

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Uso de herramientas proteómicas para el análisis de diferentes
métodos de extracción de proteínas de hojas de banano

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Katherine Milena Segarra Armijos

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA


El presente proyecto lo dedico principalmente a Dios, porque gracias a él y a mi esfuerzo, fue posible estudiar en esta prestigiosa universidad.

También se lo quiero dedicar a mis padres, quienes han estado apoyándome con mis estudios desde el inicio, trabajando duro e incluso obteniendo un segundo trabajo para poder darme lo mejor que podían y brindarme la oportunidad de estudiar en una universidad mejor, incluso si esa universidad me alejaba de ellos por muchos años. A ellos les debo todo lo que soy hoy en día, y no solo hablo a nivel profesional, sino también personal, porque gracias a ellos soy una persona con ética y valores.

Por último, quisiera agradecer a una persona muy especial, que en los últimos meses ha sido de gran apoyo emocional para mí. El cual me ha ayudado a seguir adelante cuando yo pensaba que no podía más.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Katherine Milena Segarra Armijos doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Katherine Milena Segarra Armijos

EVALUADORES

Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Nardy Del Valle Diez García

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La extracción de proteínas implicadas en el desarrollo de enfermedades vegetales es una herramienta muy importante dentro de los estudios que tienen relación con sistemas patológicos, por lo que el banano es uno de los mejores candidatos para este estudio, ya que es un fruto que proporciona seguridad nutricional y económica para millones de personas en Ecuador. Por lo que, este trabajo tiene como principal objetivo evaluar los diferentes métodos de extracción de proteínas de hoja de banano para la optimización de estudios proteómicos comparativos. Siendo de gran utilidad para empresas exportadoras de cualquier tipo de fruta o cualquier tipo de empresa que trabaje con plantas en general. Ya que, al lograr una extracción eficiente, se puede trabajar con proteínas identificadas en procesos de infección por enfermedades, generando información relevante para entender procesos de resistencia, tolerancia o susceptibilidad a las enfermedades. Se realizó la extracción de las proteínas de hojas de banano utilizando cuatro métodos de extracción: TCA acetona/fenol, CIBE, fenol y solubilidad. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford y el proceso de electroforesis bidimensional se realizó en dos etapas: por punto isoeléctrico usando un Bio-rad Protean i12 y por su peso molecular. Finalmente, para la visualización de imagen de los geles, se utilizó el Imagine Lab Software. Los métodos que mejor resultados presentaron en este estudio fueron: el método de TCA acetona/fenol y el método del CIBE. Aunque el método del CIBE, demostró ser el más eficiente, ya que los lavados eliminaron compuestos como: sales, contaminantes polares, lípidos, compuestos fenólicos, peróxidos, etc.

Palabras Clave: Proteómica, extracción, proteínas, electroforesis.

ABSTRACT

The extraction of proteins involved in the development of plant diseases is a very important tool in studies that are related to pathological systems, so the banana is one of the best candidates for this study, since it is a fruit that provides safety. nutritional and economic for millions of people in Ecuador. Therefore, this work has as main objective to evaluate the different methods of extraction of banana leaf proteins for the optimization of comparative proteomic studies. Being very useful for companies that export any type of fruit or any type of company that works with plants in general. Since, by achieving an efficient extraction, it is possible to work with proteins identified in disease infection processes, discovering relevant information to understand processes of resistance, tolerance or susceptibility to diseases. Banana leaf protein extraction was performed using four extraction methods: TCA acetone/phenol, CIBE, phenol and solubility. For the quantification of proteins, the Bradford method was obtained, and the two-dimensional electrophoresis process was carried out in two stages: by isoelectric point using Bio-rad Protean i12 and by its molecular weight. Finally, for the image visualization of the gels, the Imagine Lab Software was extracted. The methods that presented the best results in this study were: the TCA acetone/phenol method and the CIBE method. Although the CIBE method will turn out to be the most efficient, since the washings eliminated compounds such as: salts, polar contaminants, lipids, phenolic compounds, peroxides, etc.

Keywords: Proteomics, extraction, proteins, electrophoresis.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	4
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1.....	10
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Descripción del problema	10
1.2. Justificación del problema.....	10
1.3. Objetivos.....	11
1.4. Marco teórico.....	11
CAPÍTULO 2.....	18
2. METODOLOGIA	18
2.1. Extracción de proteínas	18
2.2. Cuantificación de proteínas	19
2.3. Electroforesis bidimensional	20

CAPÍTULO 3.....	24
3. RESULTADOS Y ANALISIS.....	24
3.1. Resultados.....	24
3.4. Análisis	26
CAPÍTULO 4.....	28
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
4.1. Conclusiones.....	28
4.2. Recomendaciones	28
BIBLIOGRAFÍA.....	30

ABREVIATURAS

UE	Unión Europea
EE.UU	Estados Unidos
UBESA	Unión de Bananeros Ecuatorianos S.A
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
SDS	Dodecilsulfato sódico
ICAT	Etiquetas de afinidad codificada por isótopos
SILAC	Etiquetas de isótopos estables de aminoácidos en cultivos celulares
iTRAQ	Etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta
MudPIT	Tecnología de identificación de proteínas multidimensionales
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía líquida
CHAPS	(3-((3-colamidopropilo)dimetilamonio)-1-propanesulfonato)
DTT	Ditiotreitol

SIMBOLOGÍA

μL	Microlitro
ug	Microgramo
g	Gramo
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
UV	Ultravioleta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgA	Inmunoglobulina A
Rpm	Revolución por minuto

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Curva de calibración de Abs 595 vs concentración de proteína.....	23
Figura 3.2. Imagen de gel SDS PAGE	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Valores requeridos para la hidratación de la tira con las muestras ¡Error!

