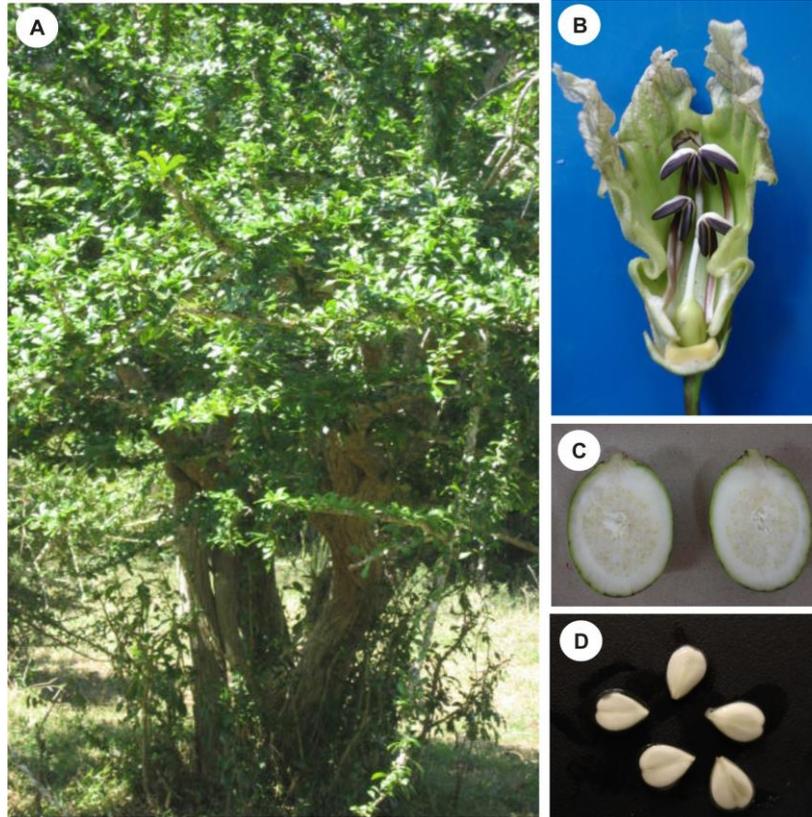


Figura 1. Fotografía **A:** árbol de totumo, **B.** flor con anteras, **C:** corte longitudinal del fruto inmaduro **D:** semillas. Fuente la autora.

1.2 DISTRIBUCIÓN

En Colombia *Crescentia cujete* L., se encuentra en los departamentos, de Amazonas, Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Casanare, Cauca, Chocó, Cundinamarca, Huila, Guajira, Magdalena, Meta, Nariño, Putumayo, Sucre, Tolima, San Andrés y Providencia y el Valle del Cauca, en las altitudes comprendidas entre 0 a 2,000 m sobre el nivel del mar. Es una especie ampliamente distribuida en zonas tropicales, se conocen seis especies silvestres, que van desde la Amazonía brasileña hasta México (Unctad, 2005)

1.3 USOS

Esta planta tiene una gran utilidad en las comunidades, en el municipio del Patía en donde utilizan los frutos pequeños en cocción para los problemas ováricos. “La pulpa madura calma dolores de cabeza, y las hojas, aplicadas sobre el vientre, facilitan el alumbramiento. Las semillas de totumo cocidas y asadas son un agradable alimento”. (Pérez, 1973)

En Colombia los frutos son empleados para curar enfermedades del sistema respiratorio para lo cual se usa la decocción de ésta. Dicha pulpa en jarabe cura el asma, las hojas y cogollos en forma de zumo o maceración, se emplean como tópico en las hemorragias y para facilitar la curación de úlceras rebeldes” (García B. , 1974)

1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Las plantas son seres vivos con magníficas propiedades y compuestos activos, de los cuales gran parte han sido identificados y evaluados; se dice que la mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en las hojas de las plantas, hierbas y especias, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, flavonoles, catequinas, antocianinas y poliflavonoides, se les reporta como responsables de los siguientes efectos biológicos: antibacterial, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Cook & samamn, 1996)

Estos efectos son de gran importancia económica para los laboratorios naturistas, debido a que representan mayores ventas a nivel mundial, así Europa y Norteamérica tienen un nivel importante en el comercio de material vegetal, en cuanto a exportación, importación, manejo de políticas y estrategias de mercado.

Según la conferencia realizada por la UNTAD sobre tratado y desarrollo (*Para la selección de ingredientes naturales derivados de especies nativas*), *Crescentia cujete* L., posee muchos compuestos activos que aún no han sido patentados (UNCTAD, 2005). Conforme a la encuesta nacional de plantas medicinales realizada por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”, *Crescentia cujete* L., está dentro de las especies con mayor volumen de venta y comercialización en laboratorios naturistas de Colombia (Arcos *et al.*, 2002); es decir es una planta con alto potencial de producción, cultivo y aprovechamiento, de allí la importancia de estudiar plantas y compuestos de interés con el fin de dar alternativas al sector agrícola.

Esta planta tiene gran importancia debido a que muchos de sus compuestos se han evaluado en bacterias principalmente que causan problemas respiratorios y en general en otras de interés clínico, encontrando resultados positivos de inhibición.

En *Crescentia cujete* L., se realizó un estudio cuyo propósito fue evaluar el efecto antibacteriano de los compuestos polifenólicos presentes en la pulpa de totumo frente a la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*, resultando que presenta un halo de inhibición de 8 a 11mm en concentraciones superiores a 2800 ppm de ácido gálico y que la actividad antibacteriana de los extractos probados están estrechamente relacionados con el contenido de sustancias polifenólicas (Benitez *et al.*, 2004).

De igual manera se evaluaron las propiedades antibacteriales de plantas tropicales, entre ellas *Crescentia cujete* L., obteniendo como resultado que bacterias gram negativas (*Alcaligenes fecalis*, *Pseudomonas fluorescens*) y gram positivas (*Arthrobacter globiformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus roseus*, *Mycobacterium phei*, *Mycobacterium rodochrus*,

Mycobacterium smegmatis) fueron susceptibles al extracto metanólico de las hojas de ésta planta (Melendez y Capriles, 2006).

En otros estudios se reportan entre los principales componentes de esta planta los derivados flavonoides como la apigenina y la quercetina, de posible efecto en la actividad anti-inflamatoria del extracto etanólico de las hojas (Almenares, 2004).

Igualmente se ha encontrado que la pulpa del fruto de *Crescentia cujete* L., contiene ácido crescéntico, tartárico, cianhídrico, cítrico, tánico, alcaloides cuaternarios y polifenoles. Además, según (Almenares, 2004), se reporta la presencia de lapachona, ácido gentsico y 1,4-naftoquinona, 2-(1-hidroxiethyl), hidroxifurano. Otros ácidos (clorgénico, cítrico) han sido reportados, se dice que es llamado "Mataganados" debido a la altísima concentración de HCN que posee.

De los escasos estudios químicos y farmacológicos realizados dentro del mismo género *Crescentia*, se conoce que "el extracto crudo de polaridad intermedia del fruto inhibe el desarrollo microbiano de bacterias gram-positivas representativas de infecciones respiratorias" (Rojas, 2001) y de las hojas se han aislado derivados de flavanoles que muestran actividad anti-inflamatoria en un modelo *in vivo* (Autore *et al.*, 2001).

Otros estudios efectuados acerca de la actividad anti-tumoral y antiviral de extractos de plantas medicinales de Colombia, evalúan el extracto acuoso del fruto de *C. cujete*, el cual arroja un resultado de CC₅₀ 20.4 (µg/ml). Donde CC₅₀ corresponde al 50% de concentración citotóxica en células de riñón de bovino (MDBK línea celular no. ATCC CCL22) y células humanas carcinoma de laringe (HEp-2 línea celular no. ATCC CCL23). (Betancur *et al.*, 1999)

Mediante espectroscopía y métodos químicos se describieron nuevos compuestos en los frutos de *C. cujete*, entre ellos cuatro conocidos: acantosido D,

β -D-glucopiranosil benzoato, (R)-1-O- β -D-glucopiranosil-1,3- octanediol, y β -D-fructofuranosil 6-O-(p-hidroxibenzoil) - α -D- Glucopiranosido. La estructura de los nuevos glicosidos se establecieron como tres glicósidos de (2R, 4S)-2,4-pentanediol, y dos glicósidos de (R)-4-hidroxi-2-pentanone, dos glicósidos de (R)-1,3-octanediol y 6-O-(p-hidroxibenzoil)-D-glucosa (Kaneko *et al.*, 1998).

El fruto de *Crescentia cujete* L., contiene 15.65% de carbohidratos en peso fresco y el 68.1% en peso seco. Minerales sodio, potasio, calcio, fósforo y magnesio. También se encuentran trazas de vitaminas tales como A, C, E tiamina, rivo flavina y niacina. Dentro de los compuestos fitoquímicos contiene alcaloides, flavonoides, saponinas, HCN, taninos y fenoles. (Ogbuagu, 2008).

No se han reportado estudios de la actividad biológica de éstos compuestos frente a hongos, en lo referente a proteínas solo se conoce que contiene el 7.67 % (Ogbuagu, 2008), pero no hay estudios sobre su evaluación frente a organismos patógenos.

Tabla 2. Compuestos encontrados en *Crescentia cujete* L.

<i>C. cujete</i>	Compuesto	Actividad	Autor	
Hojas	Flavonoides	Antibacterial, Antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador	(Cook & samamn, 1996)	
	Polifenoles	Antibacterial Gram (-) y Gram (+)	(Benitez <i>et al.</i> , 2004)	
	Extracto metanólico		(Melendez y Capriles, 2006)	
	Derivados de apigenina y quercetina	Antiinflamatorio	(Almenares, 2004)	
	fruto	Acido crescéntico, tartárico y cianhídrico,	No evaluado	
		Extracto acuoso	Antitumoral y antiviral	(Betancur <i>et al.</i> , 1999)
		Glucósidos	No evaluado	(Kaneko <i>et al.</i> , 1998)
	Carbohidratos, minerales, vitaminas (A, C, E tiamina y rivo flavina) y Proteínas.	Alimento animales	(Ogbuagu, 2008)	

2. PROTEINAS

Las proteínas son grandes moléculas cuya carga neta depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos a un pH determinado.

2.1 Clasificación según función, localización en la célula, modificación posttranslacional, organización estructural y solubilidad.

Usualmente se llama péptidos a estructuras de 2 a 100 aminoácidos con peso molecular de 10 KDa y largas estructuras polipeptídicas son clasificadas como proteínas. Estas se clasifican según sus funciones, su localización en la célula, su modificación posttranslacional, según su organización estructural y solubilidad (Minor y Otwinowski , 2004).

Clasificación según sus funciones. Las proteínas son responsables de muchas funciones diferentes en la célula y según estas funciones se denominan:

Enzimas: Son aquellas que catalizan químicos y aquellas reacciones bioquímicas dentro de la célula y fuera de ella. Este grupo es uno de los más grandes y probablemente el más importante. Las enzimas son responsables de todas las reacciones metabólicas en la célula. Ej. RNA Polimerasas, deshidrogenasas etc.

Hormonas: Son proteínas responsables de la regulación de muchos procesos en los organismos. Son usualmente pequeñas y pueden ser clasificadas como péptidos, las más conocidas son: la insulina, prolactina entre otras.

Proteínas transportadoras: Estas proteínas son transportadoras o almacenadoras de algunos químicos, compuestos e iones conocidos como: Citocromo C -

transporte de electrones; hemoglobina y mioglobina - transporte de oxígeno; albúmina-transportadoras de ácidos grasos en sistema sanguíneo.

Inmunoglobulinas o Anticuerpos: Son aquellas proteínas de la respuesta inmune de los organismos encargadas de neutralizar moléculas extrañas debidas a infecciones. Algunos anticuerpos a veces actúan como enzimas. A veces este grupo de proteínas es considerado como el grupo más grande de las proteínas de protección con la adición de proteínas tales como receptores de reconocimiento de antígenos de linfocitos, los agentes antivirales como el interferón y factor de necrosis tumoral (TNF). También deben ser clasificados como proteínas de protección, probablemente proteínas implicadas en la coagulación de la sangre, como la fibrina y la trombina

Las proteínas estructurales: Estas proteínas mantienen las estructuras de otros componentes biológicos, como las células y los tejidos. El colágeno, la elastina, α -queratina, esclerotina, fibroína - estas proteínas están implicadas en el soporte mecánico de células y organismos. Los proteoglicanos son proteínas que recubren bacterias y virus.

Las proteínas del citoesqueleto: Estas proteínas pueden convertir la energía química en energía mecánica. La actina y la miosina son responsables del movimiento muscular.

Receptores: Estas proteínas son responsables de la detección de señales y la transducción a otro tipo de señal. A veces, estas proteínas se activan sólo en complejos de compuestos de bajo peso molecular. Pertenecen a ésta familia de proteínas: rodopsina. Muchos de los receptores son proteínas transmembrana.

Las proteínas de señalización: Este grupo de proteínas está implicada en la señalización del proceso de transducción. Por lo general, modifican de forma

significativa la conformación de la presencia de algunas moléculas de señalización. Estas proteínas pueden actuar como enzimas. Otras proteínas, por lo general pequeñas, pueden interactuar con los receptores. Ejemplo grupo de proteínas GTP asas.

