

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS.  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA.



DETERMINACIÓN DE LOS MONOSÁCARIDOS PRESENTES EN EL POLISACÁRIDO  
PROVENIENTE DE LA CEPA ENTEROAGREGATIVA DE ESCHERICHIA COLI 85D5.

TESIS PREVIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA.

PRESENTADA POR

Br. Rohenic Rugama Somarriba.

TUTORES

Dr. Felipe Urbina Toruño.  
Lic. Bayardo Vilchez Rugama.  
Lic. Erick Amaya Mayorga.

LEÓN, NICARAGUA  
DICIEMBRE 2005

## DEDICATORIA

A mis abuelitos: Sr. Miguel Rugama Aráuz (Q.E.P.D), Sra. Isabel Antón Munguía (Q.E.P.D), Sr. Juan José Somarriba Coronado (Q.E.P.D) y Sra. Felipa Carmona Ruiz.

A mi hija: Francis Guadalupe Rugama González, por ser la fuente de mi inspiración.

## AGRADECIMIENTO

A **Dios Padre** por bendecirme y llenarme de vida, salud y perseverancia para llegar al final de esta meta.

A mis padres: **Sr. Francisco Rugama Antón** y **Sra. Esperanza Somarriba Carmona** por brindarme su amor, comprensión y apoyo necesarios para coronar mis estudios.

A mi esposa **Carla Vanessa González de Rugama** por estar siempre a mi lado, brindándome lo mejor de sí misma.

Al proyecto "Caracterización Molecular de Microorganismos" del departamento de Química, financiado con fondos de SIDA/SAREC, bajo el auspicio del centro de investigación del Instituto Karolinska de Suecia por haberme facilitado las condiciones del local, los materiales, equipos, métodos y reactivos necesarios para desarrollar el presente trabajo.

A mis tutores: **Dr. Felipe Urbina Toruño**, Director del proyecto "Caracterización Molecular de Microorganismos"; **Lic. Bayardo Samuel Vilchez** y al **Lic. Erick Amaya**, por su paciencia y apoyo brindado en el desarrollo de esta tesis.

*i.*      **ABREVIATURAS.**

Glu.....	Glucosa.
Gal.....	Galactosa.
Man.....	Manosa.
Rib.....	Ribosa.
Xil.....	Xilosa.
GlcNAc.....	Glucopiranosamida acetilada.
GalNAc.....	Galactopiranosamina acetilada.
LPS.....	Lipopolisacárido.
PS.....	Polisacárido.
E. coli.....	Escherichia coli.
CGL.....	Cromatografía Gas-Líquido.
AM.....	Análisis de metilación.
AA.....	Análisis de azúcar.
RMN H1.....	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
RMN C13.....	Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13.
SDS-Page.....	Dodecil Sulfato de Sodio-Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
mm.....	Milímetros.
mg.....	Miligramos.
mL.....	Militros.
μL.....	Microlitros.
SDS.....	Dodecil Sulfato de Sodio.
1H.....	Muestra a una hora de hidrólisis.

1½H.....Muestra a una hora y media de hidrólisis

2H.....Muestra a dos horas de hidrólisis.

2 ½H.....Muestra a dos horas y media de hidrólisis

Tr.....Tiempo de retención.

Rf.....Factor de retención.

CGF.....Cromatografía de gel filtración.

Ac<sub>2</sub>O.....Anhídrido Acético.

TFA.....Ácido Trifluoroacético.

MeOH.....Metanol.

HOAc.....Ácido Acético.

CCF.....Cromatografía de Capa Fina

## *ii.*      **ÍNDICE**

DEDICATORIA.....	1
....1	
AGRADECIMIENTO.....	2
....2	
<i>i.</i> ABREVIATURAS.....	4
<i>ii.</i> ÍNDICE.....	6
<i>iii.</i> RESUMEN.....	8
1.    INTRODUCCIÓN.....	9
2.    OBJETIVOS.....	11
2.1. OBJETIVOS GENERALES.....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	11
3.    MARCO TEÓRICO.....	12
3.1. BACTERIAS.....	12
3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	12
3.2.1. LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEA.....	13
3.3. EL GÉNERO ESCHERICHIA COLI.....	13
3.4. COMPONENTES ESPECIALES DE LAS PAREDES CELULARES DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.....	14
3.4.1. LIPOPROTEÍNAS.....	14
3.4.2. LA MEMBRANA EXTERIOR.....	14
3.4.3. LIPOPOLISACÁRIDO.....	15
3.4.3.1. ESTRUCTURA, ENDOTOXICIDAD, INMUNOGENECIDAD Y ANTIGENECIDAD DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS BACTERIALES (ENDOTOXINA, O-ANTÍGENOS).....	16
3.5. NATURALEZA QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LAS ENDOTOXINAS.....	16
3.6. COMPONENTES DE UN POLISACÁRIDO.....	17
3.7. ANTÍGENOS.....	18
3.8. CARBOHIDRATOS.....	20
3.9. PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN.....	21
3.10. LIOFILIZACIÓN.....	21
3.11. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.....	22
3.12. ANÁLISIS DE AZÚCAR.....	23
3.13. ACETILACIÓN DE POLISACÁRIDOS.....	23
3.14. CROMATOGRAFÍA DE GAS.....	25
4.    MATERIALES Y EQUIPOS.....	¡Error! Marcador no definido.
5.    SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
6.    METODOLOGIA.....	¡Error! Marcador no definido.
7.    RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
8.    DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
8.1. Separación del Lip-A del LPS de la cepa de Escherichia coli 85D5.....	¡Error! Marcador no definido.

- 8.2. Cromatografía de capa Fina del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5. ¡Error! Marcador no definido.
- 8.3. Análisis de azúcares Totalmente Acetilados del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5. ¡Error! Marcador no
- 9. CONCLUSIONES. .... ¡Error! Marcador no definido.
- 10. RECOMENDACIONES..... ¡Error! Marcador no definido.
- 11. BIBLIOGRAFÍA..... ¡Error! Marcador no definido.

### *iii.* RESUMEN

Con el presente trabajo de investigación se pretende contribuir al estudio de la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa 85D5 aislada de niños con diarrea en León, Nicaragua. Investigación en la cual se ha logrado caracterizar químicamente de manera parcial uno de sus factores de virulencia (Su endotoxina o Lipopolisacárido, LPS). Lográndose separar el Lípido A del Lipopolisacárido mediante una hidrólisis ácida y purificando el polisacárido resultante a través de Cromatografía en Gel Filtración. Además, se logró determinar a través de cromatografía gas-líquido, que el polisacárido es un heptasacárido compuesto por Ribosa, Manosa, Glucosa, Galactosa, Glucosamina Acetilada, Galactosamina Acetilada y Heptosa, siendo la proporción relativa de los mismos la siguiente 13:65:31:10:25:23:9.



## 1. INTRODUCCIÓN.

En Nicaragua, las enfermedades diarreicas constituyen una de las principales causa de mortalidad y morbilidad infantil. Uno de los principales organismos causantes de estas enfermedades son las bacterias *Escherichia Coli* de la familia enterobacteriacea. (1)

La *Escherichia coli* es el anaerobio facultativo predominante de la flora intestinal humana. Este organismo coloniza típicamente el tracto gastrointestinal de los niños en pocas horas de vida. La *Escherichia coli* usualmente permanece inocuamente confinada en el lumen intestinal. Sin embargo, en el huésped debilitado o inmunosuprimido, o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, aún cepas normales no patogénicas de *Escherichia coli* pueden causar infecciones. Además, aún los más robustos miembros de nuestra especie pueden ser susceptibles a infecciones por uno de varios clones altamente adaptados de *Escherichia coli* los cuales han desarrollado la habilidad de causar un amplio espectro de enfermedades humanas. Las infecciones debido a la *Escherichia coli* patogénica pueden estar limitadas a la superficie mucosal o pueden diseminarse por todo el cuerpo. Tres síndromes clínicos generales resultan de la infección con cadenas inherentemente patogénicas de la *Escherichia coli* como son la infección de tracto urinario, meningitis y enfermedades diarreicas. (23)

Actualmente, se ha descubierto que son las endotoxinas, que generalmente se encuentran en la pared celular de la bacteria, las causantes de las enfermedades o infecciones. Estas endotoxinas, en las bacterias Gram-negativas (como la *Escherichia coli*), conocidas como Lipopolisacáridos (LPS), inducen respuestas inmunes lo cual ha despertado el interés de su estudio. (23)

La importancia de estudiar la estructura de un polisacárido de los LPS bacterianos es que puede ser usada para clasificar e identificar diferentes especies. Para entender y hacer uso de las propiedades bioquímicas, biológicas e inmunológicas de los polisacáridos, es necesario conocer sus estructuras y algunas veces la conformación tridimensional de porciones de los polímeros. Hoy en día, con una estructura conocida de polisacárido es posible hacer vacunas, las cuales se obtienen de oligosacáridos producidos sintéticamente, imitando las partes activas de las estructuras polisacáridas.

Las técnicas inmunoquímicas han logrado clasificar a los LPS como serotipos y proporcionar un buen diagnóstico. Sin embargo, conocer la estructura química o las principales porciones de estas macromoléculas que inducen respuesta inmune en el organismo, solamente puede ser conseguido por métodos químicos. Estos métodos inicialmente requieren de la separación de los componentes estructurales de estas macromoléculas. Las técnicas como electroforesis SDS-PAGE, cromatografía de capa fina, análisis de azúcar, análisis por metilación, espectrometría de masa, RMN H1 y C13, cumplen con este objetivo, y además, proporcionan información sobre las porciones de la muestra.

En base a todo lo anterior, en la UNAN-León se han realizado estudios epidemiológicos y estructurales sobre esta bacteria, algunas investigaciones se han obstaculizado por falta de equipos y facilidades en los laboratorios. El estudio estructural más reciente fue realizado en la cepa de *Escherichia coli* 108 IV, cuyo objetivo era estudiar la composición de azúcares y la estructura presente en el polisacárido de la cepa de *Escherichia coli* 108 IV, realizado por Leonardo Carmona. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la UNAN-León, dentro del Programa de Enfermedades Infecciosas, Proyecto Caracterización Molecular de Microorganismos "Laboratorio de Inmunoquímica", con el apoyo y colaboración del Instituto de Karolinska, Universidad Hospital de Huddinge, Departamento de Medicina de Laboratorio, División de Bacteriología Clínica, Estocolmo/Suecia. (1)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GENERALES**

Caracterizar parcialmente la estructura del polisacárido proveniente de la cepa enteroagregativa de *Escherichia coli* 85D5.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

1. Separar el Lip-A del LPS de la cepa de *Escherichia coli* 85D5 mediante hidrólisis ácida.
2. Purificar el polisacárido obtenido del lipopolisacárido de la cepa de *Escherichia coli* 85D5 por cromatografía de gel-filtración.
3. Identificar los monosacáridos presentes en el PS de la cepa de *E. coli* 85D5 a través de CCF y CGL.
4. Calcular los radios relativos de los monosacáridos presentes en el PS de la cepa de *E. coli* 85D5, a partir de las áreas de correlación de cada pico obtenido en CGL.