Marcador no definido.0

Tabla 2.2. Solución para preparación de gel de acrilamida/tris-glicina21

Tabla 2.3. Solución para preparación de gel de acrilamida/tris-glicina21

Tabla 2.4. Preparación de buffer de corrida (5X) con pH 8,322

Tabla 3.1. Valores de absorbancia determinados con el espectrofotómetro25

Tabla 3.2. Concentración de proteínas determinados por medio de la formula25

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

Ecuador es considerado como uno de los más grandes productores y exportadores de banano a nivel mundial, por lo que el cultivo de esta fruta es una de las actividades agrícolas más importantes para la economía del país. Pero el problema existente con los cultivos de banano son las pérdidas por infecciones frente a enfermedades de campo, como por ejemplo el Mal de Panamá, el cual es el responsable de una de las peores enfermedades en la historia de la agricultura debido a las pérdidas económicas y el nivel de destrucción que provoca. Por otro lado, la Sigatoka negra es el principal problema relacionado a las enfermedades del cultivo del banano y el plátano en América, Asia y África. Incluso en algunos países, el costo de combatir esta enfermedad alcanza valores que amenazan gravemente la competitividad de la industria, provocando reducción de salario de los trabajadores o incluso que muchos pierdan sus trabajos.

1.2. Justificación del problema

El estudio de las interacciones que existen entre patógeno y hospedador, nos permiten identificar la forma en que se comporta el hospedador con el fin de desarrollar cultivos resistentes, por medio de enfoques de mutación, reproducción, transgénicos, etc. Pero las proteínas son el producto final directamente implicado en el mecanismo celular, por lo que su estudio es de gran importancia cuando se busca identificar proteínas que están directamente implicadas en procesos como la embriogénesis somática a través de un enfoque proteómico, en los estudios de patógeno-hospedador o en los referentes a estrés abiótico. En el caso del banano, este trabajo es un poco complicado, debido a que las plantas de banano contienen reservorios con sustancias parecidas a la goma en el interior de sus tejidos, los cuales generan uniones reversibles e irreversibles con las proteínas que, junto a una alta presencia de carbohidratos, pueden representar problemas durante la separación de las proteínas mediante electroforesis. Entonces, este proyecto sería de gran utilidad para personas interesadas en trabajar en el estudio de las interacciones de las

plantas, como por ejemplo las empresas exportadoras de cualquier tipo de fruta, o cualquier tipo de empresa que trabaje con plantas en general. Ya que, al lograr una extracción eficiente, se puede trabajar con proteínas que han sido identificadas de forma diferencial durante el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en procesos de infección por enfermedades, generando información relevante para entender procesos de resistencia, tolerancia o susceptibilidad a las enfermedades.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar los diferentes métodos de extracción de proteínas de hoja de banano para la optimización de estudios proteómicos comparativos.

1.3.2. Objetivos Específicos

2. Extraer las proteínas de hoja de banano utilizando diferentes métodos.
3. Separar las proteínas a partir de diferentes métodos de extracción por medio de geles bidimensionales.
4. Realizar un análisis comparativo para seleccionar el método más eficiente.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Producción de banano en Ecuador

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2020), la producción del banano es la principal actividad agrícola de la economía de Ecuador, pues se ha convertido en una fruta con gran demanda en el mercado, siendo un cultivo multifacético que presenta propiedades nutricionales (macro y micronutrientes), fitonutritivas y compuestos que le dan energía a quienes lo consumen. Por lo que se ha convertido en el sustento vital para las personas que habitan en la región costera del país (Zhiminaicela, Quevedo & García, 2020).

Los ingresos de las industrias bananeras representan el 1,6% del PIB de Ecuador, mientras que respecto a la agricultura representa el 21,60% de la producción. Incluso a pesar de la pandemia, la producción de cultivos se recuperó de forma rápida y las superficies de siembra aumentaron en el 2019 para posteriormente normalizarse en el 2020 y 2021.

Entre las provincias que más productores de banano poseen se encuentran El Oro (41%), Guayas (34%) y los Ríos (16%). De los cuales El Oro posee principalmente productores pequeños; Guayas productores grandes, medianos y pequeños; mientras que la provincia de Los Ríos posee netamente grandes productores (IEE, 2022).

El mercado de banano de Ecuador está diversificado, exportando fruta a la UE (26,09%), Rusia (23,44%), Medio Oriente (15,55%), EE.UU. (8,88%), Cono Sur (7,88%), Europa Este (5,68%), Asia (5,16%), como principales mercados y el 7,32% a mercados marginales (AEBE, 2022).

La industrialización ha tenido un lugar destacado en el punto de mira de los siguientes productos: plátanos en almíbar y rodajas secas, plátanos congelados, rodajas de plátano deshidratadas, bebidas alcohólicas y etanol, harina y polvo, jaleas, néctares y bebidas, preparación de jarabes de glucosa y jarabes de fructosa, purés, rodajas fritas y aromatizantes, vinagre, residuos de plátano textiles y almidón.

Tanto los bananos como los plátanos están constantemente amenazados por una variedad de problemas fitosanitarios, algunos de los cuales son graves ya que afectan la economía y la productividad de los productores. El surgimiento de enfermedades que causan la muerte de las plantas, como el mal de Panamá, es la razón por la cual Ecuador, al igual que otros países productores de banano, ha comenzado a sembrar nuevas variedades Cavendish resistentes para reemplazar las variedades Gross Michel que han sido altamente susceptibles al patógeno de la enfermedad. La creación y desarrollo de nuevas variedades tuvo lugar a partir de la década de 1960, cuando los productores de banano experimentaron la aparición de nuevas plagas que afectaron la calidad de las raíces y frutos (INIAP, 2022).

