



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SECCIÓN BIOTECNOLOGÍA
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA



**FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVIDAD DEL GRUPO HEMO Y DE LAS
PORFIRINAS DE *Lupinus s.l meridanus* MORITZ**

- ✓ **AUTORA:** Duque, Rocio
C.I:20.077.343
- ✓ **TUTOR:** Andrades, Efrén

Mérida, Noviembre 2015



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
SECCIÓN BIOTECNOLOGÍA
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA



**FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVIDAD DEL GRUPO HEMO Y DE LAS
PORFIRINAS DE *Lupinus s.l meridanus* MORITZ**

Trabajo de Grado, presentado como requisito obligatorio para optar al título de
Licenciada en Bioanálisis.

✓ **AUTORA:** Duque, Rocio
C.I:20.077.343

Correo: rocioklevak91@gmail.com

✓ **TUTOR:** Andrades, Efrén

Mérida, Noviembre 2015

DEDICATORIA

A Dios.

Por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr este gran objetivo, en mi carrera y en mi vida.

A La Universidad de Los Andes.

Casa de estudio que me permitió ingresar en su alma mater, para guiar mi formación inicial y permanente. Vaya a ella y sus autoridades mi gratitud.

A mi madre Lucia Duque

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, motivación y amor constante que me ha permitido ser la persona que soy hoy en día.

A mi padre Jesús Duque

Por estar siempre pendiente de mi y apoyándome en todo este trayecto.

A Eleazar Moreno.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, inculcando siempre en mi vida los buenos valores y las ganas de salir adelante, determinando que nada es imposible.

A mis familiares.

Por apoyarme cuando lo necesité, y que siempre estuvieron allí ante cualquier situación.

A mis compañeros.

Los verdaderos amigos se conocen tal como son, se comprenden donde estén, te acompañan en tus logros y tus fracasos, celebran tus alegrías, comparten tu dolor y jamás te juzga por tus errores.

A todos aquellos los que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Dedicada a todos ustedes!

AGRADECIMIENTOS

*Sentimientos de gratitud hacia muchas personas, que hicieron posible este logro. Producto del compromiso constante, **Quiero expresar formalmente mi agradecimiento.***

Principalmente a Dios por darme las fuerzas para seguir adelante, cuando estuve en los momentos más críticos de mi carrera y hacerme ver que siempre hay solución ante cada problema no importa el tamaño que sea.

A mi mamá y a Eleazar, por darme el apoyo económico e ideológico; para esta gran etapa de mi vida, de verdad que sin ustedes esto no sería posible.

A mis profesores que nos enseñaron e instruyeron lo mejor posible para ser excelentes tanto en el ámbito profesional, como en el personal y humano.

A mis amigos, con el cual compartí gran parte de mi vida universitaria, como olvidarlos en tan bonitas experiencias, las alegres, tristes, estresantes y demás, gracias por estar siempre ahí dándome animo.

Al MSc Manuel Jiménez por su apoyo en la realización de la parte experimental en esta tesis.

A Andreina Rivera y Jennifer Flores, gracias por ceder a este trabajo parte de sus resultados.

Muy particularmente agradezco a mi tutor y cotutora Prof. Efrén Andrades y Cristina Grassi, por guiarme en el asesoramiento y realización, ambos fueron gran apoyo en los momentos difíciles, porque nunca escatimaron esfuerzos y tiempo para corregir y mejorar este trabajo, por sus valiosos conocimientos siempre al servicio de los tesisistas, por ser firmes en los momentos que se requería. Pero sobre todo porque me demostraron en el trayecto de esta tarea, que son unos grandes profesores y ante todo excelentes seres humanos.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarnos toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño está tesis es en agradecimiento a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Objetivos de la investigación.....	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivo Específico.....	4
1.3 Justificación de la investigación.....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 Trabajos previos realizados por el tutor en la sección de biotecnología del IFFB.....	6
2.2 Trabajos previos realizados en el exterior.....	17
2.3 Antecedentes Históricos.....	18
2.4 Bases Teóricas.....	23
2.4.1 Fotosensibilidad.....	23
2.4.1.1 Fotofosforilación.....	23
2.4.1.2 Fluorescencia y Fosforescencia.....	26
2.4.2 Terapia Fotodinámica.....	26
2.4.2.1 Fotosensibilizantes utilizados en la terapia fotodinámica.....	27
2.4.2.2 Cáncer Basocelular.....	28
2.4.2.3 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica en el cáncer Basocelular.....	29
2.4.2.4 Espectro electromagnético y las fuentes de luz.....	30
2.4.2.5 Luz ultravioleta.....	31
2.4.2.6 Radiación fotosintéticamente activa (PAR, photosynthetically active radiation).....	32
2.4.3 El grupo Hemo.....	32
2.4.3.1 Estructura del Hemo.....	33

2.4.4 Porfirinas.....	34
2.4.4.1 Propiedades espectrales de las porfirinas.....	35
2.4.4.2 Síntesis de las porfirinas y el grupo hemo.....	35
2.4.5 ¿De dónde viene la leghemoglobina?.....	36
2.4.5.1 Familia Fabaceae.....	36
2.4.5.2 Clave artificial para el reconocimiento de las subfamilias.....	38
2.4.5.2.1 Mimosoideae.....	38
2.4.5.2.1.1 Características de la subfamilia Mimosoideae.....	38
2.4.5.2.2 Caelsapiniaceae.....	39
2.4.5.2.2.1 Características de la subfamilia Caelsapiniaceae.....	39
2.4.5.2.3 Características de la subfamilia Papilonoideae.....	40
2.4.5.3 <i>Lupinus Meridanus</i>	40
2.4.5.4 Partes de <i>Lupinus meridanus</i>	42
2.4.5.4.1 Hoja.....	42
2.4.5.4.2 Pimpollo.....	42
2.4.5.4.3 Nódulo.....	43
2.4.5.5 Rizobios.....	44
2.4.5.5.1 Interacción Rizobios- Leguminosa.....	44
2.4.5.6 Fijación de Nitrógeno.....	45
2.4.5.6.1 Fijación simbiótica de Nitrógeno.....	48
2.4.5.6.2 Formación de nódulos de leguminosa.....	49
2.4.5.7 Leghemoglobina.....	51
2.4.5.7.1 Hemoglobinas simbióticas.....	51
2.4.5.7.2 Hemoglobinas no simbióticas.....	52
2.4.6 Cromatografía.....	53
2.4.7 Espectrofotometría.....	54
2.4.8 Los extractos.....	55
2.5 Sistema de Hipótesis.....	56

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de la investigación	57
---------------------------------------	----

3.2 Tipo y Diseño de la Investigación	58
3.3 Población y Muestra.....	59
3.4 Materiales y Métodos.....	59
3.4.1 Materiales No biológicos.....	59
3.4.2 Materiales Biológicos.....	60
3.4.3 Métodos.....	60
3.4.3.1 Estrategia para la recolección de la muestra	60
3.4.3.2 Metodología para la obtención de los extractos.....	62
3.5 Experimentos realizados.....	63
3.5.1 Cromatografía en capa fina.....	63
3.5.2 Espectrofotometría.....	65
3.5.3 Electroforesis.....	66
3.5.4 Actividad Biológica y Fotoprotección.....	68
3.5.4.1 Preparación de los extractos.....	69
3.5.4.2 Procedimiento.....	69
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Resultados en la recolección.....	74
4.2 Extracción de las muestras.....	74
4.3 Resultados en la cromatografía de capa fina.....	75
4.4 Resultados de la fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría.....	83
4.4.1 Espectrofotometría de la Hoja.....	83
4.4.2 Espectrofotometría del Pimpollo.....	86
4.4.3 Espectrofotometría del Nódulo.....	93
4.4.4 Espectrofotometría de la Hoja en luz visible.....	98
4.4.5 Espectrofotometría del Pimpollo en luz visible.....	100
4.4.6 Espectrofotometría del Nódulo en luz visible.....	102
4.4.7 Espectrofotometría de la Flor Morada en luz visible.....	104
4.4.8 Espectrofotometría de la Flor Blanca en luz visible.....	106
4.5 Resultados en Electroforesis PAGE-SDS.....	107
4.6 Determinación de la fotoprotección UV y fototoxicidad de los extractos etanólicos secados y resuspendidos en agua.....	112

CONCLUSIONES	119
RECOMENDACIONES	121
REFERENCIAS	122
ANEXOS	127

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Leghemoglobina de 4 proteínas.....	10
Figura 2. Fracción microsomal menos purificada.....	10
Figura 3. Fracción subcelular de un gradiente autogenerado de la fracción microsomal del hígado de rata comparado con el homólogo de la célula nodular.....	10
Figura 4. Perfil de elución de las inmunoglobulinas del suero.....	10
Figura 5. Inmunoglobulinas Purificadas correspondientes a la clase de IgG....	10
Figura 6. Reacción de la IgG del pico 1 con los ribosomas que están sintetizando la globina en la célula nodular.....	10
Figura 7. Perfil de elución de los componentes de la ferrileghemoglobina de <i>Lupinus meridanus</i> sobre una columna de DEAE-C.....	12
Figura 8. Curva de calibración leghemoglobina peso molecular versus volumen de elución de las distintas sustancias usadas, como patrones.....	12
Figura 9. Espectro de piridin homocromogeno reducido de los distintos componentes de la leghemoglobina.....	12
Figura 10. Curva de calibración pendiente versus peso molecular.....	12
Figura 11. Espectro RPE de la leghemoglobina.....	14
Figura 12. Espectro RPE de la mioglobina.....	14
Figura 13. Cristal Hexagonal de la leghemoglobina.....	14
Figura 14. Patrón de difracción de electrones.....	14
Figura 15. Patrón de difracción de rayos X.....	14
Figura 16. <i>Lupinus meridanus</i>	16
Figura 17. Incremento del valor de las leghemoglobinas extraídas de los nódulos en relación al peso.....	16
Figura 18. Incremento en el porcentaje de carga de las leghemoglobinas.....	16
Figura 19. Espectro visible por el ojo humano.....	31