### 3. MARCO TEÓRICO.

#### 3.1. BACTERIAS.

Las bacterias son diminutos organismos, los cuales se encuentran en casi todos los lugares. En la mayoría de los casos una bacteria es una simple célula autónoma. Sin embargo las células bacteriales tienen una organización procariótica y se diferencian de las células eucarióticas de los grandes organismos por carecer de membrana nuclear, aparato mitótico, mitocondrias y retículo endoplasmático visible. Tienen una estructura superficial más compleja que las células animales, pues por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una pared celular rígida, que les permite soportar las condiciones adversas del medio ambiente que las rodea. La composición de la pared celular es diferente tanto en las bacterias Gram-positivas como en las bacterias Gram-negativas, y tienen una estructura que por su antigeneidad les confiere especificidad en cada caso. (7)

#### 3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.

Existen muchas formas de clasificar a una bacteria, pero una de las más fundamentales es la división de la bacteria en Gram-positiva y Gram-negativa. Los términos Gram-positivo y Gram-negativo provienen, de cómo la bacteria reacciona a un cierto procedimiento de coloración (teñido). Lo que determina que la reacción ocurra, es la estructura de la pared celular de la bacteria. La bacteria Gram-negativa tiene una pared celular exterior ordinaria, una bicapa adicional de la cual la parte exterior consiste de fosfolípidos, proteínas y Lipopolisacáridos (LPS), por lo que la bacteria no se tiñe. (3)

Otra forma de clasificar a las bacterias es a través del taxón superior que lo constituye el reino procariótico, que se subdivide en dos divisiones:

Primera división : Cianobacterias.

Segunda división : Bacterias.

En la segunda división, se encuentra la familia enterobacteriacea dentro de la cual está la bacteria E. coli.

### 3.2.1. LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEA.

Las bacterias de esta familia se caracterizan por las propiedades comunes siguientes: todas son bacilos gram-negativos, no forman esporas, carecen de oxidasas, reducen los nitratos en nitritos, fermentan la glucosa con producción de gas o sin la misma, son móviles (peritricos) o inmóviles, proliferan muy bien en medios comunes y son anaerobios facultativos.

La propiedad fermentativa varía según la especie. La *Escherichia coli* se diferencia de las especies patógenas (*salmonella* de la fiebre tifoidea, las paratifoidea A y B, etc.) por su actividad bioquímica más pronunciada. A pesar de que muchas especies de enterobacteriáceas son saprofitas ambientales y destruyen la materia orgánica, todas se encuentran a veces en el conducto intestinal del hombre y los animales inferiores, de ahí el nombre de la familia.

Algunos son patógenos primarios peligrosos, otras sólo secundarios. (4)

### 3.3. EL GÉNERO ESCHERICHIA COLI.

Este grupo comprende la *Escherichia coli* y diversas variantes tales como: Enterotoxigénicas (ETEC), Enteropatógenas (EPEC), Enteroinvasivas (EIEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteroagregativas (EAEC) y Adherente difusa (DAEC). (4)

Este microorganismo fue aislado de las heces fecales por T. Escherich en 1885. Este microorganismo se distingue de otras bacterias coliformes por su incapacidad para utilizar el citrato en lugar de la glucosa como fuente exclusiva de carbono; estas variantes producen una diversidad de enfermedades como diarreas, neumonía, meningitis neonatal e infecciones en las vías urinarias. (4,23)

El género *Escherichia* incluye una sola especie de *Escherichia coli* la cual comprende varios grupos serológicos que se diferencian por sus propiedades bioquímicas, antigénicas y culturales. (4)

Por su morfología, la *E. coli* corresponde a las características generales de las enterobacteriáceas, puesto que es un anaerobio facultativo cuyo crecimiento óptimo tiene lugar a temperaturas entre 30-37°C y pH 7.2-7.5; prolifera bien a temperatura ambiente en los medios corrientes y se desarrolla a temperaturas de 10 a 45°C en los primeros días. Por su estructura fisicoquímica se caracteriza como bacilo gram-negativo y mide de 0.5-1 µm. y su estructura química se define por proteínas flagelares y polisacáridos de envoltura los cuales pueden enmascarar al antígeno polisacárido-O-somático estructural que constituye parte integral de su pared celular. (23)

### **3.4. COMPONENTES ESPECIALES DE LAS PAREDES CELULARES DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.**

Los componentes celulares de las bacterias gram-negativas contienen tres componentes que yacen exteriores a la envoltura del peptidoglucano: lipoproteína, membrana exterior y lipopolisacárido. (23)

#### **3.4.1. LIPOPROTEÍNAS**

Las moléculas de una lipoproteína sirven para entrecruzar la membrana exterior y las envolturas de péptidoglucano. El componente proteico contiene una secuencia de 57 aminoácidos; es un péptido eslabonado a residuos de ácidos diaminopimélico de las cadenas laterales tetrapéptidicas del peptidoglucano.

El componente lípido consiste de un tioéster de diglicérido unido a una cisteína terminal, se inserta en forma no covalente a la membrana exterior, la lipoproteína es abundante en la célula gram-negativa y su función es estabilizar la membrana externa y fijarla a la capa del peptidoglucano. (23)

#### **3.4.2. LA MEMBRANA EXTERIOR**

Es una típica capa doble de fosfolípido en el cual estos han sido sustituidos por moléculas de lipopolisacáridos. Al igual que la membrana citoplasmática (membrana celular) la

membrana exterior es un mosaico líquido que contiene proteínas específicas ancladas en una matriz específica de fosfolípidos.

La membrana externa impide la pérdida de proteínas periplasmáticas y protege a la célula (en el caso de las bacterias entéricas) de las sales biliares y las enzimas hidrolíticas del medio. La presencia de poros externos la hace permeable a solutos de peso molecular bajo; no obstante, las moléculas grandes de antibióticos penetran con relativa lentitud, lo cual explica la resistencia que manifiestan las bacterias gram-negativas a estos. (23)

### 3.4.3. LIPOPOLISACÁRIDO.

El Lipopolisacárido (LPS) es uno de los principales componentes de la membrana exterior que envuelve la célula de la bacteria Gram-negativa. Estando éste en contacto con las proteínas de la membrana, le provee integridad y estabilidad a ésta y hace posible las propias funciones de la membrana (permeabilidad selectiva, reconocimiento e interacción intercelular). Los LPS juegan un rol importante en el contacto de los microorganismos con otros sistemas biológicos. De esta manera, éste toma parte en interacciones de la bacteria con plantas y sirve como un receptor bacteriófago, proporcionando reconocimiento para los virus de su propio microorganismo y adsorción del virus sobre la superficie celular. El LPS es una endotoxina bacterial con un amplio espectro de propiedades tóxicas, incluyendo toxicidad letal, y es un inmunoestimulante potencial. Este sirve como un inmunógeno bacterial y de protección antigénica, que es la respuesta inmune de organismos superiores, incluyendo la formación de anticuerpos, y su interacción con el microbio es directa. (25)

El término lipopolisacárido, denota una especie molecular compleja, consiste principalmente de un polisacárido, pero contiene una porción significativa de un lípido unido o asociado, que ha adquirido una connotación especial en química bacteriológica. En este contexto el lipopolisacárido es una designación aceptada para los carbohidratos componentes del O-antígeno endotóxico de las bacterias gram-negativas y los productos correspondientes de sus rompimientos bruscos o de sus mutantes. Es decir el LPS consiste de un Lípido A, el cual es una glucosamina disacárida acetilada con ácidos grasos, y carbohidratos, esta última parte consiste de un centro oligosacárido y el O-antígeno, el cual, más frecuentemente, consiste de una repetición de unidades de oligosacárido por encima de residuos de ocho azúcares. (3, 4, 25)

### **3.4.3.1. ESTRUCTURA, ENDOTOXICIDAD, INMUNOGENECIDAD Y ANTIGENECIDAD DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS BACTERIALES (ENDOTOXINA, O-ANTÍGENOS).**

En los estudios clásicos realizados a finales del siglo XIX, Richard Pfeiffer encontró que los lisados de la bacteria "Vibrio cholerae" inducía en animales experimentales shock y muerte. Pfeiffer estableció que el principio endotóxico estaba presente dentro de la célula bacteriana y por lo tanto le llamo endotoxina.

En estudios posteriores, se demostró que las endotoxinas estaban localizadas sobre la superficie de las células bacterianas y forman junto con los fosfolípidos y proteínas la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Como estructura de superficie, las endotoxinas juegan un papel importante en la interacción de la bacteria gram-negativa con los organismos superiores. Así, el sistema de defensa del huésped reconoce a la bacteria invasora por su estructura de endotoxina y reacciona con la formación de anticuerpos antibacteriales dirigidos contra la estructura de la endotoxina. Las endotoxinas, por lo tanto, presentan antígenos de superficie inmunorreactiva y si esta propiedad es bien marcada, ellas reciben el nombre de antígenos-O.

Por el contrario, las endotoxinas liberadas de bacterias contribuyen significativamente a los síntomas de bacteremias representando así factores patogénicos importantes en infecciones gram-negativas. (23)

### **3.5. NATURALEZA QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LAS ENDOTOXINAS.**

La posición de las endotoxinas en la superficie celular permite el aislamiento suave de las mismas; varios métodos de extracción han sido descritos, entre ellos los procedimientos de fenol-agua y fenol-cloroformo-éter han tenido gran aplicación. Estos métodos combinados con pasos de purificación producen preparaciones de endotoxinas libres de ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos, y otros componentes de la célula bacteriana.



Estudios realizados en endotoxinas altamente purificadas han revelado que ellas consisten de un polisacárido y un componente lipídico llamado lípido-A, y de aquí su representación química como lipopolisacárido. Hoy en día la estructura general de muchos LPS es conocida. (4)

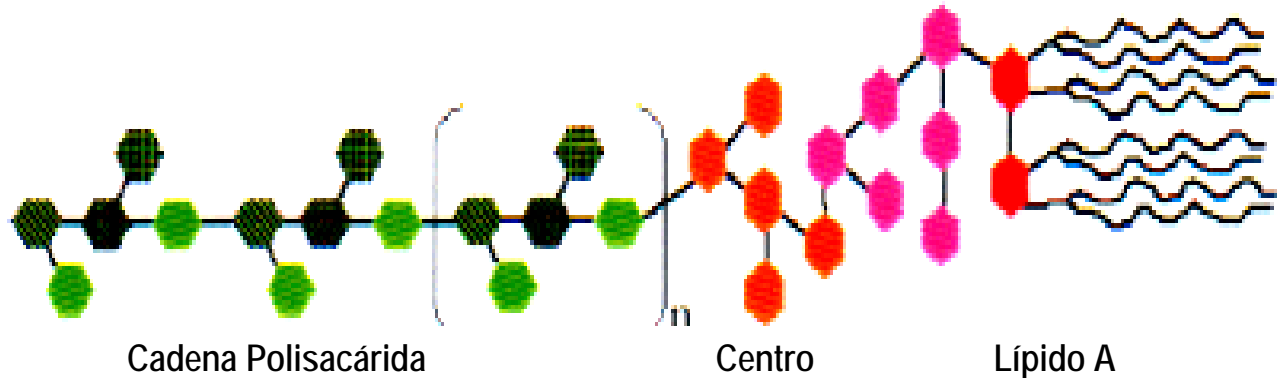


Figura # 1. Representación esquemática de un polisacárido bacteriano.