En esa época, las principales plagas eran los nematodos y los gorgojos negros, que dañan las raíces y las vides; otros atacaron el fruto y redujeron su calidad; y la mancha amarilla también afectó significativamente las hojas, reduciendo el rendimiento. Actualmente, el mal de Panamá es causado por el hongo *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* Tropical Race, una seria amenaza potencial para las plantaciones de banano y plátano. La mancha negra, por otro lado, es la enfermedad más grave que afecta a ambos cultivos, por

lo que su control se ha vuelto cada vez más difícil y costoso, ya que el hongo ha perdido significativamente su sensibilidad a los fungicidas sistémicos utilizados para su control.

El mercado bananero ecuatoriano se caracteriza por un oligopolio de 13 empresas exportadoras que concentran grandes valores de venta, de las cuales las 5 empresas más importantes son UBESA, PACIFIC CROWN FRUIT, Bananera Continental, Fruitstylelife y Reybanpac, que en conjunto concentran el 40% de las exportaciones. En este contexto, han surgido mecanismos comerciales alternativos para garantizar un equilibrio entre la conciencia ambiental, la justicia social y el beneficio económico. Uno de los mecanismos comerciales más típicos es el comercio justo (Borja, 2016).

El cultivo de Musáceas es muy importante por su valor nutricional, donde el contenido de carbohidratos (35%) es pronunciado, durante la maduración se convierte parcialmente en glucosa, sacarosa y fructosa, potasio, magnesio, fósforo, calcio, hierro y vitaminas A y C, que cubren las necesidades nutricionales básicas del ser humano. La investigación de la FAO (1999) muestra que el grupo de bananos y plátanos junto con la leche, el trigo y el arroz constituyen los cuatro productos alimenticios más importantes del mundo. La misma fuente afirma que al menos 400 millones de personas comen plátanos.

1.4.2. Extracción de proteínas

Las plantas tienen muy poca proteína en comparación con el tejido animal, ya que solo el 1-2% de la célula es el citoplasma, que contiene la proteína, el resto del volumen celular está formado por vacuolas y la pared celular. Ambas partes de la célula contienen gran cantidad de fenoles, terpenos, pigmentos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros compuestos no proteicos que interfieren en la extracción de proteínas y determinación del perfil electroforético de la planta. El primer paso de la extracción es la lisis celular, que permite la liberación de componentes de los espacios intracelulares. Esta lisis debe preservar la integridad de la proteína; otro factor importante es el tampón de extracción, que depende del tipo de célula y el uso previsto. Los tampones de extracción de proteínas son un factor importante porque son muy sensibles a los cambios de pH y permiten obtener resultados reproducibles; los tampones en los que se realiza la extracción deben evaluarse desde una perspectiva diferente, teniendo en cuenta las posibles interacciones con otros

componentes y la compatibilidad de las tecnologías de purificación, absorción UV y coste (López, 2012).

La extracción y caracterización de proteínas implicadas en la patogenicidad vegetal se ha convertido en una herramienta fundamental para el estudio de diversos sistemas patológicos, convirtiendo al banano en uno de los principales objetivos para la obtención de estas proteínas. Esto debido a que el banano es un fruto que posee gran cantidad de calorías, por lo que en su composición se encuentran carbohidratos, lípidos, proteínas, etc (Carvajal & Murgueitio, 2017).

1.4.3. Métodos de proteómica

La proteómica es una técnica emergente que se utiliza para estudiar la estructura y función de las interacciones entre proteínas en los organismos vivos. Hoy en día, el potencial de la investigación de proteínas es una pasión científica que atrae cada vez a más investigadores de todo el mundo debido a su capacidad para ampliar el conocimiento de los organismos vivos. La investigación en proteómica ayuda a comprender los mecanismos de las enfermedades, el comportamiento de defensa o simplemente los procesos de desarrollo de un organismo. Este tipo de investigación ayuda a sugerir nuevas estrategias para resolver problemas biológicos (Camacho, Elizalde & Ruiz, 2022).

Al ser esta técnica una disciplina científica encargada del estudio de las proteínas. El trabajo de un científico en proteómica consta principalmente de cuatro fases. El primero está relacionado con la extracción y aislamiento de proteínas del resto de componentes celulares. La segunda fase utiliza tecnología de "espectrometría de masas" para ayudar a identificar nuestras proteínas aisladas, la tercera fase implica el uso de software bioinformático para identificar proteínas en bases de datos y, finalmente, los investigadores utilizan toda esta información generada para usar su experiencia para comprender y describir lo que sucede en los organismos vivos (Camacho, Elizalde & Ruiz, 2022).

La investigación actual del proteoma se centra en gran medida en el desarrollo de métodos precisos y relativamente rápidos para la identificación y caracterización de proteínas. Los métodos clásicos más utilizados son la electroforesis en gel bidimensional y la espectrometría de masas. Además, los expertos cuentan con las últimas tecnologías en

bioinformática y biocomputación y son capaces de analizar millones de datos simultáneamente. Pero a pesar de los extraordinarios avances en la tecnología de investigación del proteoma, varios problemas aún obstaculizan seriamente la desafiante tarea de caracterizar todo el proteoma. Por ejemplo, una de las principales dificultades fue encontrar un método similar a la proteína C reactiva (PCR) que permitiera amplificar genes para amplificar proteínas que están presentes en pequeñas cantidades. Es decir, los científicos de hoy pueden descifrar genomas completos, pero aún no comprenden la función general y las interacciones de la mayoría de las proteínas. Sin embargo, con el crecimiento exponencial de las nuevas tecnologías, es posible que no se esté muy lejos del comienzo de la comprensión del extraordinario y complejo mundo de las proteínas que son en gran parte responsables de la composición molecular de la vida (Torrades, 2004).

