

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

Técnicas de detección de moléculas contaminantes en preparaciones proteicas purificadas de *Salmonella* spp.

Tesis Profesional Para Obtener el Título de Licenciatura en Química

Presenta

KELLY ODETTE SÁNCHEZ MORALES

Dirección de Tesis

Dr. EDGAR ARTURO TÉLLEZ ESPINO

Codirección de tesis

Dra. LAURA MORALES LARA

Asesor técnico

Dra. MARÍA MIRIAM HERNÁNDEZ ARROYO

Junio 2025

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco laboratorio de Nutravia S.A de C.V por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por ser parte de este gran proyecto.

Agradezco también infinitamente a la Dra. Laura Morales por aceptar ser mi asesora, por las correcciones, retroalimentación, conocimiento que siempre me transmitió, por la ayuda que siempre me brindo desde BUAP, por ser muy paciente conmigo. También agradezco al Dr. Edgar Téllez, primero por demostrarme que todo tiene solución y ser una persona con la disposición de ayudarme, por la paciencia y la confianza.

Agradezco infinitamente a los miembros de mi comité el Dr. Ángel Palillero, Dr. Armando Mena y la Dra. Judith Cruz por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y las observaciones realizadas durante la revisión.

Doy gracias a mis padres Gloria y Antonio por el amor y la confianza que siempre me dan, porque al final de todo ellos siempre fueron mi fuente de inspiración para que yo pudiera dar lo mejor de mí en cada paso de mi formación como Química. Gracias a mi abuelita Aurora por sus palabras de aliento para poder lograr esto y mi abuelito Chayito que ya no está entre nosotros, pero siempre lo llevo en mi corazón.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Ale, Agus, Andrés y Liz por explicarme cosas que no entendía y por ayudarme a estudiar, por convivir y pasar buenos momentos en el laboratorio. Gracias también a mis mejores amigas Abi e Itzel por siempre inspirarme, por la ayuda que siempre me brindan y por el cariño que siempre me dan. Agradezco finalmente el apoyo y consejos de mis primas, Mari, Aman, Citla y Alo y mi pequeña Gabi que es parte de una gran inspiración.

La realización de este trabajo se debe en parte al apoyo y trabajo de mis padres, de mi familia, compañeros de laboratorio y sobre todo de los Doctores que me guiaron.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	2
2.2 Salmonella una infección bacteriana	3
2.3 Características del género Salmonella spp.	4
2.4 Estructura del lipopolisacárido de Salmonella	4
2.4.1 Antígeno O	5
2.4.2 Polisacárido central	6
2.4.3 Lípido A	6
2.5 Métodos de detección de endotoxina	6
2.5.1 Pirógeno	6
2.5.2 Prueba de pirógenos en conejo (RPT)	7
2.5.3 Prueba del Lisado de amebocitos de Limulus (LAL)	7
2.5.4 Prueba de activación de monocitos (MAT)	9
3. JUSTIFICACIÓN	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos particulares	10
4. DIAGRAMA DE TRABAJO	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1 Material	12
5.2 Material biológico	12
5.3 Equipos	12
5.4 Métodos	13
6. METODOLOGÍA	13
6.1 Conservación y mantenimiento de las preparaciones proteicas	13
6.2 Método de extracción de las proteínas de Salmonella	13
6.3 Ultrafiltración del extracto crudo proteico	14
6.4 Purificación por FPLC	14
6.5 Cuantificación de proteína por el ensayo de BCA	15
6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	16
6.7 Cuantificación de dodecilsulfato de sodio (SDS) en preparaciones proteicas	17
6.8 Cuantificación de LPS por el método de Lisado de amebocitos de Limulus	18

6.9 Cuantificación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico	19
6.10 Cuantificación de lípidos totales bacterianos por el método de sulfo-fosfo-vainillina	20
6.11 Cuantificación de ARN	21
6.12 Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
7.1 Extracción de proteínas de <i>Salmonella</i>	23
7.2 Obtención de una preparación proteica homogénea de <i>Salmonella</i>	24
7.3 Análisis de las fracciones recolectadas por cromatografía de FPLC, mediante SDS-PAGE	25
7.4 Evaluación de moléculas contaminantes en las preparaciones proteicas homogéneas	31
7.4.1 Evaluación de dodecilsulfato de sodio (SDS)	31
7.4.2 Evaluación de LPS por el método de Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>	33
7.4.3 Evaluación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico	35
7.4.4 Evaluación de lípidos totales bacterianos por el método de sulfo-fosfo-vainillina	37
7.4.5 Evaluación de ARN	39
8. CONCLUSIÓN	42
ANEXOS	43
7. BIBLIOGRAFÍA	46

Lista de abreviaciones

LPS	Lipopolisacárido
Kdo	ácido 3-desoxi-D-manooctuosónico
GlcN	Glucosamina
RPT	Rabbit Pyrogen Test
BET	Bacterial Endotoxin Test
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
MAT	Prueba de activación de monocitos
MP1	Muestra proteica 1
MP2	Muestra proteica 2
MP3	Muestra proteica 3
TLR4	Toll-like receptor 4
HEK293	Células embrionarias humanas
NF-kB	Complejo proteico que controla la transcripción del ADN
SDS	Dodecilsulfato de sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SPV	Sulfo-fosfo-vainillina

Lista de figuras

<i>Figura 1.</i> Estructura química de la endotoxina de la bacteria <i>E. coli</i>	5
<i>Figura 2.</i> Técnicas de la prueba de LAL.	8
<i>Figura 3.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie del extracto MP2 (2 µg) antes y después de la ultrafiltración.....	24
<i>Figura 4.</i> Cromatogramas obtenidos de FPLC de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3.....	25
<i>Figura 5.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie del extracto crudo de MP3 (2 µg), antes de la ultrafiltración y después de FPLC.....	26
<i>Figura 6.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 70-89.	27
<i>Figura 7.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 90-109..	27
<i>Figura 8.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 110-129.....	28
<i>Figura 9.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 130-135..	28
<i>Figura 10.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3 (2 µg), después de la purificación por FPLC.	30
<i>Figura 11.</i> Electroforesis SDS-PAGE teñido por Plata de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3 (1 µg) después de la purificación por FPLC.....	30
<i>Figura 12.</i> Curva de calibración de SDS.	31
<i>Figura 13.</i> Cuantificación de SDS en las muestras proteicas homogéneas.	32
<i>Figura 14:</i> Curva de la calibración de LPS.....	33
<i>Figura 15:</i> Cuantificación de endotoxina en las muestras proteicas homogéneas.....	34
<i>Figura 16:</i> Curva de calibración de glucosa.	35
<i>Figura 17.</i> Cuantificación de carbohidratos en las muestras proteicas homogéneas..	36
<i>Figura 18.</i> Curva de calibración de ácido oleico.....	37
<i>Figura 19.</i> Reacción de SPV dependiente de la concentración de SDS.....	38
<i>Figura 20.</i> Mecanismo de reacción de SPV.....	39
<i>Figura 21.</i> Curva de calibración de ribosa.	40
<i>Figura 22.</i> Cuantificación de RNA en las muestras proteicas homogéneas.	41
<i>Figura 23.</i> Curva de calibración de Albúmina.	43
<i>Figura 24.</i> Cuantificación de proteína de MP1, MP2 y MP3 de los extractos crudos.	44

<i>Figura 25. Cuantificación de proteína de MP1, MP2 y MP3 de las preparaciones proteicas homogéneas</i>	44
<i>Figura 26. Kit de Limulus Amebocyte Lysate</i>	45

Lista de tabla

<i>Tabla 1.</i> Equipos ocupados en este trabajo.	12
<i>Tabla 2.</i> Métodos ocupados en este trabajo.	13
<i>Tabla 4.</i> Soluciones para la curva de calibración de proteína.	15
<i>Tabla 5.</i> Reactivos para llevar a cabo el gel de poliacrilamida al 12%.	16
<i>Tabla 6.</i> Reactivos utilizados para buffer de electrodo 10x.	16
<i>Tabla 7.</i> Reactivos utilizados para buffer de carga con una concentración de 2x.	17
<i>Tabla 8.</i> Soluciones para la curva de calibración de SDS.	17
<i>Tabla 9.</i> Soluciones para la curva de calibración de LPS.	18
<i>Tabla 10.</i> Soluciones para la curva de calibración de carbohidratos.	19
<i>Tabla 11.</i> Soluciones para la curva de calibración de lípidos.	20
<i>Tabla 12.</i> Soluciones para la curva de calibración de ARN.	22
<i>Tabla 13.</i> Concentración de proteína antes y después del proceso de ultrafiltración del extracto crudo.	23
<i>Tabla 14.</i> Concentración de proteína después de FPLC.	29

Resumen

En la actualidad la salmonelosis es una de las principales zoonosis que se presenta en varios países, debido al consumo de alimentos o de agua contaminados con *Salmonella typhi*, en el ser humano la enfermedad presenta varios síntomas como fiebre, dolor de cabeza o diarrea, si la infección no es tratada de manera adecuada puede ocasionar choque séptico y muerte. En la industria farmacéutica se encuentra en constante búsqueda de métodos alternativos para la detección de endotoxinas que puedan aplicar durante las operaciones de obtención de los biofármacos y en el control de calidad del producto terminado. En este trabajo se obtuvieron tres extracciones de proteínas empelando tres distintos buffers de lisis, en los cuales se modificaron las concentraciones (SDS 0.02, 0.05 y 0.07 %), a partir de estos tres extractos proteicos obtenidos, fueron analizados y purificados por FPLC modificando la concentración de la fase móvil (NaCl 75, 100, 150 mM), obteniendo las tres preparaciones proteicas purificadas a homogeneidad que mediante electroforesis se detectó la proteína de interés de 38 kDa. El objetivo de este trabajo fue detectar moléculas contaminantes en preparaciones proteicas purificadas de *Salmonella* spp. para cuantificar por diferentes métodos espectrofotométricos SDS, carbohidratos, lípidos, endotoxina y RNA. Se concluye que MP3 tiene mayor concentración de proteína (0.165 mg/mL) y menor concentración de moléculas contaminantes (SDS 2544.067 µg/mL, ARN 0.0404 mg/mL, LPS 56 EU/mL) sin embargo, MP1 fue el que obtuvo menor concentración de carbohidratos (0.318 µg/mL), todo esto se le atribuye a los cambios en el método de extracción y purificación de cada una de las muestras, así mismo, para el método de detección de lípidos no se pudo obtener una cuantificación correcta, debido a que se podría generar un complejo colorimétrico entre SDS proveniente de la preparación de la muestra y el SPV reactivo del método.

1. Introducción

La bacteria *Salmonella* spp. pertenece a la familia Enterobacteriaceae, siendo uno de los principales microorganismos implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos en humanos en todo el mundo. La infección conocida como salmonelosis es una de las más comunes y está ampliamente distribuida en el mundo, se le considera un problema de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo. Dependiendo de los factores de virulencia y el estado inmunológico del paciente, puede ocasionar una infección gastrointestinal leve y autolimitada hasta una enfermedad sistémica que llega a poner en peligro la vida del paciente (Diaz *et al.*, 2014).

La parte virulenta de esta bacteria se encuentra en el lipopolisacárido (LPS) que consta de tres partes principalmente que son: el lípido A, oligosacárido central y polisacárido repetitivo designado como antígeno "O". El LPS considerado como una endotoxina bacteriana, es posiblemente una de las moléculas que más atraen la atención de los investigadores ocupados en estudiar la problemática de la patogénesis microbiana (Barasoain, 1976).

Las endotoxinas son contaminantes habituales en productos farmacéuticos e industriales por lo que es necesario detectar y eliminar todas las trazas de esta biomolécula en fármacos, sustancias y dispositivos utilizados en complejos hospitalarios o con pacientes inmunodeprimidos. En la actualidad existen diversas técnicas para la detección de endotoxinas, siendo el test Lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) y Rabbit Pyrogen Test (RPT) los principales métodos validados por las agencias reguladoras en materia de salud, sin embargo, estos métodos presentan limitaciones por lo que la implementación de nuevas técnicas alternativas de detección de endotoxina es de suma importancia (Zuzuarregui, 2013). En este trabajo se evaluaron técnicas para poder cuantificar la presencia de endotoxinas y otras moléculas contaminantes en muestras proteicas con potencial de aplicación biofarmacéutica.

2. Antecedentes

La salmonelosis prevalece como una enfermedad descrita desde la época de Hipócrates. El género *Salmonella* engloba a todos los microorganismos capaces de generar tifus o fiebres tifoideas, su nombre fue propuesto en honor a David Elmer Salmon que junto a Theobald

Smith obtuvieron el primer aislamiento de *Salmonella cholerae-suis* a partir de esto su nomenclatura oficialmente fue aceptada en el año de 1933 (Adelantado *et al.*, 2008).

La salmonelosis una de las principales zoonosis que afecta a la población humana, es causada por bacterias del género *Salmonella* spp (Rivera *et al.*, 2012). Es una enfermedad aguda de amplia distribución mundial en áreas donde no se han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados y que no cuentan con medidas de salud pública óptimas, afecta a todos los grupos de edad, pero con mayor frecuencia a menores de cinco años y mayores de 60 años, que son los grupos más vulnerables (Gutiérrez *et al.*, 2000).

En el mundo, anualmente se registran al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea resultando en 600,000 muertes (Zaidi *et al.*, 2006). Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera por enfermedad gastrointestinal antes de los 7 años es hasta del 50% dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales (Parra *et al.*, 2002). En México, las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso ocupan la decimocuarta causa de fallecimiento, lo que representa un severo problema de salud pública para nuestro país (Hernández *et al.*, 2011).

2.2 *Salmonella* una infección bacteriana

La salmonelosis es una enfermedad reconocida mundialmente. Los seres humanos adquieren esta infección por la ingestión de *Salmonella* proveniente de alimentos contaminados, los principales serotipos causantes son *Typhi* y *Paratyphi* característicos por ser hospedero-específicos (Contreras *et al.*, 2019). Esta infección está asociada principalmente con la ingestión de alimentos preparados o manipulados inapropiadamente que se encuentran contaminados, como carnes, productos lácteos y huevos crudos, los cuales son las fuentes más probables de infección (Durango *et al.*, 2004). Una de la características importantes de esta bacteria es su persistencia y comportamiento estacional, particularmente en regiones tropicales y subtropicales donde las condiciones ambientales son ideales para su establecimiento, lo que favorece que la bacteria desarrolle estrategias de supervivencia que le permiten prevalecer por periodos prolongados adaptándose a condiciones estresantes de temperatura, pH, desecación, estrés osmótico y nutrimental que facilita su supervivencia y dispersión ambiental para el alcance de nuevos hospederos (Contreras *et al.*, 2019). Otra característica muy preocupante es el incremento en aislados de *Salmonella enterica*

resistentes a algunos antibióticos utilizados para el tratamiento empírico en particular amoxicilina/acido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas la más frecuente y detectada es la resistencia a ampicilina (de Toro *et al.*, 2014).