### 3.6. COMPONENTES DE UN POLISACÁRIDO.

El componente polisacárido de los LPS bacteriales consiste de dos regiones las cuales difieren en su determinación genética, biosíntesis y arquitectura. Estas regiones son: la cadena O- específica y el centro del oligosacárido. (4)

#### 3.6.1 CADENA O - ESPECÍFICA.

La cadena O-específica está constituida de unidades repetidas de oligosacáridos los cuales contienen hasta cinco residuos de azúcares que conforman las unidades repetidas dentro de diferentes bacterias gram-negativas. Estas incluyen azúcares piranosídicos y furanosídicos neutros (hexosas, pentosas, y derivados desoxi y O-metil) azúcares cargados (aminohexosas y aminopentosas, ácidos hexurónicos y ácidos hexosaminados urónicos) los cuales pueden llevar una gran variedad de sustituyentes tales como grupos aminos, acilos, fosforilos, glicerilos y acetilos.

La naturaleza, secuencia, tipo de enlaces y tipo de sustitución de los residuos monosacáridos individuales dentro de una unidad respectiva es característica única para un LPS dado y la cadena bacterial padre. Así, la cadena O-específica es especie específica debido a la diversidad de constituyentes y de sus enlaces que pueden concebir un diverso número de estructuras de cadena específica lo cual ha sido edificado en la naturaleza. Por lo tanto, una

inmensa variabilidad estructural es revelada si se compara la cadena O- específica de distintos ordenes bacteriales. (4)

### 3.6.2 CENTRO DEL OLIGOSACÁRIDO.

La región del centro consiste de un heterooligosacárido, el cual está subdividido en el lípido-A-proximal o centro interno y el lípido-A-distal o centro externo.

El centro externo contiene los azúcares encontrados frecuentemente, D-glucosa, D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que la región del centro interno está compuesta de los azúcares inusuales, heptosa, principalmente en la configuración L-glicero-D-manno y la D-glicero-D-manno y ácido 2-ceto-3-desoxioctónico también llamado ácido 3-desoxi-D-monooctulosónico (KDO). La región del centro interno exhibe una acumulación considerable de residuos cargados. La variación estructural del centro de diferentes especies bacteriales es pequeña comparada con la cadena O-específica; así por ejemplo, en la Salmonella existe un sólo tipo de centro para todos los serotipos, el cual es llamado centro Ra y en E. coli se han descrito hasta seis tipos de centro para más de cien serotipos diferentes. (4)

### 3.7. ANTÍGENOS.

Se denominan antígenos a sustancias orgánicas de origen ajeno y estructura coloidal, como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos de alto peso molecular (>8000kDa) y que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria detectable al ser introducidos en un animal. (23)

Al ser introducidos en el organismo (de forma subcutánea, intracutánea, intramolecular, intraperitoneal, intravenosa y también en la mucosa) son capaces de desencadenar reacciones inmunológicas específicas.

Los antígenos pueden estar constituidos por sustancias inofensivas (como la caseína, clara del huevo) o pueden ser componentes de agentes infecciosos (pueden ser virus, células enteras, una parte de la célula o sus productos solubles, o proteínas enzimáticas). Los antígenos pierden su poder antigénico al ser desnaturalizados, digeridos o hidrolizados en residuos de

pequeño peso molecular. Por tanto para actuar como antígenos, deben llegar a las células productoras de anticuerpos por cualquier vía, excepto por el aparato digestivo.

Los antígenos se caracterizan por dos propiedades:

- Inducen a la formación de anticuerpos (antigenicidad) o de linfocitos sensibilizados.
- Interaccionan con los anticuerpos correspondientes (especificidad antigénica) o con los linfocitos sensibilizados.

Luego de la combinación del anticuerpo con el antígeno sigue por lo general la destrucción del anticuerpo. Las uniones entre el anticuerpo y el antígeno se dan por enlaces químicos (covalentes, iónicos, puentes de hidrogeno, etc.).

Las bacterias presentan un difícil complejo de antígenos, entre los cuales se incluyen compuestos de elevado peso molecular de naturaleza proteica y polisacáridos biológicamente activos y otros compuestos químicos. La composición de los polisacáridos específicos de las bacterias forma diferentes derivados amínicos de azúcares, residuos de monosacáridos, alcoholes, etc.

De las bacterias móviles se distinguen dos tipos de antígenos:

Los antígenos H (del flagelo), los cuales son proteínas termolábiles que se destruyen a las temperaturas de 56-80°C.

Los antígenos O (somáticos), los cuales son lipoprotéicos termoestables que soportan el calentamiento hasta de 80-100°C. (4)

En la E. coli se han aislado antígenos K (capsulares) que componen la pared celular bacterial. El antígeno somático compuesto de las bacterias que están en forma S (smooth) contiene un hapteno (antígeno incompleto), polisacárido que condiciona su especificidad de especie. Dicha bacteria de la misma en forma R (rough), pierden el polisacárido específico y no poseen una marcada especificidad de especie. (23)

### 3.7.1. ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS DE ESCHERICHIA COLI.

En la E. coli existen más de 150 grupos de antígenos-O, los cuales se caracterizan por sus LPS somáticos, muchas cepas de E. coli desarrollan antígenos K adicionales (Kauffman, 1954, 1961). (8)

Los antígenos de E. coli se han dividido en tres grupos: A, B y L, esto se hizo en base al grado en el cual estos intervienen con la serología antígeno-O. (15)

### **3.8. CARBOHIDRATOS.**

Llamados también, sacáridos o glúcidos se definen sencillamente, como polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas y sus derivados. Muchos poseen la fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ , que daba a entender, en su origen, que se trataba de <<hidratos de carbono>>. La mayor parte de estos carbohidratos se acumulan como resultado de la fotosíntesis: el proceso mediante el cual las plantas convierten la energía solar en energía química.

Los carbohidratos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales representan la clase más abundante de biomoléculas orgánicas sobre la tierra. (20,2)

#### **3.8.1. CLASIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS.**

Químicamente los carbohidratos son derivados aldehídicos o cetónicos de alcoholes superiores polivalentes (con más de un grupo hidroxilo).

En las aldosas el grupo carbonilo está en la posición número uno, mientras que en las cetosas este grupo se encuentra en la posición número dos. Los carbohidratos, se pueden clasificar de acuerdo al número de unidades monoméricas que contienen en: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Los monosacáridos, también llamados azúcares sencillos, están constituidos por una sola unidad de polihidroxialdehído o polihidroxicetona. El monosacárido más abundante es la D-glucosa.

Los oligosacáridos, contienen de dos a diez unidades de monosacáridos unidas mediante enlaces glucosídicos.

Los polisacáridos contienen muchas unidades de monosacáridos enlazadas, formando cadenas lineales o ramificadas. Muchos polisacáridos contienen unidades de monosacáridos que se repiten, bien de una sola clase, o de dos clases, que se alteran. Los polisacáridos desempeñan dos funciones biológicas principales: una como almacenadores de combustible y otra como elementos estructurales. (2)

Los glicanos que están formados por una sola clase de monosacáridos son llamados homopolisacáridos, los heteropolisacáridos están formados por dos o más clases de monosacáridos.

Todos los polisacáridos tienen un sólo extremo reductor y unidades terminales no reductoras en números variables según el grado de ramificación, por ejemplo, el almidón, el glucogéno y la porción O-antigénica de los LPS. (9)

### **3.9. PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN.**

Esta técnica consiste en separar y purificar macromoléculas tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, enzimas, etc. Las moléculas son separadas de acuerdo a las diferencias de los tamaños moleculares que pasan por la columna empacada, cuyo medio es un gel que ha sido solvatado con un solvente determinado, dicho solvente es la fase móvil, la cual es bombeada por una bomba peristáltica, y todas las fracciones son recolectadas en un recolector programable. La separación por tamaño se debe a que los intersticios del gel son comparables en tamaño con los tamaños de las moléculas a separar.

Las moléculas (muestra) son adicionadas en la zona alta de la columna y son eluidas por un eluyente que se añade continuamente sobre el gel. Las moléculas dejan la columna en orden de tamaño, primero las de peso molecular más alto y luego las más pequeñas. (16)

### **3.10. LIOFILIZACIÓN.**

La liofilización es un proceso de secado por sublimación, es decir el paso de una sustancia de su estado sólido a su estado gaseoso sin pasar por su estado líquido. La sustancia es evaporada mediante la aplicación de temperatura y vacío cuando ha sido previamente congelada.

La virtud de un producto liofilizado es que al ponerse de nuevo en contacto con el líquido (sustancia sublimada), el producto recupera todas sus características físicas de aroma y sabor que poseía antes de ser liofilizado. Otra ventaja de la liofilización es que permite que el producto sea almacenado por largo período de tiempo sin deteriorarse. (13)

### 3.11. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.

Esta técnica se puede utilizar para la identificación de azúcares y otros tipos de sustancias. Es considerada útil con fines cualitativos, pero su aplicabilidad cuantitativa es dudosa. Sin embargo en la actualidad, como resultado de las mejoras introducidas, ha vuelto a surgir el interés por la misma, dando lugar a la cromatografía de capa fina de alta resolución.

La ventaja más importante de la cromatografía de capa fina se encuentra en el campo de aplicación, ya que es mucho más amplio debido a su versatilidad, pudiéndose utilizar para separar sustancias polares y no polares, orgánicas e inorgánicas, según el tipo de solvente utilizado.

En cromatografía de capa fina, la posición de los solutos se mide mediante los valores de  $R_f$  (factor de retención). Este factor se define como la relación entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por la fase móvil:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la zona del soluto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Otro factor es el denominado  $R_x$ , que se define como la relación entre la distancia recorrida por la zona del soluto y la recorrida por una sustancia utilizada como estándar. (17)

$$Rf = \frac{C}{X}$$

$$Rf = \frac{C}{D}$$

donde:

C = Soluto.

C = Soluto.

X = Patrón X.

D = Disolvente.

Rfx = Factor de retención con el patrón. Rf = Factor de retención.

En cromatografía de capa fina la elección de la fase móvil va a depender de la naturaleza de los solutos a separar y de la fase estacionaria utilizada. Una regla general a seguir es comparar la polaridad de los solutos de la mezcla con la de los posibles disolventes a utilizar. Hay que tener en cuenta que la fase móvil va a competir con los solutos por los sitios sorbentes, por tanto, los solutos polares necesitan un disolvente polar para que migren mejor (mayor será el valor del Rf obtenido). Para solutos pocos polares, se utilizan disolventes apolares como fase móvil. (17)

### 3.12. ANÁLISIS DE AZÚCAR.

El análisis de azúcares es un método estándar que permite analizar a los polisacáridos, oligosacáridos, monosacáridos y otros azúcares relacionados. Este método consiste en la hidrólisis de glicósidos y polisacáridos, posteriormente una reducción de azúcares y la inmediata conversión a acetatos de alditol los cuales son analizados por Cromatografía de Gas.

Una variedad de ácidos pueden ser usados para la hidrólisis, los más comunes son: ácido trifluoroacético, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico.

