



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
DIVISIÓN BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



RESUMEN TRABAJO DE GRADO

NOMBRE(S): PAOLA ANDREA

APELLIDOS: CASTRO YARA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PROGRAMA DE: INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): JOSMAN ANDREY

APELLIDOS: VELAZCO MENDOZA

TÍTULO DE LA TESIS: EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FITOHEMAGLUTININA OBTENIDA A PARTIR DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

RESUMEN

En el presente trabajo de grado se evaluaron dos métodos de extracción de la fitohemaglutinina obtenida a partir del frijol (*Phaseolus Vulgaris*), dichos métodos fueron el propuesto por Seuannez 1987 y el otro propuesto por laboratorio central de defensa civil – Cuba 1996, además se cuantifico la concentración de proteínas que se obtuvieron a partir de cada método por medio de espectrofotometría uv- visible, también se evaluó de forma cualitativa la pureza de la fitohemaglutinina que se obtuvo con la aplicación de cada método con la ayuda de SDS – PAGE y finalmente se realizo una evaluación de la estimulación mitótica generada por diferentes concentraciones de fitohemaglutinina en el medio RPMI 1640.

PALABRAS CLAVE: Evaluación, métodos, espectrofotometría uv, fitohemaglutinina, extracción

CARACTERISTICAS:

PÁGINAS: 76 PLANOS: \_\_\_ ILUSTRACIONES: \_\_\_ CD ROOM: 1

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FITOHEMAGLUTININA  
OBTENIDA A PARTIR DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

PAOLA ANDREA CASTRO YARA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FITOHEMAGLUTININA  
OBTENIDA A PARTIR DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

PAOLA ANDREA CASTRO YARA

Proyecto de grado presentado como requisito para optar el título de:  
Ingeniería biotecnológica

Director:

Ing. Josman Andrey Velasco Mendoza

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

FECHA: 12 DE AGOSTO DE 2016

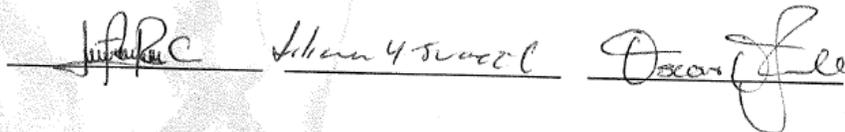
HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: SALA N°03 EDIFICIO CREAD

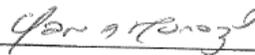
PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** "EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FITOHEMAGLUTININA OBTENIDA A PARTIR DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)"
**MODALIDAD:** TRABAJO DIRIGIDO
**JURADOS:** LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO  
LILIANA YANET SUAREZ CONTRERAS  
OSCAR ORLANDO PINILLA MANTILLA
**DIRECTOR:** JOSMAN ANDREY VELASCO MENDOZA

| NOMBRE DEL ESTUDIANTE    | CODIGO  | CALIFICACION |
|--------------------------|---------|--------------|
| PAOLA ANDREA CASTRO YARA | 1610647 | 4.6          |

**OBSERVACIONES:**  
MERITORIA**FIRMA DE LOS JURADOS:**


Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular



## **Agradecimientos**

Ante todo doy gracias a Dios, por guiarme y darme determinación en las decisiones que tomo día a día; por que la fe en ese ser celestial y mi sueño de superación me dieron esperanzas para realizar una de las mayores metas en mi vida: la culminación de mi carrera.

Les agradezco principalmente a mis padres por su amor incondicional y paciencia; me han enseñado a aceptar los retos que impone la vida con una sonrisa en el rostro, y con ánimos de superación; personas maravillosas que con su ejemplo diario, su carácter, ternura, comprensión, sus sacrificios y valores me han llevado a ser lo que soy hoy en día, a ellos y mi hermano pertenece mi infinito amor.

Agradezco a la universidad por mi formación profesional, porque cada profesor perteneciente a la universidad Francisco de Paula Santander se esmera en dar todo lo necesario para que cuando salgamos no le temamos a los retos que podemos encontrarnos en el área laboral; siempre impulsando a sus estudiantes en la búsqueda continúa del mejoramiento propio.

Agradezco a mi director de tesis, por elegir mi hoja de vida, dándome así la oportunidad de realizar mi tesis; ofreciéndome orientación cuando lo sentía necesario, y permitiéndome resolver los obstáculos encontrados en el camino por mis propios medios; también por no solo tenerme paciencia, si no enseñarme a tenerla.

A la empresa Laboratorio de Genética y Biología Molecular Ltda. Por aceptarme y permitirme usar sus instalaciones, en esta institución encontré un apoyo incondicional por parte del personal, de los cuales pude aprender mucho; no solo en la parte laboral, si no también personal; el ambiente intelectual que la empresa puede ofrecer es un sueño para el inicio

profesional de un estudiante.

Finalmente agradezco a las personas que me dieron un apoyo emocional en cada fase de mi tesis; los seres queridos que me rodearon y dieron calma en los momentos difícil, en los cuales sentía desorientación; gracias por escucharme, darme palabras de aliento, y creer en mi cuando yo no lo hacía, Muchas gracias a todas las personas involucradas en esta etapa de mi vida.