Las proteínas de almacenamiento: Estas proteínas contienen la energía, que puede ser liberada en los procesos de metabolismo en el organismo. Ej. La ovoalbúmina de huevo y la caseína de la leche. Casi todas las proteínas pueden ser digeridas y se utiliza como fuente de energía y material de construcción por otros organismos (Minor y Otwinowski , 2004).

Clasificación de las proteínas según localización en la célula. La clasificación de proteínas puede basarse en su aparición en la célula viva. De acuerdo con esto, es posible clasificar todas las proteínas en cuatro grupos principales.

Proteínas transmembranales: Se encuentran dentro de la bicapa de lípidos de la membrana celular. Pueden estar completa o parcialmente inmersas en la membrana.

Proteínas internas: Estas proteínas se encuentran dentro de la célula y todas las funciones están relacionadas con las necesidades de intercelulares.

Factores externos o Proteínas secretoras: tienen funciones fuera de la célula. Tal tipo de proteínas es más común para los organismos multicelulares.

Las proteínas de virus: son propias de virus (ADN o ARN de cadena doble o simple) y los recubren una capa proteica o cápside. (Minor y Otwinowski , 2004)

Clasificación de las proteínas mediante la modificación posttranslacional. Después de la traducción de proteínas algunas de ellas están sujetas a

modificaciones post transduccionales. Esta modificación puede estar relacionada en muchos aspectos con diferentes cambios.

Las proteínas nativas: Estas proteínas no cambian después de la traducción.

Glicoproteínas: Estas proteínas son modificadas por unión covalente con oligosacáridos lineales o ramificados.

Proteínas fraccionadas: la cadena de polipéptidos de estas proteínas se separa en dos o más piezas.

Proteínas con enlaces de disulfuro: En estas proteínas las cisteínas están unidas entre sí por enlace disulfuro S-S o (puente disulfuro).

Complejos de proteínas. Algunas proteínas producen complejos hemo con un Fe^{+2} en el centro que se combina con el oxígeno (O_2) y en el caso de citocromos C. Ej. Ferroporina el grupo hemo es Fe^{3+} .

Modificación química de las proteínas: las proteínas de algunos residuos son modificados químicamente por enlaces covalentes con otros compuestos químicos.

Los priones: Estas proteínas se pliegan incorrectamente durante la traducción, o cambian su configuración inmediatamente después de la traducción Ej. PrPsc (responsable de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) que coexiste con la anterior pero su modo de plegamiento es diferente, la torna inmune a las proteasas (enzimas encargadas de desarmar las proteínas) y su acumulación causa, finalmente, la degeneración de la neurona y su destrucción final. (Minor y Otwinowski , 2004)

Organización estructural de las proteínas. La organización estructural de la proteína se divide en cuatro niveles:

La estructura primaria o secuencia de proteínas: La secuencia de la proteína, o la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica define la estructura primaria de proteínas. De ADN (o RNA en los virus) los códigos de la estructura de la proteína primaria contienen información general para la estructura y función.

Estructura secundaria: Se refiere a la estructura bidimensional formada por el plegamiento de la estructura primaria estabilizada por interacciones débiles.

La estructura ternaria: Estructura 3D de proteínas o el plegamiento de proteínas. Estructura ternaria define completamente la organización estructural de la molécula de proteína en 3D.

Estructura cuaternaria: La estructura cuaternaria es el nivel de organización en el cual las unidades de proteínas en su estado ya plegado, es decir con su estructura terciaria se agregan para formar homo o hetero multímeros. (Minor y Otwinowski , 2004)

Clasificación física. El criterio físico más utilizado es la solubilidad:

Albúminas: proteínas que son solubles en agua o en disoluciones salinas diluidas.

Globulinas: requieren concentraciones salinas más elevadas para permanecer en disolución.

Prolaminas: solubles en alcohol.

Gutelinas: sólo se disuelven en disoluciones ácidas o básicas

Escleroproteínas: son insolubles en la gran mayoría de los disolventes. (Hernandez, 2004)

2.2 Proteínas antifúngicas

Las plantas tienen una amplia gama de parásitos, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos, insectos e incluso otras plantas. En respuesta a esta presión, las plantas producen compuestos antimicrobiales de bajo peso molecular, llamados fitoalexinas, péptidos antimicrobiales y pequeñas proteínas Ej. Tioninas, defensinas y UP reguladores de proteínas antimicrobiales. Estas son llamadas proteínas relacionadas a patógenos (PR) y a su vez han sido clasificadas en cinco grupos, PR 1-2-3-4-5, basados en el análisis de la secuencia de aminoácido. (Selitrennikoff, 2001)

2.2.1 Proteínas PR-1: las proteínas PR-1 aumentan sus niveles después de la infección del patógeno, se encuentran en plantas transgénicas como en el tabaco e *in vitro*. PR-1 se han encontrado las proteínas en arroz, trigo, maíz, tabaco, *Arabidopsis thaliana* cebada y muchas otras plantas. Las proteínas PR-1 tienen la actividad antifúngica contra hongos, *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans* y *Erysiphe graminis*. Con masas moleculares entre 15-17KDa. Aunque su mecanismo de acción no es conocido, se dice que posiblemente interactúa con los canales de membrana inhibiendo el funcionamiento del Ca^{+2} . (Selitrennikoff, 2001)

2.2.2 Proteínas PR-2 (β -glucanasas): Estas proteínas tienen (1,3) β -endoglucanasas, se ha agrupado en tres clases en base al análisis de aminoácidos, la clase I las glucanasas son proteínas básicas de 33 kDa y se encuentra en la vacuola de la planta. Las clases II y III tienen ácidos y son proteínas extracelulares de aproximadamente 36 kDa. La diferencia entre las proteínas de la clase I respecto de las otras, es que las de clase I, son sintetizadas como pre proteínas que son procesadas antes de ser enzimáticamente activas. Las proteínas PR-2 hidrolizan el (1,3) β glucano presente en la pared celular fúngica, particularmente en el ápice de la hifa donde el glucano está más expuesto. Esto debilita la pared celular provocando lisis celular y muerte. Estas se

han encontrado en el tabaco, *Arabidopsis thaliana*, guisantes, granos y frutas. Son activas *in vitro* a niveles micro molares (50 mg/ml) frente a hongos tanto en humanos como en de plantas *Rhizoctonia solani*, *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus*. (Selitrennikoff, 2001)

2.2.3 Proteínas PR-3 (quitinasas): Ensayos enzimáticos han demostrado que las proteínas PR-3 tienen actividad quitinasa *in vitro*. La mayoría tienen los pesos moleculares entre 26 y 43 kDa. Las Quitinasas han sido divididas en cinco grupos. Las quitinasas Clase I son ricas en cisteína, tienen un N-terminal, tienen dominios de 40 aminoácidos, masa molecular de 32 KDa. Las proteínas Clase II son similares a la Clase I en la secuencia de aminoácidos, pero les falta el dominio rico en cisteína y N-terminal y tienen masas moleculares de 27 a 28 kDa. Las proteínas de la Clase IV se parecen a las de la Clase I, pero son significativamente más pequeñas debido a cuatro deleciones. Las quitinasas Clase III no comparten la sucesión de aminoácidos de ninguna de las otras clases y tiene masas moleculares de 28 a 30KDa. Las quitinasas Clase V muestran similitudes en la secuencia. Similares a las exoquininas bacteriales y tiene pesos moleculares de 41 a 43 kDa (Selitrennikoff, 2001).

Se han aislado quinasas de hongos, plantas (el tabaco, pepino, frijoles, guisantes, granos entre otras) y bacterias, y tienen potente actividad antifúngica contra una gran variedad de patógenos de plantas, incluyendo *Trichoderma reesei*, *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Fusarium oxysporum*, *R. solani*, *Guignardia bidwellii*, *Botrytis cinerea*, y *Coprinus comatu*. Estas proteínas poseen endoquitinasas que se anclan a los polímeros de quitina de la pared celular, debilitándola y afectándola osmóticamente inhibiendo el crecimiento del hongo. (Selitrennikoff, 2001).

2.2.4 Proteínas PR-4 (bandas de quitina): Las proteínas PR-4 tienen bandas de quitina y sus masas moleculares son de 13 a 14.5 kDa. Estas han sido clasificadas en dos grupos. Las proteínas de la Clase I, tienen semejanzas a un

polipéptido en la secuencia de aminoácido. Este polipéptido pertenece a las lectinas. Las proteínas de la Clase II carece de dominios con bandas de quitina. Las proteínas PR-4 se han aislado de la papa, tabaco, cebada, tomate, y muchas otras. Ambas clases tienen actividad contra *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, y *B. cinérea*. La actividad antifúngica de la clase I actúa despolarizando la membrana de la pared celular del hongo inhibiendo el crecimiento debido a la interrupción de la β -quitina. El mecanismo de acción de las proteínas de la clase II aún no es conocido (Selitrennikoff, 2001).

2.2.5 Proteínas PR-5 (TL): Las proteínas PR-5 son conocidas como proteínas TL, éstas han sido aisladas de *A. thaliana*, maíz, soya, arroz, trigo, tabaco, tomate, calabaza, frijoles, cebada y muchas otras plantas. La mayoría de las proteínas PR-5 tienen masas moleculares de aproximadamente 22 kDa y son estabilizadas por ocho bandas disulfuro. Esta estructura le permite ser resistente a la degradación por proteasas. Su actividad fungicida no está muy clara aún, sin embargo se cree que las proteínas TL alteran la permeabilidad de la membrana.

2.2.6 Defensinas: Defensinas son un grupo diverso de proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína- encontradas en los mamíferos, hongos, insectos y plantas. Las defensinas de Insectos y mamíferos son bastante pequeñas de 3 a 5 kDa. Las Tioninas son también pequeñas de 3 a 5 kDa tienen péptidos ricos en cisteína y son tóxicos para los hongos. Las defensinas se clasifican en cuatro grupos. El grupo I son defensinas que causan cambios morfológicos en hongos susceptibles y son conocidas como defensinas morfogénicas, las proteínas del grupo II inhiben el crecimiento fúngico, pero no causan cambios morfológicos, El grupo III son inactivas contra los hongos probados, pero inhiben amilasas *in vitro*, El grupo IV son propios de la estructura antifúngica específica (Selitrennikoff, 2001).

2.2.7 Proteínas similares a Ciclofilinas: Estas proteínas son receptores intracelulares de ciclosporina, que se encuentran en una variedad de organismos, bacterias, plantas, animales y hongos. Recientemente una proteína de 18-kDa se aisló del frijol (*Phaseolus mungo*) con actividad contra el *R. solani*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *Coprinus comatus*. Esta proteína, muestra homología al las ciclofilinas e inhiben α - β - glucosidasas *in vitro* (Selitrennikoff, 2001).

2.2.8 Proteínas ricas Glicina/histidina: Los insectos sintetizan un número de proteínas antifúngicas ricas en glicina e histidina y polipéptidos. Inhiben hongos como *C. albicans* y patógeno humanos. El mecanismo de la acción de estas proteínas no se entiende (Selitrennikoff, 2001).

2.2.9 RIPs: Son RNA N-glicosidasas que depuran rRNA, provocando disminución de síntesis de proteínas debido al daño en los ribosomas. Los RIPs de las Plantas inhiben rRNA bacteriano, fúngico, y en si mismas la síntesis de proteínas *in vivo* e *in vitro*. Es muy interesante para la investigación saber cómo las plantas se protegen de la acción de sus propias RIPs. Estas han sido clasificadas en tres Tipos. Tipo1 tienen una solo cadena N-glicosidasa y pesos moleculares de 11 a 30 kDa. Los RIPs Tipo 2 contienen dos cadenas, la cadena B tiene una banda de lectina y en la cadena A una N-glicosidasa y tiene pesos moleculares de 60 kDa. Los RIPs Tipo 3 consisten en cuatro cadenas organizadas en dos dímeros como los del tipo 2. Los RIPs se han aislados de plantas *Mirabilis expansa*, *Pisum sativum*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis*, *Viscum* entre otras. Los RIPs Tipo 1 y 2 tienen actividad contra varios hongos patógenos de humanos, plantas y son toxicas para células de mamífero (Selitrennikoff, 2001).

2.2.10 LTPs: Los LTPs tienen la función de transferir los fosfolípidos entre las membranas. Los LTPs son proteínas pequeñas de 8.7 kDa y 90 aminoácidos estabilizados por cuatro bandas disulfuro con un canal central similar a una cavidad hidrofóbica. Se han aislado de varias fuentes incluso de mamíferos,

plantas, hongos, y bacterias y pueden desempeñar varias actividades, incluso intercambio de lípidos entre el citoplasma y organelos, tienen actividad de defensa contra bacterias y hongos; sin embargo, el mecanismo de acción no es conocido.