El ácido TFA es algunas veces más débil que los otros, pero es más fácil de eliminar (evaporar). (11)

### 3.13. ACETILACIÓN DE POLISACÁRIDOS.

La hidrólisis de glicosidos para reducir azúcares y la consecuente conversión a acetatos de alditol (Reducción con borohidruro y acetilación) es un método estándar para analizar polisacáridos que contengan aldosas, cetosas, deoxialdosas, acetamidohexosas y otros

azúcares relacionados. Los azúcares que no se pueden observar con este análisis son los ácidos urónicos, ácidos ulosónicos (como Kdo), 4-aminoazúcares, o especies cargadas, como azúcares fosforilados, los cuales pueden aparecer en un hidrolizado. Los ácidos no son observados porque la sal sódica de los ácidos que se forma en la adición de  $\text{NaBH}_4$  no es volátil. De especial interés es la diferencia en la proporción de hidrólisis entre los azúcares. De este modo, los ácidos urónicos están unidos a su sub representado. Las 2-Acetamidohexosas sufren una parcial N-deacetilación y los resultantes 2-amino azúcares no son hidrolizados del todo, y ambos, los 2-aminoazúcares y el azúcar al cual está enlazado, son subrepresentados. Normalmente, se obtienen rendimientos del 60-80%. Los 4-acetamidoazúcares son hidrolizados a pirroles derivados, los cuales son polimerizados y dichos azúcares por lo tanto no son observados. La metanolisis es sin embargo posible con los 4-acetamidoazúcares. (21)

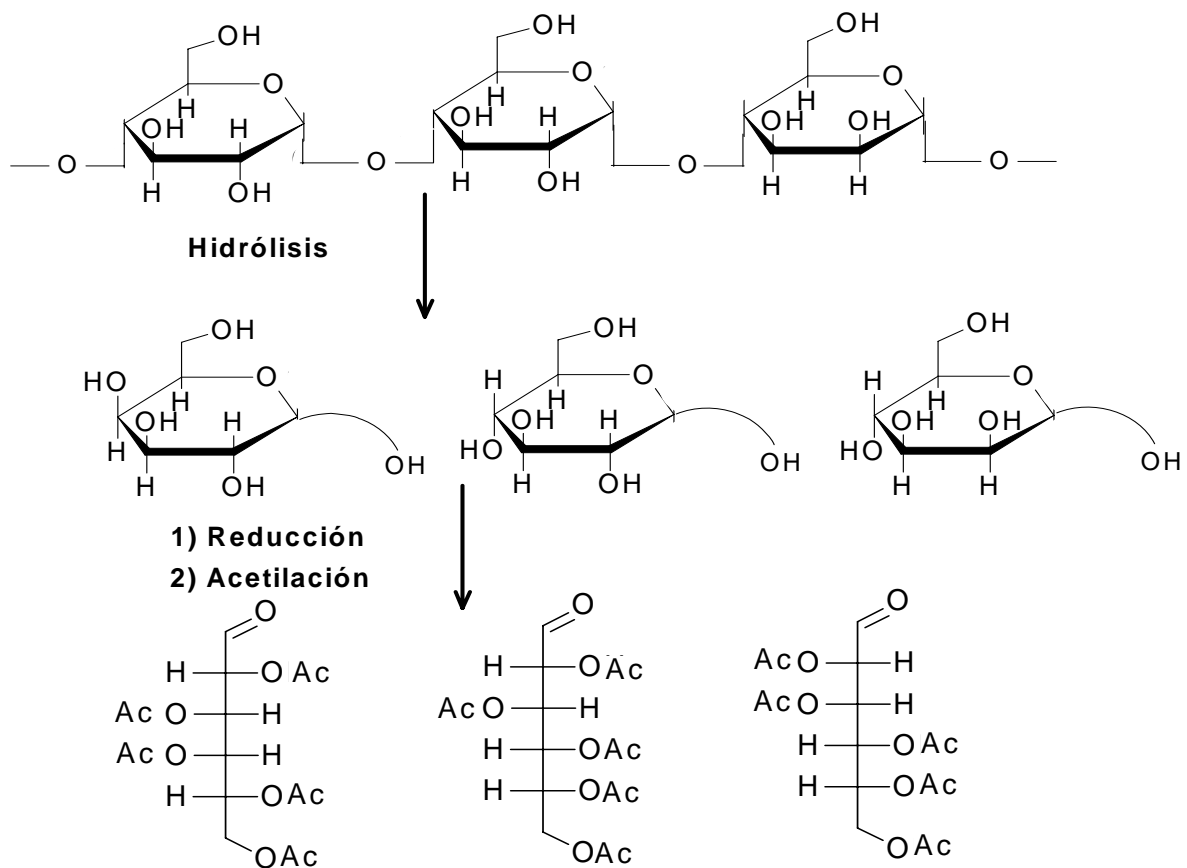


Figura # 2. Secuencia en la acetilación total de un polisacárido.



### 3.14. CROMATOGRAFÍA DE GAS.

La cromatografía de gas es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. La fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Los líquidos orgánicos de alto punto de ebullición constituyen la fase estacionaria en la cromatografía de gas-líquida. La fase estacionaria se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado soporte sólido.

La base para la separación es la partición de la muestra dentro o fuera de esta película líquida. Si se puede encontrar una fase estacionaria que tenga solubilidad selectiva para dos compuestos entonces estos dos pueden separarse mediante cromatografía de gases. Debido a la amplia gama de fases estacionarias disponibles, la GLC es la forma más selectiva de la cromatografía y la que se presta a mayor uso.

En la CGL se emplea el procedimiento de elución; la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente.

El área del pico permite determinar la concentración de cada componente separado en la columna.

La programación de la temperatura de la columna durante el análisis se utiliza para simplificar y acelerar la separación, identificación y determinación de los componentes de una mezcla. (14)

Para determinar la proporción de cada componente con respecto a otro en una mezcla, se determinan los radios relativos de estos. El Radio relativo se define como la relación entre el Área de correlación de uno de los componentes de la muestra y el Área de correlación del componente elegido como referencia, en cromatografía de gases.

$$\text{Radiorelativo} = \frac{\text{Área de correlación del componente 1}}{\text{Área de correlación del elegido como referencia}}$$

## 1. MATERIALES Y EQUIPOS.

Ultra sonido (Vidra foc).

Baño maría, Hetotherm BWO (40 °C a 110°C).

Ultra Centrífuga, Centra MP4R, (14000 rpm, -5°C a 40°C).

Liofilizador (Hetosic).

Balanza analítica, Sartorius.

Columna cromatográfica de gel filtración.

Bomba peristáltica Microperplex.

Colector de fracciones, raquetas PKT/ 12 de 20 tubos Pharmacia.

Espectrofotómetro (200-1100 nm), Shimadzu UV-1203.

Refractómetro Millipore

Vortex-2 GENIE LABORA.

Desecadores.

Bloque térmico, Baxter H-2025-1A.

Micropipetas LABSYSTEMS, 1-5 mL, 1000 µL, 50-200 µL, 1-5 µL.

Pipetas pasteur.

Viales para cromatografía.

Cromatógrafo de gas con detector de ionización de llama.

Termómetro (20 - 150°C)

Agitadores magnéticos.

pHmetro, Corning Pinnacle 530.

Volumétricos aforados de 1000 mL, 100 mL, 10 mL.

Placas Bio - rad.

Cromatofolios Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm.

Cámara de corrida.

Rociador, Merck.

Horno, W TE binder.

Jeringa SGE, 0- 50 µL.

Agujas desechables.

Gas nitrógeno.

Rotavapor con baño maría. BÜCHI 461.

## 2. SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Ácido acético glacial 100 % GR. Merck.

Acetato de sodio anhídrido. 99% para análisis. Merck.

Separes G 25. Pharmacia.

Triclorobutanol. Merck.

Fenol 99% GR, Merck.

Ácido sulfúrico concentrado. GR. 95.0 - 98.0%.

Dimetil sulfóxido de sodio (DMSO). 99% Merck.  
Butil litio. 15% en Hexano para síntesis. Merck.  
Pentóxido de fósforo. GR para análisis al 98% Merck.  
Yoduro de metilo. 99% para síntesis. Merck.  
Etanol absoluto al 99 %. Merck.  
Anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O) 98% P.A. Merck.  
Acetonitrilo. GR. 99.9 % BDH.  
Tolueno.  
Metanol 99.8% GR. Merck.  
Acido trifluoracético 98% Merck.  
Cloroformo 99.8%. EM.  
Diclorometano para cromatografía 99.8%. Merck.  
Borohidruro de sodio Merck.  
Amonio 25 % Merck.  
Piridina. 99% Merck.  
Acido acético. Merck.  
Xilosa. 99% Merck.  
Acido clorhídrico. 32% Para análisis. Merck.  
Aceite mineral. Comercial.  
Glicina 99.7 % G.R. Merck.  
Glicerol 99.9%. P.A. Fischer. A. C. S.  
Azul de bromofenol, indicador, pH 3.0 - pH 4.6. Merck.  
Formalina. 40% comercial.  
Acido cítrico. 99 % Merck.  
Hidróxido de sodio 99 % GR. Merck.  
Etanol absoluto. 99% Merck.  
Butanol 99%. Merck.  
Glucosa 99%. Merck.  
Galactosa 99%. Merck.  
Fucosa 99%. Merck.  
Ribosa 99%. Merck.  
Manosa 99%. Merck.  
Glucosamina acetilada 99%. Merck.  
Galactosamina acetilada 99%. Merck.

### 3. METODOLOGIA.

#### 6.1. HIDRÓLISIS Y PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO.

- Se pesaron 5 mg de muestra del LPS 85D5 en un tubo de ensayo con tapa de rosca. Se disolvió el LPS en 5mL de acetato de sodio pH 4.2 y se incubó a 100°C durante 4 horas. Una vez finalizada la incubación del LPS, éste se dejó enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a una temperatura de 4°C y 10,000 rpm por 20min. Se separó el sobrenadante con una pipeta pasteur, se congeló para ser liofilizado, y se obtuvo la muestra de PS seca pero impura.
- La purificación del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5 se realizó en una columna cromatográfica de P-2 (Volumen de columna empaquetado 477,594 cm<sup>3</sup>, Pharmacia). Se utilizó agua como fase móvil, se le añadió triclorobutanol al 0,05%, como agente preservativo y bactericida. El PS se disolvió en una pequeña cantidad de la fase móvil y se procedió a purificarlo.
- El equipo colector de fracciones (Pharmacia LKB-SuperFrac) se programó para que recolectará 60 fracciones, de 5mL cada una, en 8 horas.
- La velocidad de flujo se reguló con una bomba peristáltica Microperplex S 2232 a una razón de 30 mL/h. Se midió la señal a través de un refractómetro diferencial marca Agua Millipore. Se registró el número de fracciones en un registrador ABB GERZ SE 120 a una velocidad del papel registrador de 0.2 mm/min.

## 6.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.

- Se tomó 3mg del PS-85D5 purificado y se disolvió en 500µL de HCl al 3%, se colocó en un bloque de calentamiento en un período de 1 a 2½ horas a 100°C. Se aplicaron 15µL de la muestra hidrolizada en el cromatofolio a distintos tiempos de hidrólisis.