Las moléculas de proteína dan lugar a una considerable diversidad estructural, que se manifiesta de varias maneras. Por ejemplo, su nivel de estructura primaria, gracias a la variedad de ordenamientos 20 residuos de aminoácidos, además de todas las variantes con posibles modificaciones postraduccionales. Y su nivel de estructura espacial, la cual se manifiesta en estructuras muy diferentes y de las que dependen principalmente las actividades biológicas. También se produce diversidad estructural tridimensional de proteínas a través de extensos ensayos de cristalización y determinación de la estructura 3D usando técnicas de resonancia y difracción de rayos X (Castellanos, Gonzalez & Padron, 2022). Pero primero, es importante apreciar los diferentes enfoques que puede tomar.

Existen varios métodos de proteómica divididos en procesos de bajo y alto rendimiento. Los de bajo rendimiento son basados en anticuerpo, gel y cromatografía. Mientras que los de alto se dividen por microarrays analíticos, funcionales, de fase inversa y proteómica basada en espectrometría de masas. En el grupo de métodos basados en anticuerpos se encuentran técnicas como ELISA y la transferencia Western, los cuales se basan en la disponibilidad de anticuerpos contra proteínas o epítomos específicos para identificar proteínas y cuantificar sus niveles de expresión. En el grupo de métodos a base de gel se encuentran técnicas como: la electroforesis en gel bidimensional 2DE o 2D-PAGE y la electroforesis en gel diferencial DIGE. La primera fue la primera técnica proteómica desarrollada que utiliza una corriente eléctrica para separar las proteínas en un gel según

la carga en la primera dimensión y la masa en la segunda. Mientras que la segunda, es una forma modificada de gel 2DE que utiliza diferentes tintes fluorescentes para permitir la comparación simultánea de dos o tres muestras de proteínas en un solo gel. Estas técnicas de gel se utilizan para separar proteínas antes de su posterior análisis utilizando, por ejemplo, espectrometría de masas MS y para perfiles de expresión relativa. Y como último método se tiene a la cromatografía, en el que las técnicas basadas en este método se pueden utilizar para aislar y purificar proteínas de mezclas biológicas complejas, como compuestos celulares. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas en función de la carga, la cromatografía de exclusión por tamaño separa las proteínas en función del tamaño molecular y la cromatografía de afinidad utiliza la interacción reversible entre un ligando de afinidad específico y su proteína diana. Por ejemplo, las lectinas se utilizan para purificar moléculas de IgM e IgA. Estas técnicas se pueden utilizar para purificar e identificar proteínas de interés, así como para preparar proteínas para análisis posteriores (Beeton-Kempen, 2020).

En los métodos de alto rendimiento tenemos: microarrays analíticos, funcionales y de fase reversa. En el primer método, se colocan pequeñas muestras de proteína en un "chip" para su análisis; a veces esto toma la forma de portaobjetos con superficies modificadas químicamente. Los anticuerpos específicos se pueden inmovilizar en la superficie del chip para capturar la proteína objetivo en muestras complejas. Esto se denomina microarreglo de análisis de proteínas, y este tipo de microarreglo se utiliza para medir el nivel de expresión y la afinidad de unión de las proteínas en una muestra. El segundo método se utiliza para caracterizar las funciones de las proteínas, como las interacciones proteína-ARN y el recambio enzima-sustrato. Y en el tercer método, las proteínas de tejidos sanos y enfermos o células tratadas y no tratadas se unen a una micromatriz y, luego esta se sondea en busca de anticuerpos contra la proteína de interés (Beeton-Kempen, 2020).

Existen varios métodos "sin gel" para la separación de proteínas, incluidas las etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT), el etiquetado de isótopos estables de aminoácidos en cultivos celulares (SILAC) y las etiquetas isobáricas iTRAQ para la cuantificación relativa y absoluta. Existen otras técnicas menos cuantitativas, como la técnica de identificación multidimensional de proteínas MudPIT, que tienen la ventaja de ser

más rápidas y sencillas. Y otros métodos de cromatografía sin gel para la separación de proteínas incluyen la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC) (Beeton-Kempen, 2020).

Adicionalmente, muchas técnicas utilizadas en proteómica permiten obtener desdoblados u ordenados o la disposición física de mezclas de proteínas altamente complejas representadas por una combinación ingeniosa de dos o más técnicas de separación.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGIA

2.1. Extracción de proteínas

Se utilizaron dos métodos de extracción de proteínas de hoja de banano. Las hojas de banano se picaron en pequeños pedazos utilizando un bisturí. Luego se dividieron en réplicas de tres para cada método de extracción. Los gránulos de proteínas resultantes luego se solubilizaron en 70-100µL de Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, Triton 2%, DTT. Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se peso 900mg de pedazos de hoja de banano y se realizaron 9 réplicas, cada una con 100mg de hoja. Se utilizaron 3 réplicas para cada método.