2.2.11 Proteínas letales (toxinas letales): Varias levaduras secretan proteínas que son letales para las células fúngicas. Estas proteínas son codificadas por doble cadena de ARN, doble cadena de ADN linear en plásmidos o genes nucleares. *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Phaffiarhodozyma*, *Kluveromyces lactis*, y varias especies de *Pichia* secretan proteínas letales. Estas tienen pesos moleculares de 10.7 a 156.5 kDa. Aunque hay varios mecanismos de acción, el primer paso de actividad es cuando la proteína se une al ligando del receptor específico. Una vez se internaliza bloquea la síntesis de ADN e inactiva los canales de potasio K⁺, inhibe la síntesis (1,3) β-glucan, o detiene el ciclo celular. Cualquiera que sea, causa la inhibición del crecimiento del hongo y a la muerte celular del mismo (Selitrennikoff, 2001).

2.2.12 Inhibidores de Proteasas: Las proteínas inhibidoras de serinas (tripsina y quimiotripsina) y cisteína-proteasas han surgido como una clase de proteínas que tienen potente actividad antifúngica contra patógenos de plantas y animales. Los inhibidores de proteasa tienen interesantes propiedades de inhibición contra α-amilasas de insectos, pero no para bacterias y mamíferos (Selitrennikoff, 2001).

2.2.13 Otras proteínas: Se están descubriendo nuevas proteínas que tienen actividad antifúngica pero no entran en cualquiera de las clases anteriores. Una reciente proteína llamada Viridina, se aisló del medio de la cultivo de *Trichoderma viride* tiene un peso molecular de 65 kDa. Snakin-1 aislada de la papa tiene un peso molecular de 6.9 kDa. Se aisló una proteína de 30-kDa con actividad antifúngica muy potente (50 ng/disk en un ensayo de difusión de agar) se aisló de *Engelmannia pinnatifida* (Selitrennikoff, 2001).

3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE AGENTES ANTI FÚNGICOS

Griseofulvin

El mecanismo preciso de acción de este compuesto todavía es desconocido, pero se dice que interfiere con el ensamble de microtúbulos. Su espectro de acción está restringido a hongos que atacan la piel tales como *Cryptococcus neoformans* (Odds *et al.*, 2003).

Flucitosina: 5- fluorucitosina trabaja como un agente antifúngico mediante la conversión a 5-Fluorouracil, éste se incorpora en ARN, causando cambios prematuros en la terminación de la cadena, e inhibe la síntesis de ADN debido a los efectos sobre timidilasa sintasa. Para este mecanismo de acción, estos agentes deben poseer citocin-permeasas para internalizar la molécula del flucitosina, desaminasas para convertirlo a 5-fluorouracil y uracil fosforibosil transferasas para convertir 5-fluorouracil en un substrato para la síntesis de ácidos nucleicos (Odds *et al.*, 2003).

Amfotericina B: Durante muchos años ha sido el único antifúngico que puede administrarse sistémicamente para tratar una infección visceral. Su modo de acción es atípico para una molécula antimicrobial: en lugar de inhibir una enzima, se liga al ergosterol, el esteroles principal en la membrana fúngica, perturbando la función de la membrana, causando filtrado de contenidos celulares. Causa nefrotoxicidad a las células de mamíferos (Odds *et al.*, 2003).

Azoles: Imidazoles y triazoles son la clase más grande de agentes antifúngicos en el uso clínico. Su principal efecto es inhibir 14 α -dimetilación de lanosterol en la biosíntesis de ergosterol, pero en algunas especies fúngicas, también pueden inhibir los siguientes pasos de saturación delta. Disminuyendo el ergosterol y reemplazándolo por esteroides, por lo tanto la permeabilidad normal, y la fluidez de la membrana fúngica es alterada presentando consecuencias secundarias para la

membrana limitándola de enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular (Odds *et al.*, 2003).

Otros Triazoles: Voriconazole que es el primero que se aprobó y hasta ahora el más caracterizado posee un espectro muy amplio de especies a las cuales inhibe. El itraconazol, incluso es fungicida contra algunas especies filamentosas. Además, presenta actividad contra *Fusarium* y *Scedosporium* (Odds *et al.*, 2003).

Equinocandinas: son los metabolitos secundarios fúngicos comprende un hexapéptido cíclico con un lípido responsable de la actividad antifúngica. En 1990s, tres compuestos de equinocandinas, el anidulafúngico, caspofúngico y micafúngico. El blanco para el equinocandinas es el complejo de proteínas responsable de la síntesis de pared celular de β -1,3 glucano polisacárido. En *S. cerevisiae* de donde el complejo de la enzima se ha estudiado mejor, dos proteínas (Fks1p y Fks2p) son reguladas por GTP, el péptido y Rho1p (Odds *et al.*, 2003).

Oxatin

El fungicida sistémico carboxin (5,6-dihidro-2-metil-1-4-oxatin-3-carboxanilido), es uno de los componentes activos del Vitavax, el carboxin al parecer es un inhibidor del complejo II del sistema de transporte de electrones, en varios organismos, incluyendo hongos (*Saccharomyces cerevisiae*), plantas (*Phaseolus vulgaris*) y animales actúan específicamente inhibiendo el succinato - citocromo c reductasa, complejo clave de la respiración mitocondrial, por lo tanto altera el funcionamiento celular del organismo y por ende su crecimiento.

4. METODOS PARA EL ANALISIS DE PROTEINAS

4.1 Método de Bradford: Este método es exacto y rápido, se recomienda para uso general, especialmente para determinación del contenido de proteínas de fracciones celulares y concentraciones de proteína para electroforesis. El ensayo se basa en la observación del máximo de Absorbancia para una solución acida de azul brillante de Coomasie G-250, el cual cambia desde 465 a 595nm cuando se une a proteínas. Las interacciones iónicas e hidrofóbicas estabilizan la forma aniónica del colorante, produciendo un cambio visible de color. El ensayo es útil a partir del coeficiente de extinción de una solución del complejo albúmina-colorante, el cual es constante por encima de un intervalo diez veces más concentrado (Bradford, 1976).

4.2 ELECTROFORESIS SDS PAGE: La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia Dodecil Sulfato de Sodio bajo condiciones reductoras, es un método rápido, reproducible y de bajo costo ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Se trata de una técnica analítica semipreparativa en el que se separan biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico.

La disolución de proteínas que se analiza se mezcla en primer lugar con SDS, un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria (pero sin alterar los enlaces disulfuro) y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa.

Al aplicar un campo eléctrico a la muestra, el complejo proteína-SDS migrará hacia el polo positivo y se separará según su tamaño ya que se produce pérdida de la estructura terciaria y secundaria de las proteínas, generándose tantas cadenas polipeptídicas como posea la proteína. Los polipéptidos de menor peso molecular, migrarán más rápido, mientras que aquellos de alto peso lo harán más lentamente (Laemmli, 1970).

Las proteínas separadas en el gel de Bis-acrilamida pueden ser visualizadas a través de métodos de tinción, utilizando moléculas afines a las proteínas, tal como el azul de Coomassie.

Esta es una de las técnicas mas utilizadas para el análisis de proteínas debido a:

- La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- Todos los complejos SDS- proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto en el mismo sentido.
- Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- La separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, que se puede calcular.
- Los complejos SDS- proteína se tiñen fácilmente (Bollag D.M *et al.*, 1994).

5. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO FUSARIUM

Tabla 3. Taxonomía de *Fusarium*.

División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Euascmycetes</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Hypocreaceae</i>
Genero	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> , etc.

(Monzón y Rodríguez, 1999).

Los hongos del género *Fusarium* son muy abundantes en las zonas tropicales y templadas del mundo. Además este género es uno de los más agresivos para diversas plantas cultivadas, ocasionando distintos tipos de enfermedades, tales como manchas en las hojas, pudrición de raíces y de la base del tallo, cánceres de las plantas, muerte descendente, pudrición de frutos y marchitamientos vasculares. También presenta especies que ocasionan enfermedades en el hombre y en los animales y algunas son productoras de toxinas (Atarraya, 2007).

Fusarium oxysporum está entre las especies más abundantes, cosmopolitas y complejas pues tiene más de cien formas especiales caracterizadas por su alta especificidad en las plantas hospedantes que afecta. En lo que concierne a su especificidad, existen varias discusiones acerca de que una cepa o una especie contamine varios cultivos; existen trabajos en los que se ha obtenido como resultado que el *Fusarium* específico que ataca al frijol (*Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli*) infecta al clavel y al rábano, pero lo infectan otras formas especiales, con un porcentaje de infestación del 20 y 47% respectivamente (Atarraya, 2007).

F. Oxysporum es un patógeno de amplio espectro y aunque tiene formas articulares especializadas a distintos cultivos, tiene la capacidad de mutar y de volverse patógeno a otros cultivos cuando entran en contacto con ellos. Cambios en las condiciones ecológicas pueden variar la fisiología del hongo incrementando su patogenicidad. Cabe añadir que los estudios que se han hecho en Estados Unidos han sido a nivel de laboratorio y no se puede predecir con exactitud su comportamiento en condiciones naturales en el ecosistema (Atarraya, 2007).b

Se sabe que los hongos filamentosos representan un problema a nivel mundial, muchas especies del género *Fusarium* son patógenos destructores de plantas y son los responsables de enormes pérdidas de cultivos agrícolas en el mundo (Edwards, 2004). Debido a que los hongos son cada vez más resistentes, la utilización de agroquímicos sintéticos como insecticidas, bactericidas y fungicidas continúan siendo los más importantes para el control de agentes patógenos, sin embargo, la utilización masiva y a veces indiscriminada de estos productos ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes, con lo que hay un aumento significativo de los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental. Esto ha llevado a investigadores a buscar alternativas naturales para la protección de los cultivos (Bernal *et al.*, 2005).

5.1 Estudios de inhibición realizados en *Fusarium*

Los extractos y compuestos naturales han sido una alternativa para el control de *Fusarium*, con el extracto de la semilla de *Citrus paradisi* (Citrex) se evaluó el efecto sobre la marchitez causada por *Fusarium* en tomate. Para la evaluación utilizaron cinco tratamientos: inmersión de raíces de plantas en la solución de Citrex antes del trasplante, aplicación semanal al follaje; aplicación semanal al suelo; aplicación semanal al suelo y al follaje; e inmersión de raíces de plantas al trasplante más la aplicación semanal al suelo. La inmersión de raíces de plantas en la solución de Citrex mas la aplicación semanal al suelo logro reducir la marchites en un 85%, seguido por la aplicación combinada al suelo y al follaje con un 64% de reducción.

La aplicación de Citrex al follaje o al suelo ocasionó una reducción del 42%. Los resultados concluyen la posibilidad de controlar patógenos del suelo con el uso del extracto de semilla de *Citrus paradisi* (Citrex) (Rodríguez y Montilla, 2002).

Bernal realizó un estudio sobre la “Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus spp.* Sobre hongos fitopatógenos”, en el cual de las tres especies evaluadas (*L. rotundiflorus*, *L. exaltatus* y *L. montanus*), los alcaloides de *Lupinus axaltatus* mostraron inhibición contra los cuatro hongos evaluados (*Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxisporum*.) mostrando una inhibición significativa contra *F. oxisporum* (84%) a una concentración de 20,000 ppm (Bernal *et al.*, 2005).

Otro estudio evaluó la actividad fungicida de extractos alcohólicos al 6% con polvo vegetal seco (tallos y hojas), de 14 plantas silvestres sobre las especies de hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium poae* y *Fusarium moniliforme*. Los hongos del género *Fusarium* fueron los más sensibles a los extractos de *L. tridentata*, *B. glutinosa* y *D. discolor*, ya que con ellos lograron la total inhibición del crecimiento (100%). En general, se concluyó que los extractos de la planta *L. tridentata* causaron el mejor efecto fungicida ya que a la mayoría de los hongos en ese estudio, con excepción de *A. niger*, les afectó su crecimiento en más del 50%. (Taquida *et al.*, 2002)

6. METODOLOGIA

Materia prima: Los frutos de totumo se colectaron en el departamento del Cauca. El Bordo municipio del Patía, ubicación del sitio de colecta (N: 01° 54.132' W: 77°06.582') se seleccionaron frutos en estado de madurez. (Figura 2A). Para el estudio se empleó pulpa fresca, la cual se colocó en los recipientes del liofilizador Freeze Dryer 4.5 Labconco (Figura 3A), se dejó por tres días, éste equipo seca al vacío extrayendo toda el agua de la muestra, por lo tanto al tercer día se pulverizó y se paso por un tamiz estándar N. 80, abertura en micrómetros 50 μm , y se almacenó en un desecador Movilax para el siguiente proceso. (Figura 3B).