Tabla # 1) Aplicación del PS de la cepa de Escherichia coli 180 a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tiempo de hidrólisis (Hrs)	Aplicación	Muestra
1	15µL	PS 85D5
1½	15µL	PS 85D5
2	15µL	PS 85D5
2½	15µL	PS 85D5

- Para los patrones se tomó 1mg de los patrones puros (Glucosa, Galactosa, Ribosa, Xilosa, Manosa, Glucosamina y Galactosamina), y se disolvieron en 300µL de HCl al 3%.
- En el proceso de identificación de azúcares se necesitó realizar estas cromatografías utilizando diferentes solventes para seleccionar el o los más adecuado para ello. Después de varios ensayos se seleccionaron los solventes Butanol:Etanol:Agua (5:4:1) y Butanol:Etanol:Agua (5:4:1) en 1% de volumen de NH<sub>4</sub>OH y se uso como revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (1:9).

## 6.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALMENTE ACETILADOS.

### 6.3.1. Hidrólisis con Ácido Trifluoracético.

- Se transfirieron 0.2mg de muestra de PS seco y puro a un tubo screw cap. Se utilizó como estándar interno 50µg de Xilosa.
- Se hidrolizó en 0.3mL de TFA 0.5M a 100°C durante 16 hrs.

- Se evaporó a sequedad la solución con una corriente de  $N_2$ , y se agregó 0.5mL de metanol, y se evaporó a sequedad (se repitió una vez más).

### **6.3.2. Reducción con Borohidruro de Sodio.**

- Se redujo con 0,3mL de solución recién preparada de  $NaBH_4$  en amoniaco (1mg/mL), por 30min a 20 °C.
- Se detuvo la reacción con 0,5mL de 10% HOAc en MeOH, se evaporó a sequedad (Se repitió dos veces más). Se agregaron 0,5mL de MeOH y se evaporó a sequedad (se repitió dos veces más).

### **6.3.3. Acetilación con Anhídrido Acético y piridina.**

- Se acetiló con 100 $\mu$ L de  $Ac_2O$  y 100 $\mu$ L de Piridina a 100°C por 20 min.
- Se evaporó la solución y se agregó 0,5 mL de tolueno, se evaporó a sequedad (se repitió una vez más).

### **6.3.4. Purificación de los Acetatos de Alditol obtenidos.**

- Se realizó la partición, agregando 0,5mL de agua y 0,5mL de  $CHCl_3$  y se mezcló por agitación. Se esperó a que ambas fases se separaran y se removió la fase superior con una pipeta Pasteur. Se agregó 0,5mL de agua, se agitó y se separó nuevamente la fase superior. Después de remover la fase superior acuosa se agregó etanol hasta completa claridad. Se evaporó a sequedad. Se disolvió en 1 mL de  $CH_2Cl_2$  y se transfirió a un vial, se evaporó a sequedad. Se agregó 20 $\mu$ L de  $CH_2Cl_2$  para inyectarse al equipo CGL (Equipo de suecia).
- Todo este procedimiento se le realizó también a los estándares siguientes: Glc, Gal, Rib, Fuc, Xil, Rha, Ara, Man, GlcNAc, GalNAc.

#### 4. RESULTADOS.

##### 7.1. HIDRÓLISIS Y PURIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO.

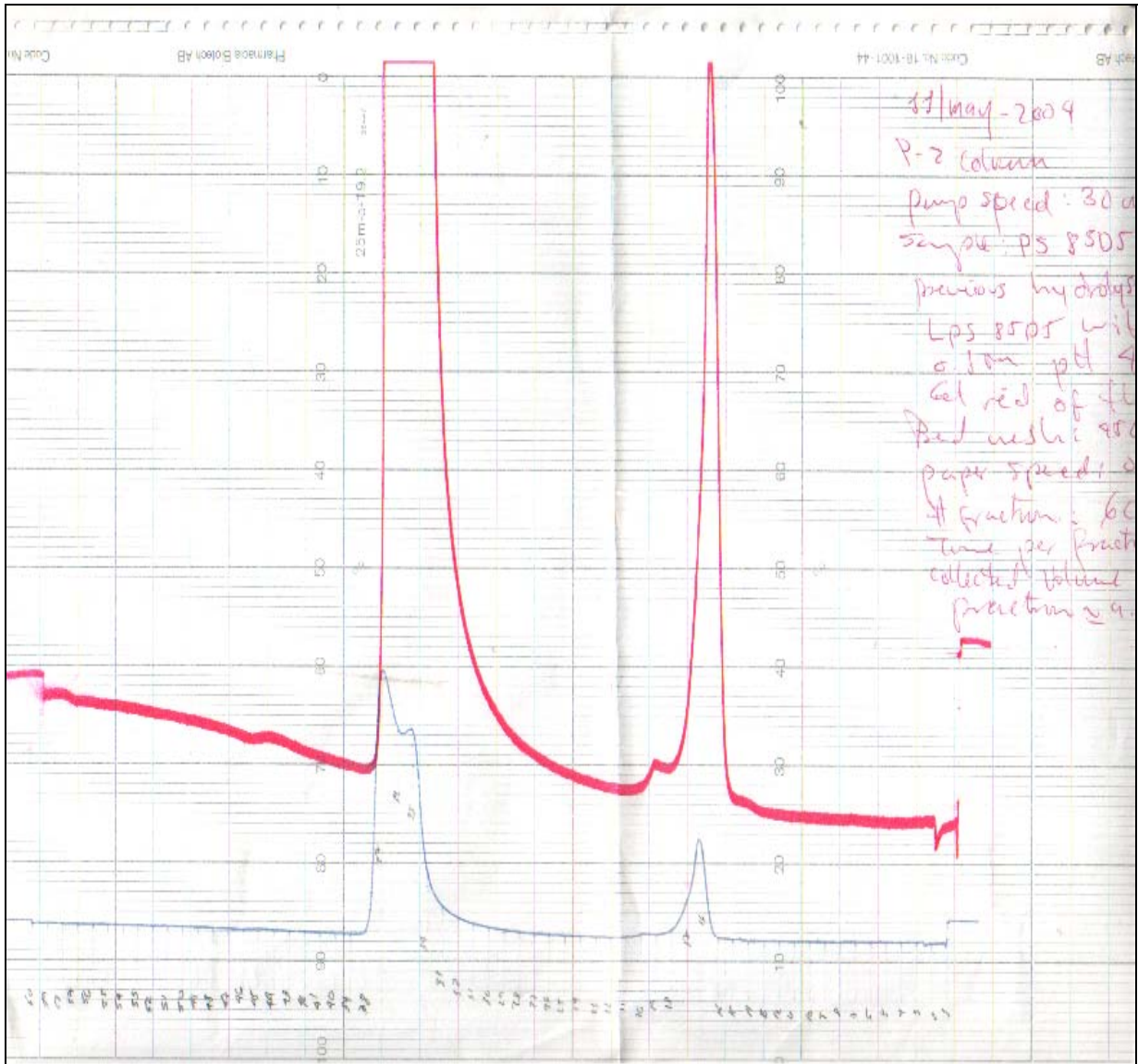


Figura # 3. Gráfico del perfil de elución del PS 85D5 hidrolizado con Acetato Sódico a pH 4.2; purificado a través de cromatografía en Gel Filtración Biogel P-2. (No. de fracciones vs. Absorbancia/medición).

## 7.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.

La selección de los patrones de los azúcares neutros para la identificación de los azúcares de la muestra por comparación de sus  $R_f$  (factor de retención) está basada en todos los estudios realizados con anterioridad sobre una gran variedad de lipopolisacáridos bacteriales.

Después de realizados los ensayos con los patrones de los diferentes carbohidratos y la muestra, se corrieron estos en Butanol:Etanol:Agua (5:4:1), obteniéndose los resultados siguientes:

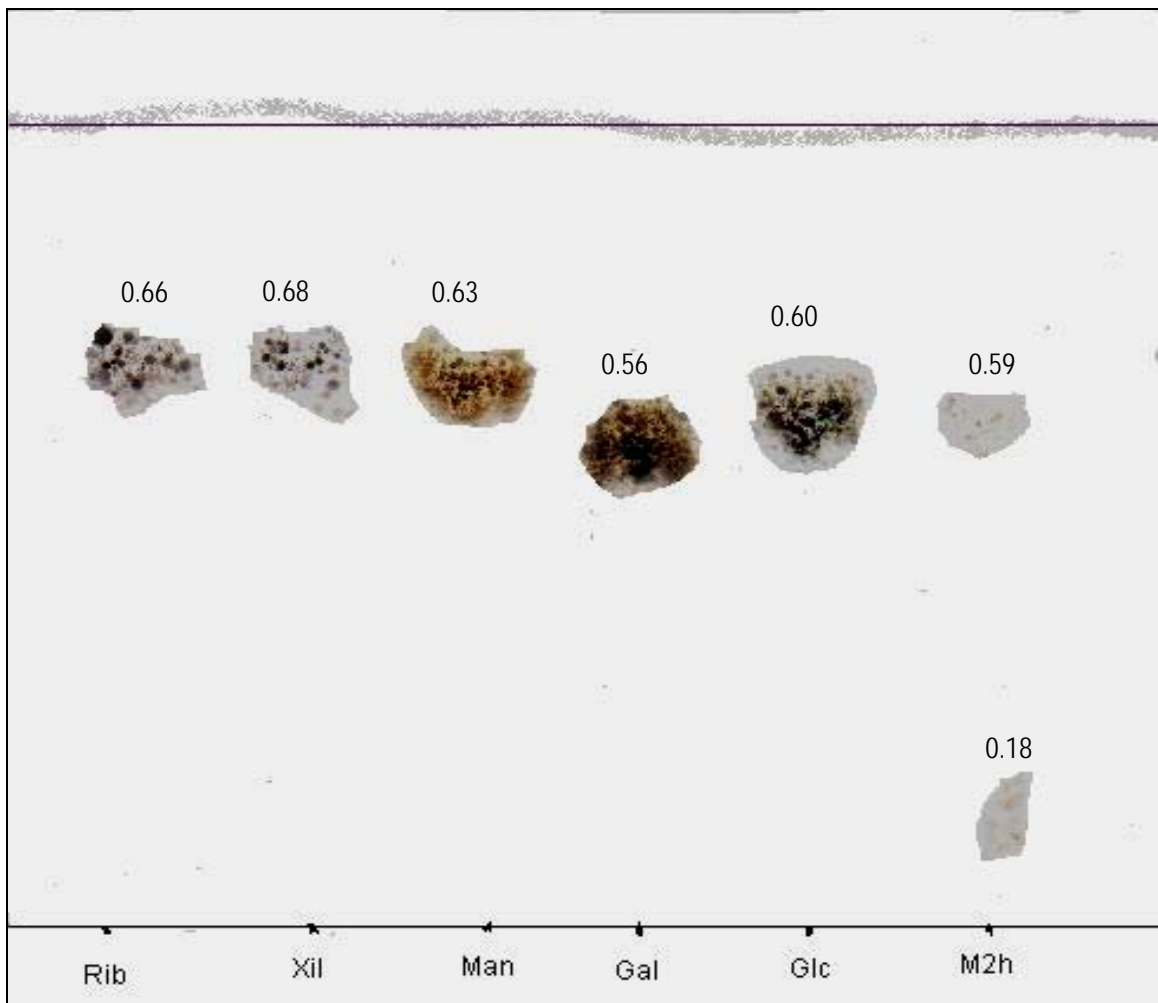


Figura # 4: Cromatoplaça # 1 del PS de la cepa de *Escherichia coli* 85D5 hidrolizado en HCl al 3% {Fase móvil Butanol:Etanol:Agua (5:4:1)}.