2.3 Características del género *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* spp. está conformado por bacterias Gram-negativas, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y comprende una población grande y estrechamente relacionada de patógenos médicamente importantes, hasta la fecha se han identificado más de 2,500 serotipos diferentes (Su *et al.*, 2007). Este género consta de sólo dos especies que son *S. enterica* y *S. bongori*. Por su parte la especie de *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies que se distinguen por algunas características bioquímicas, estas subespecies son: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *índica* (Tindall *et al.*, 2005). De acuerdo con la presencia de los antígenos O (lipopolisacárido), Vi (polisacárido capsular) y H (flagelar) actualmente pueden serotiparse las serovariedades que pertenecen al mismo género con base a su gran identidad genética mayor al 90%, en consecuencia la especie *S. entérica* agrupa a los patógenos de mayor interés para la salud pública, por ejemplo *Salmonella typhi* causante de la fiebre tifoidea o en raras ocasiones *Salmonella Paratyphi* (A, B y C) que puede producir un cuadro clínico similar pero de menor gravedad. Las demás subespecies de *S. entérica* y también *S. bongori* son habitantes del ambiente y se asocian con animales de sangre fría (Delgado *et al.*, 2015).

2.4 Estructura del lipopolisacárido de *Salmonella*

Salmonella spp. tiene un polisacárido capsular que cubre la superficie de la bacteria que actúa como factor de virulencia importante en su supervivencia en el ambiente ácido del estómago, además es responsable de la resistencia a la fagocitosis (Rodríguez, 2018).

El LPS es una endotoxina, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; está compuesto por una región lipídica y una glicosídica con funciones separadas y sinérgicas lo que hace que esta molécula contribuya a su virulencia, cuya comprensión ha sido complicada, por lo que continúa estudiándose ampliamente (Romero *et al.*, 2010). La estructura básica de su LPS consta de tres partes: lípido A, oligosacárido central y polisacárido repetitivo designado como antígeno "O" (figura 1). El lípido A está altamente

conservado y ejerce la actividad endotóxica, mientras que la cadena de carbohidrato del antígeno "O" es un polímero de oligosacáridos repetidos, que difiere entre especies (Rezania *et al.*, 2011).

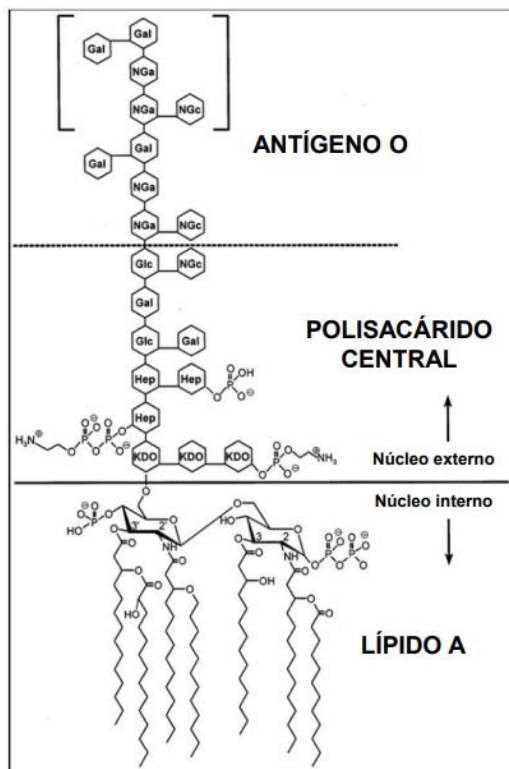


Figura 1. Estructura química de la endotoxina de la bacteria *E. coli*. El LPS de las bacterias Gram-negativas está constituido por tres regiones principales que son el antígeno O, el polisacárido central que a su vez se divide en externo e interno, y el lípido A (Tomada de Magalhães *et al.*, 2007).

2.4.1 Antígeno O

La parte más expuesta al exterior celular bacteriano de la molécula de LPS es el antígeno O, por lo tanto, es el principal antígeno al que se dirigen las respuestas de anticuerpos del huésped, el LPS contiene de una a ocho unidades repetitivas de residuos monosacáridos y se diferencian entre las cepas por medio del tipo de azúcares, su secuencia, enlace químico, sustitución y las formas de anillo utilizadas; esto conduce a una diversidad casi ilimitada de la estructura de la cadena O dando como consecuencia a cientos de serotipos para especies Gram negativas particulares. Asimismo, el número de subunidades utilizadas para completar la cadena varía entre 0 - 50 y tan solo un organismo producirá una amplia gama de estas longitudes, dando lugar al patrón de pesos moleculares del LPS (Erridge *et al.*, 2002).

2.4.2 Polisacárido central

El polisacárido central puede estar subdividido en interno y externo. El núcleo externo generalmente consiste en azúcares de hexosa comunes como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina. La diversidad estructural de la región externa está prácticamente limitada a los lipopolisacáridos de enterobacterias. Los componentes del núcleo interno en *Salmonella* y *E. coli* se caracterizan por tener azúcares más inusuales, que son característicos del LPS, particularmente como el ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa (Rojas, 1995).

2.4.3 Lípido A

El lípido A es un componente estructural del LPS responsable de su actividad endotóxica. Se sabe que el lípido A de *Salmonella* se subdivide formalmente en un esqueleto hidrofílico que contiene glucosamina y fosfato y un resto hidrofóbico que consiste en residuos de ácidos grasos de cadena larga (Liideritz *et al.*, 1973). Se compone típicamente por un disacárido β -D-GlcN-(1-6)- α -D-GlcN unido a dos grupos fosforilo (posición 1,4'), estos grupos fosfatos se pueden sustituir por etanolamina, fosfato de etanolamina, difosfato de etanolamina, GlcN, 4-amino-4-deoxy-L-arabino-piranososa y D-arabinofuranosa. Estas cadenas a su vez pueden ser sustituidas por más ácidos grasos como el ácido palmítico, mirístico, láurico, cáprico, esteárico, entre otros, para proporcionar moléculas de LPS con hasta siete sustituyentes acilo, que varían considerablemente entre especies en cuanto a número, longitud, orden y saturación (Kabanov *et al.*, 2010).

2.5 Métodos de detección de endotoxina

2.5.1 Pirógeno

El término pirógeno hace referencia a agentes que producen fiebre y se usa con frecuencia para describir específicamente las endotoxinas de bacterias Gram-negativas en la industria farmacéutica (Franco *et al.*, 2018).

La detección de pirógenos es de suma importancia cuando se habla de control de calidad, ya que es una parte esencial de las pruebas de seguridad de medicamentos en la industria farmacéutica, laboratorios de referencia e instituciones de atención médica. Para garantizar la seguridad del paciente, se han determinado niveles de umbral crítico de contaminación pirogénica en el biofármaco y que no deben superarse. Por consecuencia la Farmacopea

Europea promueve métodos de detección de endotoxinas rápidos y eficientes (Wunderlich *et al.*, 2014). A continuación, se describen los más importantes.

2.5.2 Prueba de pirógenos en conejo (RPT)

La prueba de pirógenos en conejos (RPT) fue desarrollada en la década de 1920 y fue el primer método aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos en EE.UU. para la detección de LPS (Su *et al.*, 2015). Fue descubierta por primera vez por Hort y Penfold, su principio se basa en administrar fármacos por vía parenteral a conejos y observar si los animales presentan aumento de temperatura. La prueba en conejos es sensible para detectar concentraciones de la endotoxina tan bajas como 0.5 EU/mL; similar a la prueba en humanos (Vipond *et al.*, 2016).

Sin embargo, el uso de RPT para evaluar vacunas que contienen niveles altos de endotoxina, es problemático por variaciones en su sensibilidad, además su vía de administración puede ser intravenosa, que garantiza una administración rápida en el torrente sanguíneo, mientras tanto, la administración subcutánea o intramuscular en donde se interactúa con las células del sistema inmunitario y la absorción al torrente sanguíneo es más lenta. Las pruebas de seguridad en fármacos son de suma importancia ya que la administración de un producto contaminado que tenga altas concentraciones de material pirogénico podría tener consecuencias devastadoras, como la muerte en humanos. Este método ha sido objeto de crítica por sus deficiencias científicas y éticas y ha sido reemplazado por la prueba de endotoxinas bacterianas (BET, Bacterial Endotoxin Test), sin embargo, RPT se considera un "estándar de la industria", particularmente para detectar pirógenos no endotóxicos en medicamentos parenterales (Hoffmann *et al.*, 2005).

2.5.3 Prueba del Lisado de amebocitos de Limulus (LAL)

En la década de los 60's los investigadores comenzaron a estudiar el mecanismo de coagulación de la sangre del cangrejo herradura del Atlántico (*Limulus polyphemus*) y descubrieron que tiene una alta sensibilidad a las endotoxinas. En 1964 Federick Bang y Jack Levine desarrollaron una prueba enzimática que consistió en mezclar los factores de coagulación de la sangre que se encuentra en los amebocitos con una muestra de fármaco en un tubo de ensayo; en donde si hubiera endotoxina presente, el líquido en el tubo se

coagularía, esta fue la primera prueba basada en el “LAL” (Limulus Amebocyte Lysate) para endotoxinas (Akbar *et al.*, 2012).

La prueba LAL es más sensible que el método RPT que solo detecta 0.5 EU/mL. Esta prueba también es conocida como prueba de endotoxina bacteriana (BET). En este método existen tres técnicas básicas, la técnica de coágulo-gel, turbidimétrica y cromogénicas (figura 2). La técnica turbidimétrica y cromogénica son más precisas y sensibles que la técnica coágulo-gel (Dullah *et al.*, 2017).

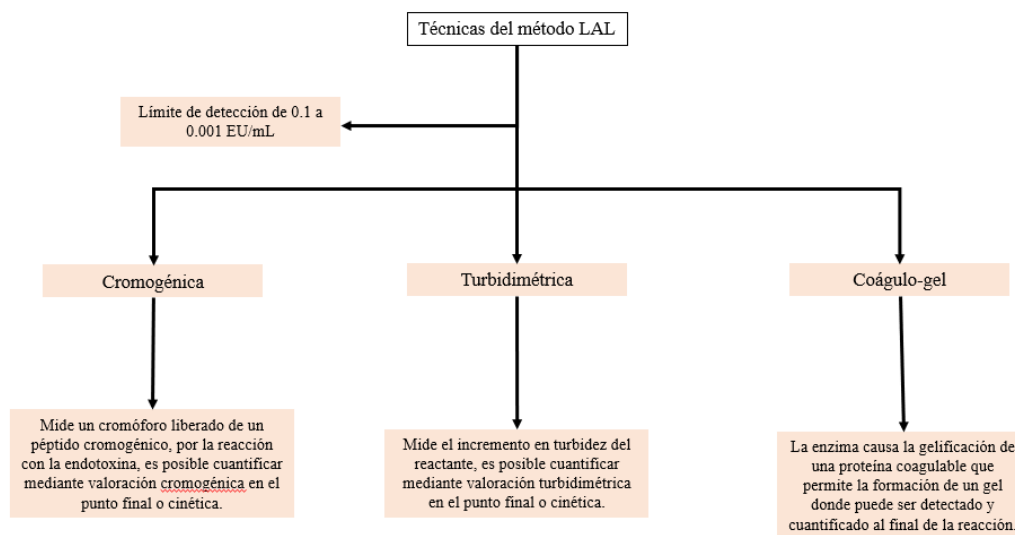


Figura 2. Técnicas de la prueba de LAL. La prueba LAL requiere tres técnicas: turbidimétrica, cromogénica y coágulo-gel, su límite de detección mínimo es de 0.001 EU/mL (Modificado de Joiner *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción comprende una serie de pasos que junto con LAL permiten la formación del gel en presencia de endotoxinas bacterianas. La reacción se lleva a cabo con la formación del coágulo a través de una cascada de pasos de activación enzimática. La proteína de coagulación (coagulógeno) es desdoblada por la enzima de coagulación activada, los productos del desdoblamiento son insolubles y se unen mediante interacción iónica para formar la matriz del gel (Cortes *et al.*, 2006).

La prueba LAL ha sido aceptada como un método confiable para medir la pirogenicidad, pero solo es específica para el componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, por lo que no es aplicable para muestras que contengan una gran cantidad de proteína, tampoco es capaz de cuantificar satisfactoriamente las actividades de endotoxina *in*

vivo y no es aplicable en muestras que contengan iones metálicos. Las ventajas de esta prueba son su posibilidad de realizar una medición cuantitativa o semicuantitativa de endotoxinas, la alta sensibilidad del método, la relativa facilidad y velocidad de ejecución del ensayo, su única desventaja es que no detecta pirógenos no endotóxicos (Peterbauer *et al.*, 2000).

2.5.4 Prueba de activación de monocitos (MAT)

Recientemente la prueba de activación de monocitos (MAT) se ha considerado en la Farmacopea Europea como una prueba de detección de endotoxina. Esta prueba se basa en la activación de monocitos humanos por pirógenos lo que permite por primera vez la detección de pirógenos en la especie humana (Perdomo *et al.*, 2011).

Esta prueba se basa en la activación de TLR4 (Toll-like receptor 4), el sensor de endotoxinas de los mamíferos que reconoce LPS estructuralmente. El TLR4 activa factores de transcripción provocando la secreción de fosfatasa alcalina fácilmente detectable por la coloración azul/morada del medio de detección HEK-blue™. Las células de HEK-blue™ proceden de células HEK293 transfectadas con todos los genes necesarios para la cascada de señalización, incluyendo TLR4 junto con una fosfatasa alcalina mejorada para ser secretada, con un promotor inducible por NF-κB y fosfatasa alcalina-1 (Fernández, 2019).