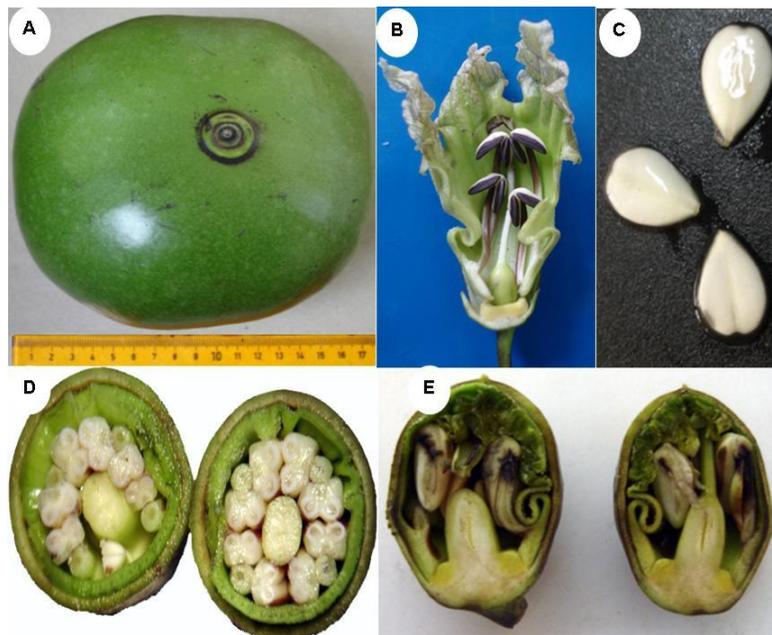


Figura 2. Fotografías de *Crescentia cujete* L.: **A.** Fruto maduro; **B.** Flor; **C.** Semillas, **D.** Corte transversal del botón floral; **E.** Corte longitudinal de botón floral. Fuente la autora.

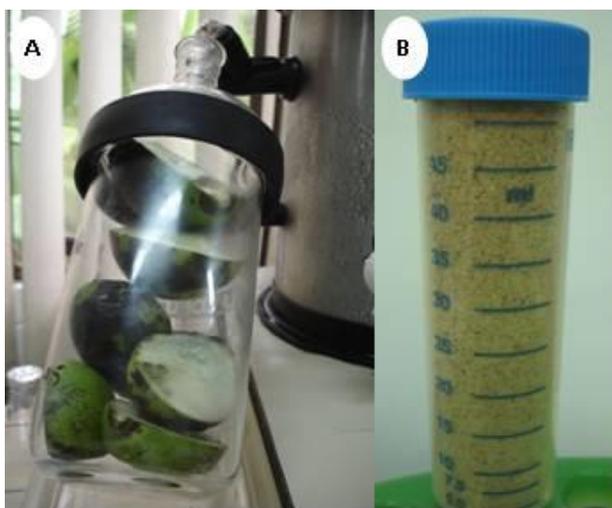


Figura 3: **A.** Fruto de Totumo en el liofilizador; **B.** Muestra liofilizada y tamizada. Fuente la autora.

6.1 Aislamiento y purificación de proteínas

Según el método descrito por (Llewellyn, 1997) con algunas modificaciones, el material (92g) previamente seco y tamizado se colocó en un balón de fondo redondo, se adicionó 4 volúmenes de metanol y se dejó en agitación por una hora en cabina de flujo laminar vertical marca Labconco, luego se agregó 1 volumen de cloroformo y se dejó nuevamente en agitación por una hora, y posteriormente se adicionó 3 volúmenes de agua, se licuó por 5 minutos. Este homogenizado se transfirió a tubos de nalgene y se precipitó en una centrífuga Equiment company modelo IECB-22M con refrigeración programable durante 5 minutos a 150000 xg, las proteínas quedaron en la interfase líquida.

Cromatografía de tamiz molecular: Siguiendo el método descrito por (Riaño y Zamora, 2005) y para una mejor separación se colocó esta interfase líquida de proteínas (25 mL) en una columna empacada con 0.2mg de Sephadex G-25, y se eluyó con amortiguador fosfato de sodio 50Mm pH 6.0, obteniendo

aproximadamente 18 mL de filtrado final. De este filtrado de proteínas se tomó 2 mL y se confirmó mediante una lectura en el Espectrofotómetro Marca espectral Modelos Genesys 5 a una longitud de onda de 275-290nm.

Extracción de Polifenoles: La extracción de polifenoles se realizó por el método descrito por (Sripad y Narasinga, 1982). Se preparó agua caliente, acetato de etilo, etanol, ácido acético glacial en proporción 1:10(p/v), se ajustó el pH a 8.0 con HCL y se colocaron los extractos sólidos de proteínas por separado de las distintas extracciones, ácido acético, etanol y ácido acético glacial. Las distintas extracciones se colocaron en balones de fondo redondo con agitador magnético durante 30 min y se trasvasaron a tubos nalgene para centrifugar a 18.000 rpm durante 5 min. Se realizaron varios cambios hasta cuando el sobrenadante fue claro.

Precipitación de Proteínas: Utilizando el método descrito por (Riaño y Zamora, 2005), se realizó la precipitación de proteínas. Se unieron los anteriores residuos y se agregó 20mL sulfato de amonio al 30%, se agitó toda la noche en un balón de fondo redondo a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 18000 rpm, se resuspendió el sobrenadante en un tubo falcon y se rotuló (SA 30%). El botón se transfirió a un tubo falcon y se rotuló (Botón SA 30%). Al sobrenadante SA 30% se adicionó 20mL sulfato de amonio al 70%, en un balón de fondo redondo se agitó por 12h a 4°C. Posteriormente se pasó la muestra a tubos nalgene y se centrifugó a 18000 rpm, el sobrenadante se resuspendió en un tubo falcon y se rotuló (SA 70%), el botón se transfirió a un tubo falcon y se rotuló (Botón SA 70%). Los Botones SA 30%, SA 70%, fueron dializados contra agua por 12h para eliminar la sal.

Se realizaron varios lavados con NaClO (Peso molecular: 164.53g/mol) 1%, se centrifugó, se decantó y luego se lavaron los botones cuatro veces con agua destilada estéril. Los botones se liofilizaron en un equipo Freeze dryer 4.5 Labconco, cuando se secaron se pesaron las fracciones proteínas y se trasvasó a

un tubo falcon (12mL) limpio y estéril para ensayos en *Fusarium sp* y también se pesó en dos tubos ependorf (10mg) para electroforesis. Todo este procedimiento se realizó en condiciones estériles dentro de la cabina de flujo laminar vertical marca Labconco.



Figura 4. Fotografía montaje extracción de proteínas mediante agitación en balón, por adición de los solventes cloroformo- metanol- agua. Fuente la autora.

6.2 Hidrólisis Enzimática

Con el fin de eliminar muchas moléculas metabolitos que alteraran la pureza de las proteínas, como es el caso de la celulosa, la cual debe ser removida para asegurar la veracidad del estudio. Este procedimiento se realiza siguiendo el método descrito por (Erikson *et al.*, 2004), para esto se adiciona 10 mL celulasa (sigma) al 1% a la muestra en una caja de petri (Figura 4) y se llevó a la incubadora digital Isotemp-Small Marca Fisher a 40°C, temperatura a la cual la celulasa es más activa, a un pH 4.5, con un periodo de incubación de 24 horas.

Posteriormente se colocó la muestra en tubos nalgene y se centrifugó a 18000 rpm por 5 minutos, con el fin de precipitar las proteínas y descartar la celulosa que quedó en el sobrenadante. El botón se llevó al liofilizador Freeze dryer 4.5 Labconco y se guardó en condiciones asépticas para el ensayo posterior (Wang, 1998).



Figura 5. Fotografía Hidrólisis enzimática de celulosa mediante adición de celulasa.
Fuente la autora.

6.3 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

Para éste ensayo es necesario un espectrofotómetro de luz uv/visible, el reactivo de Bradford (Azul brillante de Coomassie, etanol y ácido fosfórico) y NaOH 1M para permitir la solubilización de proteínas de membrana y reducir la variación de coloración de proteína-proteína producida.

Preparación de la muestra: se disolvió una cantidad X mínima de muestra de proteínas en un tubo eppendorf y se adicionó 0.5 mL NaOH 1M, agitando en vórtex y 0.5 mL del reactivo de Bradford, se llevó a la incubadora digital

Isotemp-Small Marca Fisher durante 5 minutos, se midió la absorbancia a 280 nm.

Preparación de Estándares: Los estándares deben estar en un intervalo de 0 a 2 mg de proteína en un volumen de 100 μ l en éste caso de albúmina. Se preparó una curva estándar de absorbancia versus mg de proteína de muestras originales de albúmina (5 mg/ mL) a partir de la cantidad de proteína, volumen/ muestra y factor de dilución. (Bradford, 1976)

6.4 Separación de Proteínas

Se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio SDS-PAGE, descrita por (Laemmli, 1970). Se hizo el ensamblaje de los vidrios, soportes y separadores y la preparación de los amortiguadores de resolución y concentración según la técnica mencionada, una vez polimerizado el gel se retiró el peine, éste dejó los pozos donde se depositaron la muestra y los marcadores.

Preparación de la muestra: Se pesaron 10mg y se disolvieron en 100 μ l de amortiguador de extracción de proteínas, se maceró finamente en un mortero, se transfirió a un tubo ependorf y se centrifugó a 14000 rpm. Se cargó 8 μ l de marcador en los dos pozos iniciales y finales y en los pozos intermedios 15 μ l de muestra. Aproximadamente una hora después cuando las bandas llegaron a unos cuantos milímetros del borde se sacó y se tiñó el gel con azul brillante de coomasie y posteriormente éste se retira y se destiñe con amortiguador de destinción (metanol-acido acético-agua). Finalmente se escaneó y se procesó la imagen para calcular la masa molecular de sus bandas.

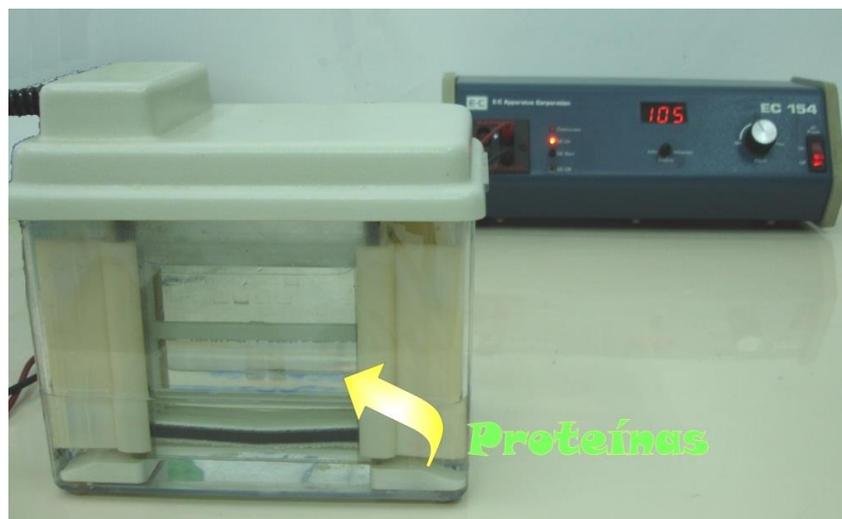


Figura 6. Fotografía montaje y corrida electroforética de proteínas extraídas de *Crescentia kujete* L. (Totumo), se observan las dos bandas de proteínas. Fuente la autora.

6.5 Ensayo de Esterilidad

El objetivo de éste ensayo es verificar si las proteínas que se aislaron y purificaron anteriormente están en condiciones estériles. En una cabina de Flujo Laminar H850 Se sembraron 10 μ l de solución de proteína en discos esféricos de papel Whatman N° 2, de 6 mm de diámetro, éstos se colocaron sobre medios de cultivo para microorganismos Papa-dextrosa-Agar (PDA) y se llevó a la incubadora digital Isotemp-Small Marca Fisher, a 28°C, por un periodo de 72 horas. De igual manera se sembraron 10 μ l de fracción proteínica en discos esféricos de papel Whatman N° 2, en agar nutritivo para descartar la presencia de bacterias. Para cada medio se hizo réplica, pues es necesario asegurarse de la limpieza de las proteínas que posteriormente serán evaluadas en el hongo.

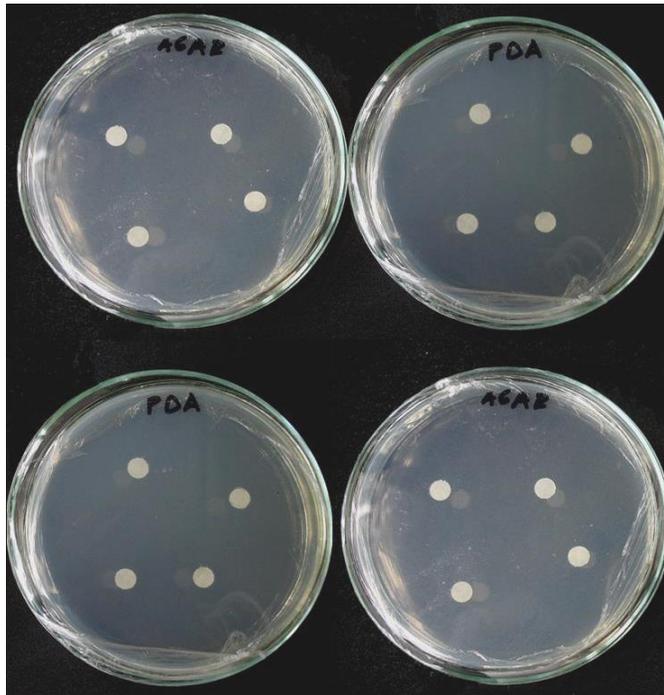


Figura 7. Fotografía de siembra de proteínas en agar nutritivo y PDA. Fuente la autora.

6.6 Evaluación Efecto de la proteína sobre *Fusarium sp.*

Microorganismo: Se empleó una cepa de *Fusarium sp.* donada por el Laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle.