Para obtener una mayor información acerca de los azúcares presentes en la muestra, se corrió esta placa para lo cual se usa la mezcla anterior Butanol:Etanol:Agua y se le añadió el 1% en volumen de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . El revelador es el mismo,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%):EtOH (1:9). Se obtuvo entonces los siguientes valores:

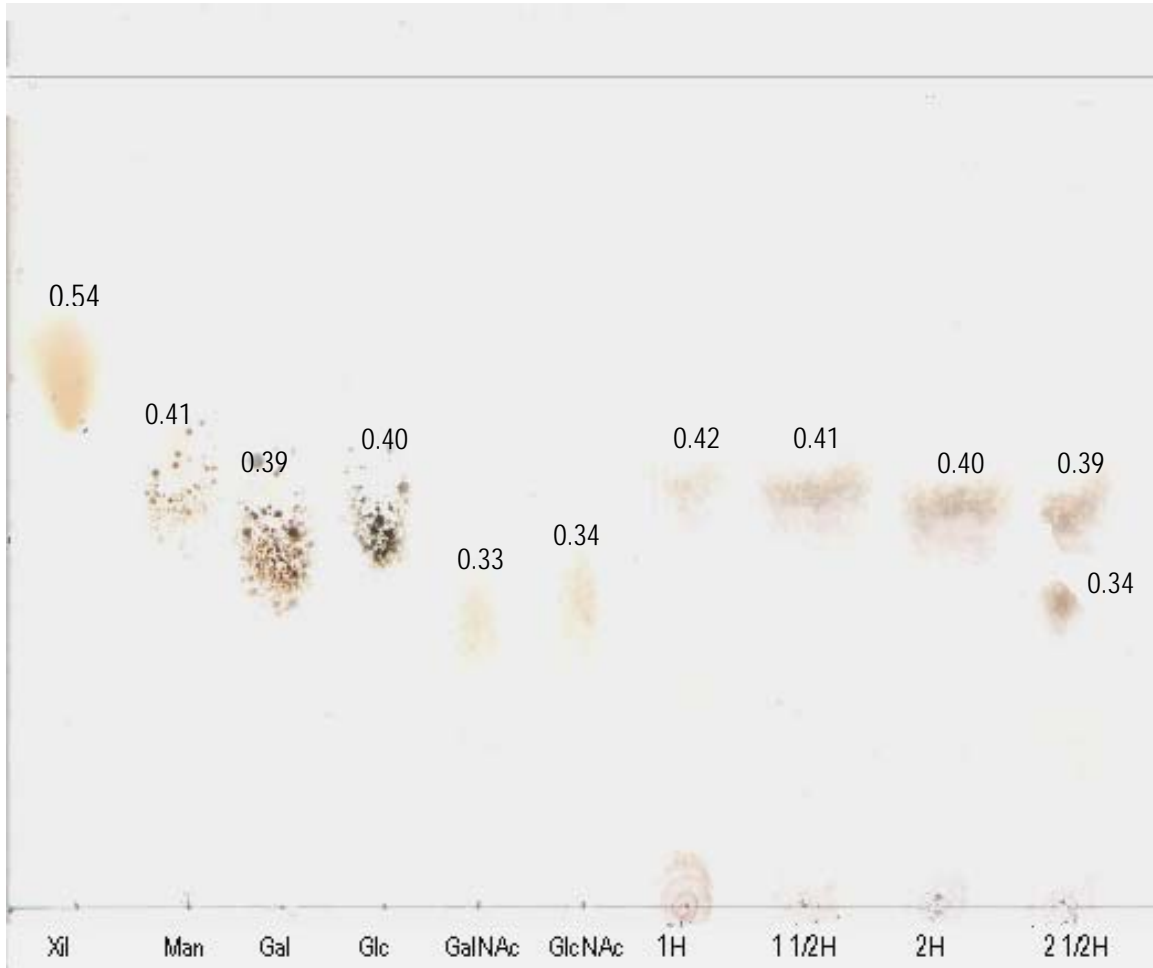


Figura # 5: Cromatoplaqa # 2 del PS de la cepa de *Escherichia coli* 85D5 hidrolizado en HCl al 3% {Fase móvil Butanol:Etanol:Agua (5:4:1) y se le añadió 1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ }.

### 7.1. ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALMENTE ACETILADOS.

Monosacárido	Tiempo de Retención (min.)
--------------	----------------------------

	Std. 1	Std. 2
Rha	9.42	-
Rib	9.49	9.46
Fuc	9.63	9.68
Ara	9.73	9.74
<b>Xil (estándar interno)</b>	10.15	10.2
Man	15.55	15.56
Glc	15.8	15.86
Gal	16	16.02
GlcNAc	-	19.88
GalNAc	-	20.54

Tabla # 2. Tiempos de retención en cromatografía de gas-líquido del estándar I y II acetilados en análisis de Azúcares.

No. Picos	Tr (min.) Muestra	Área de Correlación (muestra)	Radio relativo (muestra)	Posibles Azúcares (muestra)
1	9.486	14016667	13	Rib
2	10.202	70047437	Estándar Interno	Xil (estándar interno)
3	15.611	71622922	65	Man
4	15.838	34276835	31	Glc
5	16.013	11016590	10	Gal
6	19.844	27182339	25	GlcNAc
7	20.490	25213953	23	GalNAc
8	22.010	10039686	9	Hep

Tabla # 3. Tiempos de retención en cromatografía de gas-líquido de los azúcares acetilados del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5 en análisis de Azúcares.

Area Percent Report

Data File : d:\1\Samuel\0301003.D  
Acq On : 30 Apr 2004 14:00  
Sample : std.1  
Misc : 0,8mg

Vial: 3  
Operator:  
Inst : GC/MS  
Multiplr: 1.00  
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e  
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\SA.M (Chemstation Integrator)  
Title :

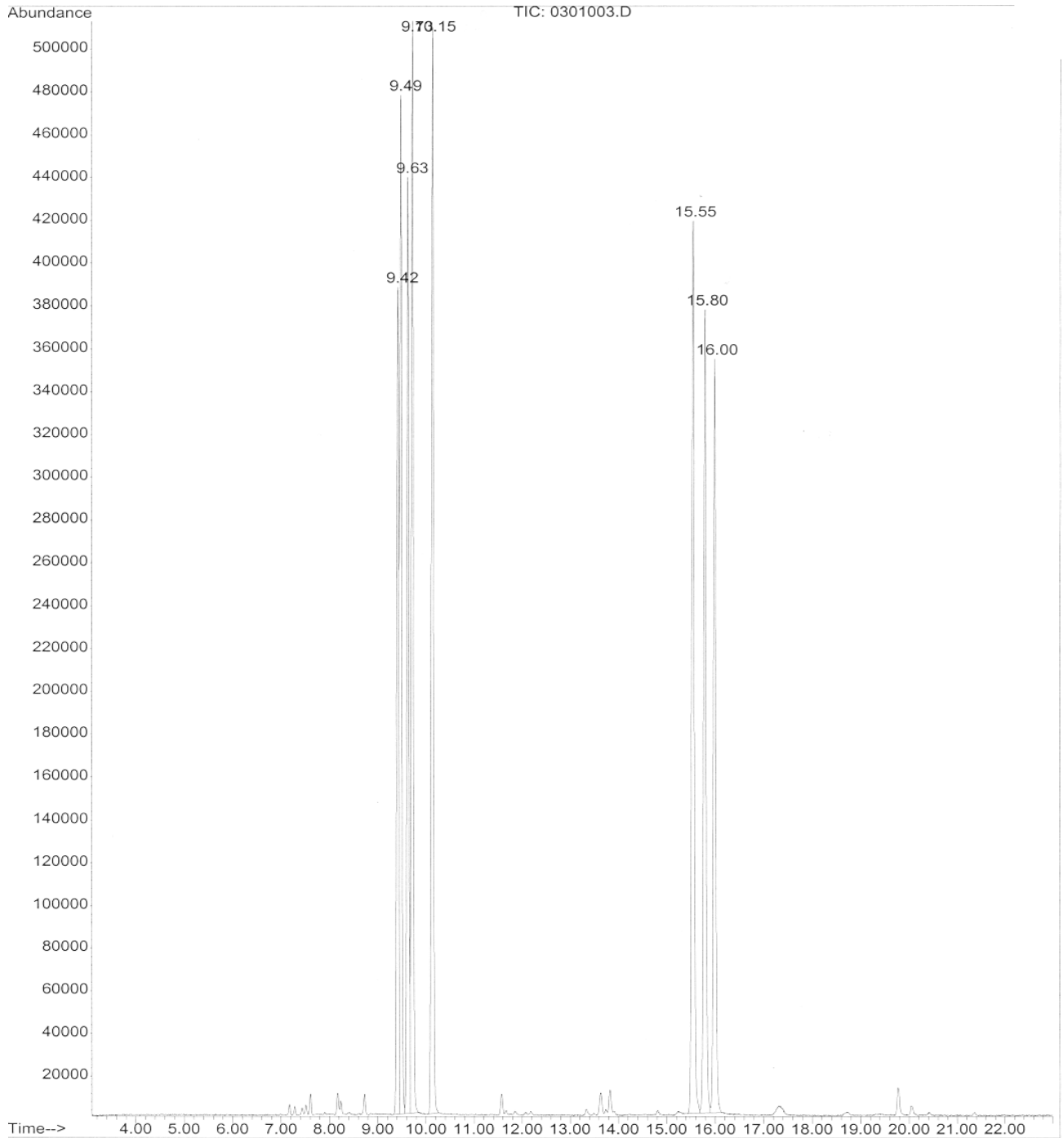


Figura # 6. Cromatograma del estándar I acetilado en análisis de azúcares.

