

Metodología de extracción de metabolitos desde agar para análisis por LC-MS

Fecha: 4/10/2025

Elaborado por: Wilson David Blanco Mariño

Objetivo

Establecer un procedimiento estandarizado para la extracción de metabolitos a partir agar de colonias microbianas (fúngicas o bacterianas), para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas.

Alcance

Este procedimiento aplica a muestras fúngicas o bacterianas cultivadas en medios sólidos, y se realizará en el laboratorio de “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” con el fin de obtener extractos para análisis metabolómico.

Materiales y Equipos

- Puntas de micropipeta de 1000 µL estériles (se usará la parte de atrás para tomar los plugs).
- Tubos Eppendorf de 2 ml estériles.
- Isopropanol grado HPLC o destilado.
- Acetato de etilo grado HPLC o destilado.
- Ácido fórmico grado HPLC.
- Metanol grado masas.
- Baño de Ultrasonido.
- Centrífuga (mínimo 10000 RPM).
- Centrivap.
- Viales para cromatografía e insertos reductores de volumen de 0.2 mL.
- Micropipetas y puntas estériles.

Procedimiento (ver figura 1)

1. Cortar tres Plugs de agar (aproximadamente 5-6 mm de diámetro) de la colonia utilizando la parte de atrás de una punta de micropipeta de 1000 µL estéril.
2. Transferir los plugs a un tubo Eppendorf de 2 ml estéril.
3. Añadir 1 ml de una mezcla de isopropanol:acetato de etilo (1:3 v/v) al 1 % de ácido fórmico.
4. Sonicar durante 60 minutos.

5. Transferir el extracto a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml.
6. Evaporar el solvente en centrivap a 40 °C por 2 horas o hasta secar.
7. Disolver el residuo seco en 0.3 ml de metanol grado masas.
8. Sonicar durante 10 minutos para favorecer la disolución.
9. Centrifugar a mínimo 10000 RPM durante 15- 30 minutos.
10. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a los viales de cromatografía.
11. Conservar los viales a temperatura adecuada hasta el análisis (-4°C si el análisis se realiza pronto o -20 °C si el análisis tarda más de un mes).

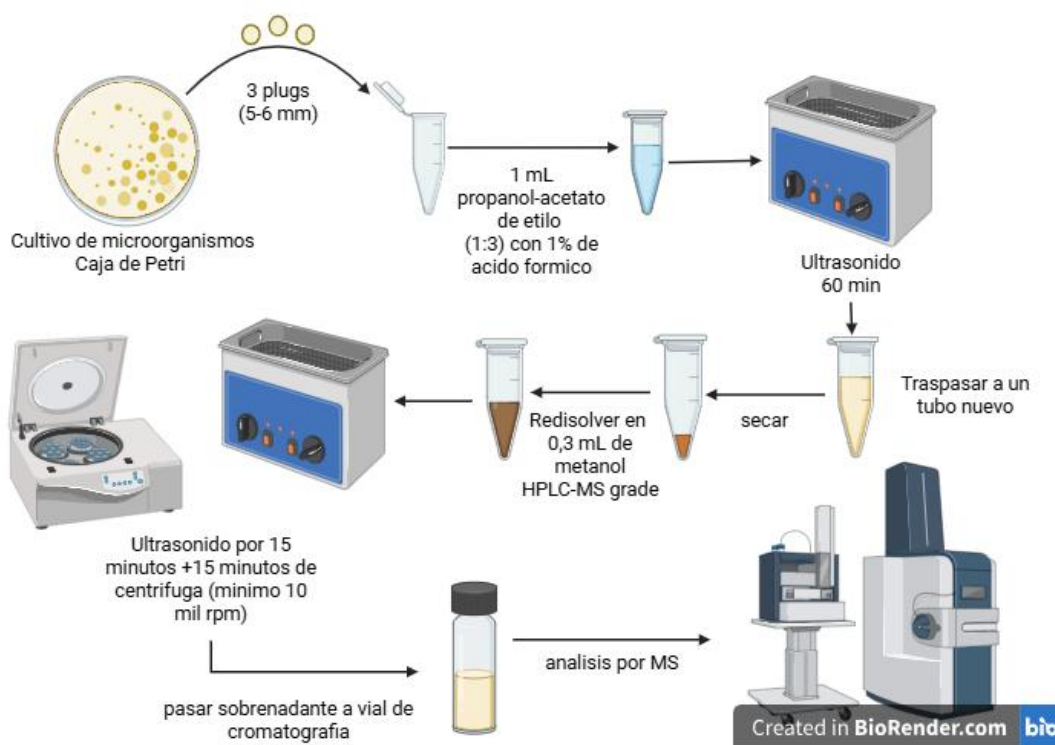


Figura 1. Metodología de extracción de metabolitos desde agar para análisis por UHPLC-MS realizado en BioRender.com

Referencias

- Protocolo adaptado de:

Clemmensen, S. E., Kromphardt, K. J. K., & Frandsen, R. J. N. (2022). Marker-free CRISPR-Cas9 based genetic engineering of the phytopathogenic fungus, *Penicillium expansum*. *Fungal Genetics and Biology*, 160, 103689. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2022.103689>