Figura 20. Representación de la estructura de la hemoglobina.....	34
Figura 21. Plantas del genero <i>Lupinus A</i>	41
Figura 22. Nódulos de <i>Lupinus meridanus</i>	43
Figura 23. Fijación biológica del nitrógeno.....	46
Figura 24. Ubicación donde se realizó la recolección.....	61
Figura 25. Recolección de la muestra.....	61
Figura 26. Placa en cubeta de cromatografía.....	64
Figura 27. Placa en lámpara UV.....	64
Figura 28. Geles de electroforesis realizados.....	68
Figura 29. Distribución de las muestras en las tres placas UV, O y B.....	71
Figura 30. Distribución de las muestras en aislamiento.....	72
Figura 31. Sensibilidad de los extractos con UV.....	72
Figura 32. Distribución de las muestras en el aislamiento N°2.....	73
Figura 33. Cromatografía N°1 en luz UV onda larga.....	78
Figura 34. Cromatografía N°2 en luz UV onda larga.....	79
Figura 35. Cromatografía N°1 en luz UV onda corta.....	81
Figura 36. Cromatografía N°2 en luz UV onda corta.....	81
Figura 37. Dos geles de electroforesis realizados.....	107
Figura 38. Gel N°1.....	108
Figura 39. Gel N°2.....	108
Figura 40. Resultados en oscuridad.....	113
Figura 41. Resultados en luz blanca.....	113
Figura 42. Resultados de fotoprotección en luz UV.....	114
Figura 43. Aislamiento N°1.....	115
Figura 44. Aislamiento N°2.....	116
Figura 45. Coloración de Gram N°1.....	117
Figura 46. Coloración de Gram N°2.....	118

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de aminoácidos de la leghemoglobina 1.1.....	11
Tabla 2. Patrón de respuesta cuantitativo de la leghemoglobinas de Lupinus meridanus al incremento latitudinal.....	16
Tabla 3. Principales grupos de inoculación cruzada de leguminosas.....	51
Tabla 4. Referencia de las bandas cromatográficas.....	76
Tabla 5. Orden y concentración de los extractos etanólicos en cromatografía N°1	77
Tabla 6. Orden y concentración de los extractos etanólicos en cromatografía N°2	78
Tabla 7. Cromatografía N°1 observada en luz UV onda larga.....	79
Tabla 8. Cromatografía N°2 observada en luz UV onda larga.....	80
Tabla 9. Cromatografía N°1 observada en luz UV onda corta.....	82
Tabla 10. Cromatografía N°2 observada en luz UV onda corta.....	82
Tabla 11. Cálculos de la concentración de proteína y la contaminación por ácidos nucleicos.....	111
Tabla 12. Método de Warbureg y Crhistian.....	111

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Espectro ascendente, descendente, resta y división de los extractos etanólicos de la Hoja.....	84
Gráfica 2. Resta de los espectros (Ascendente- Descendente) en el extracto de hoja.....	85
Gráfica 3. División de los espectros (Ascendente-Descendente) en los extractos de hoja.....	85
Gráfica 4. Espectro ascendente, descendente, resta y división de los extractos etanólicos del pimpollo.....	87
Gráfica 5. Resta de los espectros (Ascendente-Descendente) de 190 a 290nm en el extracto del pimpollo.....	87
Gráfica 5.1. Resta de los espectros (Ascendente-Descendente) de 290 a 390nm en el extracto del pimpollo.....	88
Gráfica 5.2. Resta (Polinómica) en extracto del pimpollo.....	88
Gráfica5.3. Resta (lineal) en el extracto del pimpollo.....	89
Gráfica 6. División de los espectros (Ascendentes-Descendentes) de 190 a 290nm en el extracto del pimpollo.....	89
Gráfica 6.1. División de los espectros (Ascendentes-Descendentes) de 290 a 390nm en el extracto del pimpollo.....	90
Gráfica 6.2. División (Polinómica) en el extracto del pimpollo.....	90
Gráfica 6.3. División (lineal) en el extracto del pimpollo.....	91
Gráfica 6.4. División (Polinómica) de 335 a 390nm en el extracto del pimpollo.....	91
Gráfica 6.5. Relación (Polinómica) ascendente-descendentes.....	92
Gráfica 7. Espectro ascendente, descendente, resta y división del extracto etanólico del nódulo.....	93
Gráfica 8. Resta de los espectros (Ascendente-Descendente) de 190 a 290nm en el extracto del nódulo.....	94
Gráfica 8.1. Resta de los espectros (Ascendente-Descendente) de 290 a	

390nm en el extracto del nódulo.....	94
Gráfica 8.1.1. Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.....	95
Gráfica 8.1.2. Resta (Media móvil) en el extracto del nódulo.....	95
Gráfica 8.1.3. Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.....	96
Gráfica 8.1.4. Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.....	96
Gráfica 9. División de los espectros (Ascendente-Descendente) de 190 a 290nm en el extracto del nódulo.....	97
Gráfica 9.1. División de los espectros (Ascendente-Descendente) de 290 a 390nm en el extracto del nódulo.....	97
Gráfica 10. Extracto etanólico de hoja ascendente (400-500nm).....	99
Gráfica 10.1. Extracto etanólico de hoja ascendente (500-600nm).....	99
Gráfica 10.2. Extracto etanólico de hoja ascendente (600-700nm).....	100
Gráfica 11. Extracto etanólico de pimpollo ascendente (400-500nm).....	101
Gráfica 11.1. Extracto etanólico de pimpollo ascendente (500-600nm).....	101
Gráfica 11.2. Extracto etanólico de pimpollo ascendente (600-700nm).....	102
Gráfica 12. Extracto etanólico del nódulo ascendente (400-500nm).....	102
Gráfica 12.1. Extracto etanólico del nódulo ascendente (500-600nm).....	103
Gráfica 12.2. Extracto etanólico del nódulo ascendente (600-700nm).....	103
Gráfica 13. Extracto etanólico de flor morada ascendente (400-500nm).....	104
Gráfica 13.1. Extracto etanólico de flor morada ascendente (500-600nm).....	105
Gráfica 13.2. Extracto etanólico de flor morada ascendente (600-700nm).....	105
Gráfica 14. Extracto etanólico de flor blanca ascendente (400-500nm).....	106
Gráfica 14.1. Extracto etanólico de flor blanca ascendente (500-600nm).....	106
Gráfica 14.2. Extracto etanólico de flor blanca ascendente (600-700nm).....	107



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
AREA: BIOTECNOLOGÍA –IIFFB

**FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVIDAD DEL GRUPO HEMO Y DE LAS
PORFIRINAS DE *Lupinus s.l meridanus MORITZ***

AUTORA: Duque, Rocio

TUTOR: Andrades, Efrén

Resumen

Este trabajo contiene un estudio de búsqueda de compuestos fotosensibles/fotoactivables en plantas salvajes de *Lupinus s.l. meridanus Moritz*, colectadas a más de 3000m.s.n.m. La metodología incluye la recolección y separación de las partes: hoja, nódulo, pimpollo o retoño, parte blanca y parte morada de la flor, colocándolas de inmediato en etanol, en la oscuridad y en frío (4-10°C). Los extractos etanólicos fueron extraídos para realizar cromatografía, espectrofotometría ascendente y descendente, aislamiento de microorganismos contaminantes, evaluación de su capacidad fotoprotectora/UV, actividad biológica, presencia de pigmentos fotosintéticos y electroforesis (PAGE-SDS). Se pusieron en evidencia varias moléculas fotosensibles en los extractos de la hoja y el nódulo, los cuales presentan también capacidad fotoprotectiva/UV (50% y 40% respectivamente). Se pudieron observar de dos a tres posibles porfirinas presentes en el nódulo. El pimpollo o retoño contiene un componente en el extracto etanólico que revela un posible sistema de “celdas acumuladoras de energía lumínica” similar a las celdas solares. De la misma manera, en el nódulo se observó una “absorción bimodal”. Finalmente se pudo determinar la posible presencia de una banda de proteína similar en peso molecular, determinado por electroforesis, a la Hemo- Oxigenasa, en el extracto etanólico de la flor blanca. Este resultado coincide con el 100% de fotoprotección/UV determinado en este extracto.

Palabras claves: *Lupinus meridanus*, extractos etanólicos, moléculas fotosensibles, espectrofotometría, cromatografía, fotoprotección/UV, actividad biológica y electroforesis

Introducción

Algunas de las moléculas fundamentales en los seres vivos, como la clorofila y la hemoglobina, contienen en su estructura a las porfirinas, las propiedades de esta, se debe a su actividad biológica. Según Pino, F., y Pérez, D. (1987). Las porfirinas forman complejos con los iones metálicos, como el magnesio y el hierro, los cuales resultan fundamentales para su acción. Las clorofilas (magnesio-porfirinas), debido a su gran capacidad para donar electrones, son capaces de absorber energía de la luz y transmitirla para la síntesis de moléculas orgánicas. Se estima que en su calidad de pigmentos fotosintéticos han contribuido al desarrollo de una atmósfera abundante en oxígeno y constituyen uno de los elementos distintivos del reino vegetal.

El grupo hemo de las porfirinas, se acoplan al hierro y constituyen el grupo prostético de las hemoproteínas como la hemoglobina, mioglobina y la leghemoglobina, así como la de los citocromos y de algunas enzimas (catalasa, peroxidasa y triptófano oxigenasa). Stanier, R., y col (1996).