2.1.1. Método de TCA/acetona/fenol (Muestra A)

Este método se realizó siguiendo el protocolo de extracción de proteínas en hojas de *Arabidopsis Thaliana*, con ligeras modificaciones. Se lavó la réplica con TCA acetona al 10% (500µL para cada una) y luego se las centrifugo. Este paso se realizó tres veces, pero la tercera vez se utilizó acetona al 80%. Se desechó el sobrenadante y se puso a secar el pellet para quitar el exceso de líquido. Se lavo el pellet con SDS buffer (500 µL), se la traslado a la sorbona, se le agrego 500 µL de fenol + 75 µL de mercaptoethanol y se la centrifugo. Se extrajo 400 µL del sobrenadante y se lo coloco en otro tubo de 2ml con la misma etiqueta. (Se desecho el tubo al que se le extrajo los 400 µL). Se agregó 500 µL de acetato de amonio y se dejó precipitar durante 4 a 16 horas en refrigeración.

Se centrifugo la muestra, se desechó el sobrenadante y al pellet se le agrego 500 µL de metanol para volver a centrifugar la muestra. Se desecha el sobrenadante y se le agrega 500 µL de acetona al pellet para centrifugar volver a centrifugar la muestra. Se desecha el sobrenadante y se pone se secar el pellet. Se agrego 30 µL de buffer de solubilidad al pellet, se mezcló bien y se mantuvo en refrigeración.

2.1.2. Método de TCA+detergente (Muestra B)

Este método se realizó siguiendo el mismo protocolo de extracción de proteínas en hojas de *Arabidopsis Thaliana* utilizado en el método anterior, con la diferencia de que, al inicio

del proceso, también se le agregó una mezcla de agua (250 μ L) + detergente en específico (250 μ L).

2.1.3. Método de fenol (Muestra C)

Se lavó la réplica con SDS buffer (500 μ L), se la traslado a la sorbona, se le agrego 500 μ L de fenol + 75 μ L de mercaptoethanol y se la centrifugo. Se extrajo 400 μ L del sobrenadante y se lo coloco en otro tubo de 2 ml con la misma etiqueta. (Se desecho el tubo al que se le extrajo los 400 μ L). Se agregó 500 μ L de acetato de amonio y se dejó precipitar durante 4 a 16 horas en refrigeración.

Se centrifugo la muestra, se desechó el sobrenadante y al pellet se le agrego 500 μ L de metanol para volver a centrifugar la muestra. Se desecha el sobrenadante y se le agrega 500 μ L de acetona al pellet para centrifugar volver a centrifugar la muestra. Se desecha el sobrenadante y se pone se secar el pellet. Se agrego 30 μ L de buffer de solubilidad al pellet, se mezcló bien y se mantuvo en refrigeración.

2.1.4. Método de solubilidad (Muestra D)

Se lavó la réplica con buffer de solubilidad (500 μ L), se la traslado a la sorbona, se le agrego 500 μ L de fenol + 75 μ L de mercaptoethanol y se la centrifugo. Se extrajo 400 μ L del sobrenadante y se lo coloco en otro tubo de 2ml con la misma etiqueta. (Se desecho el tubo al que se le extrajo los 400 μ L). Se agregó 500 μ L de acetato de amonio y se dejó precipitar durante 4 a 16 horas en refrigeración. Posteriormente, se extrajo 100 μ L del sobrenadante, se lo coloco en otro tubo de 2 ml con la misma etiqueta y se desechó el resto de la muestra. A la nuestra muestra se le agrego 1 ml de acetona y se centrifugo. Finalmente, se desechó el sobrenadante, al pellet se le agrego 30 μ L de buffer de solubilidad y se mantuvo en refrigeración.

2.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por medio del método de Bradford.

Se rotulo una placa de 96 pocillos de ELISA para diferenciar las muestras por método y se agregó 200 μ L de Bradford en 32 pocillos. Posteriormente, se agregó en cada pocillo 1 μ L de la muestra + 9 μ L de agua ultrapura y se mezcló bien con la pipeta. Finalmente, se

llevó la placa a un espectrofotómetro y se realizó la cuantificación de proteínas a rango de de 595 nm.

2.3. Electroforesis bidimensional

2.3.1. Enfoque isoeléctrico (IEF)

Tabla 2.1. Valores requeridos para la hidratación de la tira con las muestras

Método	Muestra de extracción (µL)	Buffer de rehidratación (µL)	Nueva muestra (µL)
A	30	95	125
B	28	97	125
C	29	96	125
D	30	95	125

Se tomo 100 µL de cada nueva muestra y se la coloco en una canaleta rotulada por método. Se agrego una tira de 7cm para isoelectroenfoque en la canaleta por cada método y se dejó hidratar por 12 horas. Después de la rehidratación, las proteínas se separaron mediante sus puntos isoeléctricos con un equipo analizador de células IEF de enfoque isoeléctrico Bio-rad Protean i12 durante 6 horas o más.

Luego, a las tiras enfocadas se le agrego 400 µL de buffer de equilibrio I en la canaleta y se colocó la canaleta sobre un agitador durante 20 minutos. Luego se recogió el buffer de equilibrio I con una pipeta y se lo desecho. Se repitió el proceso, pero con un buffer de equilibrio II.