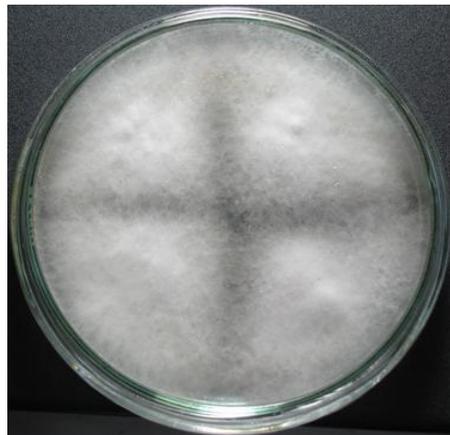


Figura 8. Fotografía de cepa de *Fusarium sp.* A emplear en el ensayo. Fuente la autora.

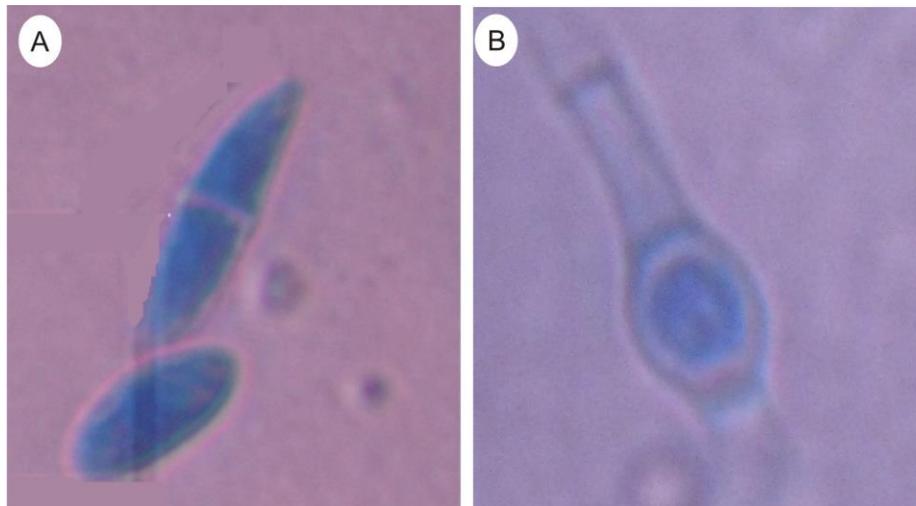


Figura 9. Fotomicrografía de *Fusarium sp.* **A.** microconidias; **B.** clamidospora. Objetivo 100x. Fuente la autora.

Antifúngico: En este caso se utilizó como control positivo una solución madre de 75 mg de Vitavax en 30 mL de agua destilada, una concentración recomendada por los ingenieros agrónomos a los agricultores.

Tabla 4. Identificación del producto químico Vitavax.

INGREDIENTE ACTIVO	g/L
Pertenece al grupo químico Oxatilinas	
Carboxin: 5,6-dihidro-2-metil,-1,4-oxati-ino-3-carboxanilido	200
Thiram: N-(Tricloromeltitio)ciclohex-4-ona-1,2-dicarboxamida	200



Figura 10. Vitavax antifúngico comercial. Fuente la autora.

Medio de cultivo: Para este ensayo se preparó 200 mL de medio de cultivo PDA, se llevó a 120°C por 45min en autoclave modelo 9000-D Napco. Posteriormente se adicionó 1 mL de oxitetraciclina y 0.01 mL de gentamicina por cada 100 mL de medio, con el fin de evitar el crecimiento de bacterias, que pudieran alterar el resultado del ensayo. Finalmente se sirvió 20 mL por caja de Petri, se dejó que tome consistencia.

Suspensión conidial y de esporas: Se realizó una suspensión conidial y de esporas de la cepa, agregando 3 mL de agua estéril en forma de lavado y realizando un raspado muy superficial con bisturí. Se transfirió este lavado a tubos ependorf y posteriormente a las celdas de espectrofotómetro y se procedió a realizar la lectura de la transmitancia a 620nm, para determinar la densidad óptica, que debe estar entre 0.15 y 0.17. Se utilizó la siguiente formula:

$$A = 2 - \text{Log } T$$

Donde A es la Absorbancia.

T es la transmitancia de la suspensión.

$$A = 2 - \text{Log } (70)$$

$$A = 0.15$$

Luego se tomó 0.1 mL de ésta suspensión y se adicionó a caja de Petri, se esparció uniformemente por extensión.

Siembra: Para la siembra de los extractos se utilizó el método descrito por (Espinel *et al.*, 2007), en cada caja de Petri se acomodaron cinco discos de papel whatman N° 2 estériles, de 6 mm de diámetro y luego fueron embebidos con 40 µL de cada tratamiento. Para evaluar la actividad de las proteínas de *C. cujete* L., sobre *Fusarium sp.*, se montó un experimento con arreglo en bloques al azar con 5 tratamientos y tres bloques, donde la unidad experimental correspondió a cada caja de Petri y la unidad de observación correspondió a cada disco con su respectivo tratamiento. Se trabajo con un índice de confianza del 95%.

Tabla 5. Datos de los tratamientos por caja.

Disco	Cantidad	Tratamiento	Concentración Tratamiento
1	40µL	Vitavax control positivo	
2	40 µL	Extracto proteínico	5 mg/ mL de proteína
3	40 µL	Extracto proteínico	15 mg/ mL de proteína
4	40 µL	Extracto proteínico	30 mg/ mL de proteína
5	40 µL	agua destilada estéril Control negativo	Agua pura.

Se llevaron a Incubadora Digital Isotemp-Small a 28°C se tomó registro fotográfico, cada 24 horas durante 5 días y estas imágenes se procesaron con el programa de análisis de imágenes Visión Builder para medir el halo. Estos datos se analizaron a través del programa estadístico SPSS Versión 11.0, mediante el cual se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos de la variable de respuesta fueron normales, asimismo para hallar diferencias entre los tratamientos y bloques se aplicó un análisis de varianza y finalmente se realizó un

análisis de comparaciones múltiples que permite contrastar uno a uno los tratamientos y los bloques para hallar las diferencias significativas entre ellos, si éstas existen.

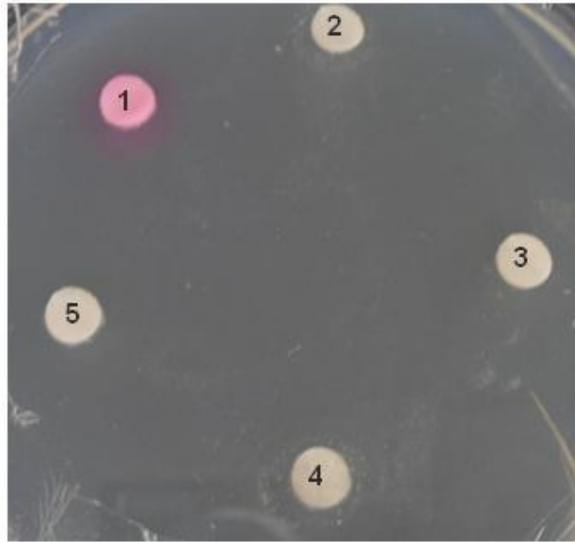


Figura 11. Fotografía de la siembra de las diferentes concentraciones de proteínas y el control positivo y negativo. **1.** Vitavax; **2.** Proteína 5 mg/ mL; **3.** Proteína 15 mg/ mL; **4.** Proteína 30 mg/ mL; **5** Agua. Fuente la autora.

7. Cromatografía de Capa fina (TLC) para determinación de azúcares.

Extracción de la muestra:

Las soluciones de azúcares extraídas en etanol 80% (1 mL) se concentraron mediante liofilización y las alícuotas se corrieron en placas cromatografías de sílica gel Whatman, 250 mm de espesor.

La cromatografía se desarrolló de acuerdo al método de (Lato *et al.*, 1968) utilizando un sistema de solventes de n-butanol-acetato de etilo-isopropanol-ácido acético-agua (7:20:12:7:6).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Aislamiento y Purificación de la muestra. Se partió de un fruto de totumo cuyo peso fresco fue de 1.12 Kg, al liofilizarlo se obtuvo un peso seco de 92 g (8%). La cantidad de proteína total encontrada en el fruto seco de *Crescentia cujete* L. fue de 4.4%, éste valor es menor al reportado por (Ogbuagu, 2008), el cual fue de 7.6%. La diferencia de resultados se debe probablemente a los métodos de extracción, puesto que en éste estudio se estandarizó un intensivo proceso de extracción y purificación de proteínas, tomado de varios protocolos encontrados en la literatura y aunque estos son comúnmente utilizados y se consideran eficientes, difieren del método posiblemente más analítico utilizado por (Ogbuagu, 2008), (AOAC Métodos oficiales de análisis de la Asociación oficial de Química Analítica, Washington DC.)

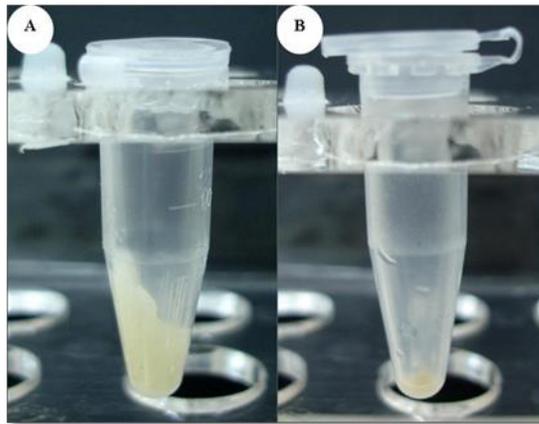


Figura 12. Fotografía del extracto proteínico obtenido al final del proceso, **A.** Muestra purificada sin pasar por Sefadex; **B.** Muestra purificada pasada por Sefadex G 50. Fuente la autora.

La lectura en el espectrofotómetro confirmó la presencia de proteínas, debido a que dependiendo de su composición de aminoácidos, tienen un espectro de

absorción amplio con picos de 275 a 290nm. Este pico se presenta debido a anillos aromáticos y múltiples contribuyentes de residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano y un poco por la cisteína (puentes disulfuro), (Arenas y Sanchez, 2004). La fracción proteica de *Crescentia cujete* L. tiene un espectro de absorción que va desde 275 a 322 nm. Presentando un máximo de absorción en 295nm con una absorbancia de 1.95, y un mínimo de absorción en 280 nm con una absorbancia de 0.287 y para el caso del pico en 322 nm y absorbancia 0.8, puede deberse a otros compuestos. (Figura 13).

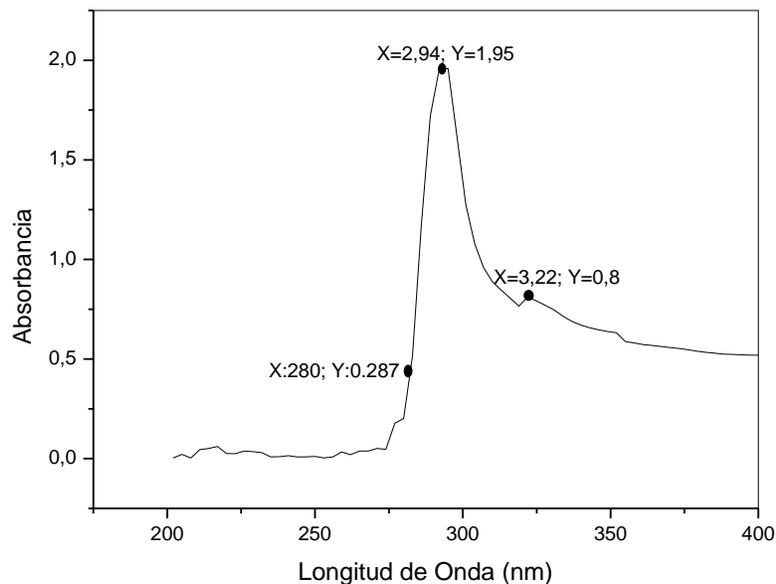


Figura 13. Absorbancia vs. longitud de onda de la fracción proteínica extraída de *Crescentia cujete* L. mediante precipitación y purificación CL-METOH-AGUA. Espectrofotómetro UV-Visible. Fuente la autora.

8.2 Hidrólisis Enzimática: La degradación enzimática tuvo éxito, esto se debe a que la enzima celulasa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos que actúan de forma sinérgica en la degradación de celulosa, cuyo complejo está formado por tres tipos de enzimas: endoglucanasas (EGs) o endocelulasas β -1,4-D-glucan, 4-glucanohidrolasa), celobiohidrolasas (CBHs) o exocelulasas (1,4 β -D-

Glucancelobiohidrolasa) y β -glucosidasa (BGs), cuyo mecanismo de acción catalítica, degrada la celulosa mediante sucesivas reacciones. (Walker, 1991). La proteína al final del proceso se muestra libre de celulosa, lo cual dependió en gran parte al control de variables óptimas pH (5-6) y temperatura (40-50°C), que pueden modificar la fuerza iónica del medio produciendo diferentes efectos sobre la hidrólisis. (Figura 14).