Con un límite de detección de 0.01 EU/mL los esfuerzos científicos buscan validar la MAT para la detección de pirogénicos endotóxicos y no endotóxicos, buscando un reemplazo *in vitro* para RPT. La prueba de MAT *in vitro* tiene el potencial de detectar sustancias pirogénicas porque utiliza sangre entera humana (Borton *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La salmonelosis es una enfermedad bacteriana que afecta de manera importante al ser humano a nivel mundial, causada principalmente por ingerir alimentos previamente contaminados. El lípido A es una toxina presente en el LPS localizado en la membrana de bacterias del género *Salmonella*, principal responsable de la actividad tóxica de la bacteria, provocando fiebre, dolor de cabeza, diarrea e incluso la muerte cuando la infección no es tratada de manera adecuada. Diferentes componentes bacterianos tienen un papel importante en el desarrollo de mecanismos de patogenicidad, así como la respuesta aguda y severa que el patógeno desarrolla y que continúa investigándose su potencial inmunogénico. En el presente trabajo de investigación se evaluaron técnicas de detección de moléculas contaminantes presentes en preparaciones proteicas con función inmunogénica, obtenidas de *Salmonella* spp.

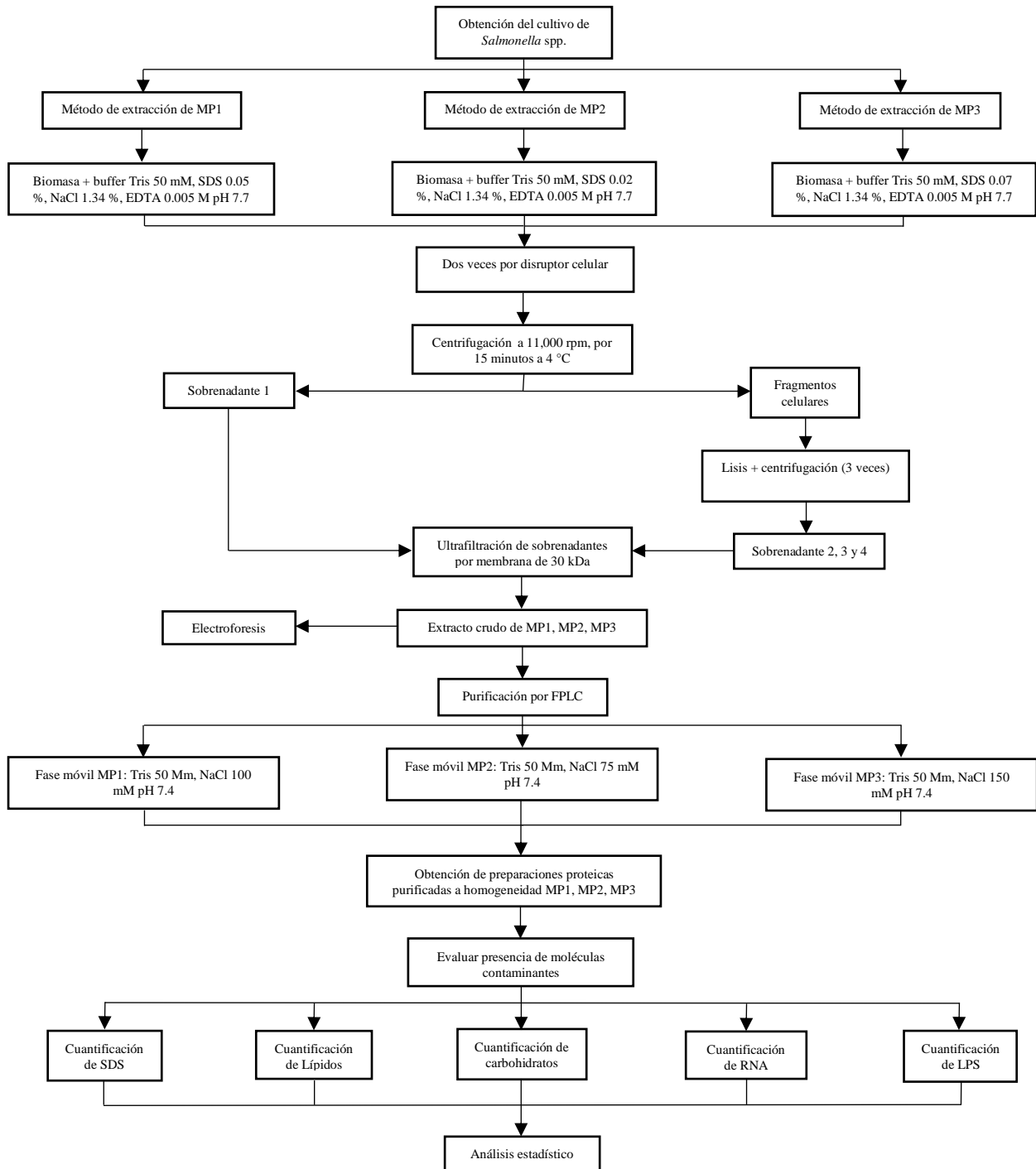
3.1 Objetivo general

Cuantificar moléculas contaminantes residuales presentes en preparaciones proteicas purificadas a homogeneidad de *Salmonella* spp.

3.2 Objetivos particulares

- Obtener el extracto crudo a partir de biomasa de *Salmonella*.
- Obtener una preparación proteica purificada a homogeneidad a partir del extracto crudo de *Salmonella*.
- Cuantificar SDS en las preparaciones proteicas purificadas.
- Cuantificar diferentes biomacromoléculas residuales como carbohidratos, LPS, lípidos y RNA en las preparaciones purificadas, mediante métodos colorimétricos y espectrofotométricos.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico para cada determinación.

5.2 Material biológico

Las preparaciones proteicas proporcionadas están bajo resguardo por el laboratorio de Nutravia S.A de C.V.

5.3 Equipos

Tabla 1. Equipos ocupados en este trabajo.

Equipo	Marca	Modelo
Espectrofotómetro	Hach	DR 5000
Campana de extracción	Prendo	CH-120
Vórtex	Thermo scientific	M37615
Incubadora	Lab-tech	LSI-3016-A
Balanza de grado analítico	Ohaus	PA214
Baño maría	Sheldon manufacturing, inc	SWBR17
Campana de flujo laminar	Prendo	CFL102 NW
Lector de microplacas	Bio-rad	¡MARK™
Autoclave	Aesa	CV300
Centrifuga	Eppendorf AG	5805F
Disruptor celular con una presión	Emulsiflex*	C5
Ultrafiltrador	Millipore	8050
Cromatógrafo de líquidos de baja presión fplc	AKTA de General Electric (GE)	Avant 25

5.4 Métodos

Tabla 2. Métodos ocupados en este trabajo.

Determinación	Método	Referencia
Extracción de las proteínas	Lisis alcalina	Nikaido <i>et al.</i> , 1983
Purificación de las proteínas	Cromatografía de filtración en gel FPLC	Hagopian <i>et al.</i> , 1999
Cuantificación de proteína soluble	Colorimétrico	Smith <i>et al.</i> , 1985
Determinación de peso molecular	Electroforesis	Laemmli <i>et al.</i> , 1970
Cuantificación de SDS	Colorimétrico	Rusconi <i>et al.</i> , 2001
Cuantificación de LPS	Coágulo gel	Solís, 2004; Burguet <i>et al.</i> , 2012
Cuantificación de carbohidratos	Colorimétrico	Dubois <i>et al.</i> , 1956
Cuantificación de lípidos	Colorimétrico	Frings <i>et al.</i> , 1970; Izard <i>et al.</i> , 2003
Cuantificación de RNA	Colorimétrico	Almog <i>et al.</i> , 1978

6. METODOLOGÍA

6.1 Conservación y mantenimiento de las preparaciones proteicas

Las muestras proteicas fueron resguardadas y conservadas a 20 °C hasta su análisis espectrofotométrico.

6.2 Método de extracción de las proteínas de *Salmonella*

La biomasa de *Salmonella*, se incubó con el buffer Tris 50 mM pH 7.7 con una relación (1:4) durante 30 minutos a 37 °C a 120 rpm de agitación. Terminada la incubación se le agregó buffer de Tris 50 mM, 0.05 % de SDS, 1.34 % NaCl, EDTA a 0.005 M a pH 7.7 con una relación (1:4) y se lisó por dos ciclos en el disruptor celular con una presión de 700 Bar. La

suspensión obtenida se centrifugó a 11,000 rpm, por 15 minutos a 4 °C, para obtener el sobrenadante 1 y fragmentos celulares.

1. Después de obtener los fragmentos celulares, se agregó buffer de Tris 50 mM, 0.05 % de SDS, 1.34 % NaCl, EDTA a 0.005 M a pH 7.7, con una relación (1:4). La mezcla se lisó en el disruptor a 700 Bar por un ciclo. El lisado se centrifugó a 11,000 rpm por 15 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante 2.
2. A los fragmentos celulares se les agregó un buffer de Tris 50 mM, 0.05 % de SDS, 1.34 % NaCl, EDTA a 0.005 M a pH 7.7, manteniendo la misma relación. La mezcla se lisó en el disruptor a 700 Bar por un ciclo. Repitiendo este ciclo por 2 veces más para obtener el sobrenadante 3 y 4.
3. Los sobrenadantes 1, 2, 3, 4 se incorporaron, en una sola muestra que se microfiltró con una membrana de disco con poro de 0.22 µm para finalmente obtener el extracto crudo proteico MP1 (Nikaido *et al.*, 1983).

Este método fue modificado en el buffer de lisis que se utilizó para la extracción, donde se cambió la concentración de SDS para cada una de las extracciones, para MP1 se utilizó una concentración de SDS de 0.05 % (descrita anteriormente) para MP2 0.02 % y MP3 0.07 %, en todos los casos se ocupó el mismo método de extracción.

6.3 Ultrafiltración del extracto crudo proteico

El extracto crudo MP1 previamente microfiltrado, fue sometido a ultrafiltración con una presión de 50-70 Bar por membrana de 30 kDa hasta retener el 20 % del volumen inicial para obtener un concentrado proteico final de MP1, este mismo proceso se aplicó para MP2 y MP3.

6.4 Purificación por FPLC

A través de cromatografía de exclusión molecular en FPLC el concentrado proteico MP1 se microfiltró nuevamente por filtro de tamaño de poro de 0.45 µm y se cargaron 5 mL en una columna con resina Superdex S-200 de Cytiva de 60 cm, con un flujo de 5 mL/min utilizando como fase móvil una solución buffer de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.4 con una temperatura de 21 °C y con presión de 20 PSI, el tiempo de corrida consto de 180 min, donde se recolectaron fracciones de un mililitro por minuto durante los primero 150 min para su análisis posterior en SDS-PAGE (Hagopian *et al.*, 1999).

El método de FPLC fue únicamente modificado en el buffer de la fase móvil, donde se cambió la concentración de NaCl para cada una de las corridas, para MP1 se utilizó una concentración de 100 mM (descrita anteriormente) para MP2 75 mM y MP3 150 mM en todos los casos se ocupó el mismo método de purificación.

6.5 Cuantificación de proteína por el ensayo de BCA

La cuantificación de proteína se midió con el kit Pierce TM BCA protein Assay de Thermo Scientific TM. Este ensayo tiene 2 componentes: el BCA reagent A y el BCA reagent B. Para la preparación de la solución de trabajo se mezclaron ambos reactivos en una proporción de 50:1, Reagent A: B, esta preparación producirá un color verde claro cuando hay presencia de proteína soluble.

Para la realización de la curva de calibración del ensayo de BCA se utilizó una solución a una concentración de Tris 50 mM pH 7.7 y una solución estándar de Albúmina de Suero Bovino (incluida en el kit) con una concentración de 2 mg/mL. A partir de esta solución estándar y con la solución Tris se realizaron diluciones en un rango de 25 µg/mL a 2000 µg/mL como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Soluciones para la curva de calibración de proteína.

Nº de muestra	Albúmina de Suero Bovino (µL)	Solución de Tris (µL)	Concentración (µg/mL)
1	0	1000	0 (Blanco)
2	12	988	25
3	62	936	125
4	125	875	250
5	250	750	500
6	375	625	750
7	500	500	1000
8	750	250	1500
9	1000	0	2000

De cada una de las diluciones y de la muestra problema se tomaron 25 μ l y se colocaron en una microplaca, posteriormente se agregaron 200 μ L de la solución Reagent A:B, se agitó e incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Smith *et al.*, 1985).

6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Dependiendo al peso molecular de las proteínas, las muestras MP1, MP2 y MP3 fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel fue preparado de acuerdo con la tabla 5, el buffer de electrodo (concentración de 1x) y el buffer de carga fueron preparados de acuerdo con la tabla 6 y 7 respectivamente. Finalmente, al terminar la electroforesis el gel fue teñido por azul de Coomassie o por plata (Laemmli *et al.*, 1970).

Tabla 5. Reactivos para llevar a cabo el gel de poliacrilamida al 12%.

Gel de poliacrilamida (12%)	
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %	12 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.75 mL
Agua desionizada	2.38 mL
Persulfato de amonio 10 %	35 mL
TEMED	3.5 ML

Tabla 6. Reactivos utilizados para buffer de electrodo 10x.

Buffer de electrodo 10 x (1 L)	
Tris	10 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Tabla 7. Reactivos utilizados para buffer de carga con una concentración de 2x.

Buffer de carga 2x (10 mL)	
SDS	0.4 g
Glicerol	2 mL
β -mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	0.04 g
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
Agua desionizada	4.5 mL

6.7 Cuantificación de dodecilsulfato de sodio (SDS) en preparaciones proteicas

La cuantificación de dodecilsulfato de sodio (SDS) en muestras proteicas se llevó a cabo por el método de Rusconi *et al.*, 2001. Para la determinación cuantitativa de SDS se preparó una curva de calibración realizando una solución estándar al 0.5 % de SDS con la solución de Tris(hidroximetil)aminometano 50 mM con un pH de 7.7. Usando la solución anterior se prepararon diferentes diluciones como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Soluciones para la curva de calibración de SDS.

N° de muestra	Solución de SDS (μL)	Solución de Tris (μL)	Concentración (%)
1	0	1000	0 (Blanco)
2	20	980	0.01
3	40	960	0.02
4	60	940	0.03
5	80	920	0.04
6	100	900	0.05
7	120	880	0.06
8	140	860	0.07
9	160	840	0.08
10	180	820	0.09
11	200	800	0.1

Posteriormente, se preparó una solución estándar con una concentración de 1 mg/mL de carbocianina en 1:1 de Agua: Isopropanol, posteriormente se preparó una solución final con 1 mL de solución estándar de carbocianina más 1 mL de formamida en 19 mL de agua desionizada, mezclando perfectamente, esta solución se mantiene estable en la oscuridad durante 3 días a una temperatura de 23 °C.