Las proteínas son uno de los componentes más abundantes que se encuentran en las células, y son las moléculas principales encargadas de la función de estas. La estructura de las proteínas y las funciones, que representan constituye uno de los problemas centrales de la bioquímica hoy en día. Las proteínas se clasifican en simples y conjugadas, siendo esas últimas, subdivididas en base a la naturaleza química de su grupo prostético conjugado, en los siguientes términos: nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas, hemoproteínas, glicoproteínas, etc. Las metaloproteínas son aquellas que poseen un metal en su estructura, asociado o no a un grupo prostético, el cual puede ser un núcleo tipo porfirínico unido a un metal, en este último caso se denomina hemoproteína, figurando entre estas la hemoglobina, mioglobina, leghemoglobina, citocromos y otras.

Este trabajo entre varios aspectos estudiará la leghemoglobina que significa "hemoglobina de leguminosas", la cual es una proteína que se encuentra en los nódulos radicales de la *Lupinus s.l meridanus Moritz*. Estos nódulos se forman durante el periodo activo de fijación de nitrógeno, por interacción simbiótica del *Rhizobium* con la leguminosa. Inicialmente se asumió que esta interacción simbiótica era realizada directamente por la leghemoglobina. Sin embargo rápidamente se determinó, que el nitrógeno era fijado por la nitrogenasa, mientras que la leghemoglobina solo transporta el oxígeno necesario para la síntesis del ATP, promoviendo el mantenimiento de una presión parcial de oxígeno baja, pero constante, en los nódulos de la raíz de la leguminosa. La nitrogenasa es sensible al oxígeno, el cual la inactiva irreversiblemente, por lo tanto otra función de la leghemoglobina es la de secuestrar el oxígeno para proteger la nitrogenasa. Además se encontró que existe una relación directa entre la efectividad de los nódulos y la fijación del nitrógeno, ya que a mayor cantidad de proteína encontrada en los nódulos y mientras más tiempo permanezca sin descomponerse, mayor será la cantidad de nitrógeno asimilado. Bustos, M., (2010).

La importancia del estudio de la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa, reside en su función biológica, esta simbiosis es la responsable de la fijación de nitrógeno en la planta, factor importante para la biofertilización de los mismos. Sadowsky y Graham, (1998).

Esta investigación, se enmarca en las propiedades de fotosensibilidad y fotoactividad de las porfirinas. Este caso a estudiar se refiere a una leguminosa de alta montaña denominada "chocho paramero" cuyo nombre científico es *Lupinus meridanus*. Esta es una planta leguminosa que contiene en los nódulos de sus raíces la leghemoglobina, la cual ayuda en el proceso de simbiosis que fue mencionado anteriormente. Estos nódulos son fotosensibles ya que al exponerse a la luz se causará un efecto o cambio que pueden ser desencadenados por agentes internos como las porfirinas y el grupo hemo.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Lupinus meridanus es una planta leguminosa de alta montaña tropical, que crece entre 1800 y 3600 m.s.n.m. en el estado Mérida. En esta planta se encuentra presente la leghemoglobina (LegHb) que es una hemoproteína monomérica presente en los nódulos radicales simbióticos de las leguminosas que se caracterizan por ser las bacterias de género *Rhizobium* el cual son altamente específicas, la planta contribuye con el suministro específico de la globina (proteína), mientras que la bacteria con el hierro (grupo hemo). La leghemoglobina tiene como función principal facilitar el transporte de oxígeno hasta la membrana simbiosomal, evitando la inactivación irreversible de la nitrogenasa. Esta función es posible gracias a la rápida asociación de la hemoproteína con el oxígeno y a la lenta disociación del mismo. Barragán, N.A., y col (1998)

Según Pino, F y Pérez, D. (1987) las porfirinas están implicadas en procesos biológicos redox y de transporte de oxígeno. Uno de los papeles más importantes puede encontrarse en la fotosíntesis. La estructura de las porfirinas se caracterizan por ser tetrapirroles cíclicos constituidos por cuatro anillos pirrolicos unidos por cuatro puentes de α - metenilo (-CH=) para formar un anillo planar (los carbonos de los anillos pirrolicos y los puentes metenilo quedan en el mismo plano).

Estas porfirinas son muy fotosensibles por ello se emplean en la terapia del cáncer basocelular en concreto se utiliza el derivado de la hematoporfirina que es el photofrin. Este compuesto se administra por vía intravenosa y al exponerlo a la

acción de la luz se produce la acumulación de porfirinas fotoactivadas en las células malignas para regenerar el área afectada. (Gilaberte, Y., Serra, C. et al., 2006).

Los antecedentes presentados más adelante, detallan que se han investigado las distintas estructuras de la leghemoglobina, su purificación, diferentes propiedades de carga, masa, funciones entre otras, sin embargo se notó que hay muy poco estudio de fotosensibilidad con respecto a las porfirinas que se encuentran dentro de la leghemoglobina, en la leguminosa *Lupinus meridanus*, evaluando si hay alguna actividad distinta presente en ella, quien podría tener un gran avance en cuanto a la terapia fotodinámica en el cáncer basocelular, por ello para el desarrollo de esta investigación se plantea como pregunta problema: ¿Qué posibilidad hay de encontrar, fotosensibilidad en los componentes de la ruta biosintética del hemo en la leghemoglobina del *Lupinus s.l. meridanus Moritz*?

1.2 Objetivos de la Investigación

1.2.1 Objetivo General

➤ Determinar la fotosensibilidad del hemo y las porfirinas de la *Lupinus meridanus*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Recolectar el material vegetal, en las áreas seleccionadas.
- Realizar la extracción etanólica de algunas partes de la planta.
- Extraer la leghemoglobina en *Lupinus s.l. meridanus Moritz* y analizar por electroforesis.
- Evaluar la fotoprotección, actividad microbiana, biológica y toxicidad en los diferentes extractos de *Lupinus s.l. meridanus Moritz*.
- Ensayar la fotosensibilidad y fotoactividad de los extractos y las porfirinas en *Lupinus s.l. meridanus Moritz*.

1.3 Justificación de la investigación

El interés de investigar estas hemoproteínas, radica en que ellas transportan oxígeno a muy bajas presiones parciales de este gas y a muy bajas temperaturas, ambas condiciones extremas para tal función, haciendo que el bacteroide *Rhizobium* respire y la enzima nitrogenasa no se desactive consiguiendo así una efectiva fijación de nitrógeno (Grassi, H.C.; Medina, G.E.; Andrade, E.D.J. 1998); logrando que el nitrógeno fijado pase a formar parte de proteínas; ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides. Esta fijación biológica produce un gran aporte ecológico ya que hay un ahorro energético bastante notable el cual no produce ningún efecto contaminante como lo hacen los abonos nitrogenados.

Es muy poca la información y los estudios realizados en relación a la fotosensibilidad y fotoactividad de las porfirinas en la leguminosa *Lupinus meridanus*, a consecuencia de esto se quiere desarrollar esta investigación para determinar si es posible producir algún cambio en la fotoactivación de las porfirinas y el grupo hemo de la *Lupinus s.l. meridanus* Moritz la cual es una planta habitual de los páramos del estado Mérida que como se ha mencionado anteriormente crece a una altura entre 1800 y 3600 m.s.n.m. Si los resultados obtenidos son los deseados el aporte social va a ser notable ya que al haber un efecto de fotoactivación en el grupo hemo y las porfirinas podría dar una opción distinta y más económica para el carcinoma basocelular.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Trabajos previos realizados por el tutor en la sección de biotecnología del IIFFB.

- Flores, J y Rivera, A. recientemente en el 2015 desarrollaron su trabajo de grado en el instituto de investigaciones de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes en la ciudad de Mérida, Venezuela. Que llevaba por título: Determinación preliminar de la composición de moléculas fotosensibles de la flor *Lupinus meridanus*. El objetivo de este trabajo de grado fue determinar la composición de la parte blanca y morada de la flor y las moléculas fotosensibles a partir de los extractos etanólicos, los cuales fueron resultado de la maceración en la oscuridad de cada parte de la flor *Lupinus meridanus*, por separado usando como solvente etanol. Se ha podido determinar que estudios realizados de los extractos de la flor tiene una composición diferente en la parte blanca con respecto a la morada, en cuanto a la absorción ultravioleta y fotosensible. Esta investigación consta de manera específica en estudiar la composición de ambas partes de la flor por técnicas espectrofotométricas en la cual se realizaron con los extractos etanólicos de cada parte de la flor, espectros ascendentes de (190 a 290nm) y (290 a 390nm), descendentes de (390 a 290nm) y (290 a 190nm), además de espectros diferenciales (resta y división), como también técnicas cromatográficas en capa fina a diferentes concentraciones para la flor blanca (5, 10 y 20µl), flor morada (1, 5, 10µl). Se obtuvo un tamaño muestral de diez plantas recolectadas en Apartaderos sector Matica de Rosa. El tipo de muestreo será no probabilístico con características de muestreo intencional, debido a que se establece previamente los criterios para seleccionar las

unidades de análisis. Posterior a ello, el resultado más importante que hemos conseguido es la existencia de fotosensibilidad expresada a 190nm con un Rf de 0,33 y 212nm con un Rf de 0,47. La fotosensibilidad expresada entre las longitudes de onda entre 190nm a 195nm es posible que esté involucrado un grupo éster. Una diferencia importante con los resultados es que ambas son distintas lo cual podría ser por varios factores involucrados como la altura, la temperatura, la humedad, la iluminación, otros factores ambientales deben tener que ver con este resultado, la genética de las dos plantas también podría ser relevante.