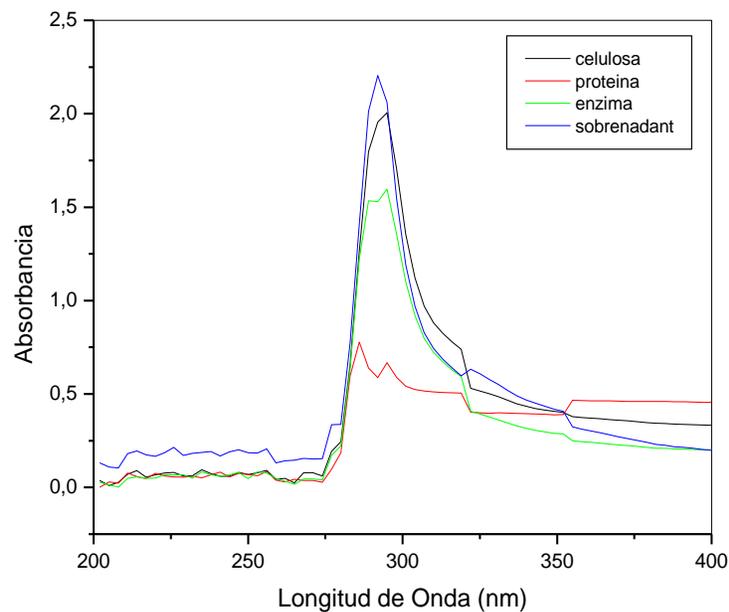


Figura 14. Hidrólisis enzimática de celulosa, Mediante acción catalítica de celulasa. Espectrofotómetro UV-Visible. Fuente la autora.

8.3 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford: La concentración de proteína se determinó a partir de la realización de una curva de calibración utilizando como proteína estándar albúmina, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 6. Datos para la elaboración de la curva de calibración.

Cantidad sustancia en mg	Absorbancia
0,02	0,25
0,05	0,261
0,1	0,273
0,2	0,281
0,5	0,293
1	0,34
1,5	0,42
2	0,51
X	0.091

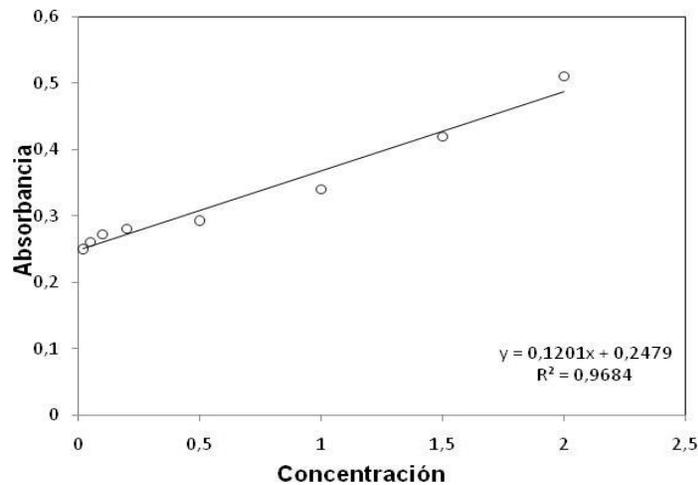


Figura 15. Curva de calibración a partir de la cantidad de albúmina vs. absorbancia. Fuente la autora.

$$y = 0.1201 X + 0.2479$$

$y = 0.1201 X + 0.2479$; Donde y es la absorbancia de la muestra a 280 nm.

$$(0.091) = 0.1201 X + 0.2479$$

$$X = \frac{0.2479 - 0.091}{0.1201} = 1.2 \text{ mg / ml de proteína encontrada en } \textit{Crescentia kujete} \text{ L.}$$

Esto debido a que el colorante reacciona con los residuos de arginina y seguidamente con histidina, tirosina, triptófano y fenilalanina, aminoácidos presentes en las proteínas (Bradford, 1976).

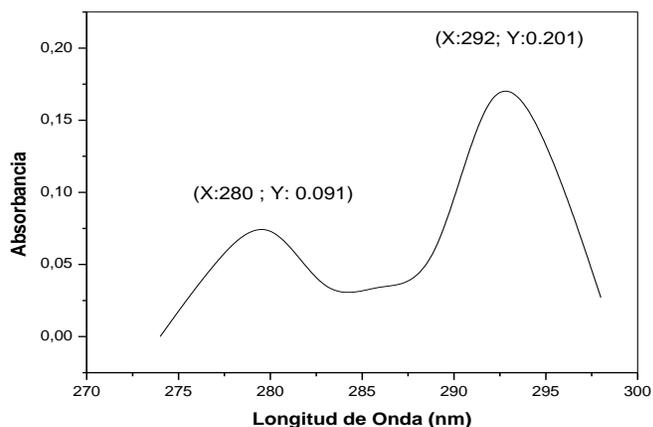


Figura 16. Absorbancia vs. Longitud de Onda de proteínas de *Crescentia kujete L.*, mediante el método de cuantificación de Bradford. Aplicación: Barrido. Fuente la autora.

8.4 Separación de proteínas mediante Electroforesis: Inicialmente se realizó una curva de calibración a partir de los pesos moleculares estándares y mediante la ecuación de la recta se calculó el peso molecular de las bandas presentes en la muestra.

Tabla 7. Base de datos para cálculo de pesos moleculares de las proteínas de *Crescentia kujete L.* Fuente la autora.

Marcadores	Distancia recorrida (mm)	Movilidad Relativa $RF = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{*DistanciaTotal}}$	Peso molecular	Log PM
Miosina	4	0.04	215 Kd	2.3324
Fosforilasa B	14	0.14	120 Kd	2.0791
BSA	20	0.2	84 Kd	1.9242
Ovoalbúmina	35	0.35	60 Kd	1.7781
Anhidrasa carbónica	53	0.53	39.2 Kd	1.4471
Lisozima	82	0.83	18.3 Kd	1.2624
Bandas encontradas en <i>Crescentia sujete</i> .				
Banda 1	63	0.63	X	
Banda 2	82	0.82	X	

* Distancia total 100mm.

Tabla 8. Datos finales para la elaboración de la curva de calibración.

RF	Log PM
0,04	2.3324
0,14	2.0791
0,2	1.9242
0,35	1.7781
0,53	1.4471
0,83	1.2624

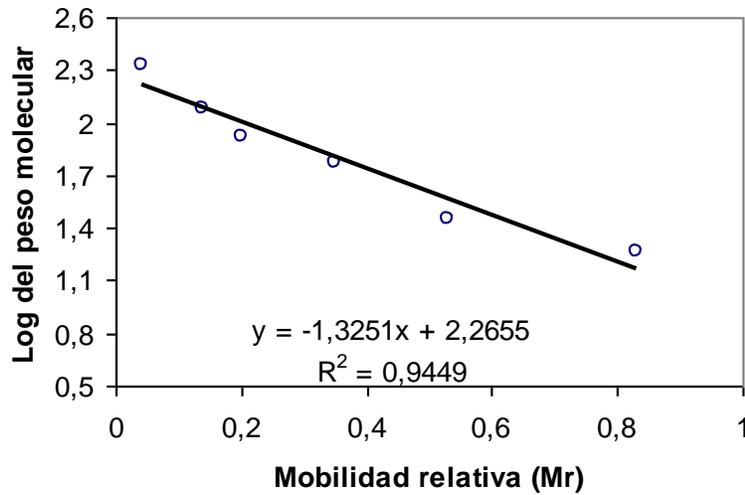


Figura 17. Curva de calibración a partir de los pesos moleculares estándares, Logaritmo del peso molecular vs. movilidad relativa (RF). Fuente la autora.

$$Y = -1,3251X + 2,2655$$

$$Y = -1,3251(0,63) + 2,2655$$

$$Y = -0,8348 + 2,2655$$

$$Y = 1,4306$$

$$PM = 10^{1,4306} = 27 \text{ Kd}$$

$$Y = -1,3251X + 2,2655$$

$$Y = -1,3251(0,82) + 2,2655$$

$$Y = -1,0865 + 2,2655$$

$$Y = 1,1789$$

$$PM = 10^{1,1789} = 15,03\text{Kd}$$

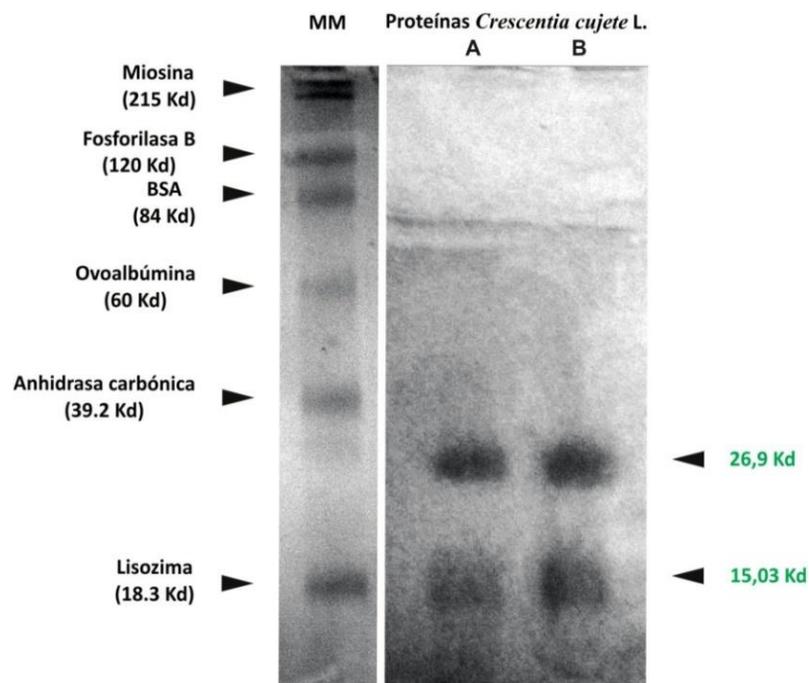


Figura 18. Electroforesis en geles de Poliacrilamida SDS-PAGE 12%. MM: Marcador molecular. A y B: Muestra de *Crescentia kujete* L. Fuente la autora.

En algunas plantas de la familia bignoniaceae se han encontrado compuestos activos con efectos antibacteriales (Melendez y Capriles, 2006) (Cook & samamn, 1996), antivirales (Betancur *et al.*, 1999) y antifúngicos, es el caso de *Jacaranda mimosifolia* D. Don, la cual presenta actividad contra *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* (Muschiatti *et al.*, 2005).

Mediante electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), se realizó la separación de proteínas y se calcularon sus pesos moleculares aparentes que corresponden a proteínas de 27 y 15 KDa, Si bien estas proteínas no han sido secuenciadas por lo que no se conoce su naturaleza, es posible pensar que aquella de 27KDa puede pertenecer a una quitinasa clase II (Selitrennikoff, 2001), debido a que está dentro del intervalo de 27 – 28 KDa y además después de su elución con sulfato de sodio 50Mm, presentó una absorbancia de 0.62 a 280nm. Las quitinasas también han sido aisladas por (Huynh *et al.*, 1991) de semillas de maíz y evaluadas *in vitro* contra *Trichoderma reesie*, *Alternaria solani* y *Fusarium oxisporum*, encontrando que inhibieron 87% del crecimiento de estos hongos.

En cuanto a la segunda banda de proteína de peso molecular 15 KDa, es posible pensar que se debe a proteínas PR4 las cuales tienen bandas de quitina y masas moleculares de 13 a 14.5 kDa. Además se ha encontrado que éstas presentan actividad contra *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, y *Botrytis cinérea*, despolarizando la membrana de la pared celular del hongo inhibiendo el crecimiento debido a la interrupción de la β -quitina (Selitrennikoff, 2001).

Por lo general las proteínas que están en estos intervalos de masa molecular se relacionan a quitinasas, las cuales se caracterizan por inducir la respuesta contra ataques de patógenos. En el caso de las semillas, juegan un papel importante en la protección de éstas durante su germinación (Huynh *et al.*, 1991).

El contenido de quitinasas aumenta en forma coordinada con la maduración y el desarrollo de algunas plantas, es el caso de *Pisum sativum* L. (Mauch *et al.*, 1988). En el caso de los frutos, durante su proceso de maduración, estos generan grandes cantidades de azúcar, haciéndose susceptibles al ataque de hongos, de esta manera se activa la síntesis de proteínas antifúngicas tales como las quitinas, como un mecanismo de defensa regulado durante la maduración de los frutos

(Salzman *et al.*, 1988), para contrarrestar los efectos causados por hongos generalmente glucósidos como es el caso de *Crescentia cujete* L. (Kaneko *et al.*, 1998).

Otras proteínas con pesos moleculares de 19,16 y 15 KDa, aisladas de *Hordeum vulgare* L, han sido encontradas en frutos intensamente dulces, llamadas PR-5, exhiben secuencias homologas a thaumatinas (*Thaumatococcus daniellii* fruits) (Trudel *et al.*, 1998) y son conocidas como proteínas antifúngicas.

De semillas también se han identificado proteínas llamadas permatinas, con pesos moleculares de 19-27 KDa, su mecanismo de acción altera la permeabilidad de la membrana del hongo, alterando su funcionamiento y crecimiento.