2.3.2. Electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS PAGE)

En un vaso de precipitación se agregó:

Tabla 2.2. Solución para preparación de gel de acrilamida/tris-glicina

10%	5 ml
Agua	2.648
40% A/bis	1.250
1.875M Tris, pH 8.8	1.000
10% SDS	0.050
10% AP	0.050
TEMED	0.005

Se armo la cámara de electroforesis y se colocó la mezcla sobre un extremo pegado al vidrio hasta que se alcanzó 3/4 del sistema, formando un tapón en la parte inferior, se agregó 0,25 ml de alcohol al 96% y se dejó polimerizar de 25 a 30 minutos. Se calentó agarosa en intervalos de 5 segundos hasta que sea totalmente líquida. Posteriormente, se retiró el exceso de alcohol del sistema. En otro vaso de precipitación se agregó:

Tabla 2.3. Solución de para preparación de gel de acrilamida/tris-glicina

Stacking (4%)	2 ml
Agua	1.492
40% A/bis	0.200
1.875M Tris, pH 6.8	0.200
10% SDS	0.020
10% AP	0.050
TEMED	0.005

Se colocó la mezcla cuidadosamente sobre un extremo del vidrio hasta cubrir totalmente el sistema, formando un tapón en la parte superior. Se colocó una peineta sobre el sistema para crear espacios y crear pocillos a lo largo del gel. Se cubrió los extremos del sistema con la agarosa líquida para que no entre aire y se dejó polimerizar de 25 a 30 minutos.

Se retiró la peineta cuidadosamente, se retiró el soporte del sistema y se colocó el gel en el sistema de electroforesis. Se colocó el sistema de electroforesis dentro de la cubeta para electroforesis, se llenó el sistema con buffer de corrida hasta la mitad para observar que no haya fugas en el sistema y finalmente se llenó todo el sistema.

Tabla 2.4. Preparación de buffer de corrida (5X) con pH 8,3

Buffer de corrida 5X	300 ml
Tris base 5X	4,5 g
Glicina	21,6 g
SDS	1,5 g
H2O bidest hasta	300 ml

Se colocó 5 μ L de marcador de peso molecular en el primer pocillo y en el resto de los pocillos se colocó la cantidad en microlitros de las muestras de proteína según los valores obtenidos en la cuantificación de proteínas. Se tapó la cubeta de electroforesis, se conectó el sistema con el equipo de PowerPacBasic y se programó a un volumen constante de 100V durante 2 horas.

2.3.3. 2D-PAGE

La electroforesis en segunda dimensión se realizó usando las tiras de IPG de 7 cm de pH 3-10 NL con las que se trabajó en el enfoque isoeléctrico.

En un vaso de precipitación se agregó las cantidades y soluciones expuestas en la **Tabla 2.2**. Se armó la cámara de electroforesis y se colocó la mezcla sobre un extremo pegado al vidrio hasta que se alcanzó los 4/4 del sistema y se agregó 0,25 ml de alcohol al 96% para dejarlo polimerizar de 25 a 30 minutos. Se calentó agarosa en intervalos de 5 segundos hasta que sea totalmente líquida. Posteriormente, se retiró el exceso de alcohol del sistema. Se cubrió los extremos del sistema con la agarosa líquida para que no entre aire y se dejó polimerizar de 25 a 30 minutos.

Una vez que polimerizó el gel, se colocó la tira obtenida en el enfoque isoeléctrico cuidando de no dejar burbujas. Luego, se retiró el soporte del sistema y se colocó el gel en el sistema de electroforesis. Se colocó el sistema de electroforesis dentro de la cubeta para electroforesis, se llenó el sistema con buffer de corrida hasta la mitad para observar que no haya fugas en el sistema y finalmente se llenó todo el sistema.

2.3.4. Tinción

Luego de la electroforesis, se desarmo el sistema y se retiró la lámina de vidrio pequeña con un cortador de plástico. Se corto verticalmente el gel y con la ayuda de una piseta llena de agua destilada, se despegó el gel de la otra lamina de vidrio.

Se colocó el gel en una caja de Petri, se desechó el exceso de agua destilada, se colocó 2.5 ml de Coomasie Blue y se colocó la caja de Petri en el agitador por 25 minutos. Este proceso se realizó una segunda vez mas y posteriormente se dejó reposar el gel hasta que se evidenciaron las bandas en el gel.

2.3.5. Imagen

Los geles obtenidos por electroforesis se analizaron con el Imagine Lab Software y se determinó la intensidad de las bandas de las muestras y sus pesos moleculares.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1. Resultados

En la Figura 3.1 se puede observar la curva de calibración de Abs 595 vs concentración de proteína obtenida mediante el método de Bradford, de la cual se logró sacar la fórmula de la curva, la que sirvió para encontrar el valor de “x” que representaba el valor de la concentración de las proteínas.