Area Percent Report

Data File : d:\1\data\040419\0201002.D  
Acq On : 19 Apr 2004 13:35  
Sample : std.2  
Misc : 0,8mg

Vial: 2  
Operator:  
Inst : GC/MS  
Multiplr: 1.00  
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e  
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\SA.M (Chemstation Integrator)  
Title :

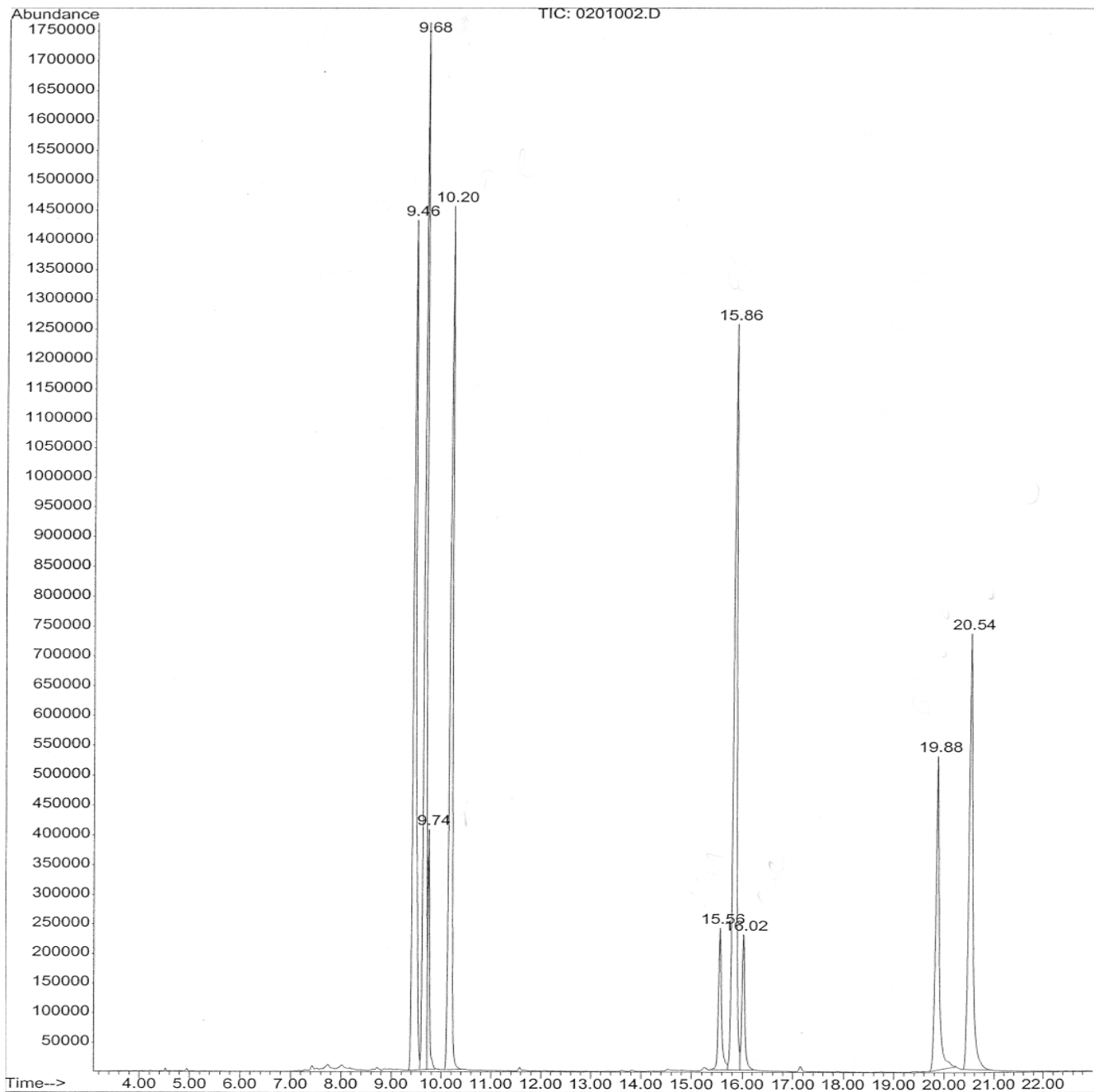


Figura # 7. Cromatograma del estándar II acetilado en análisis de azúcares.

Area Percent Report

Data File : d:\1\Samuel\0801008.D  
Acq On : 30 Apr 2004 16:07  
Sample : LPS 85D5 ph/w  
Misc : 2,8 mg 1M TFA

Vial: 8  
Operator:  
Inst : GC/MS  
Multiplr: 1.00  
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e  
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\SA.M (Chemstation Integrator)  
Title :

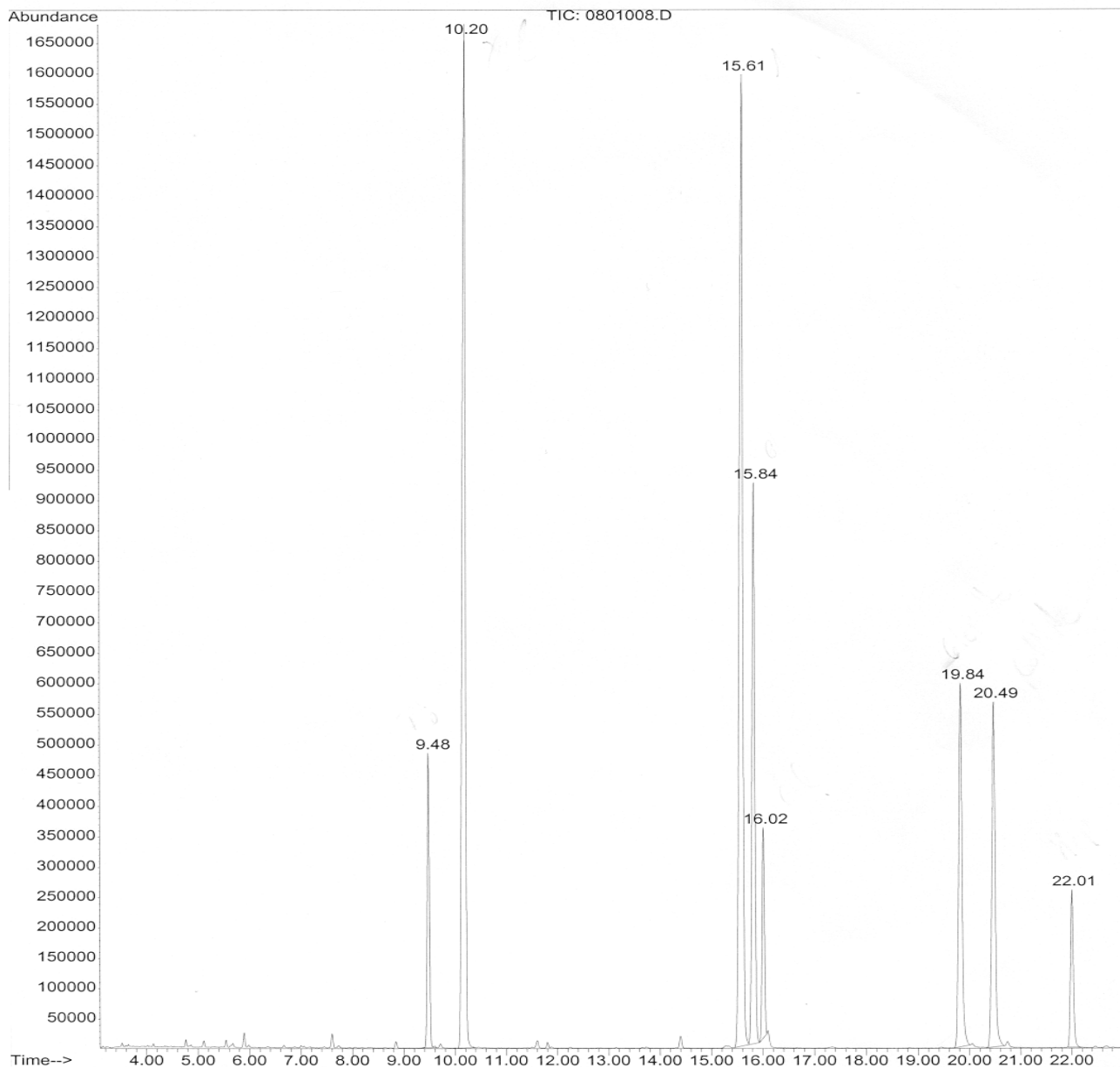


Figura # 8. Cromatograma de los azúcares acetilados de la muestra del PS 85D5 en análisis de azúcares.

## 1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 8.1. Separación del Lip-A del LPS de la cepa de Escherichia coli 85D5.

En la figura # 3, del gráfico del perfil de elución de la purificación del polisacárido 85D5, se muestran 60 fracciones colectadas, de las cuales se seleccionaron las fracciones de la 15 a la 38, en donde la mayor concentración de azúcares estaba presente, el relativo incremento de absorbancia en las fracciones de la 39 a la 60 se le atribuye al producto de sales formadas debido a la hidrólisis. Aquí cabe señalar el principio de la técnica: primero eluyen las moléculas más grandes y luego las más pequeñas.

### 8.2. Cromatografía de capa Fina del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5.

En la figura # 4 (cromatoplaqueta # 1) se muestran los resultados obtenidos al realizar el corrido de las muestras con la mezcla de solventes Butanol:Etanol:Agua (5:4:1), la cual se reveló con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%): Etanol (1:9).

El  $R_f$  de la muestra a dos horas de hidrólisis del PS-85D5, en comparación con los  $R_f$  de los patrones, nos indica la presencia de un azúcar con un  $R_f$  de 0.59. De aquí se asume la presencia de Galactosa ( $R_{fGal} = 0,56$ ) y/o de Glucosa ( $R_{fGlc} = 0,60$ ), en esta señal aún no es posible indicar si estaban los dos azúcares en una única señal o si se trataba de sólo uno de ellos, y cuál de ellos era. También la placa presentaba una señal pequeña cercana al lugar de aplicación de la muestra ( $R_f = 0.18$ ).

En la Figura # 5 (cromatoplaqueta # 2) se muestran los resultados obtenidos al realizar el recorrido de las muestras con la mezcla de solventes Butanol:Etanol:Agua (5:4:1) añadiéndosele 1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , revelándose con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%): Etanol (1:9).

En esta cromatoplaqueta, los  $R_f$  de las muestras hidrolizadas del PS-85D5, en comparación con los  $R_f$  de los patrones, nos indican la presencia de un azúcar con un  $R_f$  de 0.42 a 1 hora, que al ser comparado con los  $R_f$  de los estándares, no se puede distinguir entre la presencia de Manosa ( $R_f = 0.41$ ), y/o Glucosa ( $R_f = 0.40$ ), por la proximidad de  $R_f$  de los mismos. Lo mismo sucede para el caso de la muestra a 1½ horas de hidrólisis. Con respecto a la muestra de 2 horas de

hidrólisis, existe una mancha con un Rf de 0.40, lo cual nos indica la presencia de Glucosa (Rf = 0.40), y/o Galactosa (Rf = 0.39). En la muestra a 2½ horas de hidrólisis, se detecta la presencia de dos azúcares con un Rf de 0.39 y un Rf de 0.34. Se ratifica la presencia de Galactosa (Rf = 0,39) y/o Glucosa (Rf = 0.40) con respecto a la mancha con Rf = 0.39. Mientras que la mancha con Rf de 0.34 nos indica la presencia de Galactosamina (Rf = 0,33) y/o de Glucosamina (Rf = 0,34), en esta señal aún no es posible indicar si estaban los dos azúcares en una única señal o si se trataba de sólo uno de ellos, y cuál de ellos era.

### 8.3. Análisis de azúcares Totalmente Acetilados del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5.

Los azúcares Totalmente Acetilados, del PS de la cepa de Escherichia coli 85D5, fueron separados en una columna de silica fundida HP-5 (0.20mm x 25m; Hewlett-Packard), usando un programa de temperatura de 170°C (1min) seguido por aumento de temperatura de 1 °C/min. hasta 180 °C (1min) y 4 °C/min. hasta 250°C. Se usó Hidrógeno como gas de arrastre. La columna fue fijada a un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard (modelo 5890 serie II equipado con un detector de llama FID).