- Andrade, A. y Rivas, N. en el (2014) analizaron en el instituto de investigaciones de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes en la ciudad de Mérida, Venezuela. Su título fue: Estudio de la fotosensibilidad y fotoactividad de los extractos etanólicos de la flor *Lupinus meridanus* en el páramo merideño. En este trabajo se estudió la fotosensibilidad y la actividad biológica de los extractos etanólicos de la parte blanca y la parte morada de la flor de *Lupinus meridanus*. La metodología incluyó, recolección de las muestras en el páramo merideño, transporte en la oscuridad, separación de las flores, y extracción con etanol gramo a gramo. Los extractos fueron estudiados por varias técnicas, espectrofotometría ascendente y descendente para determinar el efecto comparativo. Cromatografía en capa fina para determinar los componentes generales presentes en los extractos. Como control se determinó la presencia de microorganismos en las flores y en los extractos. Se usó la cepa de *Escherichia coli* GY5027 para determinar la actividad biológica y la fotoprotección. Las extracciones se hicieron por duplicado para cada parte de la flor, se procesaron 30g de la parte blanca y 82g de la parte morada. En el análisis espectrofotométrico ascendente comparativo entre flor blanca y flor morada se observa un máximo de absorbancia diferencial en el extracto etanólico de la parte blanca con respecto a la parte morada en el rango de 245 a 260nm. En la cromatografía se observan un mínimo de 9 bandas, y la posible banda de interés por su absorción en el UV es la n° 4 con un RF de 0,64 y la n° 5 con un RF de 0,59 (flor blanca). Los posibles microorganismos contaminantes son cocos grampositivos y

bacilos gramnegativos. Se encontró una actividad de fotoprotección en el extracto etanólico de la parte blanca de la flor.

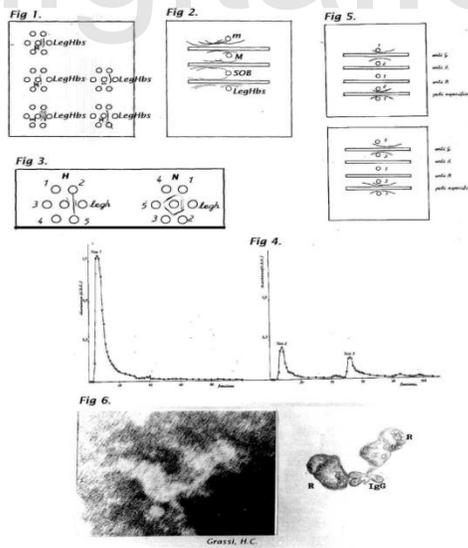
- Madriz, L., realizó la Tesis de grado presentada en el (2001), en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, la cual trataba de la determinación de la estructura primaria y secundaria de la leghemoglobina de *Lupinus s.l meridanus moritz*. Sus objetivos eran: a) purificar la leghemoglobina principal de *Lupinus s.l meridanus moritz*, b) determinar la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de dicha proteína, c) predecir la estructura secundaria (hélices, hojas, vueltas) de la hemoproteína y determinar la estereoquímica de los aminoácidos proximales y distales al grupo hemo, d) producción de un agregado hemoproteico, e) determinar las propiedades de cargas, masas y algunos otros parámetros fisicoquímicos de dicha proteína. Los resultados logrados fueron: una pureza obtenida por los métodos convencionales de purificación, apenas alcanzando a un máximo de 90%, el agregado hemoproteico es similar inmunológicamente, a la mezcla de leghemoglobinas, por lo tanto, es de suponer que está formado por un complejo de todas las leghemoglobinas, en el espectro infrarrojo se determinaron 4 bandas importantes que corresponden a 4 grupos químicos orgánicos funcionales (O-H, C-H, C=C, C-O) presentes en las leghemoglobinas también resulto la presencia de una cisteína en la posición 103, es única en este tipo de hemoproteínas. El exceso de carga positiva de la leghemoglobina I se explica y se exoliga por la presencia de 14 residuos de lisina (K) y 6 residuos de histidina (H), el peso molecular calculado a partir de la secuencia es 16.668Da por ultimo comparando la secuencia de esta leghemoglobina I de *Lupinus meridanus* con la secuencia de la leghemoglobina I del *Lupinus luteus* obtuvieron una conservación de aminoácidos de 85,7%. Con respecto a la leghemoglobina II del *Lupinus luteus* obteniendo una conservación de 79,4%. La secuencia final obtenida revela que la mayoría de los aminoácidos invariables en las leghemoglobinas se conservan en esta leghemoglobina. También permanecen invariables en la leghemoglobina I de *Lupinus meridanus* los aminoácidos distales y proximales al grupo hemo que están presentes en LbII del *Lupinus luteis*. Esto indica

por analogía que la estructura secundaria de LegHbI mantiene las 7 alfa hélices y 2 giros beta de igual forma la LbII del *Lupinus luteus*.

- Chávez, A.C., Andrades, E.D.J. y Grassi, H.C. (1999) publicaron en la revista RABSUV un artículo sobre la proposición de un método aplicable a la agricultura: el porcentaje de carga de la leghemoglobina como parámetro evaluador de cultivos de leguminosa de uso comercial. Este trabajo se propone un método de evaluación del estado funcional de los nódulos radicales tomando en cuenta el porcentaje de carga de la leghemoglobina, con especial referencia a especies leguminosas de los llanos occidentales. Como resultado final de este estudio se describió un método de evaluación del estado fisiológico de los nódulos radicales de fijación simbiótica de nitrógeno, en activos de leguminosa, usando como parámetros el porcentaje de carga de la LegHb. Estableciendo tres niveles de porcentaje de carga para la evaluación deficiente (0-15%), normal (15-30%), óptimo (más de 30%).

- Grassi, H.C.; Medina, G.E.; Andrades, E.D.J.(1998), presentaron en la XIX reunión latinoamericana de rizobiología la investigación que presentaba el nombre de: Caracterización inmunoquímica de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus* cuyo objetivo fue la determinación cuantitativa y cualitativa de las LegHbs por medio de técnicas inmunoquímicas, que puede ser una herramienta muy útil para medir la expresión molecular de los diferentes genes que las codifican, los cambios de estructura y localización funcional de las diferentes isoelectroleghemoglobinas, como resultados se obtuvieron: cinco sueros inmunes, cuatro de ellos dirigidos contra cada una de las cuatro isoelectro LegHbs y el quinto suero fue dirigido contra la mezcla de esas cuatro isoproteínas. Cada uno de estos sueros identificó a su LegHb homóloga dentro de la mezcla de isoproteínas (Fig.1) indicando que el esquema de inmunización fue más cualitativo que cuantitativo, en el sentido de que diferenció cada una de las isoproteínas independientemente de las otras, dentro de la mezcla. Estos resultados indican que cada isoproteína muestra un determinante antigénico individual y diferente de cada una de las otras iso-LegHbs y que cada uno de los determinantes antigénicos de cada una de las isoproteínas es inmunodominante dentro de la estructura proteica. La inmunolectroforesis demostró lo siguiente (Fig.2): la

fracción microsomal menos purificada presentó las cuatro bandas de precipitación, mientras que la fracción microsomal más purificada y el sitio de biosíntesis presentaron sólo dos bandas de precipitación, que suponemos son las globinas que se estaban sintetizando específicamente en los ribosomas de la célula nodular en el momento de hacer la recolección de las plantas. Para probar el suero V, éste se enfrentó a las fracciones subcelular de un gradiente autogenerado de la fracción microsomal de hígado de rata, el cual fue comparado con su homólogo de tejido nodular (Fig.3). Se observó que no hay reacción cruzada con la hemoglobina de rata o alguno de sus precursores en ninguna de sus subfracciones mientras que las fracciones 2, 3 y 4 de la fracción microsomal del tejido nodular (intermedias en el gradiente autogenerado) sí reaccionaron de manera idéntica a una de las bandas de la LegHb. La Fig.4 muestra el perfil de elución de las Inmunoglobulinas del suero V. En la Fig.5 se demuestra que las tres Inmunoglobulinas purificadas corresponden a la clase IgG. La Fig.6 muestra la reacción de la IgG del pico 1 con los ribosomas que están sintetizando la globina en la célula nodular.



La **figura 1** fue tomada de Grassi, H.C.; Medina, G.E.; Andrades, E.D.J. (1998, Septiembre).

- Barragán, N.A.; Gutt, V.F.; Silva, P.J.; Andrade, E.D.J.; León, V. (1998-Septiembre) realizaron la purificación y caracterización bioquímica de las leghemoglobinas de *Lupinus meridanus*. Presentando esta investigación en la XIX reunión latinoamericana de rizobiología, dicha investigación se desarrollo en la Universidad de Los Andes, Mérida y en IVIC, Caracas. Llevando como objetivos: el estudio bioquímico y biofísico integral, tratando de conocer las bases estructurales que justifiquen las funciones moleculares cumplidas por las Leghemoglobinas de *L. meridanus*. En ese trabajo se abordan los aspectos bioquímicos estructurales más relevantes de esas hemoproteínas. Como resultados finales se obtuvieron hasta 6 isoelectro-LegHbs (Fig.7). La más abundante LegHb 1.1 tiene la mayor carga positiva y copurifica con la LegHb 1.2. El peso molecular determinado por cromatografía en Sephadex G-50 (Fig.8) es aproximadamente 17KDa para la mezcla de las LegHbs monoméricas, pero sus espectros son levemente diferentes (Fig.9). Las LegHbs purificadas no presentaron diferencias significativas en su afinidad por el Oxígeno. Mediante el FergusonPlot (Fig.10) se pudo determinar la presencia de una forma tetramérica de la LegHb 1.1 cuyo peso molecular calculado es de 65KDa y su carga neta se corresponde con la misma de la LegHb 1.1. La composición de aminoácidos de la LegHb 1.1 es:

Asx	18	Thr	10	Ser	8	Glx	19
Pro	4	Gly	8	Ala	15	Val	13
Cys	1	Met	1	Ile	6	Leu	19
Tyr	4	Phe	7	Lys	12	His	5
Arg	2	NH ₄	11	Trp	ND	TOTAL	152

La **tabla. 1** fue extraída de Barragán, N.A.; Gutt, V.F.; Silva, P.J.; Andrades, E.D.J.; León, V. (1998).