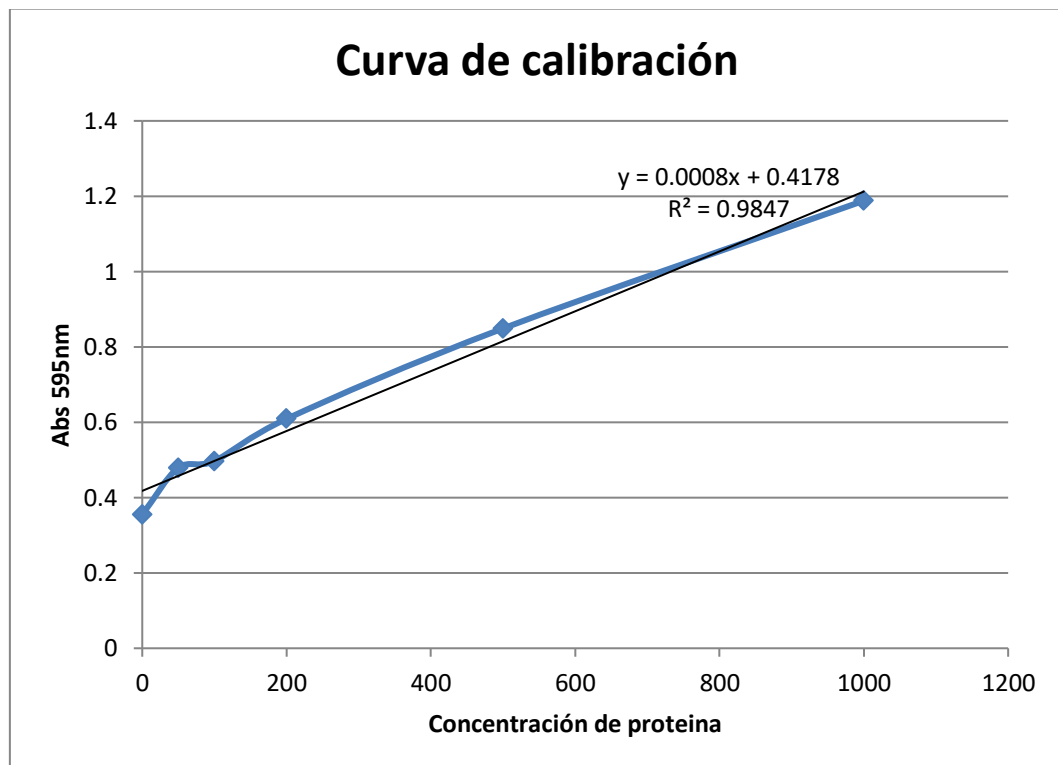


Figura 3.1. Curva de calibración de Abs 595 vs concentración de proteína

En la **Tabla 3.1** se logra observar los valores obtenidos mediante el espectrofotómetro y los cuales fueron reemplazados en la ecuación (3.1) para encontrar los valores de concentraciones de proteínas que se representan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.1. Valores de absorbancia determinados con el espectrofotómetro

Muestras	Absorbancia 595 nm		
A1	0.846	0.835	0.937
A2	0.67	0.594	0.978
A3	0.761	0.742	0.731
B1	0.837	0.721	1.15
B2	0.806	0.759	1.229
B3	0.921	0.812	0.986
C1	0.899	0.789	0.981
C2	1.152	1.21	0.961
C3	0.785	0.781	1.292
D1	0.633	0.551	0.613
D2	0.509	0.486	0.609
D3	0.511	0.437	0.413

Formula obtenida de la curva de calibración:

$$y = 0.0008x + 0.4178 \quad (3.1)$$

$$y - 0.4178 = 0.0008x$$

$$x = \frac{y - 0.4178}{0.0008}$$

Tabla 3.2. Concentración de proteínas determinados por medio de la formula (3.1)

Muestras	Concentración de proteínas			Promedios de concentración	Conversión a ug/ul
A1	535.25	521.5	649	568.58	5.686
A2	315.25	220.25	700.25	411.92	4.119
A3	429	405.25	391.5	408.58	4.086
B1	524	379	915.25	606.08	6.061
B2	485.25	426.5	1014	641.92	6.419
B3	629	492.75	710.25	610.67	6.107
C1	601.5	464	704	589.83	5.898
C2	917.75	990.25	679	862.33	8.623
C3	459	454	1092.75	668.58	6.686
D1	269	166.5	244	226.50	2.265
D2	114	85.25	239	146.08	1.461
D3	116.5	24	-6	44.83	0.448

En la **Figura 3.2** se puede observar la imagen del gel SDS PAGE obtenida con el Image Lab Software, donde se pueden visualizar las bandas de los pesos moleculares de las proteínas. De la cual se logro obtener que el peso de las proteínas del estudio era de 70 KDa.

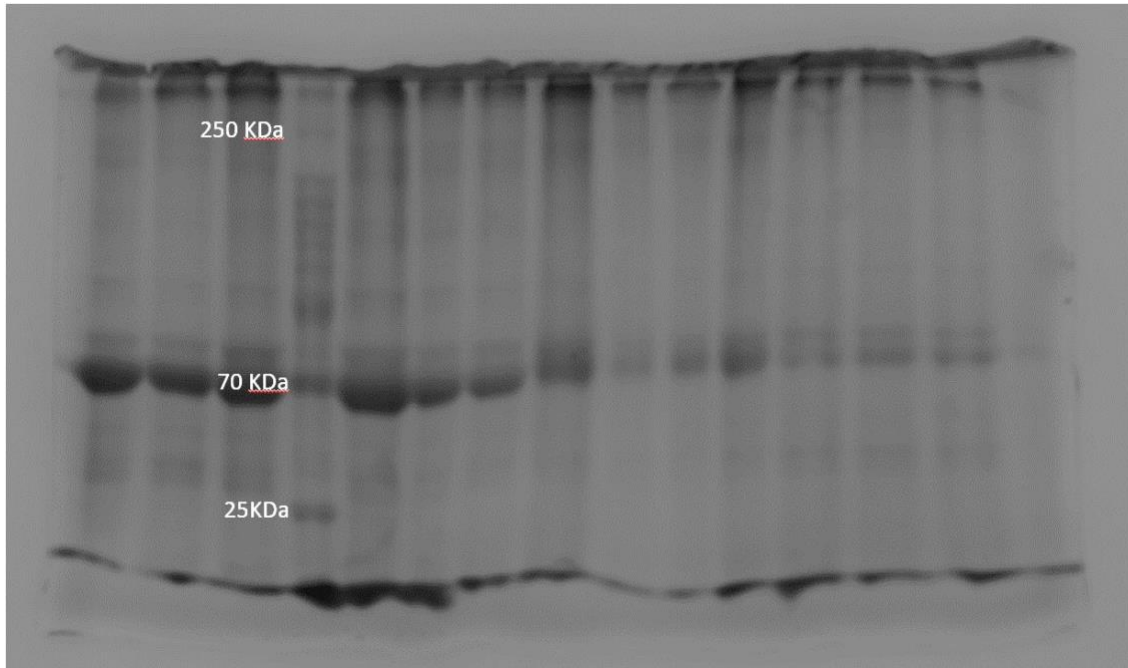


Figura 3.2. Imagen de gel SDS PAGE

3.4. Análisis

Según los resultados obtenidos, en el proceso de cuantificación de proteínas, el método del fenol obtuvo los valores más altos del estudio con un promedio total de 7.069 ug/ul, seguido por el método del CIBE con 6.196 ug/ul, el método del TCA acetona/fenol con 4.630 ug/ul y finalmente el método de solubilidad con 1.391 ug/ul. Por lo que el método del fenol demostró mayor eficiencia respecto a la cantidad de proteína obtenida.