## Resumen

El frijol es una fuente rica en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales; sin embargo contiene sustancias anti fisiológicas, una de ellas es la fitohemaglutinina, que es una proteína o glicoproteína, de origen no inmune, capaz de reconocer e interactuar reversiblemente con carbohidratos de superficie celular. La importancia de esta proteína se debe principalmente a sus propiedades biológicas, tales como inducción de mitosis, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias entre otras.

El objetivo principal del presente trabajo fue la evaluación de dos métodos de extracción de dicha proteína, la cual tiene un uso mensual entre 20 a 40 ml en el área de citogenética en el laboratorio de Genética y Biología Molecular Ltda. Esta evaluación se realizó teniendo en cuenta 3 aspectos:

El primero fue la cuantificación de la proteína, este se realizó con ayuda de un nanodrop 2000c; obteniendo una concentración de 2,76 mg/ml para el método N°1 y de 6,48 mg/ml para el método N°2 evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos.

El segundo fue comprobar de manera cualitativa la pureza de la proteína; esto se desarrolló por medio de una electroforesis SDS –PAGE, comparando nuestras proteínas extraídas con una fitohemaglutinina comercial; obteniendo resultados positivos para el método N°1, debido a que los patrones entre la fitohemaglutinina comercial y esta fueron similares; por el contrario no se evidenciaron resultados para el método N°2.

Y por último se realizó una prueba de actividad mitogénica, en la cual se evaluaron 3 volúmenes (10 $\mu$ l, 75  $\mu$ l y 150  $\mu$ l) para la adición de esta proteína en un medio de cultivo celular RPMI 1640, como control positivo se usó la fitohemaglutinina comercial con el volumen recomendado por la empresa (150 $\mu$ l); debido a que se observaba una precipitación en el medio al adicionar la proteína extraída por el método N°2 no se le pudo realizar esta prueba; sin embargo los resultados obtenidos por parte del método N°1: para 10 $\mu$ l 0.3; 75  $\mu$ l 15.725 y 150  $\mu$ l 13,875 son prometedores, debido a que los volúmenes de 75 $\mu$ l y 150 $\mu$ l no presentan diferencia estadísticamente significativa con el control positivo.

Los resultados obtenidos nos indican que el mejor método de extracción que puede utilizar el laboratorio para reemplazar la compra de fitohemaglutinina a empresas extranjeras, es el método N°1; debido a que este no afectara la calidad en los procesos del área de citogenética, estos resultados también se tendrán en cuenta a futuros como evidencia para realizar el registro INVIMA del producto obtenido (fitohemaglutinina).

## Contenido

|                                   | Pág. |
|-----------------------------------|------|
| Introducción                      | 15   |
| 1. Problema                       | 17   |
| 1.1 Título                        | 17   |
| 1.2 Planteamiento del problema    | 17   |
| 1.3 Formulación del problema      | 18   |
| 1.4 Justificación                 | 18   |
| 1.5 Objetivos                     | 19   |
| 1.5.1. Objetivo General           | 19   |
| 1.5.2. Objetivos Específicos      | 19   |
| 1.6 Delimitaciones                | 19   |
| 1.6.1 Espacial                    | 19   |
| 1.6.2 Temporal                    | 20   |
| 1.6.3 Conceptual                  | 21   |
| 2. Marco referencial              | 22   |
| 2.1 Antecedentes                  | 22   |
| 2.1.1 Antecedente empírico        | 22   |
| 2.1.2 Antecedentes bibliográficos | 23   |
| 2.2 Marco teórico                 | 25   |
| 2.2.1 Phaseolus Vulgaris          | 25   |
| 2.2.2 Electroforesis              | 27   |

|   |    |
|---|----|
|   | 10 |
| 2.2.3 Espectrofotometría Uv – Visible   | 30 |
| 2.2.4 Cariotipo   | 34 |
| 2.3 Marco contextual  | 37 |
| 2.4 Marco Legal   | 39 |
| 3. Metodología  | 40 |
| 3.1 Tipo de investigación   | 40 |
| 3.2 Población y muestra   | 40 |
| 3.2.1 Población   | 40 |
| 3.2.2. Muestra  | 40 |
| 3.3 Etapas desarrolladas  | 41 |
| 3.3.1 Extracción fitohemaglutinina (PHA)                                      | 41 |
| 3.3.2 Cuantificación de proteínas   | 44 |
| 3.3.3 Pureza de la proteína   | 45 |
| 3.3.4 Actividad biológica   | 47 |
| 4. Resultados y Análisis  | 51 |
| 4.1 extracción fitohemaglutinina (PHA)  | 51 |
| 4.1.1 Método 1: propuesto por Seuannez (1987)                                 | 51 |
| 4.1.2 Método 2: combinación de extracción ácida con 2 precipitaciones salinas | 51 |
| 4.2 Cuantificación de proteínas   | 52 |
| 4.3 Electroforesis SDS- PAGE  | 54 |
| 4.4 Actividad biológica   | 55 |
| 4.4.1 comparación entre duplicados  | 55 |
| 4.4.2 Índice mitótico para diferentes volúmenes                               | 58 |
| 4.5. Análisis de costos   | 61 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
|                            | 11 |
| 5. Conclusiones            | 63 |
| 6. Recomendaciones         | 65 |
| Referencias Bibliográficas | 66 |
| Anexos                     | 71 |