Concluyendo que las LegHbs de *Lupinus meridanus* se diferencian más por su carga que por su masa molecular. La LegHb 1.1 es la hemoproteína mayoritaria y es la que está más cargada positivamente. En condiciones *in vitro* esta proteína puede

oligomerizarse. Esto podría interpretarse como que se trata de un artefacto del método, o puede tratarse de una propiedad fisiológica natural de la proteína.

Fig. 7

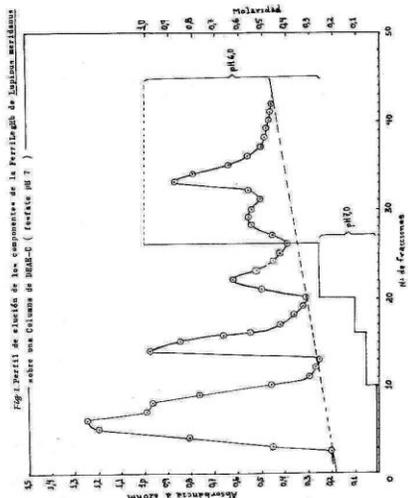


Fig. 8

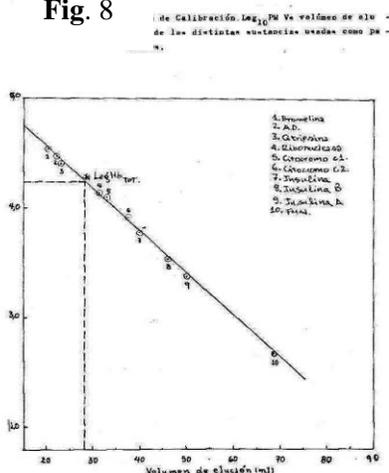


Fig. 9: Espectros de piriña ultravioleta reducida de los distintos componentes de la leghemoglobina: a) LegH₁, b) LegH₂, c) LegH₃ y d) LegH₄.

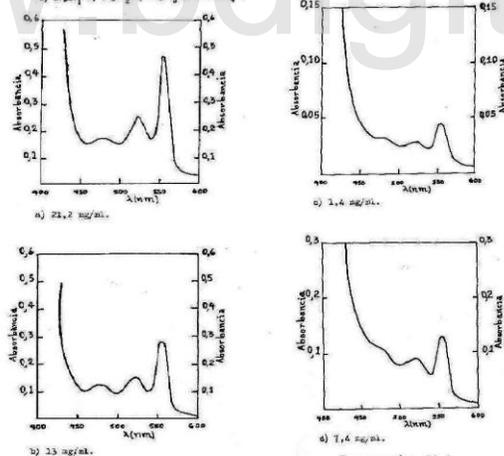
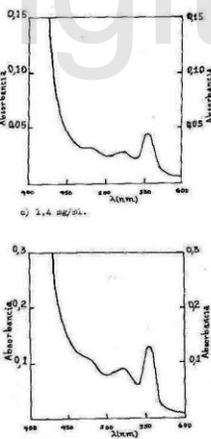


Fig. 9

Fig. 3. a) y b).



Barragán, N.A.

Fig. 9: Curva de Calibración pendiente Vc peso molecular para determinar el peso molecular de la LegH_{1,2}.

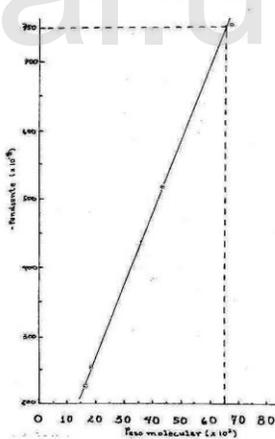


Fig. 10

Las figuras anteriores fueron extraídas de Barragán, N.A.; Gutt, V.F.; Silva, P.J.; Andrades, E.D.J.; León, V. (1998).

- En 1998, Silva, P.J., Gutt, V.F., Barragán, N.A., León, V., Andrades, E.D.J. Desarrollaron una investigación en La Universidad de los Andes, Mérida y en el

IVIVC, Caracas, teniendo por título: cristalización y estudio biofísico de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus*. Presentando como objetivos el estudio bioquímico y biofísico integral, tratando de conocer las bases estructurales que justifiquen las funciones moleculares cumplidas por las Leghemoglobinas de *L. meridanus*. En este trabajo se abordan los aspectos biofísicos estructurales más relevantes de esas hemoproteínas. Obteniendo como resultados la cristalización de la Leghemoglobina 1 observando una aproximación asintótica del pH de la solución de hemoproteína al punto isoeléctrico de la misma. Esto indica que la cristalización lograda fue inducida tanto por la insolubilización de la LegHb ocasionada por la sal neutra, como por la neutralización de la carga debido a la aproximación al punto isoeléctrico. Esto permitió obtener cristales cuya dimensión promedio más larga era de 0,5mm, de color rojo intenso. El espectro RPE de la LegHb (Fig.12) es similar al de la mioglobina (Fig.11), con señales fuertes en $g=5,93$ y $g=5,91$ respectivamente. Las diferencias observadas se explican por la menor oxidación de la LegHb y la menor calidad de esta preparación. En la Fig.13 se observa un cristal hexagonal de la LegHb el cual produce un patrón de difracción de electrones que se muestra en la Fig.14. En la imagen aumentada de la Fig.13 se observa que el lecho superior es un cristal de la sal. El patrón de difracción de rayos X (Fig.15) demostró que la disposición de capas de estos cristales está afectada por la cristalización del Sulfato de Amonio que orientó los lechos moleculares planos y paralelos de la proteína. Estos resultados permitieron concluir que la cristalización por este método de celdas de diálisis, afecta el producto final debido a que el Sulfato de Amonio se deposita sobre los lechos moleculares planos de la proteína. Es por ello que los patrones de difracción de electrones y rayos X no se corresponden con la simetría esperada, sin embargo, es claro que los cristales adoptan la forma geométrica casi perfecta, dirigidos por la cristalización de la sal. Continuación de las figuras en la siguiente página.

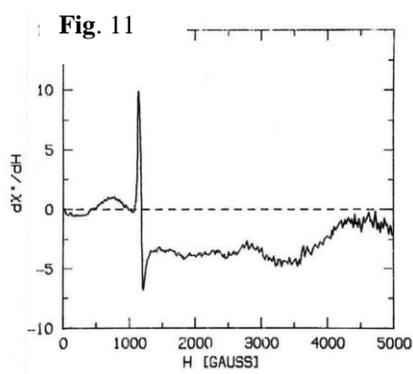


Fig. 11

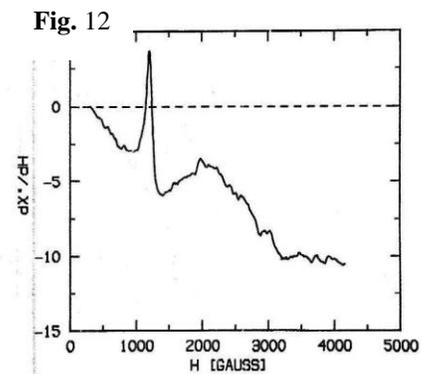


Fig. 12

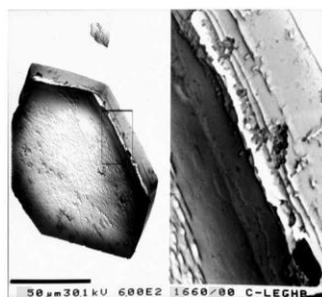


Fig. 13

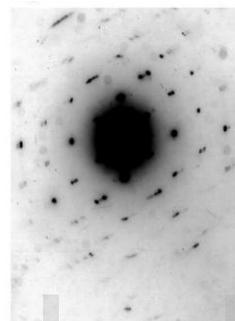
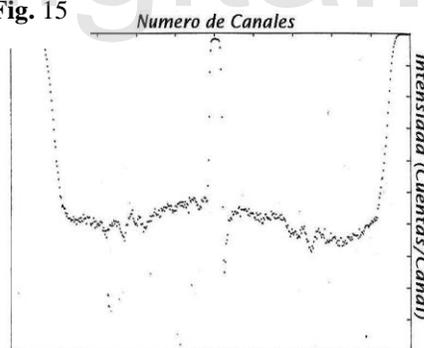


Fig. 14

Fig. 15



Silva, P.J.

Figuras extraídas de Silva, P.J., Gutt, V.F., Barragán, N.A., León, V., Andrade, E.D.J. (1998).

- Andrades, E.D.J., Leal, A.A., Chávez, A.C., Andrade-Grassi, S.E., y Grassi, H.C. presentaron en 1998 su investigación de la estructura y función de Leghemoglobinas de *Lupinus meridanus*: caracterización preliminar, en la XIX

reunión latinoamericana de rizobiología. Esta investigación se procesó en la Universidad de Los Andes, Mérida; IUTJAA, El Tigre y UNELLEZ, Barinas, Venezuela. Los objetivos planteados en este trabajo era tratar de caracterizar preliminarmente las Leghemoglobinas de *L. meridanus*, mediante la extracción y purificación de dichas proteínas, para comparar cuantitativa y cualitativamente las plantas recolectadas a diferentes alturas. Los resultados demostraron que existe un patrón de respuesta cuantitativo de las Leghemoglobinas de *L. meridanus* al incremento latitudinal. La Tabla 2 muestra como incrementa el valor de esas proteínas extraídas de los nódulos en relación al peso de los mismos, con el incremento latitudinal. Esto se demuestra claramente en la Figura 17. Igualmente fue posible demostrar un incremento significativo y lineal en el porcentaje de carga de las Leghemoglobinas extraídas del nódulo (Tabla 2 y Figura 18). Permitiendo concluir que *L. meridanus* expresa una compensación cuantitativa y no cualitativa en su Leghemoglobina, ante las condiciones extremas más importantes a las cuales está sometido: Bajas concentraciones de oxígeno y bajas temperaturas.