Del cromatograma de los azúcares acetilados de la muestra del PS 85D5 (ver figura # 8), se puede notar la presencia de 8 picos en éste, con Tr de Pico<sub>1</sub> 9.486, Pico<sub>2</sub> 10.202, Pico<sub>3</sub> 15.611, Pico<sub>4</sub> 15.838, Pico<sub>5</sub> 16.013, Pico<sub>6</sub> 19.844, Pico<sub>7</sub> 20.490, Pico<sub>8</sub> 22.010, comparándolos con los Tr de el estándar I (Std I) (ver Figura # 6), podemos asumir presencia de Ribosa (Tr<sub>Rib</sub> = 9.49) con respecto al pico # 1. El pico # 2 corresponde al estándar interno de Xilosa (Tr<sub>Xil</sub> = 10.15). En el pico # 3 presencia de Manosa (Tr<sub>Man</sub> = 15.55). En el pico # 4 Glucosa (Tr = 15.8). En el pico # 5 Galactosa (Tr<sub>Gal</sub> = 16).

Los otros dos picos que aparecen en el cromatograma de la muestra del PS 85D5 (ver figura # 8), nos indican debido a los altos valores de los tiempos de retención la presencia de al menos dos aminoazúcares, por lo cual se presenta el segundo cromatograma de estándar II (STD II) (ver Figura # 7). Cabe señalar que tanto el STD I y el STD II son mezclas de azúcares de referencia. Realizándose el STD II, sólo con la finalidad de determinar la presencia de aminoazúcares en la muestra. Con el empleo del STD II se determina la presencia GluNAc (Tr<sub>GluNAc</sub> = 19.88) con respecto al pico # 6 y GalNAc (Tr<sub>GalNAc</sub> = 20.54) con respecto al pico # 7.

El último pico presente en el cromatograma de la muestra (ver figura # 8), pico # 8, nos hace asumir la presencia de Heptosa ( $Tr_{Hep} = 22.01$ ).

El PS de la cepa de E. coli 85D5 hidrolizado contiene: Ribosa, Manosa, Glucosa, Galactosa, Glucosamina, Galactosamina y heptosa; en un radio 13:65:31:10:25:23:9, en relación a la Galactosa (Gal =10).



## 2. CONCLUSIONES.

1. Se logró separar el Líp-A del LPS de la cepa de Escherichia coli 85D5.
2. Se purificó el PS-85D5 resultante por CGF.
3. El polisacárido de la cepa de Escherichia coli 85D5 es un Heptasacárido, compuesto por dos aminoazúcares, cuatro azúcares neutros y una heptosa. Los cuatro azúcares neutros son Rib, Man, Glc y Gal, y los aminoazúcares son GluNAc y GalNAc.
4. El radio relativo de los monosacáridos presentes en el PS de la cepa de E. coli 85D5 es:  
**Rib: Man: Glc: Gal: GlcNAc: GalNAc: Hep (13:65:31:10:25:23:9)**

### 3. RECOMENDACIONES.

1. Confirmar la presencia de los monosacáridos presentes por análisis de metilación de azúcares, a través de Cromatografía Gas-Líquido y espectrometría de masas.
2. Determinar la posición de los enlaces y tipo de anillo (furanosa o piranosa) de los monosacáridos presentes a través de Cromatografía Gas-Líquido y espectrometría de masas.
3. Determinar la configuración absoluta de los Azúcares por Cromatografía Gas-Líquido.
4. Tipificar la cepa de E. coli 85D5 a través del método electrofóretico SDS-PAGE.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA.

1. Carmona Grillo Leonardo José. Estudio de la composición de azúcares presentes en el lipopolisacárido de la cepa de escherichia coli 108 IV. Tesis Monográfica, Noviembre de 2002.
2. Albert L. Lehninger. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. University School of Medicine. Primera reimpresión 1981. Editorial pueblo y educación, Habana, Cuba.
3. Alexandra Kjellberg. Structural studies of two Bacterial Polysaccharides Using NMR spectroscopy and specific Chemical degradation methods. Department of Organic Chemistry, Stockholm University 1996. Licenciated thesis.
4. Alemán Israel, Estudios Estructurales del Lipopolisacárido de la cepa K-235, Tesis Monográfica. Abril 1994.
5. Bengt Lindberg and Jörgen Lönngrén. A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. Department of Chemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm, Stockholm Sweden.
6. Blakeney Anthony B. and Bruce A. Stone. Methylation of Carbohydrates with Methyl Sulphinyl Carbanion. Department of Biochemistry. La Trobe University, Bundoora, Victoria. Australia.
7. Bucardo Rivera Filemón. Aplicación de la electroforesis en la tipificación de ARN viral, Lipopolisacáridos y Proteínas, UNAN-León. Tesis Monográfica. Agosto 1998 León, Nicaragua.
8. Clinton E. Ballow. Studies on the structure of Lipolysaccharide from Mycobacterium species, Accouts of Chemicals, Vol 1, December 1968.

9. de Lederkremer Rosa M. y Valera Oscar: Hidratos de Carbono. Departamento de química Orgánica. OEA. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Washington, D.C- 1998.
10. García - Segura, Juan Manuel. Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica.
11. Geert-Jan Boons, Carbohydrate Chemistry, University of Birmingham UK.
12. G. Widmalm. Physical Methods in Carbohydrate Research.
13. Håkan Björndal, Carl Gustaf Hellerquist, Rengt Lindbert and Siegfried Skensson. Gas Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polisaccharides. Angew, Chem. Internat. Editorial/Vol 9.
14. Harld M. Mcnair, Cromatografía de Gases. OEA, Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, Washington, D.C-1981.
15. I. Sutherland: Surface Carbohidrates. The Procariotic Cell, 1977.
16. Kremmer, Tibor. Gel Chromatography, 3rd edition 1979.
17. Maestría en Química Analítica. Técnicas Cromatográficas y electroforéticas. León, Nicaragua. 1998.
18. Morrison, Robert Thornton. Química Orgánica, Segunda Edición, México; Fondo educativo Interamericano, 1985.
19. Nataro James P. and Kaper James B. Diarreheagenic Escherichia Coli. Clinical Microbiology Reviews. January 1998, Vol 11, No 1. PP 143.
20. Padilla Dávila Flor de María y Alvarado Delgadillo Claudia Elena. Estudios estructurales del Lipopolisacárido de la Cepa de Escherichia Coli 105. Tesis Monográfica, UNAN-León. Diciembre del 1999 León, Nicaragua.

21. Per Erik Jansson, Göran Widmalm and Andrej Weintraub. Standard Operating Procedures for Carbohydrates Chemistry, 1998.
22. Per Erik, Lennart Kenne, Helena Liedgren. A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. Department of Chemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm, S-104 05 Stockholm Sweden.
23. Rodríguez Carlos. Estudios estructurales del Lipopolisacárido de la cepa K-235. Tesis Monográfica, Septiembre de 1996.
24. Willard. Análisis Instrumental. Segunda Edición, 1988.
25. Yu. A. Knirel and N. K. Kochetkou. The structure of Gram-Negative. I. General Characterization of the Lipopolysaccharides and the structure of Lipid A. N. D. Zelinskii Institute of Organic Chemistry. Russian Academy of Sciences, Moscow. Translated From BioKhimiya, Vol 58, N° .2. February, 1993.
26. E. A. Larson, Felipe Urbina, Zhennai Yang, Andrej Weintraub and Göran Widmalm. Structural and immunochemical relationship between the O-antigenic polysaccharides from the enteroaggregative Escherichia coli strain 396/C-1 and Escherichia coli O126.

**ANEXOS**

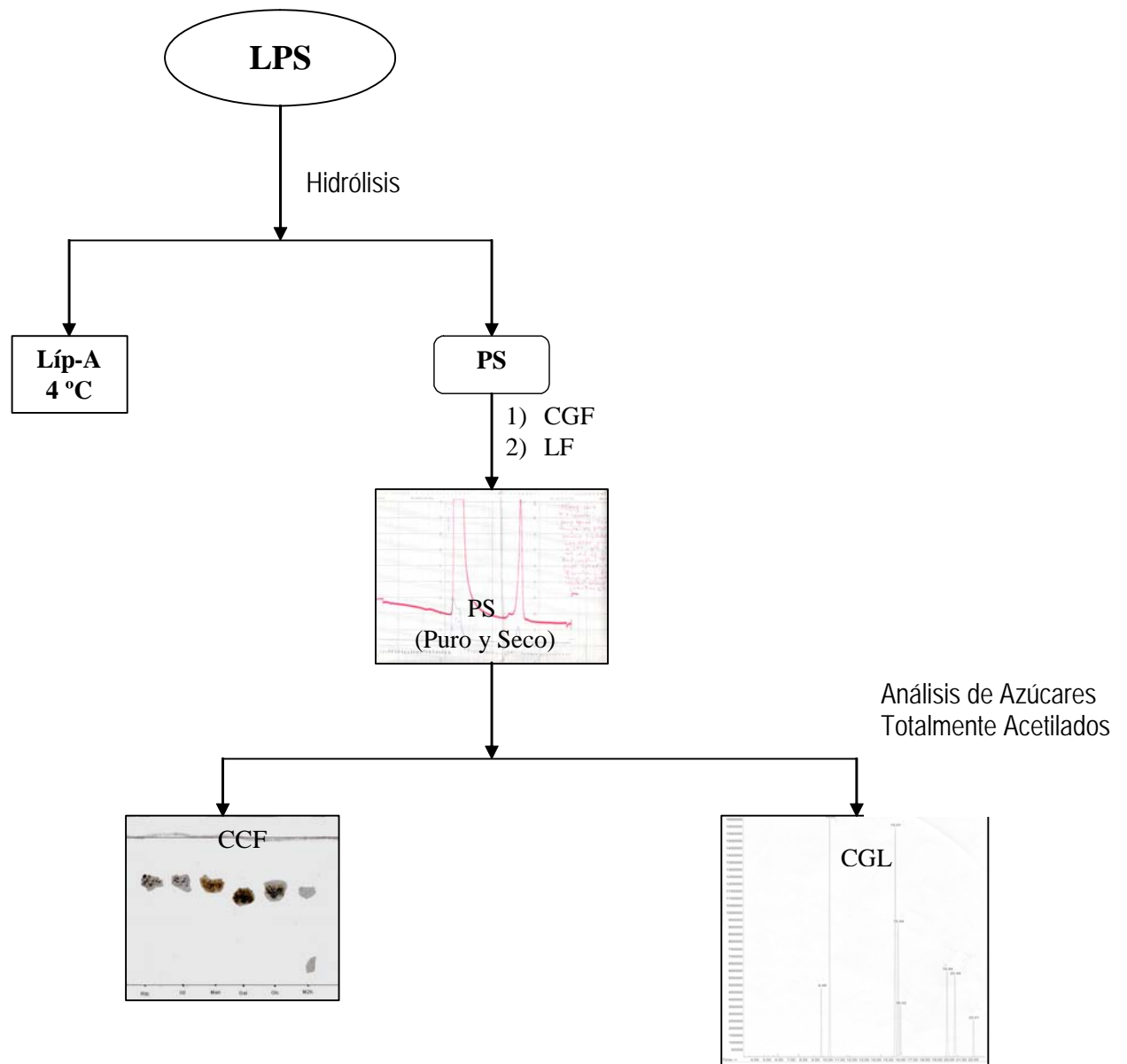


Figura # 9. Flujograma del análisis de Polisacáridos.