Posiblemente las proteínas aisladas de *Crescentia cujete* L, pertenezcan a alguno de estos grupos de proteínas antifúngicas, por su parecido en cuanto a pesos moleculares, por la similaridad de extracción y por los estudios previos realizados encontrados en la literatura, sin embargo esto debe ser confirmado mediante secuenciación, objetivo que no se planteó en este estudio.

8.5 Ensayo de esterilidad de proteínas

Pasadas las 72 horas se observa que no hubo crecimiento bacterial ni fúngico en la siembra de proteínas, sobre los discos de papel Whatman, por lo tanto se confirmó que las proteínas estaban estériles y se procedió al siguiente ensayo.

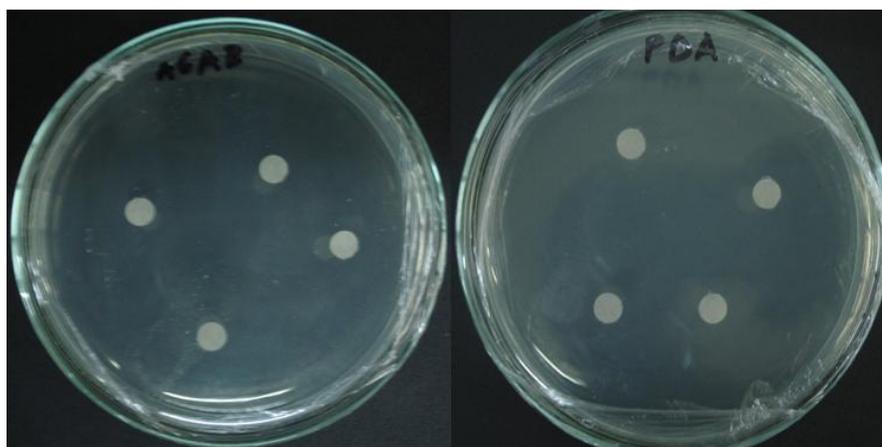


Figura 19. Fotografía de siembra de extracto proteínico de *Crescentia kujete* L. (Totumo). Método difusión en disco en Agar Nutritivo y medio PDA después de 72 horas de incubación. Fuente la autora.

8.6 Evaluación Efecto de la proteína sobre *Fusarium sp.*

La actividad de las proteínas de *Crescentia kujete* se evaluó sobre *Fusarium sp.*, mediante la técnica de difusión en disco, se montó un experimento con arreglo en bloques al azar con 5 tratamientos y 5 bloques, donde la unidad experimental correspondió a cada caja de Petri y la unidad de observación correspondió a cada disco con su respectivo tratamiento. Se trabajo con un índice de confianza del 95%.

Tabla 9. Datos para el experimento en bloques, para la evaluación en *Fusarium*.

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5
Etiqueta	Vitavax 70%	5 mg/ mL	15 mg/ mL	30 mg/ mL	agua
Bloque	1	2	3	4	5
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5

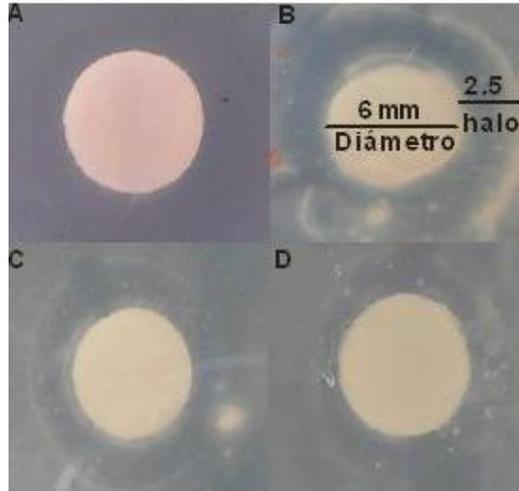


Figura 20. Fotografía medición de halos de inhibición micelial *Fusarium sp.* Obtenidos por la técnica de difusión en disco. **A.** Vitavax; **B.** Proteína *Crescentia kujete* L. 5 mg/ mL; **C.** Proteína de *C.cujete* 15mg/ mL; **D.** Proteína de *C .cujete* 30 mg/ mL. Fuente la autora.

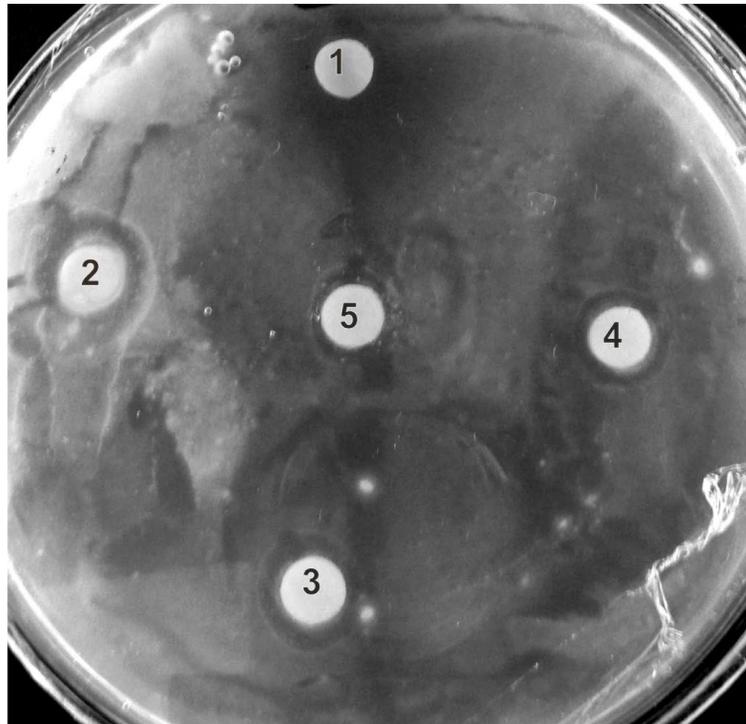


Figura 21. Fotografía de halos de inhibición micelial *Fusarium sp.* Obtenidos por la técnica de difusión en disco. **1.** Vitavax; **2.** Proteína *Crescentia kujete* L. 5 mg/ mL; **3.** Proteína 15 mg/ mL; **4.** Proteína 30 mg/ mL; **5.** Agua. Fuente la autora.

De acuerdo a la prueba no paramétrica de Kolmogorov-smirnov los datos se ajustan a la distribución normal, dando paso a la siguiente prueba de Levene para determinar homogeneidad de varianzas, que arroja un valor de $0.45 > 0.05$, por lo tanto indica que la varianza de la variable dependiente halo, es homogénea a lo largo de todos los grupos.

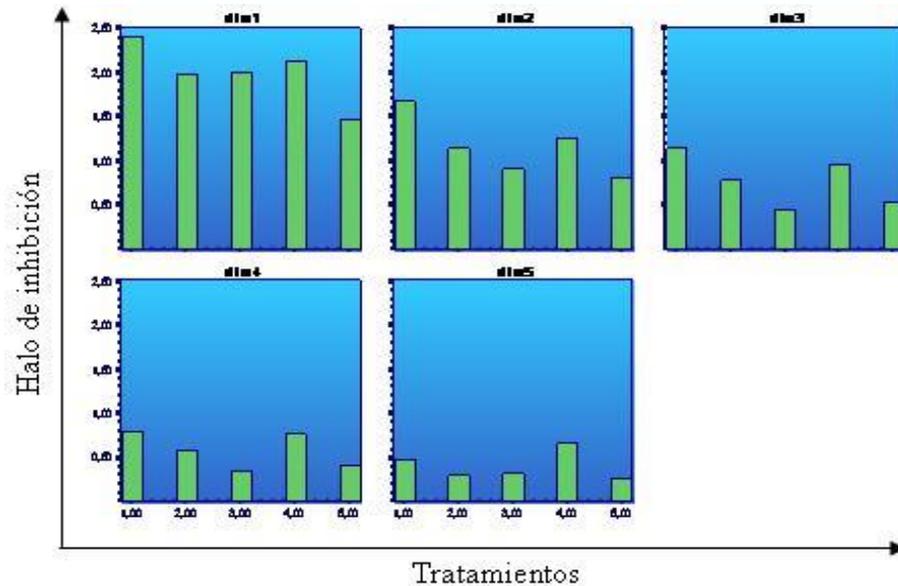
Al comparar las medias de los diferentes tratamientos se observa que éstos difieren a medida que transcurren los 5 días. Esto se verifica con el análisis de varianza en el cual los tratamientos: fungicida, 5 mg / mL, 15 mg/ mL y 30 mg/ mL de proteína y agua presentan diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P 0.002 < 0.05$. De igual manera la variable días presentan un valor de $0.00 < 0.05$ altamente significativo, demostrando variabilidad entre los días.

La efectividad de los tratamientos se establece mediante la prueba de comparaciones múltiples, en donde el fungicida se diferencia del control negativo (agua) significativamente con un valor de $P 0.03 < 0.05$, lo que se esperaba, dada la efectividad del antifúngico, frente al agua sola. De igual manera el fungicida se diferencia significativamente de la concentración 15 mg/ mL, con un valor de $P 0.02 < 0.05$ debido posiblemente a la baja efectividad del tratamiento a ésta concentración.

La concentración 30mg/ mL se diferencia significativamente del control negativo, con un valor de $P 0.054 \leq 0.05$, pero respecto a los demás tratamientos no presenta diferencia significativa.

Las barras representan las medias del halo de inhibición que presentó *Fusarium sp*, frente a cada uno de los cinco tratamientos. En el día uno (24h después de la siembra) se observa que hubo una mayor inhibición, por parte de los tratamientos: fungicida, 5 mg/ mL, 15 mg/ mL y 30 mg/ mL de proteína, pero a partir del día dos ésta fue decayendo a medida que transcurrieron los días. La inhibición causada

por el tratamiento 30 mg/ mL no decae drásticamente a través de los días, es así como en el cuarto y quinto día mantiene valores casi similares a la inhibición causada por Vitavax.



Grafica 22. Representación de la variable halo de inhibición vs. tratamiento y su cambio en el transcurso de cinco días.1: Vitavax, 2: 5mg/ mL, 3: 15mg/ mL, 4: 30mg/ mL y 5: agua. Fuente la autora.

Tanto hojas como frutos de diferentes plantas se han utilizado para obtener un mejor control (Quiroga *et al.*, 2001) de *Fusarium sp*, el cual ha sido ampliamente evaluado debido a la gran pérdida de cultivos e infección causada por este hongo. La dosis media efectiva DE_{50} depende en gran medida de la naturaleza del compuesto activo. Para el control de *Fusarium* (Rodríguez y Montilla, 2002) determinaron la disminución de la marchitez causada por este hongo a una dosis media efectiva de 63 mg/L del extracto de semilla de *Citrus paradisi* (Citrex).

Tabla 10. Porcentaje de inhibición micelial de cada tratamiento frente *Fusarium sp.*, mediante técnica de difusión en disco.

Día	Tratamiento	% de inhibición (Media de los datos)
1	Fungicida	100 %
	5 mg/ mL	79 %
	15 mg/ mL	83 %
	30 mg/ mL	87 %
2	Fungicida	66 %
	5 mg/ mL	45 %
	15 mg/ mL	37 %
	30 mg/ mL	50 %
3	Fungicida	45 %
	5 mg/ mL	29 %
	15 mg/ mL	16 %
	30 mg/ mL	37 %
4	Fungicida	33 %
	5 mg/ mL	25 %
	15 mg/ mL	12 %
	30 mg/ mL	29 %
5	Fungicida	20 %
	5 mg/ mL	12 %
	15 mg/ mL	12 %
	30 mg/ mL	25 %

Las proteínas de *Crescentia cujete* L., demostraron actividad antifúngica a una concentración de 30 mg/ mL, con un porcentaje de inhibición de 45.6% en promedio, manteniendo su inhibición durante los cinco días de observación, en comparación a la actividad ejercida sobre este mismo hongo por la fracción diclorometano y acetato de etilo de hojas frescas y secas de *Pedilanthus tithymaloides* a concentraciones de 10 y 13.33 mg/ mL (Marquez *et al.*, 2007). Esta diferencia se explica debido a que existen diferencias entre los compuestos, posibles condiciones de pH, temperatura, humedad y concentraciones manipuladas en los dos estudios, lo cual se refleja en los efectos sobre el hongo.

9. Cromatografía de capa fina (TLC) para azúcares.

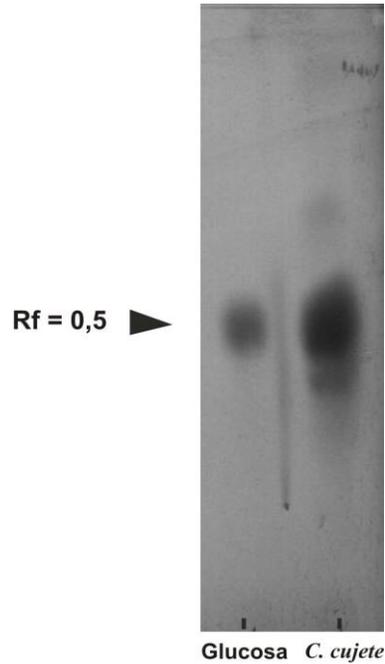


Figura 23. Cromatografía de placa fina (TLC) de *Crescentia kujete* L. (totumo).