Fig. 16-a)



Fig. 16- b)

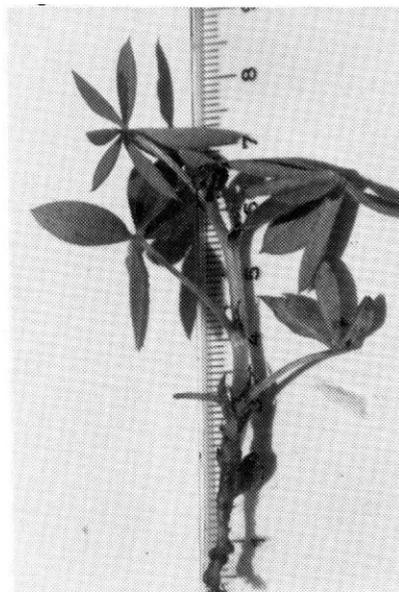


Tabla 2

PARCELA	ALTITUD	LegHb mg/gnódulos	% DE CARGA
1	2.000	2,2	15
2	2.150	0,5	8
3	2.240	3,2	20
4	2.450	3,8	24
5	2.700	4,0	26

Fig. 17

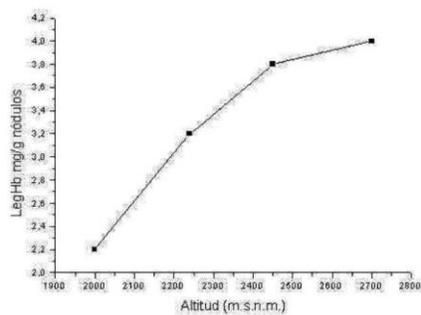
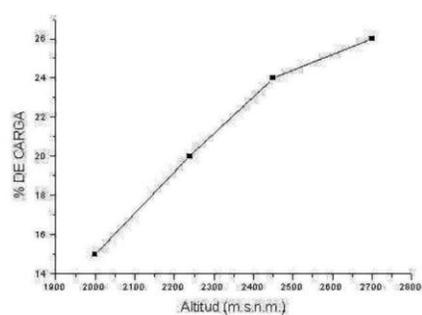


Fig. 18



Andrade, E.D.J.

Figuras extraídas de Andrades, E.D.J., Leal, A.A., Chávez, A.C., Andrade-Grassi, S.E., y Grassi, H.C. (1998).

- Andrades, E.D.J., Medina-Ramírez, G.E., Grassi, H.C., y Leal, A.A. en 1998 realizaron una investigación en los laboratorios de fisiología vegetal, Instituto Universitario Tecnológico José Quintero en Anzoátegui, El Tigre, y en el instituto de investigaciones de La Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes en la ciudad de Mérida, Venezuela. Su título era: relación de la carga de la leghemoglobina de *Lupinus s.l. meridanus Moritz* con la altitud a la cual es recolectada. Dicha investigación la publicaron en Memoria XIX reunión latinoamericana de rizobiología. El objetivo de esta investigación era determinar varios parámetros de dicha hemoproteína en plantas salvajes colectadas a 1200, 2240, 2450 y 2700 msnm. Los resultados obtenidos concluyeron que la respuesta del tejido fijador de nitrógeno a la disminución de la tensión de oxígeno y de la temperatura es, en el caso de la LegHb, más cuantitativa que cualitativa. Esto indicaría que desde el punto de vista evolutivo, la función de la LegHb, en el caso de *Lupinus s.l. meridanus Moritz*, está en un proceso temprano.

2.2 Trabajos previos realizados en el exterior

- Escuredo, P., en 1998 presentó la tesis doctoral, que llevaba por título: senescencia de los nódulos de leguminosa inducido por nitrato en la oscuridad continua. Esto fue presentado en La Universidad de Zaragoza en España. Los objetivos a desarrollar en esta investigación fueron: 1) determinar si se produce estrés oxidativo en los nódulos tras exponer las leguminosas a condiciones medioambientales adversas. 2) Investigar el mecanismo de inhibición de la actividad fijadora de N₂ en nódulos de plantas tratadas con nitrato o expuesta a oscuridad prolongada. 3) profundizar en el estudio del metabolismo del oxígeno activado en nódulos. Como resultados se obtuvieron que en el tratamiento de plantas de guisantes y judías con nitrato, inhibe la actividad nitrogenasa en un 85% confirmando la hipótesis de que el O₂ es un factor crítico en la regulación del metabolismo nodular, también resultó que dichos nódulos retienen virtualmente intacta su capacidad defensiva antioxidante tras dos días de exposición al nitrato, la exposición de las

plantas leguminosas ya mencionadas a un día de oscuridad causa una inhibición del 96% en la actividad fijadora del nitrógeno y por último se noto que la ascorbatoperoxidasa se localiza principalmente en el parénquima nodular y en la zona infectada.

- En el 2013, se publicó un artículo de La Universidad de Calcuta por Pijush, B., and Maitree, B., que llevaba por título (Intrinsic tryptophan fluorescence and related energy transfer in Leghemoglobin isolated from *Arachis hipogea*) en español sería La fluorescencia intrínseca del triptófano y la energía relacionada que se traslada entre Leghemoglobina aislada de *Arachis hipogea*, los objetivos propuestos en esta investigación fueron, explorar las propiedades estructurales del hemo que contiene proteínas leghemoglobinas de leguminosa por medio de la intrínseca triptófano., también se quería calcular la interacción de la fluorescencia del colorante con un anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS). Por tanto comparar la temperatura de fusión, el rendimiento cuántico y las propiedades de transferencia de energía de las proteínas globulares de leghemoglobina con otra norma. Como resultados de este trabajo se reveló una comparación de la estabilidad térmica de las proteínas globulares que contienen hemo el cual su orden sería: Hb> Lb>Cyt-C. para el rendimiento cuántico y la constante de unión para la interacción de Trp-ANS se sobre determinó la leghemoglobina por ultimo la distancia de transferencia de energía aparente de Trp-ANS en libras y otras proteínas globulares se exploraron seguir el orden:

Oval <Lb <BSA <Cyt-C <lisozima.

2.3Antecedentes Históricos

El área de investigación de este proyecto es la biotecnología. Castellanos, C., Frailan, D., y Baez, M., (2012). Se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos, como células vivas, cultivo de tejidos o moléculas derivadas de un organismo como las enzimas o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos mejorar una planta, animal o desarrollar un microorganismo

para utilizarlo con un propósito específico. En sí misma es una ciencia que posee un enfoque multidisciplinar que involucra varias disciplinas y ciencias como la biología, bioquímica, genética, virología, ingeniería, agronomía, veterinaria, medicina y química.

Algunos hitos de la biotecnología es que es muy antigua, ya en el año 6000 a.c los babilonios consiguieron fabricar cerveza por primera vez. En este proceso se utilizan células de levadura que transforman el azúcar en alcohol, en el siglo XVII Anton Van Leeuwenhoek viera los microbios con uno de los primeros microscopios. En 1900 se inició el estudio del ácido desoxiribonucleico por Rosalind Franklin descubriendo que tenía forma helicoidal y Watson y Crick describieron su estructura, este fue el punto de partida de la biotecnología moderna según Muñoz, E., (2001). Cuando la biología da los pasos provechosos al identificar el código genético y realizar manipulación del mismo, combinando el material hereditario, mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico producidas por un medio cualquiera fuera de la célula, dentro de un virus, un plásmido bacteriano u otro sistema vector, de modo que permita su incorporación al organismo huésped en el que no se encuentra de manera natural, pero en el que son capaces de propagarse de forma continuada.

- Silva, P., (1985) realizó una investigación de tipo experimental en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes que llevaba como título, la caracterización físico química de la leghemoglobina del *Lupinus meridanus* Entre los objetivos que se perseguían con este trabajo estaba: a) La caracterización fisicoquímica y bioquímica de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus*, b) Desarrollar una técnica de oligomerización para los distintos componentes de la leghemoglobina que se encuentran en los nódulos de las raíces, c) Mejorar la técnica de cristalización de los primeros dos componentes de la leghemoglobina, para tratar de obtener cristales de mayor tamaño y poder utilizar la técnica de resonancia paramagnética electrónica (RPE) con toda su potencialidad. Obteniendo como resultado después de culminar el proceso de extracción de la LegHb, se pudo

observar que no es recomendable usar tampón fosfato ya que este desnatura la LegHb. Es recomendable cambiarlo a tampón tris HCL, puesto que con este no se desnatura. La LegHb estudiada contiene cuatro fracciones que difieren de carga y cantidad según lo muestra el perfil de elución de la columna intercambiadora iónica. Determinando que la legHb1.1 existe en mayor porcentaje en estado natural que la legHb1.2. la LegHb puede oligomerizar en un sistema electroforético disociante que cumpla ciertas condiciones, esto hizo pensar en usar la legHb1 como un marcador de peso molecular para proteínas que se encuentren en su rango ya que su oligomerización les produjo como mínimo 5 bandas, a las que ya hemos determinado su peso molecular finalmente se concluyó que la necesidad de los organismos vivientes de avanzar en estructura y función, además de la oligomerización estable de la LegHb de *Lupinus meridanus*, unidos a las semejanzas en el espectro RPE, nos aventura a pensar que esta hemoproteína tiene la necesidad de pasar a una etapa superior, en la que modificaría su función según la necesidad de la planta y, esto tendría una gran repercusión en el proceso de fijación de nitrógeno. Este trabajo de grado se relaciona de una manera directa a esta tesis porque realiza un estudio detallado de la leghemoglobina en la *Lupinus meridanus* proporcionando información necesaria para el desarrollo de la investigación.