El procedimiento consistió en tomar 1 µL de las diluciones y de las muestras proteicas, para el blanco se colocó 1µL de la solución de Tris, posteriormente se le agregaron 200 µL de la solución de carbocianina en vórtex por 10 s. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 438 nm.

6.8 Cuantificación de LPS por el método de Lisado de amebocitos de *Limulus*

La cuantificación de endotoxina en muestras proteicas se llevó a cabo por el método de Solís et al., 2004 y Burguet *et al.*, 2012. La determinación cuantitativa de LPS se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de endotoxina de *E. coli* de 100 EU/mL preparado con agua libre de pirógenos, a partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Soluciones para la curva de calibración de LPS.

N° de tubo	Solución de endotoxina (µL)	Agua libre de pirógenos (µL)	Concentración (EU/mL)
1	0	1000	0 (Blanco)
2	100 µL de la solución de 100 EU/mL	900	10
3	500 µL de la solución de 10 EU/mL	500	5
4	100 µL de la solución de 10 EU/mL	900	1
5	100 µL de la solución de 1 EU/mL	900	0.1
6	100 µL de la solución de 0.1 EU/mL	900	0.01

Primeramente, se preparó una solución de *Limulus Amebocyte Lysate* PYROGENT 5000 mezclando suavemente con el buffer de reconstitución PYROGENT 5000 por 1 min, hasta que se homogeneizó completamente (evitando la formación de burbujas), esta solución llamada LAL es fotosensible y debió ser preparada antes de su uso, ya que solo es estable

hasta por 8 h almacenada a 2-4 °C. Para el proceso en general, todas las muestras debieron estar a 25 °C, posteriormente se agregaron 100 µL de todas las muestras y se pre-incubaron todas las muestras a 37 °C por 10 min, después se agregó 100 µL del reactivo LAL a cada una de las muestras y se dejó reaccionar por 1 hora a 37 °C. La absorbancia se midió en un lector de microplacas a una longitud de onda de 340 nm.

Nota: Este método se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminación.

6.9 Cuantificación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico

La cuantificación de carbohidratos totales se llevó a cabo por medio del método colorimétrico descrito por Dubois *et al.*, 1956. Para esta determinación cuantitativa de carbohidratos totales se preparó una curva de calibración a partir de una solución estándar de glucosa en agua destilada con una concentración de 0.1 µg/mL. Usando la solución anterior se prepararon diferentes diluciones como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Soluciones para la curva de calibración de carbohidratos.

N° de muestra	Solución de glucosa (µL)	Agua destilada (µL)	Concentración (µg/mL)
1	0	1000	0 (Blanco)
2	100	900	0.01
3	200	800	0.02
4	300	700	0.03
5	400	600	0.04
6	500	500	0.05
7	600	400	0.06
8	700	300	0.07
9	800	200	0.08
10	900	100	0.09
11	1000	0	0.1

Una vez preparadas las soluciones para la curva de calibración, para proceso en general se agregó 1 mL de las diluciones y de las muestras proteicas, el blanco contendría 1 mL de agua destilada, a cada tubo se le agregó 1 mL de solución fenol al 5 %, se agitaron durante 10 segundos en vórtex. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, y se agitaron durante 10 segundos en vórtex, se dejó reaccionar por 10 min a 25 °C y se colocaron en un baño de agua fría por 10 min para detener la reacción. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

6.10 Cuantificación de lípidos totales bacterianos por el método de sulfo-fosfo-vainillina

La cuantificación de lípidos totales se llevó a cabo por el método colorimétrico de Sulfo-fosfo-vainillina (SPV) para cuantificar lípidos totales bacterianos descrito por Frings *et al.*, 1969 e Izard *et al.*, 2003. La cuantificación de lípidos totales se preparó una curva de calibración a partir de una solución estándar de ácido oleico con concentración de 2 mg/mL en cloroformo, a partir de esta solución se realizaron diferentes diluciones como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Soluciones para la curva de calibración de lípidos.

N° de muestra	Solución de ácido oleico (µL)	Cloroformo (µL)	Concentración (mg/mL)
1	1000	0	2
2	900	100	1.8
3	800	200	1.6
4	700	300	1.4
5	600	400	1.2
6	500	500	1
7	400	600	0.8
8	300	700	0.6
9	200	800	0.4
10	100	900	0.2

Primeramente, se preparó una solución de (SPV) con una concentración de 1.2 mg/mL de vainillina en una solución de 1:4 de agua desionizada: ácido fosfórico perfectamente homogénea con agitación constante. Para las diluciones se tomaron 100 μ L de cada concentración y se colocaron en un baño de agua a 60 °C por 10 min para evaporar el solvente. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 100 μ L de agua desionizada agitando por 10 s en vórtex, después se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado agitando en vórtex por 10 s, se dejó reaccionar por 10 minutos en baño maría a 100 °C e inmediatamente después se colocaron en un baño de agua fría por 5 min, finalmente se le agregaron 5 mL del reactivo SPV agitando por 10 s en vórtex y se incubó a 37 °C a 200 rpm por 15 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

Así mismo para el tratamiento de las muestras proteicas el proceso fue el siguiente: a cada tubo se le agregaron 100 μ L de la muestra proteica y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado agitando en vórtex por 10 s y se dejó reaccionar por 10 min en un baño maría a ebullición; inmediatamente después se colocó en un baño de agua fría por 5 min, finalmente se le agregaron 5 mL del reactivo SPV agitando por 10 s en vórtex y se incubó a 37 °C a 200 rpm por 15 min. Para la preparación del blanco se agregaron 100 μ L de agua desionizada, 2 mL de ácido sulfúrico y 5 mL del reactivo SPV y se siguió el mismo procedimiento anterior. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

6.11 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se llevó a cabo por medio del método colorimétrico descrito por Almog *et al.*, 1978. La cuantificación de ARN se determinó a partir de una curva de calibración realizando una solución de ribosa con agua destilada con una concentración total de 0.02 mg/mL, a partir de esta última solución se prepararon diferentes diluciones con una concentración como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Soluciones para la curva de calibración de ARN.

N° de muestra	Solución de ribosa (µL)	Agua destilada (µL)	Concentración (mg/mL)
1	0	1000	0 (Blanco)
2	100	900	0.002
3	200	800	0.004
4	300	700	0.006
5	400	600	0.008
6	500	500	0.010
7	600	400	0.012
8	700	300	0.014
9	800	200	0.016
10	900	100	0.018
11	1000	0	0.02

Primeramente, se preparó una solución de orcinol con una concentración de 10 mg/mL más 5 mg/mL de cloruro férrico en ácido clorhídrico concentrado. Después se tomó 1 mL de las diluciones y de las muestras proteicas, se colocaron en un tubo, después se les adicionaron 3 mL del reactivo orcinol a cada tubo y fueron calentados en baño maría a 100 °C por 15 min. Posteriormente, los tubos fueron colocados en baño de agua fría por 10 min para detener la reacción. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Para determinar la concentración de RNA total, la concentración fue multiplicado por 4.23 que constituye el promedio del peso del tetranucleótido del ARN.

NOTA: *Todo el material utilizado debió ser lavado primeramente con dextran, después con agua destilada, posteriormente con alcohol etílico al 96 % y secado en horno a 60 °C, para finalmente ser esterilizado.*

6.12 Análisis estadístico

Las absorbancias obtenidas a partir de las curvas de calibración de cada método fueron graficadas, posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal para obtener una ecuación

(pendiente de la recta) por el método de mínimos cuadrados y un análisis de correlación, cada curva de calibración fue realizada por triplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción de proteínas de *Salmonella*

Las extracciones se realizaron a partir de 50 g de biomasa de *Salmonella* spp., variando solo la concentración de SDS en el buffer de lisis (como se describe en la parte de metodología 6.2). En la tabla 13 se muestra la concentración de los extractos obtenidos en los 3 procesos distintos. Después de que el extracto fuera sometido a ultrafiltración con membrana de 30 kDa, los volúmenes disminuyeron aproximadamente hasta un 20 %, lo que favoreció que la proteína se concentrara, la concentración de proteína se evaluó mediante el método de BCA (Smith *et al.*, 1985, Anexo 1)

Tabla 13. Concentración de proteína antes y después del proceso de ultrafiltración del extracto crudo.

Extractos crudos						
Muestra	Volumen antes de ultrafiltración mL	Concentración de proteína antes de ultrafiltración mg/mL	Proteína total antes de ultrafiltración mg	Volumen después de ultrafiltración mL	Concentración de proteína después de ultrafiltración mg/mL	Proteína total después de ultrafiltración mg
MP1	110	1.720	189.2	22	3.988	87.736
MP2	106	1.640	173.84	21	3.796	79.716
MP3	115	1.872	215.28	23	4.256	97.888

En la tabla 13 muestra los volúmenes totales y concentraciones finales de proteína en cada uno de los extractos crudos, se puede observar que la concentración de proteína más alta se obtuvo con el extracto crudo MP3 (4.256 mg/mL), seguido del extracto crudo e MP1 (3.988 mg/mL) y finalmente MP2 (3.796 mg/mL), en consecuencia el método de extracción de MP3 es más eficiente, lo que se atribuye a que el buffer de lisis (Tris 50 mM, 0.07 % de SDS, 1.34 % de NaCl, EDTA a 0.005 M a pH 7.7) puede mejorar la extracción al contener mayor concentración de SDS.

Con el proceso de ultrafiltración se trató de retirar proteína contaminante menor a 30 kDa como se observa en el ejemplo de la muestra MP2 en la figura 3, donde se identifica la proteína de interés con un peso molecular aproximadamente de 38 kDa antes y después de la ultrafiltración. Adicionalmente, el volumen obtenido disminuyó, lo cual promovió que la concentración de proteína del extracto crudo aumentara.

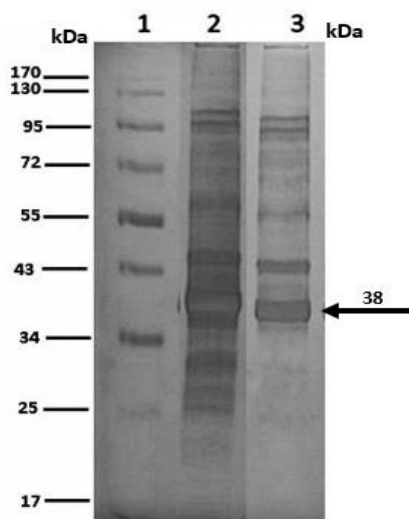


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie del extracto MP2 (2 µg), antes y después de la ultrafiltración. Descripción de carriles: Carril 1: Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific), Carril 2: Extracto MP2 antes de ultrafiltrar, Carril 3: Extracto MP2 después de ultrafiltrar.

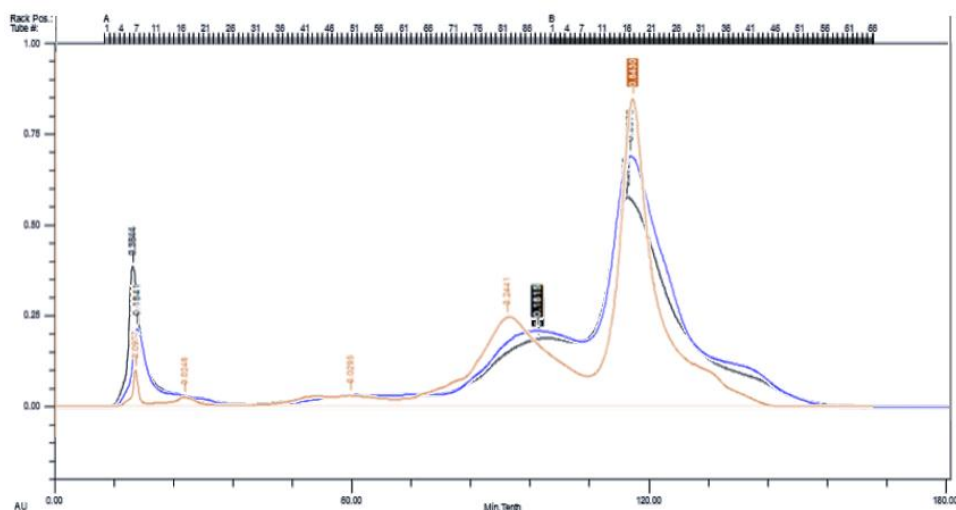
Cabe recalcar que después de cada ultrafiltración en cada uno de los extractos, la concentración de proteína aumento, pero se conservó la proteína de interés (con peso molecular aproximadamente de 38 kDa), por lo tanto, el procedimiento fue eficiente para retirar proteína contaminante menor de 30 kDa, sin embargo, aún se observa la presencia de proteínas contaminantes mayor a 30 kDa lo requirió continuar con el procedimiento de purificación mediante FPLC.

7.2 Obtención de una preparación proteica homogénea de *Salmonella*

Una vez que se obtuvieron los extractos crudos (MP1, MP2 y MP3) previamente sometidos a ultrafiltración, fueron separados posteriormente mediante FPLC, variando la concentración de NaCl (75, 100 y 150 mM), 15 mg de proteína fueron inyectados en la columna. Se obtuvieron 150 fracciones por corrimiento de FPLC.

Los cromatogramas de la figura 4 muestran que las fracciones 70-135 contenían mayor concentración de proteínas, además el corrimiento de FPLC empleando NaCl a 150 mM favoreció una mejor resolución de los picos proteicos.

En la figura 4 se puede observar los cromatogramas de los extractos crudos proteicos (MP1, MP2 y MP3) con la similitud de los picos en el mismo tiempo de retención. El cromatograma de MP3 mostró una mejor definición en los picos, atribuyendo esto a la concentración de cloruro de sodio, lo que mejoró la elución de la muestra, este cambio tiene un impacto significativo en las interacciones moleculares y, por lo tanto, en la eficiencia de la separación la muestra.



cambio de la fase móvil favoreció la elución de las proteínas esto al influir en las interacciones entre las moléculas del analito y la fase estacionaria del gel, debido a que las proteínas presentan cierta carga eléctrica que, a un determinado pH, la muestra proteica queda retenida sobre el soporte solido (en este caso resina) por afinidad electrostática, esto depende de la carga eléctrica neta de las proteínas (relación carga/tamaño), algunos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre la resina que otros, lo que provocara una mejor separación. En este caso el pH y la concentración salina en este caso NaCl en la fase móvil hace que se alcance el punto isoeléctrico de las proteínas, neutralizando de este modo la fuerza que las retiene en la columna, la elución puede ser de manera isocrática (concentración constante de sal) como es el caso, o en su defecto puede existir gradiente de concentración (Montecino, 2009).