Cálculo de los valores de Rf del estándar y de la muestra:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Cálculo de Rf Placa I

$$Rf \text{ Crescentia kujete} = \frac{4,8 \text{ cm}}{9,5 \text{ cm}} = 0,50$$

$$Rf \text{ glucosa} = \frac{5 \text{ cm}}{10 \text{ cm}} = 0,50$$

$$Rf \text{ Crescentia cujete} = \frac{5 \text{ cm}}{10 \text{ cm}} = 0.5$$

Según la literatura encontrada, el fruto de *Crescentia cujete* L., contiene 15.65% de carbohidratos en peso fresco y el 68.1% en peso seco. (Ogbuagu, 2008). Teniendo en cuenta esto se encontró mediante la cromatografía de capa fina (TLC), reveló la presencia de glucosa en *Crescentia cujete* L., con valores de Rf de 0,5, resultados comparables con estudios más exhaustivos que se han realizado sobre los glicósidos presentes en el fruto de *Crescentia cujete* L., se describieron nuevos compuestos, entre ellos cuatro conocidos: acantosido D, β -D-glucopiranosil benzoato, (R)-1-O- β -D-glucopiranosil-1,3- octanediol, y β -D-fructofuranosil 6-O-(p-hidroxibenzoil) - α -D- Glucopiranosido. La estructura de los nuevos glicosidos se establecieron como tres glicósidos de (2R, 4S)-2,4-pentanediol, y dos glicósidos de (R)-4-hidroxi-2-pentanone, dos glicósidos de (R)-1,3-octanediol y 6-O-(p-hidroxibenzoil)-D-glucosa (Kaneko *et al.*, 1998). Cabe aclarar que estos glicósidos se encuentran conjugados con otros compuestos, en comparación con la glucosa de estructura sencilla encontrada en este estudio.

10. CONCLUSIONES

La purificación inicial de proteínas permitió separar metabolitos secundarios de proteínas de *Crescentia cujete* L., que pudieran alterar su determinación. De igual forma la técnica de tamiz molecular, permitió la separación de proteínas debido a la alta cantidad de celulosa y moléculas que aún lograron quedar del proceso de extracción anterior.

El contenido de polifenoles de *Crescentia cujete* L., se descartó mediante solventes orgánicos, debido a la alta cantidad de oxidantes presentes en la muestra, logrando garantizar su ausencia en el producto final.

La digestión mediante celulasa hidrolizó de manera efectiva la celulosa presente en la muestra, de manera que la solución de proteínas quedó libre de perturbación por parte de celulosa y azúcares.

Mediante electroforesis SDS-PAGE. Se determinó el peso molecular aparente de dos proteínas de 26.9 y 15 KDa, presentes en *Crescentia cujete* L. posibles quitinasas implicadas en la defensa durante la maduración de los frutos, frente a patógenos.

El método estadístico permitió realizar un buen análisis de los datos en cuanto a inhibición del hongo por parte de las proteínas, encontrando una mayor y casi constante inhibición en 30 mg/ mL de proteína durante los cinco días de observación, actividad que superó la del fungicida Vitavax al quinto día. Estos resultados son validos ya que en otros estudios se ha encontrado proteínas con similares masas moleculares que poseen actividad antifúngica (Trudel *et al.*, 1998).

Con este estudio se ratifica experimentalmente los conocimientos tradicionales, antifúngicos, por parte de las comunidades, aunque las prácticas de preparación de los extractos no son las más adecuadas (Arbeláez, 1996).

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir esta línea de investigación, ya que es de suma importancia encontrar nuevas fuentes de control de hongos, las cuales sean inocuas tanto para el hombre como para el ambiente.

En estudios posteriores es importante evaluar nuevas técnicas de extracción y de electroforesis para proteínas de bajo peso molecular, debido a que en algunos geles del 10% de acrilamida de proteínas totales se observaron bandas que podrían corresponder a proteínas de bajo peso molecular del tipo tiorinas, cuyos efectos antimicrobianos son ya conocidos en diferentes plantas y posteriormente secuenciar las proteínas encontradas en este fruto, para verificar su naturaleza y compararla con secuencias de quitinasas u otras proteínas.

De igual manera es importante realizar otras metodologías de siembra para la evaluación de estas proteínas y también probar con otras concentraciones quizás más altas, así determinar mejores resultados del ensayo.

Es importante hacer participe a las comunidades Patianas de aquellos estudios que se realicen con esta planta, debido a la importancia social, cultural y económica que representa el totumo para estas comunidades.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Almenares, W. (2004) Totumo Huella y Presencia. Antropos Ltda. Bogotá, D.C: Naranjo, 70 Pp.
- Arbeláez, P. (1996) Plantas Útiles de Colombia , Quinta Edición ed. Bogotá, Colombia: Publicado por el DAMA Fondo FEN Colombia y Jardín Botánico José Celestino Mutis, 831 Pp.
- Arcos A., Becerra M.T., Cendales M.H., Chaux M.A. (2001) Biocomercio Sostenible. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt, 26 Pp.
- Arenas y Sanchez. (2004) Espectrofotometria de Absorcion: Metodos de Laboratorio. Mexico: Autonoma de Mexico, 41h.Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Atarraya. (2007) Características del Hongo. Recuperado el enero de 2010, de <http://escuelacolombia.atarraya.org>.
- Autore, G., Rastrelli, L., Lauro, M. R., Marzocco, S., Sorretino, R., Sorretino, U. (2001) Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. Life Sciences . Soc. Quim , 523-534.
- Barnett y Hunter. (1998) Genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota: The american Phytopathological society USA.
- Benitez, A., Corena, N., Casas Forero, M., Cueto Vigil, G., Cález Ramírez. (2004) Efecto Antibacteriano de los polifenoles de pulpa de Totumo. Fitopatologia , 1-5.
- Bernal, Artemiza., Zamora, J.F., Calleros, G.V. (2005) Actividad Biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatogenos. Revista Mexicana de Fitopatologia , 140-146.

- Betancur, LA., J Saez, H Granados., A Salazar.,JE Ossa.(1999) Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal plants extracts. Mem Inst Oswaldo Cruz , 531-535.
- Binutu, O. (1997) Phytochemical and antimicrobial studies on *Crescentia cujete* , N° 2. Department of Pharmacognosy,University of Ibadan, Nigeria. Fitoterapia , 1-5.
- Bollag D.M. (1994) Protein Methods. Madrid: publications WileyLiss.
- Bradford (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry , 248-254.
- Cook y samamn. (1996) Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, And Dietary Sources. Nutr. Biochem, 66-76.
- Edwards, S. (2004) Influence of agriculture practices on *Fusarium* infection on cereal and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. Toxycol Lett., 29-35.
- Erikson J.,Malmsten M., Tiberg, F.,Honger, T.,Damhus, T., Johansen, S.K. (2004) Enzymatic degradation of model cellulose films. Journal of Colloid and interface science, 99-106.
- Espinel, A.I., Arhinton, S.B., Iqbal, N. (2007) Multicenter Evaluation of a New Disk Agar Diffusion Method For Suseptibility testing of filamentous Fungi With Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Amphotericin B, and Caspofungin. Journal Of Clinical Microbiology , 1811-1820.
- Garcia, Barriga (1974) Flora Medicinal de Colombia Botánica medica. Bogotá Colombia: Imprenta Nacional.
- (1975) Flora medicinal de Colombia. Bogotá: Imprenta nacional.
- Gentry Alwyn H. (1973). . "Flora of Panama". Ann Missouri Bot. Gard , 781-997.
- (1982) "Bignoniaceae". Flora de Veracruz. . INIREB. Xalapa : Veracruz Mexico,
- Hammond-Kosack K.E., y Jones J.D.G.(1996) Inducible plant defense. mechanisms and resistance gene function. Plant Cell 8, 1773-1791.

- Hernandez, R. (2004) GUATEMALA Facultad de Ciencias Médicas. Recuperado el 27 de febrero de 2010, de <http://www.guatequimica.com/>
- Huynh Q.K. (1991) Hironaka, E.B., Smith, C.E., Borgmeyer, J.R., Shah, D.M. Antifungal Proteins: Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from Maize seed. *The Journal of biological chemistry*, 6635-6640.
- Kaneko, Tetsuo., Kazuhiro, Ohtani., Ryoji Kasai., Kazuo Yamasaki. (1998) n-alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose *Crescentia cujete*. *Phytochemistry*, 253-263.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* , 680-685.
- Llewellyn. (1997) Antifungal proteins from seeds of Australian native plants and isolation of an antifungal peptide from *Atriplex nummularia*. *New Zealand Journal of Botany* , 385-394.
- Marquez V.R., De la Rosa, T.C., Mercado, P.A. (2007) Actividad Antifungica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit. *Scientia et Technica* , 155-159.
- Mauch, F., Hadwiger L.A., Y Thomas B. (1988) Purification and Characterization of two Chitinases and two ,S-1,3-Glucanases Differentially Regulated During Development and in Response to Fungal Infection. *Plant Physiology* , 325-333.
- Melendez y Capriles. (2006) Antibacterial Properties of Tropical Plants from Puerto Rico. *Revista Elsevier. Phytomedicine* , 272-276.
- Minor y Otwinowski. (2004) Organization With Expertise In Protein Biochemistry. Recuperado el 26 de febrero de 2010, de Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology*: <http://proteincrystallography.org/protein/>
- Monzón y Rodríguez. (1999) Infecciones Causadas Por el genero *Fusarium*. *Centro Nacional de Microbiología* , 100-105.

- Muñoz, D. Mingarro., N. Acero., F. Llinares, J.M, Pozuelo., A. Galán de Mera,J.A Vicenten, L. Morales, L.F Alguacil, C. Perez. (2003) Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *Journal of Ethnopharmacology* , 163–167.
- Muschietti, L., Derita, Marcos., Sulsen V., Muñoz, J.,Ferraro G., Zacchino, S., Martino, V. (2005) In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* , 233-238.
- Odds Frank, Brown Alistair J.P, y Gow Neil A.R. (2003) Antifungal agents:mechanisms of action review. *TRENDS in Microbiology* , 272-279.
- Ogbuagu, M. N. (2008) The nutritive and anti-nutritive compositions of calabash (*Crescentia cujete*) fruit pulp. *Journal of animal and veterinary advances* , 1069-1072.
- Patiño, V. (1967) *Plantas Cultivadas y Animales Domesticos en America Equinoccial*. Cali: Imprenta Departamental
- Pérez Arbelaez. (1973) *Plantas Útiles de Colombia*. Bogotá: Editorial Victor Hugo.
- Quiroga Emma Nelly., Sampietro A. Rodolfo., Vattuone M. Amelia. (2001) Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* , 89–96.
- Revital, H. (2006) *Characterization And Efficacy Testing of Novel Antifungal Peptides In Transgenic Rice*.United States, 255 h.Tesis Doctoral (Doctor of Philosophy). Department of Plant and Soil Sciences.
- Riaño y Zamora. (2005) Proteinas antifungicas contra *P. infestans* en los espacios intracelulares de hoja de tomate (*Lycopersicom sculetum cerasiforme*) posibles defensas de plantas. *Revista Colombiana de Quimica* , 7-23.
- Rodriguez y Montilla. (2002) Disminucion de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. *Fitopatologia* , 46-50.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tortoriello, J., & Navarro, V. (2001). *Ethnopharmacology*. Soc. Quim , 97-101.
- Salzman, Ron A., Tikhonova, I., Bruce P., Hasegawa, P.M y Bressan R.A (1988) Coordinate Accumulation of Antifungal Proteins and Hexoses Constitutes a

- Developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape¹.
 Plant Physiology , 465-472.
- Sripad y Narasinga (1982). Extractability of Polyphenols of sunflower seed in various solvents. Journal Biosci , 145-152.
- Selitrennikoff Claude P. (2001) Antifungal Proteins. American Society for Microbiology , Vol. 67, No. 7. 2883–2894.
- Tequida, M.M., Cortez, R. M., Rosas, B.E, López, S.S y Corrales, M.C. (2002) Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. Revista Iberoamericana de Micología , 84-88.
- Trudel J., Grenier J., Potvin, Claude y Asselin A. (1998). Several Thaumatin-like Proteins Bind to B-1,3-Glucans. Plant physiology, 1431-1438.
- Turner J.G. y Novacky A. (1974) The quantitative reaction between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. Phytopathology , 885-890.
- UNCTAD. (2005) Market Brief in the European Union *Crescentia cujete*. United Nations Conference on Trade and Development. European Union: (BTFP) 1-40Pp.
- Vance C.P., Kirk T.K., y Sherwood R.T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. . Annu Rev Phytopathology , 259-288.
- Villarruel Franco R., Huizar L.R.,Corrales M., Sanchez T., Islas R.R.(2004). Péptidos naturales antimicrobianos: Escudo esencial de la respuesta inmune. Investigación en salud, Universidad de Guadalajara:Mexico, vol 6. 170-179.
- Walker (1991) Enzymatic hydrolysis of cellulose. Bioresource Technology, 3-14.
- Wang, Sun Nam.(1998) Cellulose Degradation. Maryland: University Maryland, departament of chemical and biomolecular engineering college park,Protocolo (Experimento 4) 7p.
- Zabaleta, Mejia E.. (1999) Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra Latinoamerica REDALIC ,Vol 17 201-207.