Esta tesis al igual que la anterior se relaciona de una manera directa a este trabajo de grado ya que los resultados obtenidos proporcionan información esencial para la investigación de la leghemoglobina en la *Lupinus meridanus*. Gutt, V., realizó su trabajo de grado de tipo experimental en el año de 1985, en la Facultad de Ciencias de La Universidad de Los Andes, que llevaba como título: caracterización físico química de la leghemoglobina del *Lupinus meridanus*, diferenciación de rayos X y electrones. Análisis de composición de aminoácidos. Teniendo como objetivo a) la extracción y purificación de muestras recolectadas en una población salvaje de *Lupinus meridanus*, b) estudio sobre el peso molecular, composición en celda de diálisis de las mejores muestras obtenidas en el proceso de purificación, c) determinación del grupo cristalino, parámetro de red, volumen de celdas unidad y

ángulo, mediante dos técnicas diferentes, como lo son la microscopia electrónica y los rayos X, cuya finalidad es obtener comparaciones útiles y como modo de auxilio entre ambas técnicas. Como resultados se logró obtener con bastante exactitud el peso molecular de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus*, se detectó por primera vez la presencia de oligómeros, nunca antes reportados por otras LegHb, al estudiar la composición de los aminoácidos observaron la gran similitud con las LegHb de soya *Lupinus*, en cuanto a la presencia de casi todos los aminoácidos que ellas poseen, por último encontraron fallas en el sistema de cristalización que al final redundaron en la formación final de los cristales y por tanto, estos no dieron patrones de difracción ni por rayos X ni por electrones, limitando esto a un estudio más exhaustivo que se hubiese podido realizar con buenos cristales.

- Medina, G., ejecuto el trabajo de grado presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes, en la Facultad de Ciencias, en el año de 1987, con el título de: estudio estructural del sitio de biosíntesis de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus*. Sus objetivos eran: a) obtención y purificación de inmunoglobulinas G, b) fraccionamiento subcelular del tejido nodular para estudiar los componentes del sitio de biosíntesis, c) estudio ultra estructural (microscopia electrónica) del tejido nodular, d) extracción y purificación de las formas proteicas homologas de la leghemoglobina. Como resultados se purificaron las leghemoglobinas casi hasta su homogeneidad, mostrando que conservan un ligante no desplazado por la oxidación con ferricianuro de potasio, durante las etapas previas de purificación ese ligante impide la asociación de la piridina al grupo hemo, se obtuvieron 3 tipos de inmunoglobulinas G con factores de elusión diferentes.

- Medina, G.E., Andrade, E.D.J. and Serrano, J.A. presentaron en la IV jornada de microscopia electrónica, de La Universidad de Oriente en el Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas en el año de 1990. Investigación realizada en la Facultad de Ciencias y medicina de la UIA Mérida, llevando como título: physicochemical and ultra structural characterization of

leghemoglobin's site of synthesis (caracterización fisicoquímica y ultra estructural del sitio de síntesis de la leghemoglobina). Esta investigación se realizó con el objetivo de estudiar la caracterización física, química y estructural del sitio de biosíntesis de la globina proteína de la leghemoglobina de la *Lupinus meridanus*, en los resultados obtenidos se identificó la presencia de ribosomas en el sitio de biosíntesis gracias a la microscopia electrónica también moléculas específicas de la leghemoglobina se purificaron con inmunoglobulinas G demostrando una hipocromicidad de 248nm cuando estas reaccionaron con el complejo ribosoma- globina.

- En 1995, skwierinski, R., Jaimes, R., y Muñoz, A. publicaron el siguiente artículo: Variaciones diarias y estacionales de actividad nitrogenasa y concentración de la leghemoglobina y su relación con factores climáticos. En la revista de agronomía tropical, tal investigación fue realizada en el laboratorio de fijación biológica del nitrógeno en la facultad de ciencias de la UIA. Los objetivos planteados fueron: a) variación de la actividad nitrogenasa y concentración de leghemoglobina a lo largo del crecimiento de la planta, b) Ciclo diario de la actividad nitrogenasa y concentración de leghemoglobina, c) Oscilaciones de las variables micro climáticas (temperatura del suelo, humedad del suelo y radiación). Como resultado se obtuvo la mayoría de los nódulos presentaban una coloración verdosa producto de la oxidación de la leghemoglobina, lo cual es indicativo de la no funcionalidad del nódulo con respecto a la AN, La Lb, según los resultados que se muestran, cumpliría una función de regulador de la difusión de oxígeno hacia los bacteroides, y las tensiones de oxígeno a nivel de los bacteroides variarían de acuerdo con la AN, dando como resultado el compartir su función protectora con la respiración de los bacteroides por oxidasas localizadas en la membrana de éstos, impidiendo la penetración del oxígeno al citoplasma de los bacteroides, el "sitio" de la nitrogenasa, debido a los cambios en las temperaturas a nivel de la superficie del terreno se produjo efectos en la disminución de la AN en la mayor cantidad de nódulos ubicados en la raíz principal y que se encuentran cerca de la superficie, Esto comprueba que un aumento de la

temperatura fuera de lo normal tiene efectos en un lapso de tiempo muy pequeño sobre la AN.

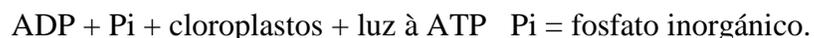
2.4 Bases teóricas

2.4.1 FOTOSENSIBILIDAD

Este es un fenómeno que afecta a ciertas plantas, órganos vegetales o semillas sensibles a la acción de la luz. Se debe a la fotosensibilidad el movimiento en dirección de la luz de ciertas esporas (fototaxis), el giro de luz hacia algunos tallos (fototropismo positivo), la orientación hacia el suelo de las raíces (fototropismo negativo), el hecho de que ciertas semillas no germinen con luz o por el contrario no puedan germinar sin haber sido previamente iluminadas, etc. López, A., (2006).

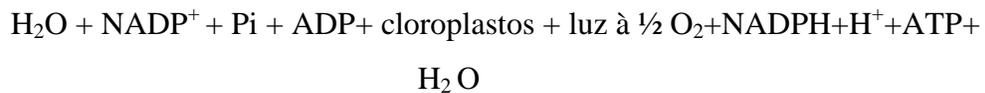
2.4.1.1 FOTOFOSFORILACIÓN

Este proceso fue descubierto por Daniel Arnon y sus colaboradores en 1950. En condiciones celulares normales. La fotofosforilación requiere un flujo de electrones, aunque en ciertas ocasiones la Fotofosforilación y el flujo de electrones pueden ocurrir independientemente el uno del otro. Al flujo de electrones que no va acompañado de fosforilación se le denomina desacoplado. Lincoln, T., y Zeiger, E., (2006) La Fotofosforilación se desarrolla con la síntesis de ATP que se produce cuando se exponen cloroplastos aislados a la acción de la luz, en presencia de ADP y fosfato. La formación de ATP a partir de la reacción de ADP y fosfato, es el resultado del acoplamiento energético de la fosforilación al proceso de transporte de electrones inducido por la luz, de la misma forma que la fosforilación oxidativa está acoplada al transporte de electrones y al consumo de oxígeno en las mitocondrias.



En el fotosistema I se realiza la síntesis cíclica de ATP, que es independiente de la fotólisis del agua y de la formación de NADPH; mientras que la

fotofosforilación no cíclica, está acoplada al transporte de electrones desde el agua, en el fotosistema II a través de una cadena transportadora de electrones hacia el fotosistema I, donde la ferredoxina cede dos electrones al NADP^+ para que se reduzca a NADPH. . Lincoln, T., y Zeiger, E., (2006).



La molécula de H_2O del lado izquierdo de la ecuación, cede los dos electrones necesarios para la reducción del NADP^+ y el átomo de oxígeno que se libera en forma de $\frac{1}{2} \text{O}_2$. La molécula de H_2O del lado derecho de la ecuación procede de la formación de ATP a partir de la reacción de $\text{ADP} + \text{Pi}$. Lincoln, T., y Zeiger, E., (2006).

En la membrana tilacoidal como resultado de la fotólisis del agua y de la oxidación de la plastoquinona (PQH_2) se generan protones (H^+); que originan un fuerte gradiente de concentración de protones (H^+) al ser transportados del lumen tilacoidal hacia el estroma. Este gradiente de pH a través de la membrana es responsable de la síntesis de ATP, catalizada por la ATPsintasa (o sintetasa) o conocida también como factor de acoplamiento; ya que acopla la síntesis de ATP al transporte de electrones y protones a través de la membrana tilacoidal.

El flujo cíclico de electrones tiene lugar en algunos eucariotes y bacterias fotosintéticas primitivas. No se produce NADPH sino ATP solamente. Esto puede ocurrir cuando las células pueden requerir un suministro de ATP adicional, o cuando no se encuentre presente NADP^+ para ser reducido a NADPH. En el fotosistema II, el bombeo de iones H^+ dentro del tilacoide crea un gradiente electroquímico que culmina con la síntesis de ATP a partir de $\text{ADP} + \text{Pi}$. Las halobacterias, que crecen en agua extremadamente salada, son aerobias facultativas; ya que pueden crecer en ausencia de oxígeno. Los pigmentos púrpuras conocidos como retinal (pigmento encontrado en el ojo humano) funcionan como las clorofilas. La bacterio rodopsina es

un complejo formado por retinas y proteínas de la membrana, la que genera electrones que establecen un gradiente de protones que activa una bomba ADP-ATP, que produce ATP en presencia de la luz, pero en ausencia de clorofila. Este comportamiento ayuda a sustentar la universalidad de la teoría quimio-osmótica de Mitchell, en la función de sintetizar ATP.