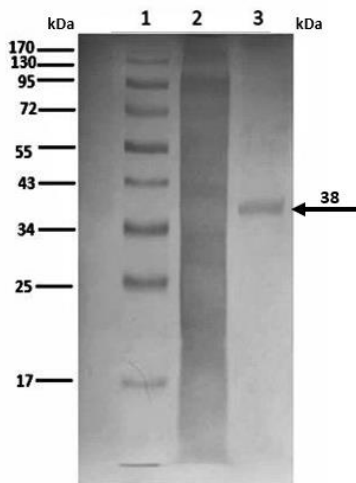


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie del extracto crudo de MP3 (2 µg) antes de la ultrafiltración y después de FPLC. Descripción de carriles: Carril 1: Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific), Carril 2: Extracto MP2 antes de ultrafiltrar, Carril 3: Extracto MP2 después de la purificación por FPLC.

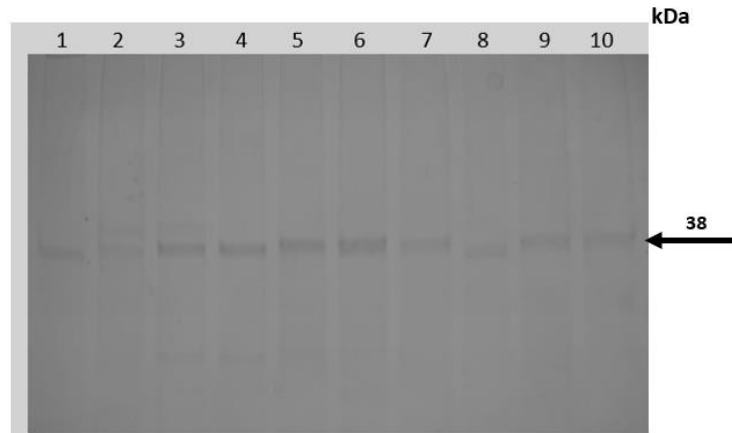


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 70-89. Descripción de carriles: Carril 1: Fracción 70 y 7, Carril 2: Fracción 72 y 73, Carril 3: Fracción 74 y 75, Carril 4: Fracción 76 y 77, Carril 5: Fracción 78 y 79, Carril 6: Fracción 80 y 81, Carril 7: Fracción 82 y 83, Carril 8: Fracción 84 y 85, Carril 9: Fracción 86 y 87, Carril 10: Fracción 88 y 89.



Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 90-109. Descripción de carriles: Carril 1: Fracción 90 y 91, Carril 2: Fracción 92 y 93, Carril 3: Fracción 94 y 95, Carril 4: Fracción 96 y 97, Carril 5: Fracción 98 y 99, Carril 6: Fracción 100 y 101, Carril 7: Fracción 102 y 103, Carril 8: Fracción 104 y 105, Carril 9: Fracción 106 y 107, Carril 10: Fracción 108 y 109.



Figura 8 . Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 110-129. Descripción de carriles: Carril 1: Fracción 110 y 111, Carril 2: Fracción 112 y 113, Carril 3: Fracción 114 y 115, Carril 4: Fracción 116 y 117, Carril 5: Fracción 118 y 119, Carril 6: Fracción 120 y 121, Carril 7: Fracción 122 y 123, Carril 8: Fracción 124 y 125, Carril 9: Fracción 126 y 127, Carril 10: Fracción 128 y 129.

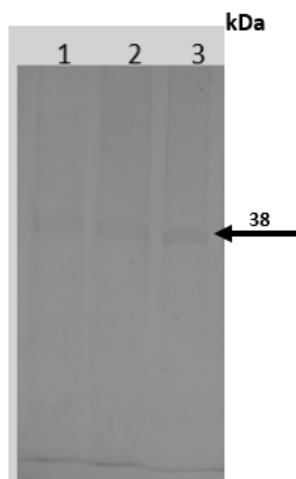


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones obtenidas mediante la purificación de FPLC de MP1 (2 µg), minuto de retención 130-135. Descripción de carriles: Carril 1: Fracción 130 y 131, Carril 2: Fracción 132 y 133, Carril 3: Fracción 134 y 135.

Posteriormente se muestra en la tabla 14 el volumen obtenido de cada una de las preparaciones proteicas juntando las fracciones (70-135) de una sola inyección, mostrando la concentración de cada una de las preparaciones, se puede observar que la preparación proteica MP3 tiene la mayor concentración de proteína purificada con 0.165 mg/mL, seguida

de MP1 con 0.125 mg/mL y MP2 con 0.116 mg/mL, esto demuestra que el mejor método de purificación y extracción es el de MP3 para obtener mayor concentración de la proteína de interés, esto se debe al cambio de la concentración de SDS en el buffer de extracción y el cambio de concentración en el cloruro de sodio en la fase móvil del método de purificación por FPLC, en la tabla también se observa que es mayor la proteína total que se obtiene de la muestra MP3 que de MP1 y MP2.

Tabla 14. Concentración de proteína después de FPLC.

Preparación proteica	Mililitros totales	Concentración de proteína mg/mL	Concentración total de proteína mg
MP1	55	0.125	6.875
MP2	56	0.116	6.496
MP3	54	0.165	8.910

Después de la unión de las fracciones en cada método de purificación y al obtener las tres preparaciones proteicas, se realizó SDS-PAGE teñido por Coomassie Brilliant Blue G250 (figura 10) y tinción por plata (figura 11) de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3. En el gel teñido con Coomassie Brilliant Blue se observan las tres bandas a la misma altura, sin embargo, se realizó un gel con tinción de plata, en este gel se observan las tres bandas a la misma altura, pero también se observan impurezas en cada una de las preparaciones proteicas debido a la alta sensibilidad de la tinción de plata, en la preparación MP3 se observan menos impurezas que en MP1 y MP2, como consecuencia el método de purificación de MP3 es mucho mejor y se obtiene un mejor rendimiento de proteína total.

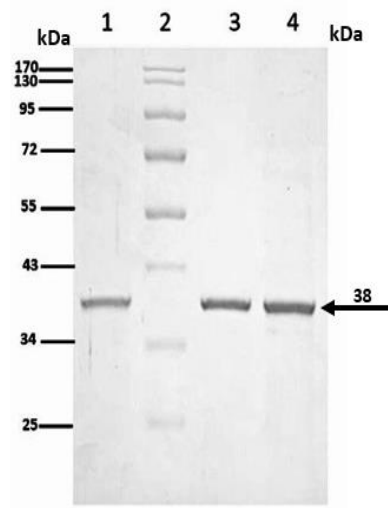


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE teñido con Coomassie de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3 (2 µg) después de la purificación por FPLC. Descripción de carriles: Carril 1: Preparación proteica MP3, Carril 2: Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific), Carril 3; Preparación proteica MP2, Carril 4; Preparación proteica MP1

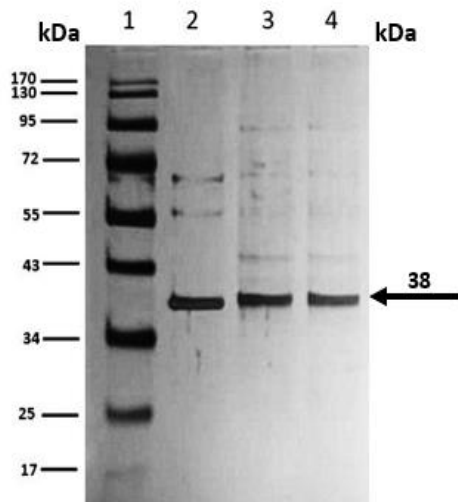


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE teñido por Plata de las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3 (1 µg), después de la purificación por FPLC. Descripción de carriles: Carril 1: Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific), Carril 2: Preparación proteica MP3, Carril 3; Preparación proteica MP2, Carril 4; Preparación proteica MP1.

7.4 Evaluación de moléculas contaminantes en las preparaciones proteicas homogéneas

Después de obtener las tres muestras proteicas con grado homogeneidad, se procedió a analizar las moléculas contaminantes para poder deducir cual método de extracción y purificación es el más conveniente para obtener la proteína de interés.

7.4.1 Evaluación de dodecilsulfato de sodio (SDS)

La cuantificación de SDS se basó en el uso de un colorante de carbocianina como reactivo específico y sensible de SDS, es una reacción colorimétrica en donde, la carbocianina (colorante catiónico) reacciona con el SDS (detergente aniónico) que por fuerzas iónicas forman un complejo estable. Este complejo cambia de color de fucsia intenso a amarillo, mostrando un cambio gradual y proporcional a la cantidad de SDS lo que permite cuantificar por medio de espectrofotometría de luz visible a 438 nm.

Para evaluar la presencia de SDS, se realizó una curva de calibración con un rango de concentraciones de 0.1 a 1 mg/mL de SDS a partir de una solución estándar de 0.5% de SDS que fue realizada con la solución de Tris 50 mM con un pH de 7.7. La curva de calibración se muestra en la figura 12.

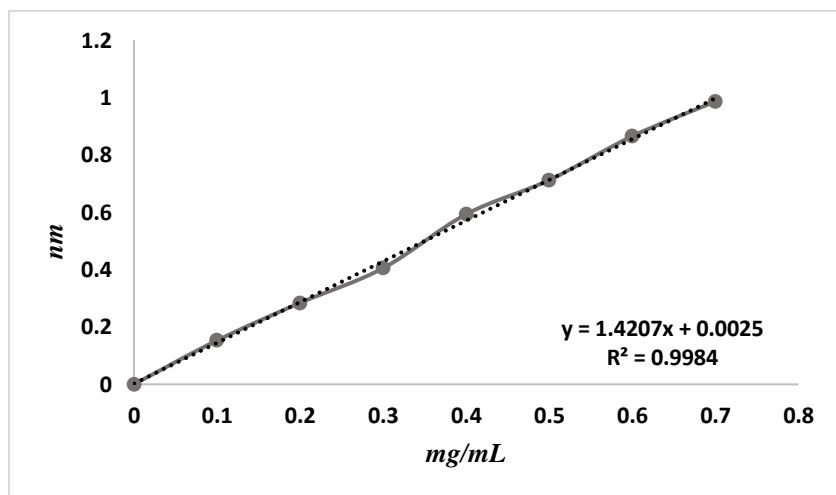


Figura 12. Curva de calibración de SDS.

En la curva de calibración de SDS (figura 12) se obtuvo una linealidad con un coeficiente de correlación de 0.998 lo que demostró que hay una correlación entre la concentración de SDS y la absorbancia. Una vez obtenida la curva de calibración se analizaron las preparaciones proteicas MP1, MP2 y MP3 después de la purificación por FPLC, a partir de la ecuación de

la pendiente obtenida en la curva de calibración se obtuvieron las siguientes concentraciones de las tres preparaciones proteicas (figura 13).

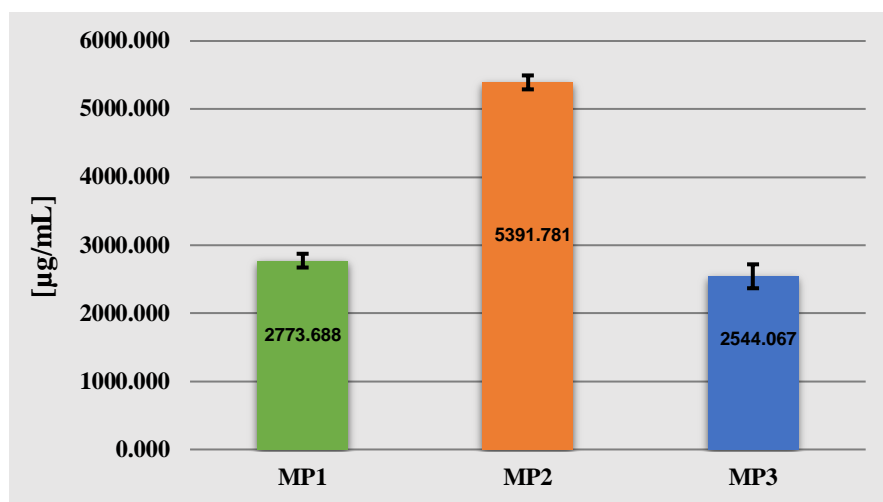


Figura 13. Cuantificación de SDS en las muestras proteicas homogéneas. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de SDS de las muestras MP1, MP2 y MP3 después de la purificación por FPLC expresado en µg/mL.

A partir de esta cuantificación se obtuvieron los siguientes datos, MP3 contiene 2544.067 µg/mL de SDS seguido de MP1 con 2773.688 µg/mL y por último MP2 5391.781 µg/mL. Estos datos confirman que el método de purificación de la muestra proteica MP3 es más eficiente que los métodos MP1 y MP2, pues contiene niveles menores de SDS, esto se atribuye al cambio de concentración del NaCl en el método de purificación en FPLC (descrito anteriormente en la sección 7.3).

En la química de proteínas el uso de SDS es importante porque comúnmente se utiliza para la desnaturalización o solubilización de la proteína, que a menudo son importantes para la purificación de proteínas, la unión entre SDS y proteína es independiente de la fuerza iónica y principalmente la formación de complejo proteína-SDS es de naturaleza hidrofóbica (Bischoff et al., 1998). A nivel farmacológico el SDS tiene una serie de usos funcionales como agente emulsionante, agente solubilizante, agente de liberación modificada entre otros y aunque no existe algunas recomendaciones reglamentarias o directrices en la Unión Europea en relación a los niveles aceptables de SDS en medicamentos, solo se autoriza medicamentos que contengan concentraciones que van desde 0.2 % (cremas) hasta el 25%

(shampoo) y no se permite usar SDS en productos parentales (European Medicines Agency, 2015).

7.4.2 Evaluación de LPS por el método de Lisado de amebocitos de *Limulus*

El pirógeno de mayor preocupación para las industrias farmacéuticas y médicas es la endotoxina bacteriana (LPS) porque es un contaminante tóxico, debido a estas características, se han buscado varios métodos para su cuantificación y detección (métodos descritos en la sección 2.5) su detección es una prueba control de calidad requerida para todos los productos farmacéuticos, por lo tanto, se propuso un método para cuantificar endotoxina en preparaciones proteicas procedentes de *Salmonella*. El método LAL se sustenta en que la endotoxina provoca la coagulación extracelular mediada por serina proteasa de la hemolinfa del cangrejo herradura, los componentes enzimáticos y los eventos moleculares que son responsables de la cascada de coagulación, el factor C, el primer componente de la cascada, es una serina proteasa que se activa mediante la unión de endotoxinas. La cascada, iniciada por la endotoxina, culmina en la activación de la enzima pro-coagulación a su forma activa, la enzima coagulante, que a su vez actúa sobre el coagulógeno para convertirlo en el coágulo de coagulina y este coagulo se mide a través de absorbancia para su cuantificación de endotoxina (Abate *et al.*, 2017).