En el proceso de electroforesis por otro lado, se evidencio que los procesos que mejor resultados dieron fueron el método del TCA acetona/fenol y el método del CIBE, ya que las bandas observadas en la imagen del gel eran más claras para estos dos métodos. Lo que quiere decir que, aunque en la cuantificación de proteínas el método del fenol haya dado

mayor cantidad de proteínas, estas no estaban tan limpias, es decir que las muestras presentaban gran cantidad de impurezas.

Por lo que teniendo en cuenta que el método del CIBE presento la mayor concentración de proteínas luego del método del fenol y observando que en el análisis del gel el método del CIBE y método del TCA acetona/ fenol fueron los que presentaron muestras sin gran cantidad de impurezas. El método del CIBE sería el proceso óptimo para realizar una extracción de proteínas de forma eficiente.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Al momento de realizar la cuantificación de proteínas extraídas, el método del fenol presento mayor concentración de proteínas, seguido del método del CIBE, pero esto pudo deberse a que las muestras con el método de fenol contenían un excedido de pedazos de hoja de banano. Por lo que, en ese caso el método del CIBE es el que presentaría mayor concentración de proteínas.

En el proceso de separación de proteínas a partir del gel de primera dimensión se demostró que el método del CIBE presentaba bandas más claras y limpias en comparación los demás métodos, seguidos por el método del TCA acetona/fenol. Respeto a los geles de segunda dimensión no tuvo éxito, debido a que los geles no corrieron de forma correcta. Esto pudo deberse a que las tiras que se usaron tenían mucho tiempo guardadas o que el buffer de corrida contamina las muestras.

El método propuesto por el CIBE demostró ser más eficiente que los del método de TCA/acetona/fenol, método del fenol y método de solubilidad, ya que los lavados eliminaron compuestos como: sales, contaminantes polares, lípidos, compuestos fenólicos, peróxidos, etc. Además, el detergente usado en el método del CIBE evitó que las proteínas se degraden en el proceso de extracción.

4.2. Recomendaciones

- Mientras se realice el proceso de extracción de proteínas, se deben mantener las muestras en un recipiente frío, ya que las proteínas se pueden degradar.
- No utilizar más de dos veces el mismo buffer de corrida, ya que este puede tener impurezas y puede contaminar el proceso de electroforesis haciendo que las muestras tarden mucho más en correr.

- Tener mucho cuidado al momento de desmontar el gel para tinturarlo, ya que es muy delicado y podría romperse.

BIBLIOGRAFÍA

- INIAP (2022). *Banano, plátano y otras musáceas*. Obtenido de <https://www.iniap.gob.ec/banano-platano-y-otras-musaceas/>
- Zhiminaicela Cabrera, J. B., Quevedo Guerrero, J. N., & García Batista, R. M. (2020). *La producción de banano en la Provincial de El Oro y su impacto en la agrobiodiversidad*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 189-195.
- Beeton-Kempen, N. (2020). *Proteómica: principios, técnicas y aplicaciones*. Obtenido de <https://www.news-courier.com/proteomics/articles/proteomics-principles-techniques-and-applications-343804>
- Borja, J. (2016). *La producción de banano bajo el sistema de comercio justo: un análisis del caso ecuatoriano*. Obtenido de Siembra: <https://doi.org/10.29166/siembra.v3i1.185>
- AEBE (2022). *REPORTE ESTADISTICO ENERO/NOVIEMBRE 2022*. Obtenido de https://f4cd675b-3f71-47d5-8daa-725c5f8789e5.usrfiles.com/ugd/f4cd67_1f15f120e0574242afba2e7fe3bbe2a4.pdf
- IEE (2022). *ESTADO DEL BANANO EN ECUADOR: acumulación, desigualdad y derechos laborales*. Obtenido de <https://library.fes.de/pdf-files/bueros/quito/19562-20220927.pdf>
- Camacho, C., Elizalde, J. & Ruiz, E. (2022). *Proteómica, nueva herramienta científica*. Obtenido de <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1465-proteomica-nueva-herramienta-cientifica>
- Castellanos, L., Gonzalez, L., & Padron, G. (2022). *PROTEÓMICA*. Obtenido de Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología: <https://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/chapter20.pdf>
- López, L. (2012). *Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de *Pentacalia nítida* y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso*. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11802/LopezQuimbayoLinaDaniela2012.pdf?sequence=1>

Carvajal, M., & Murgueitio, F. (2017). *Caracterización de las proteínas de la cáscara de Plátano tipo Williams* [Giant Cavendish] (Bachelor's thesis, Universidad Estatal de Guayaquil).

Torrades, S. (2004). *Proteómica*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-proteomica-13060308#:~:text=La%20investigaci%C3%B3n%20de%20los%20proteomas,y%20la%20espectrometr%C3%ADa%20de%20masas>.