Mediante el método LAL se realizó una curva de calibración con un rango de concentraciones de 0.01 a 10 EU/mL a partir de una solución estándar de endotoxina de *E. coli* de 100 EU/mL como se muestra en la figura 14.

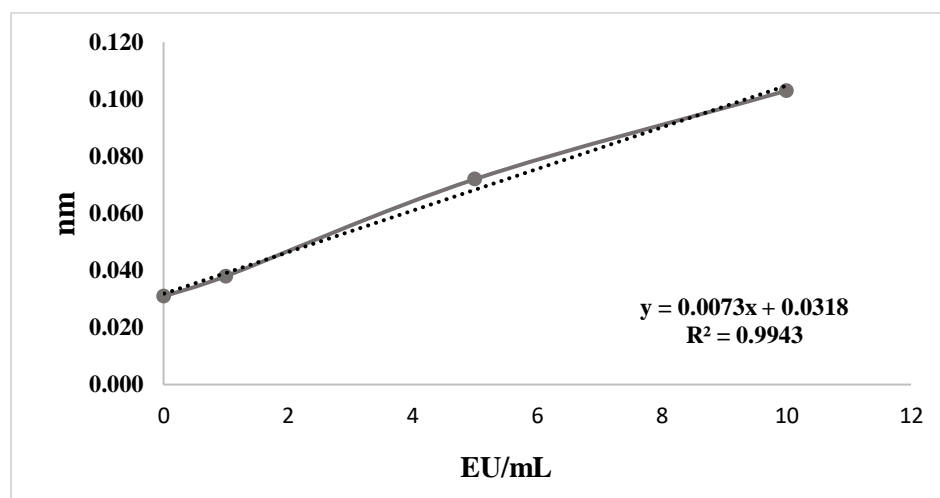


Figura 14. Curva de la calibración de LPS.

En la curva de calibración de endotoxina (figura 14) se observó una correlación en donde se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9943, cabe recalcar que este método (LAL) es muy sensible a contaminaciones, por lo cual se recomienda que el método se realice en un ambiente esterilizado y se recomienda ocupar el kit completo (Ver anexo 3) para tener una cuantificación correcta, se trató de reemplazar agua despirogeneizada por agua grado molecular o agua desionizada, previamente estéril y no se observó una buena correlación.

En la figura 15 se muestran las concentraciones de las muestras proteicas obtenidas mediante la ecuación de la pendiente de la curva de calibración.

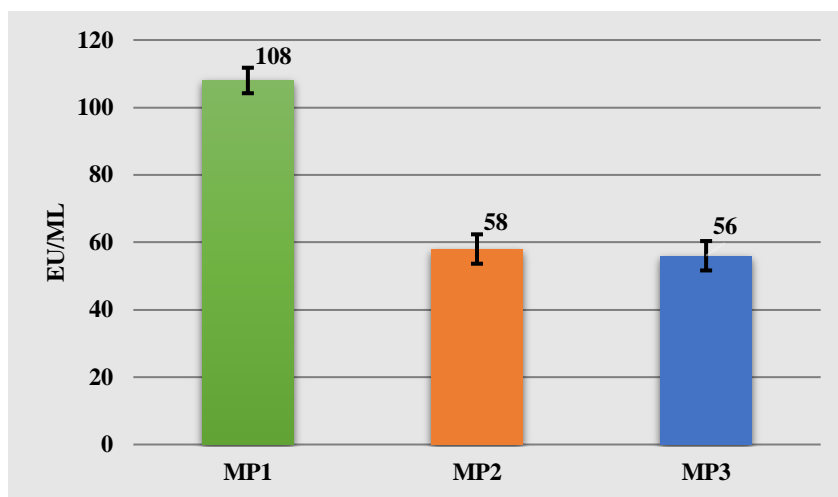


Figura 15. Cuantificación de LPS en las muestras proteicas homogéneas. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de LPS de las muestras MP1, MP2 y MP3 después de la purificación por FPLC expresado en EU/mL.

Por medio de esta cuantificación se obtuvo que MP1 tiene 108 EU/mL, seguido de MP2 con 58 EU/mL y finalmente MP3 con 56 EU/mL, se demuestra que MP3 tiene menor concentración de endotoxina, por lo que su método de purificación funciona mejor que el de las muestras MP1 y MP2, de igual manera cabe recalcar que es muy difícil la purificación total de proteína, porque existe una interacción química entre proteína/endotoxina lo cual complica la separación total entre estas dos.

Es imprescindible obtener la proteína lo más purificada posible para su posible uso farmacológico ya que los humanos son extremadamente sensibles a las endotoxinas en cantidades nanomolares, sin embargo, la FDA en su reporte Guidance of Industry Pyrogen and Endotoxin Testing: Questions and Answers, del 2012, establece que para un medicamento administrado por vía intramuscular o intravenosa, con un volumen máximo de 2 mL para un adulto de peso promedio de 70 kg, el límite máximo de endotoxina en el producto es de 175 EU/mL, si bien, rebasando este límite en el ser humano pueden inducir una respuesta de fiebre aguda y sepsis por consecuencia se ha requerido el desarrollo de una prueba altamente confiable, sensible y cuantitativa en las industrias farmacéutica y médica (Mathaes *et al.*, 2016).

7.4.3 Evaluación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico

El método de ácido fenol-sulfúrico descrito por Dubois descompone los glucósidos, polisacáridos, glicoproteínas, oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos. Con esta reacción exotérmica se forman derivados del furfural, las pentosas (compuestos de 5 carbonos) se deshidratan a furfural y las hexosas (compuestos de 6 carbonos) a hidroximetil furfural. Estos compuestos luego reaccionan con el fenol para producir un color amarillo dorado, en condiciones adecuadas (Nielsen., 2010). En consecuencia, para detectar los carbohidratos solubles totales de las preparaciones proteicas se preparó una curva de calibración con glucosa anhidra con un rango de concentraciones 0.2 a 2 µg/mL como se observa en la figura 16.

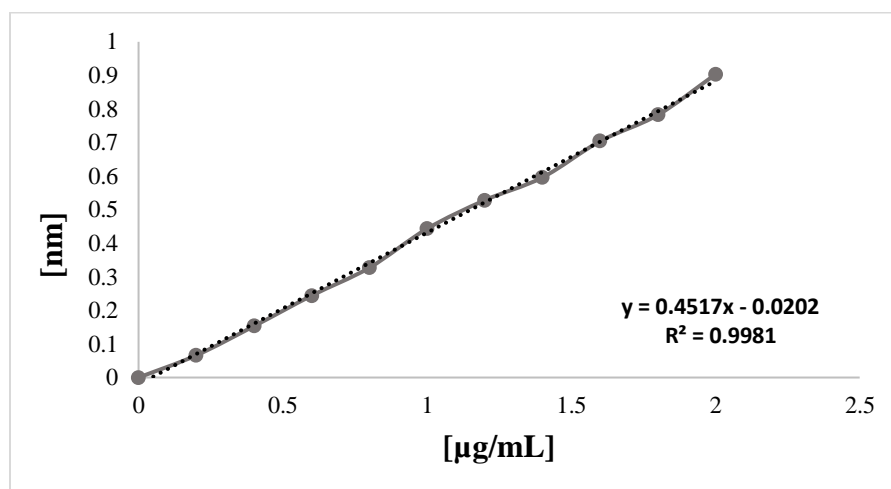


Figura 16. Curva de calibración de glucosa.

En la figura 16 se obtuvo una buena correlación entre la concentración de la glucosa y la absorbancia teniendo un coeficiente de correlación de 0.998, de acuerdo con la ecuación de la pendiente obtenida en la curva de calibración se obtuvieron las siguientes concentraciones de las muestras proteicas (figura 17).

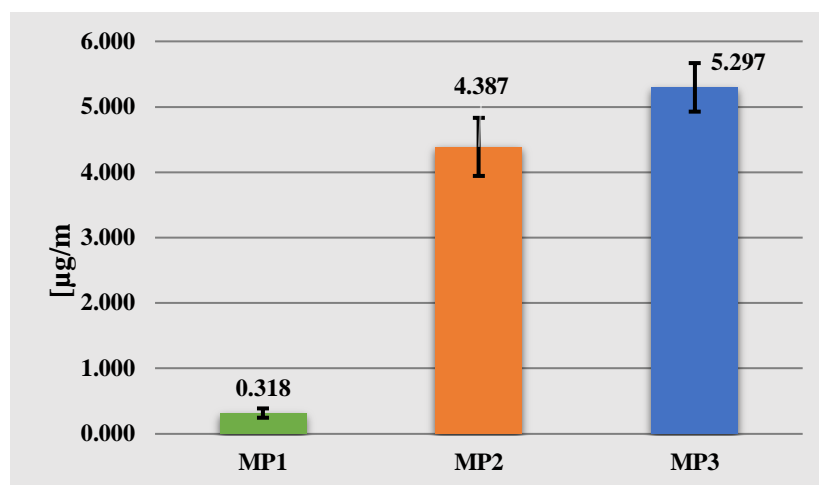


Figura 17. Cuantificación de carbohidratos en las muestras proteicas homogéneas. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de carbohidratos solubles de las muestras MP1, MP2 y MP3 después de la purificación por FPLC expresado en µg/mL.

En la figura 17 se observa que la muestra MP1 con 0.318 µg/mL, seguida de MP2 con 4.387 µg/mL y finalmente MP3 con 5.297 µg/mL, considerando los resultados se observa que MP3 tiene mayor concentración de carbohidratos y que ahora MP1 tiene una menor concentración esto quiere decir que su método de purificación es más eficiente para eliminar carbohidratos. Pero de acuerdo con los resultados anteriores de la cuantificación de SDS y endotoxina, se observa que la muestra MP3 tiene menor cantidad de endotoxina, al menos lo más tóxico para el ser humano, por consecuencia método sigue siendo más eficiente pero no tan efectivo para eliminar carbohidratos totales. Anteriormente se describió (Sección 2.4) que el LPS de *Salmonella* está conformado por varios azúcares (mono, di, oligosacáridos) esta cuantificación de carbohidratos no necesariamente puede ser del LPS de la bacteria, si no que pueden provenir de restos membranales de la bacteria, por consecuencia no se puede decir que haya alguna relación entre esta cuantificación y la cuantificación de LPS.

7.4.4 Evaluación de lípidos totales bacterianos por el método de sulfo-fosfo-vainillina

La reacción de SPV para la determinación de lípidos totales, es un método simple, rápido y razonablemente preciso y se ha recomendado como un procedimiento aceptable para uso rutinario (Byreddy et al., 2016).

Para la detección de lípidos totales se preparó una curva de calibración con ácido oleico en un rango de concentraciones de 0.2 a 2 mg/mL como se muestra en la figura 18.

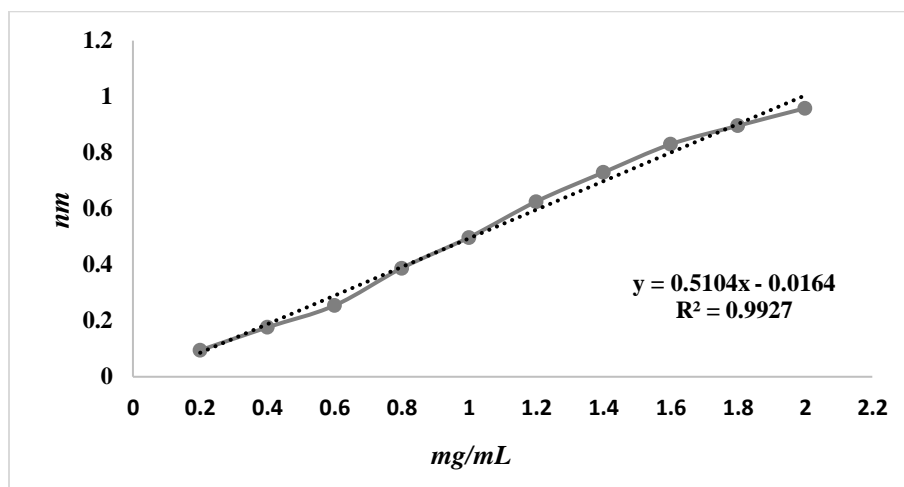


Figura 18. Curva de calibración de ácido oleico.

En la figura 18 se observó una correlación entre la concentración de ácido oleico y las absorbancias obtenidas, con un coeficiente de correlación de 0.992, desafortunadamente esta técnica no funcionó para la cuantificación de lípidos, pues cuando se hacía la cuantificación de las muestras, se tenía la sospecha de que reaccionaba con el SDS (figura 19), por consecuencia se practicó esta técnica a una solución de SDS al 0.33% y se comprobó que sí había interacciones químicas entre el SDS y los componentes de la reacción dando una absorbancia de 0.892 nm, por lo cual nos daban falsos positivos a las mediciones de las preparaciones proteicas. En una búsqueda bibliográfica, no se encontraron trabajos que indiquen que ocurren interacciones químicas del SDS durante la reacción con SPV, la hipótesis al respecto es que existen interacciones iónicas entre las cargas del SDS y el compuesto de resonancia que se forma durante la reacción.



Figura 19. Reacción de SPV dependiente de la concentración de SDS. En la figura se muestra la reacción de SPV con las siguientes muestras, de izquierda a derecha, una solución de SDS al 0.33%, la muestra MP2, la muestra MP3, la muestra MP1 y un blanco (agua).

Al realizar una búsqueda bibliográfica sobre la química básica de la reacción y la reactividad con varios lípidos, se encontró que la reacción requiere un doble enlace carbono-carbono, este requisito es fundamental ya que los ácidos grasos saturados y los triglicéridos (ácido esteárico, palmítico y tripalmitina) así como el glicerol, no reaccionan. El ácido sulfúrico concentrado reacciona con lípidos insaturados en el paso inicial para formar un ion carbonio. El ácido fosfórico reacciona con la vainillina para producir un éster de fosfato que aumenta la reactividad del grupo carbonilo, el ion carbonio reacciona con el grupo carbonilo de la fosfovainillina para formar un compuesto coloreado que se estabiliza por resonancia (figura 20), los compuestos insaturados con más de un doble enlace reaccionan, pero la reacción puede variar con el impedimento estérico (Knight et al., 1972).

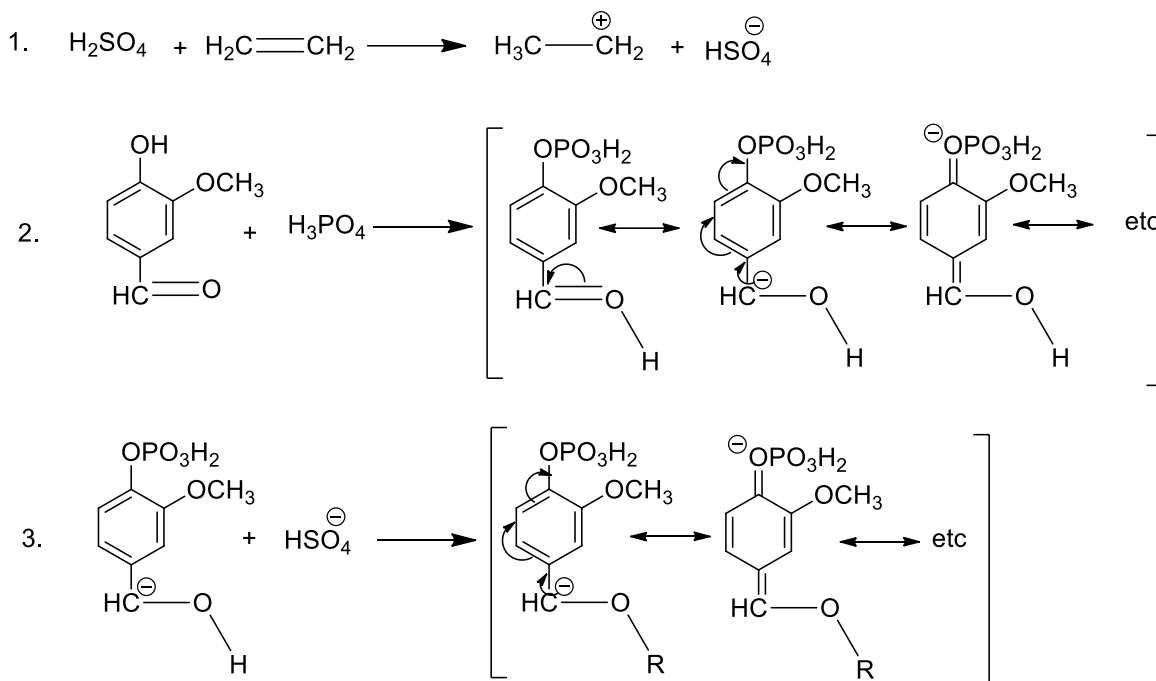


Figura 20. Mecanismo de reacción de SPV. Según la secuencia de la reacción es (1) Los compuestos insaturados reaccionan con ácido sulfúrico para producir un ion carbonio, (2) la vainillina reacciona con ácido fosfórico para producir un éster de fosfato aromático, y (3) el ion carbonio reacciona con el grupo carbonilo activado de la fosfovainillina para producir un complejo coloreado cargado que se estabiliza por resonancia y se absorbe al máximo a unos 525 nm (Modificado de Knight et al., 1972).

Aparentemente la reacción es específica para compuestos orgánicos insaturados, por lo tanto, se debe esperar que los resultados varíen según el peso molecular y la estructura química del lípido que reacciona, lo que a su vez significa que los valores informados mediante el uso de este método dependen en gran medida de la composición del estándar de referencia utilizado (Anschau et al., 2017).

7.4.5 Evaluación de ARN

La problemática para cuantificar ARN en presencia de ADN y proteínas tiene como consecuencia que se desarrollen métodos totalmente específicos para la cuantificación de ARN, este método espectrofotométrico es el de orcinol que está previamente estudiado y modificado para hacer la cuantificación de ácidos nucleicos bajo la absorbancia de 660 nm en donde la interferencia de ADN y proteínas no se hacen presentes (Dische et al., 1937).

Hay pruebas previas en donde el ADN o la desoxipentosa se convierten principalmente en ácido levulínico en condiciones ácidas, mientras que el azúcar ribosa del ARN se convierte

principalmente en furfural y sus homólogos que al reaccionar con el reactivo orcinol (ácido en presencia de calor) produce bandas a 660 nm; el hecho de que el furfural reaccione con el orcinol mientras que el ácido levulínico no lo hace ha llevado al desarrollo de este método específico para la cuantificación de ácidos nucleicos (Mejbaum, 1939).

Para cuantificar los ácidos nucleicos en las muestras proteicas se realizó una curva de calibración con ribosa en un rango de concentraciones de 0.02 a 0.002 $\mu\text{g/mL}$ como se observa en la siguiente figura 21. En donde se obtuvo una coloración de verde a amarillo claro dependiendo de la concentración de ARN.

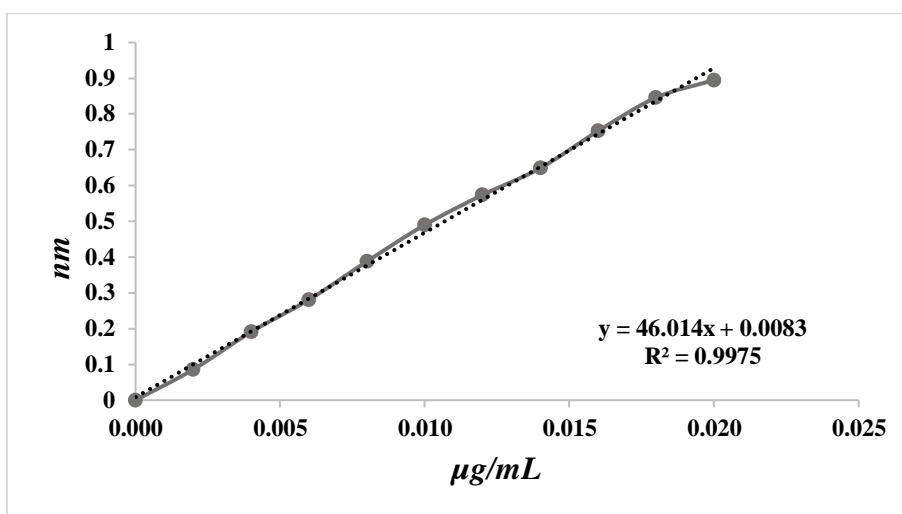


Figura 21. Curva de calibración de ribosa.

En función de la ecuación obtenida en la curva de calibración se obtuvieron las siguientes concentraciones de ácidos nucleicos presente en las muestras proteicas (figura 22).

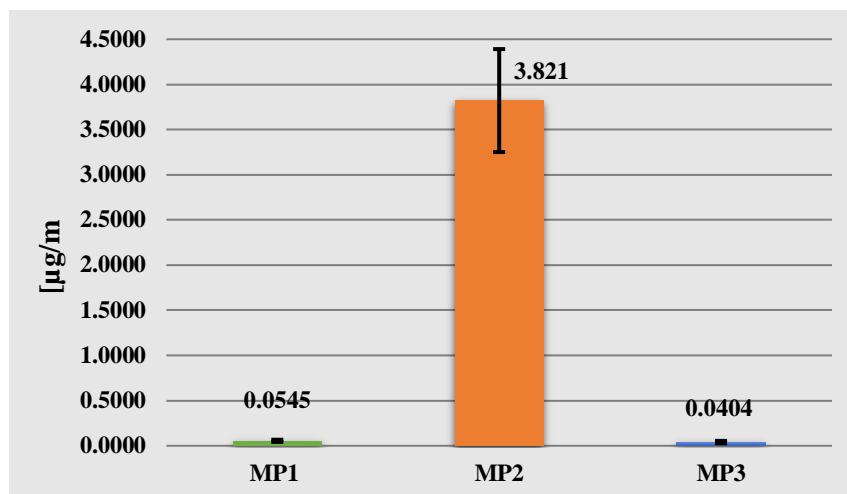


Figura 22. Cuantificación de RNA en las muestras proteicas homogéneas. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de ARN expresado en µg/mL de las muestras MP1, MP2 y MP3 después de la purificación por FPLC.

De acuerdo con la cuantificación la muestra MP1 tiene 0.0545 µg/mL, seguida de MP2 con 3.821 µg/mL y finalmente MP3 con 0.0404 µg/mL, nuevamente se observa que la muestra proteica MP3 tiene menos contenido de RNA, donde se comprueba nuevamente que el método de purificación por FPLC es completamente exitoso quitando contaminantes de la muestra proteica, como anteriormente se dijo lo más tóxico para muestras con fin farmacológico es el SDS y LPS, pero también un punto importantes es el ARN ya que el problema de que exista material genético (ARN) en una muestra con fin farmacológico son las mutaciones que pueden alterar el funcionamiento normal del ARN en los seres humanos y causar enfermedades potencialmente mortales que se pueden heredar o aparecer variantes nuevas con mayor resistencia a los antibióticos, las tasas de mutaciones que causan enfermedades a los seres humanos son muy altas, esto explica la rápida evolución y capacidad para producir variantes nuevas con mayor infectividad, en consecuencia es importante mantener un control de concentraciones de material genético para evitar problemas a nivel mundial (Wang *et al.*, 2022).

8. CONCLUSIÓN

- De los extractos crudos obtenidos de Salmonella, se modificó la concentración de SDS (0.02, 0.05 y 0.07 %) en el buffer de lisis, en cada uno de los extractos se pudo observar por medio de un análisis electroforético la proteína de interés de 38 kDa, sin embargo, se obtuvo un mejor rendimiento en la concentración de proteína en la muestra MP3, donde se observó que el incremento de SDS (0.07 %), demostró ser la mejor condición para la obtención de un extracto proteico con un 12 % más de proteína total.
- En los tres extractos crudos de Salmonella se realizaron métodos distintos de FPLC, donde se modificó la concentración de NaCl (75, 100 y 150 mM), en las tres preparaciones proteicas purificadas se observó la proteína de interés (38 kDa) mediante un análisis electroforético, sin embargo, el método más eficiente fue el de la muestra MP3 (NaCl 150 mM) obteniendo un 22 % más de proteína total.
- Las técnicas de detección empleadas para la evaluación de las moléculas contaminantes en las preparaciones proteicas purificadas a homogeneidad fueron eficientes, la muestra MP3 mostró que contenía 54 % menos SDS comparado con MP2, 49 % menos LPS comparada con MP1 y 98 % menos ARN comparada con MP2, considerando la concentración más alta en cada una de las técnicas de detección. Sin embargo, el método de purificación no fue tan eficiente para quitar carbohidratos pues la muestra proteica MP3 contiene un 95 % más que MP1 siendo esta muestra la cual contenía menor concentración de carbohidratos.
- El método de detección de lípidos no fue eficiente para poder cuantificar en las preparaciones proteicas purificadas a homogeneidad, pudiera ser por la presencia de SDS en las muestras proteicas, ya que se mostró una coloración rosa en la muestra debido al porcentaje de SDS (0.33%) que contenía, se concluye que se podría generar un complejo colorimétrico con el reactivo SPV que impide una cuantificación correcta de lípidos en las muestras proteicas.

ANEXOS

Anexo 1:

Cuantificación de proteína soluble por el ensayo de BCA.

El ensayo del ácido bicinonónico (BCA) es un ensayo colorimétrico para la determinación de la concentración de proteínas, en este ensayo la formación de color es el resultado de dos reacciones. En primer lugar, los iones Cu^{2+} del cobre se reducen a Cu^+ mediante la(s) proteína(s) ensayada(s) en condiciones alcalinas a través de la reacción de Biuret. En el siguiente paso, se forma un complejo de color púrpura de Cu^+ y ácido bicinonónico que se puede medir a una longitud de onda de 595 nm. Sin embargo, varios estudios también demuestran que, además del enlace peptídico, varios aminoácidos como la cisteína, la cistina, el triptófano y la tirosina también son capaces de reducir Cu^{2+} a Cu^+ (Rogatsky *et al.*, 2021).

De acuerdo con el método de BCA se obtuvo la siguiente curva de calibración para obtener la concentración de las muestras problemas.

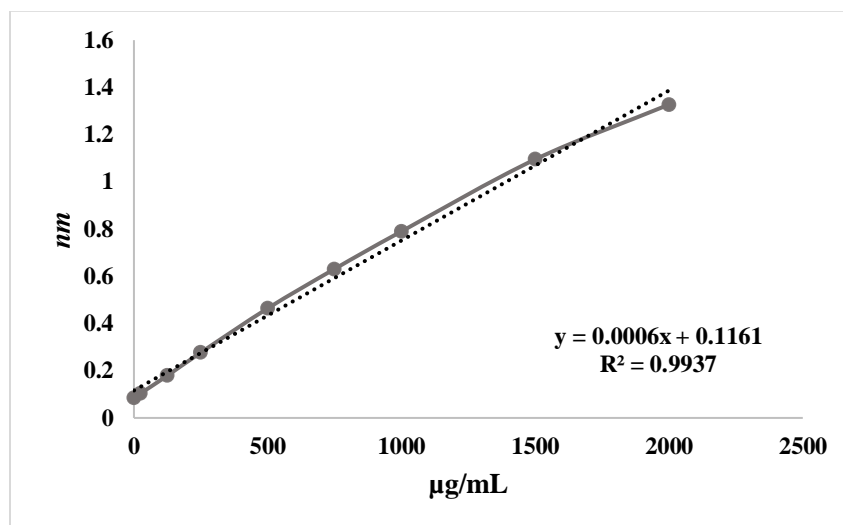


Figura 23. Curva de calibración de Albúmina.

En la curva de calibración de Albumina (figura 23) se obtuvo una linealidad con un coeficiente de correlación de 0.993 que demostró que hay una correlación entre la concentración de BCA y la absorbancia obtenida. Una vez obtenida la curva de calibración se procedió a cuantificar los concentrados y las preparaciones proteicos.

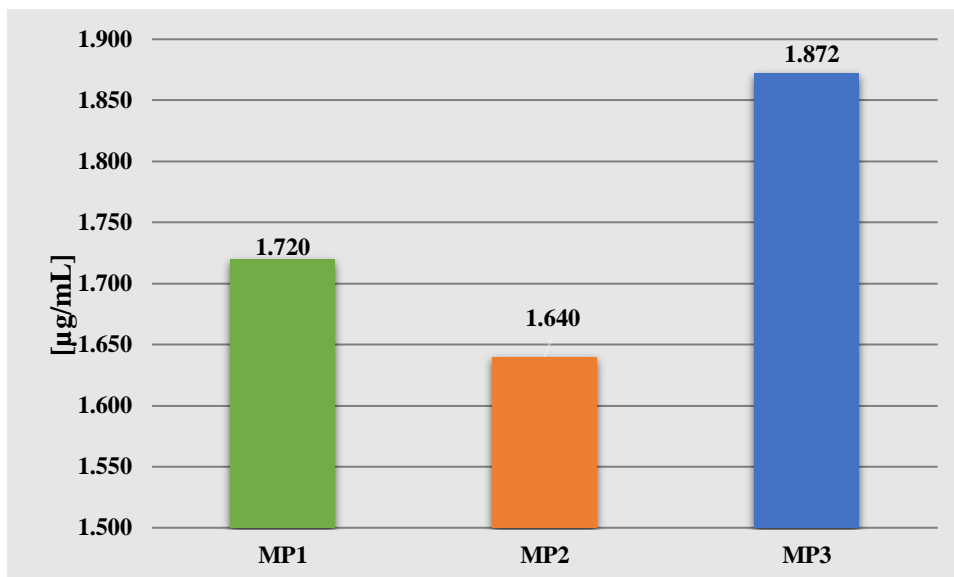


Figura 24. Cuantificación de proteína de MP1, MP2 y MP3 de los extractos crudos. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de los concentrados proteicos MP1, MP2 y MP3 expresado en mg/mL.

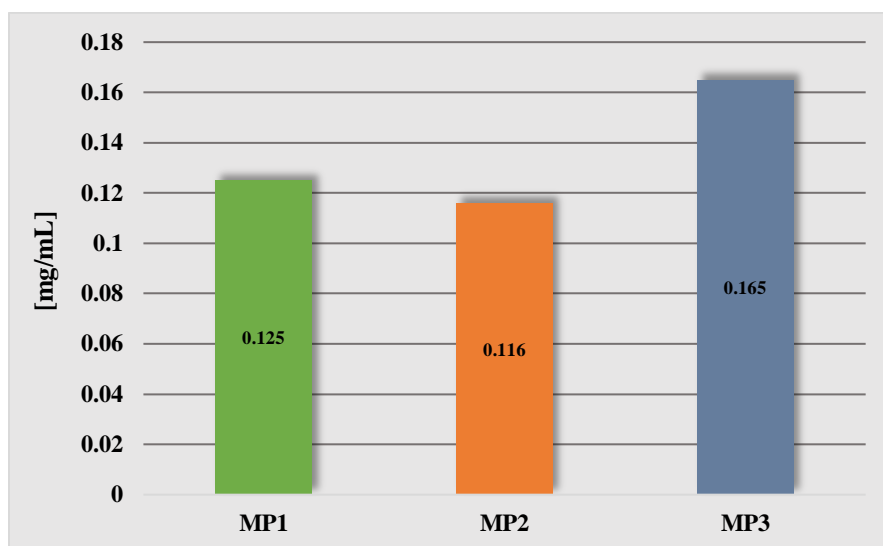


Figura 25. Cuantificación de proteína de MP1, MP2 y MP3 de las preparaciones proteicas homogéneas. La gráfica muestra los datos obtenidos de la cuantificación de las preparaciones proteicas finales MP1, MP2 y MP3 expresado en mg/mL.

Anexo 2

En la figura 26 se muestra el kit completo para la cuantificación de endotoxina, es esencial para la cuantificación correcta de LPS.



Figura 26. Kit de Limulus Amebocyte Lysate

7. BIBLIOGRAFÍA

Almog, R., and Shirey, T. L. (1978). A modified orcinol test for the specific determination of RNA. *Analytical Biochemistry*, 91(1), 130–137.

Abate, W., Sattar, AA, Liu, J., Conway, ME y Jackson, SK (2017). Evaluación del ensayo de factor C recombinante para la detección de especies estructurales de lipopolisacáridos divergentes y comparación con ensayos basados en lisado de amebocitos de *Limulus* y un ensayo de actividad de monocitos humanos. *Revista de microbiología médica*, 66 (7), 888-897.

Akbar John, B., Kamaruzzaman, B.Y., y Zaleha, K. (2012). TAL-una fuente de detector de endotoxinas bacterianas en muestras biológicas líquidas. *Revista internacional de investigación alimentaria*, 19, 423-425.

Anschau, A., Caruso, CS, Kuhn, RC y Franco, TT (2017). Validación del método de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV) para la determinación del contenido lipídico en microorganismos oleaginosos. *Revista Brasileña de Ingeniería Química*, 34, 19-27.

Batista P., Lopes A., Mazzola P., Yagui D., Penna T. y Pessoa Júnior, A. (2007). Métodos de eliminación de endotoxinas de preparaciones biológicas: una revisión.

Bischoff, KM, Shi, L. y Kennelly, PJ (1998). La detección de la actividad enzimática después de la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. *Bioquímica analítica*, 260 (1), 1-17.

Borton L.K. y Coleman K.P. (2018). Pirógenos mediados por materiales en dispositivos médicos: aplicabilidad de la prueba de activación de monocitos in vitro. *ALTEX-Alternativas a la experimentación animal*, 35 (4), 453-463.

Burguet Lago N., Reyes Tur M. I., Brito Godoy L. C., y Troche Concepción, Y. (2012). Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(3), 320-328.

Blasco, M. I. B. (1976). Estudio inmunobiológico de endotoxinas bacterianas. Universidad Complutense de Madrid (Spain).

Byreddy, AR, Gupta, A., Barrow, CJ y Puri, M. (2016). Un método colorimétrico rápido para la cuantificación de lípidos totales en microalgas. *Revista de métodos microbiológicos*, 125, 28-32.

Calderón L., Delgado P., Urbano M., Est M., y Coy F. (2012). Resistencia de Salmonella a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7 (1), 116-129.

Caro Cortes N., y Cruz Méndez Y. M. (2006). Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos. [Tesis de licenciatura, Universidad Javeriana].

Committee for Human Medicinal Products. (2015). Background review for sodium laurilsulfate used as an excipient. European Medicines Agency, Science Medicines Health. 18.

Contreras M.B, Medrano J.A., Ibarra J.R., Martínez J., Chaidez Q.C, y Castro N. (2019). Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista biociencias*, 6.

de Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sáenz, Y. (2014). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de Salmonella enterica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 4-10.

Díaz Osorio, M. Á., Díaz Guevara, P. L., Rodríguez Cárdenas, E. C., Montaña Valencia, L. A., Medina Alfonso, M. I., González Patiño, G. I., & Realpe, M. E. (2014). Caracterización fenotípica y genotípica de Salmonella Typhimurium variante 5-asociada a un brote de enfermedad transmitida por alimentos en el municipio de Paz de Río, Boyacá, 2010. *Iatreia*, 27(1), 23-30.

Dische, Z., & Schwarz, K. (1937). Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. *Microchimica Acta*, 2(1), 13-19.

Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. A., and Smith, F. (1956). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.

Dullah E.C. y Ongkudon C.M. (2017). Tendencias actuales en la detección de endotoxinas y análisis de interacciones endotoxina-proteína. Reseñas críticas en biotecnología, 37 (2), 251-261.

Durango J., Arrieta G., y Mattar S. (2004). Presencia de Salmonella spp. En un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. Biomédica, 24(1), 89-96.

Erridge C., Bennett E. y Poxton I.R. (2002). Estructura y función de los lipopolisacáridos. Microbios e infección, 4 (8), 837-851.

Fernández R. D. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género Salmonella. Acta Médica del Centro, 9(4), 73-75.

Fernández Vicente P., y Anel Bernal A. (2019). Diferenciación de células madre mesenquimales a cardiomiocitos. [Tesis de maestría, Universidad de Zaragoza, CIEN].

Franco E., Garcia V., Jiménez P., Garrosa M., Girbés T., Cordoba M., y Cordoba D. (2018). Endotoxinas desde el punto de vista de la farmacopea. Toxinas, 10 (8), 331.

Frings C. S., and Dunn R. T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. American journal of clinical pathology, 53(1), 89-91.

Gutiérrez L., Montiel E., Aguilera P., y González M. D. C. (2000). Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. salud pública de México, 42(6), 490-495.

Hernández C.C., Aguilera M. G., y Castro G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enfermedades infecciosas y microbiología, 31(4), 137.

Hagopian, K. (1999). Método electroforético preparativo para la purificación de una proteína de membrana hidrófoba: subunidad c de la ATP sintasa mitocondrial de hígado de rata. Bioquímica analítica, 273 (2), 240-251.

Hoffmann S., Peterbauer A., Schindler S., Fennrich S., Poole S., Mistry Y., y Hartung T. (2005). Validación internacional de nuevas pruebas de pirógenos basadas en células monocitoides humanas. Diario de métodos inmunológicos, 298 (1-2), 161-173.

- Hurtado S. R., y Iregui, C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, (19), 37-45.
- iFaura, C. A., Angulo E. L. A., Masdeu L. M., Estebán M. A. M., Ordóñez G. O., Musarra F. P., y Zekaria D. (2008). La salmonella, de actualidad desde siempre. *Real Escuela de Avicultura*, 2-10.
- Izard J., and Limberger R. J. (2003). Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of microbiological methods*, 55(2), 411–418.
- Joiner T.J, Kraus P.F y Kupiec T.C. (2002). Comparación de métodos de prueba de endotoxinas para productos farmacéuticos. *Revista internacional de compuestos farmacéuticos*, 6, 408-409.
- Kabanov D.S y Prokhorenko I.R. (2010). Análisis estructural de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. *Bioquímica (Moscú)*, 75 (4), 383-404.
- Knight, JA, Anderson, S. y Rawle, JM (1972). Base química de la reacción de sulfosfo-vainillina para estimar los lípidos séricos totales. *Química clínica*, 18 (3), 199-202.
- Laemmli, Reino Unido (1970). Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblaje de la cabeza del bacteriófago T4. *naturaleza*, 227 (5259), 680-685.
- Lüderitz O., Galanos C., Lehmann V., Nurminen M., Rietschel E.T., Rosenfelder G., and Westphal O. (1973). Lípido A: estructura química y actividad biológica. *Revista de enfermedades infecciosas*, 7(4), 185-200.
- Mathaes R, Koulov A, Joerg S, Mahler HC. Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals-Pushing the Boundaries. *J Pharm Sci*. 2016 Aug;105(8):2255-9. doi: 10.1016/j.xphs.2016.05.029. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27378678.
- Mejbaum, W. (1939). Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.
- Nielsen, SS (2010). Método del ácido fenol-sulfúrico para carbohidratos totales. *Manual de laboratorio de análisis de alimentos*, 47-53.

Orellana Montecino, C. A. (2009). Modelamiento y Simulación de las Curvas de Elución de Proteínas a Alta Concentración en Cromatografía de Intercambio Iónico.

Nikaido, Hiroshi. (1983). [Métodos en Enzimología] Biomembranas Parte K: Biogénesis de Membranas: Ensamblaje y Direccionamiento (Procariotas, Mitocondrias y Cloroplastos) Volumen 97. Proteínas que forman grandes canales a partir de las membranas externas bacterianas y mitocondriales: Porinas y proteína receptora lambda del fago. , (), 85–100.

Peterbauer A., Eperon S., Jungi T.W., Werner E.R. y Werner-Felmayer G. (2000). Líneas celulares monocitoides preparadas con interferón- γ : optimización de su uso para la detección in vitro de pirógenos bacterianos. Revista de métodos inmunológicos, 233 (1-2), 67-76.

Parra M., Máttar S., y Durango, J. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. Revista MVZ Córdoba, 7(2), 187-200.

Perdomo R., Pardo Z., Spreitzer I., Lagarto A., y Montag T. (2011). La prueba de activación de monocitos (MAT) detecta de forma fiable pirógenos en formulaciones parenterales de albúmina sérica humana. ALTEX-Alternativas a la experimentación animal, 28 (3), 227-235.

Rezania S., Amirmozaffari N., Tabarraei B., Jeddi-Tehrani M., Zarei O., Alizadeh R., and Zarnani, A. H. (2011). Extraction, purification, and characterization of lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi. Avicenna journal of medical biotechnology, 3(1), 3.

Rodríguez E. M. (2018). Fiebre tifoidea y factores de virulencia de Salmonella entérica serotipo Typhi [Tesis de doctorado, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE].

Rojas Campos N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas.

- Rusconi F., Valton E., Nguyen R., and Dufourc E. (2001). Quantification of sodium dodecyl sulfate in microliter-volume biochemical samples by visible light spectroscopy. *Analytical biochemistry*, 295(1), 31–37.
- Solís Asencios J. S. (2004). Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (*Limulus amoebocyte lysate*) por el Método de Gel Clot en Clindamicina 600 mg. Inyectable, [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Su L. y Chiu C. (2007). Salmonella: importancia clínica y evolución de la nomenclatura. *Revista médica Chang Gung*, 30 (3), 210.
- Su W. y Ding X. (2015). Métodos de detección de endotoxinas. *Revista de automatización de laboratorio*, 20 (4), 354-364.
- Smith, PE, Krohn, RI, Hermanson, GT, Mallia, AK, Gartner, FH, Provenzano, M., y Klenk, DC (1985). Medición de proteínas mediante ácido bicinconínico. *Bioquímica analítica*, 150 (1), 76-85.
- Tindall B.J, Grimont P., Garrity G.M. y Euzeby J.P. (2005). Nomenclatura y taxonomía del género *Salmonella*. *Revista internacional de microbiología sistemática y evolutiva*, 55 (1), 521-524.
- Vipond C., Findlay L., Feavers I. y Care R. (2016). Limitaciones de la prueba de pirógenos en conejos para evaluar vacunas meningocócicas basadas en OMV. *ALTEX- Alternativas a la experimentación animal*, 33 (1), 47-53.
- Wang D, Farhana A. *Bioquímica, Estructura del ARN*. (2022). Disponible en: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>)
- Wunderlich C., Schumacher S. y Kietzmann M. (2014). Métodos de detección de pirógenos: comparación del ensayo de sangre entera bovina (bWBA) y la prueba de activación de monocitos (MAT). *BMC Farmacología y Toxicología*, 15 (1), 1-7.
- Zaidi M. B., López C., & Calva E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 121-125.

Zuzuarregui-Olasagasti, A. (2013). Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basado en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre un biosensor electroquímico de diseño específico.