En diversos tipos de vegetales se pueden encontrar cloroplastos de muchos tamaños y formas. Eso cloroplastos surgen de diminutos protoplastidios (plásticos inmaduros pequeños y casi incoloros, con pocas o ninguna membrana interna) casi siempre, los protoplastidios se derivan solo de óvulos sin fecundar, el esperma no contribuye en lo absoluto. Los protoplastidios se dividen a medida que se va desarrollando el embrión, y se convierten en cloroplastos al formarse los tallos y las hojas. Los cloroplasto jóvenes también se dividen de una forma activa, especialmente cuando el órgano que lo contiene se expone a la luz, por lo que a menudo una célula de una hoja madura contiene unos cuantos cientos de cloroplastos. La mayoría de los cloroplastos se observan con facilidad al microscopio óptico pero su estructura fina solo puede revelarse con microscopía electrónica. Salsbrusy, F.B y Koss, C.W. (2000).

Cada cloroplasto se encuentra rodeado por un sistema de doble membrana o en envoltura que controla el tránsito de moléculas de hacia dentro o hacia fuera. En el interior del cloroplasto se encuentra el amorfo, gelatinoso y rico en enzimas llamado estroma, que contienen enzimas que convierten el CO₂ en carbohidratos especialmente en almidón. Embebidos por todo el estroma se encuentran los tilacoides, que contiene pigmentos en los que se emplean la energía de la luz para oxidar el agua y formar ATP y NADH, que son ricos en energía y necesarios a la vez para que el estoma convierta el CO₂ en carbohidratos. En alguna porciones del cloroplastos se encuentran pilas tilacoidales que reciben el nombre de grana. Los pigmentos que hay en las membranas tilacoidales consisten principalmente en dos tipos de clorofilas verdes, la clorofila α y la clorofila β también aparecen pigmentos

amarillos – naranja que se clasifican como carotenoides ciertos carotenoides aparecen en la envoltura del cloroplasto, dándole cierto color amarillento, mientras que la clorofila nunca se presentan en las envolturas. Salsbrusy, F.B y Koss, C.W. (2000).

2.4.1.2 Fluorescencia y fosforescencia

Un átomo, ion o molécula en estado de excitación, puede perder su energía de tal estado en cualquiera de las siguientes maneras: primero, puede perder toda la energía de manera inmediata, en forma de calor, es decir se convierte por completo en energía de traslación, vibración o rotación. En segundo lugar puede perderse de manera parcial en forma de calor, y la que queda se emite como luz visible de cualquier longitud de onda (un fotón de menor energía) distinta a la absorbida. Si sucede esto en los 10^{-9} a 10^{-5} s siguientes a la absorción del fotón original, se denomina fluorescencia. Si el decaimiento dura más se llama fosforescencia. En tercer lugar, la energía puede utilizarse en una reacción química, tal como la fotosíntesis. Moreno, G., Luna, A., Alvarado, A., y Campos, A., (2007).

2.4.2 Terapia Fotodinámica

Es una de las técnicas más actuales empleadas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, aunque actualmente ya se ha demostrado su eficacia en otras enfermedades inflamatorias. En dermatología su principal indicación es el carcinoma baso celular, pero también se ha empleado en carcinoma escamoso *in situ* enfermedad de Bowen y más recientemente en acné, rosácea, varices, foto rejuvenecimiento, liquen, liquen escleroso y atrófico y leishmaniasis, entre otras dermatosis.

Citando a Moreno, G., Luna, A., Alvarado, A., y Campos, A., (2007). La TFD consiste en la administración de un agente fotosensibilizante sobre el tejido afectado y la posterior irradiación de una dosis lumínica determinada, que origina un estado excitado que, a su vez, entrega energía a moléculas de oxígeno presentes en estado basal, las que se convierten en oxígeno *singlety* tóxico, lo que causa, al cabo de pocas

horas, necrosis por coagulación, inducción de apoptosis, micro trombosis de vasos tumorales de neoformación e inflamación intensa de la zona por liberación de factores vasoactivos y pro-coagulantes como el factor de activación plaquetaria y tromboxano A₂; en algunos días se forma una costra que precede a la regeneración del epitelio normal; el oxígeno *singlety* los radicales libres inducen daño tisular citotoxicidad y destrucción selectiva de los tejidos. La selectividad del tratamiento con respecto al tejido sano adyacente se basa en la mayor capacidad que tienen las células tumorales o alteradas para captar y concentrar la sustancia fotosensibilizante y su menor velocidad de eliminación. En resumen, la TFD es selectiva, ataca las células neoplásicas y deja intactas las sanas. Una vez que el agente fotosensibilizante es aplicado, es retenido principalmente por los tejidos neoplásicos lo que puede visualizarse por la luminiscencia roja característica al aplicar luz azul o cercana al ultravioleta. Incluso 1 a 3 días después puede activarse el medicamento con una luz láser de alta potencia y de longitud de onda apropiada.

2.4.2.1 Fotosensibilizantes utilizados en la terapia fotodinámica

Gilaberte, Y., Serra, C., Guillén, B., Herasc, M., Ruiz, R., Rodríguez, D., y Fernández, L., (2006). Se utilizan los siguientes: porfirinas, porfinas, porfocenos, phthalocianinas, clorinas, Lutetium texapirina (Lu-Tex), Ácido-aminolevulínico. Las cualidades de estos fotosensibilizante son importantes para la efectividad del tratamiento fotodinámico. Las características que debe reunir son dos:

Capacidad de localizarse específicamente en el tejido o las células que hay que tratar

- Distribución homogénea en el tejido diana
- Alta lipofilia para difundir a través de las membranas biológicas
- Espacio de tiempo lo más breve posible entre su administración y la acumulación máxima en dichos tejidos
- Vida media corta y rápida eliminación de los tejidos normales

- Activación a longitudes de onda con penetración óptima tisular
- Alto rendimiento en la producción de oxígeno (1O₂), o en general de especies reactivas del oxígeno.
- Ausencia de toxicidad en la oscuridad.

2.4.2.2 Cáncer baso celular

Lascano, A., Kuznitzky, R., Garay, L., Duccase, C., y Albertini, R., (2005). El carcinoma basocelular (CBC) es un tumor maligno de la piel que se cree, surge del folículo piloso. Es el cáncer más común en la población blanca mundial, y el tumor cutáneo más frecuente; representa aproximadamente el 70% de las enfermedades malignas de la piel.

La mortalidad por CBC no es alta debido a su bajo potencial metastizante; presenta una incidencia de metástasis entre 0.003% a 0.55%, pero es alta la morbilidad y los costos para el sistema de salud. Es paradójico en medicina, que muchas veces condiciones raras son muy estudiadas mientras que las comunes son dejadas de lado, tal ha sido el caso del CBC; a pesar de su alta frecuencia existen pocos datos sobre factores de riesgo (FR) y menos aún trabajos realizados en poblaciones sudamericanas. Además, hasta hace poco tiempo, el carcinoma espinocelular y el CBC eran estudiados colectivamente como cáncer de piel no melanoma y se atribuían mayormente a la exposición solar acumulada. La distribución del CBC y el carcinoma espinocelular no es la misma, el carcinoma espinocelular es más común en áreas de exposición solar intensa, mientras que el CBC lo es en áreas de exposición moderada. En cambio la luz ultravioleta ha sido aceptada como el principal FR para CBC, la relación causal es mucho menos clara que en el caso del carcinoma espinocelular. Esta relación entre la radiación ultravioleta y el CBC es compleja, y discutida especialmente en cuanto a los patrones de exposición solar en diferentes períodos de la vida, que se suponen críticos para el desarrollo tumoral. Estudios de casos-contrroles recientes documentan una falta de asociación con la exposición solar acumulada y un riesgo aumentado con la

exposición solar en etapas tempranas de la vida. Además de la exposición a radiaciones ultravioletas, factores del huésped, como color del pelo y ojos, tendencia a quemarse con el sol o pobre capacidad de bronceado también han sido asociados a mayor riesgo de CBC. En un número considerable de estudios, el riesgo atribuido a estas variables es relativamente bajo y se ha sugerido que la mayoría de los pacientes con CBC no tienen marcadores fenotípicos identificables de riesgo alto. Lascano, A., y col. (2005).

2.4.2.3 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica en el cáncer basocelular.

La PDT requiere de interacción simultánea entre un agente fotosensible y luz de longitud de onda adecuada con la presencia de oxígeno. Experimentos in vitro han demostrado que las células tumorales son resistentes a PDT con concentraciones bajas de oxígeno. Otros modelos experimentales in vivo con ratas han demostrado la producción de radicales de oxígeno durante la PDT, y se menciona que éste es el elemento clave para este tratamiento. Se ha demostrado una disminución del efecto de PDT en presencia de baja concentración de oxígeno y una disminución del efecto del tratamiento en tejido con hipoxemia. Algunos estudios sugieren que las áreas de hipoxia en el tumor no responden igual a la PDT. Experimentos in vitro han demostrado que la lesión celular más temprana encontrada a nivel de célula tumorales en la membrana plasmática y otras membranas celulares. Se cree que las membranas son el primer blanco debido a que el agente fotosensible se une a estas membranas al penetrar hacia las regiones intracelulares. Experimentos con cultivos celulares muestran que la PDT causa que los movimientos celulares normales cesen y que se transformen en discos resistentes de tipo plástico. Hoy hay fuertes evidencias de que el daño de la membrana celular se muestra con el desarrollo de bulas protuyendo de la membrana.

Por otro lado la lesión mitocondrial se ha demostrado por inhibición de enzimas transportadoras de electrones, reducción en los niveles de trifosfato de

adenosina y bloqueo de la fosforilación oxidativa. Algunos estudios han mostrado lesión del núcleo con ruptura de DNA, pero no se cree que éste sea el mecanismo responsable de la muerte celular. Otros experimentos in vivo han sugerido que el endotelio de la neovascularización tumoral puede ser el primer blanco de la PDT. Estos muestran que hay estasis en el flujo de sangre de arteriolas y vénulas después de la aplicación del tratamiento, y subsecuentemente agregación de neutrófilos y plaquetas que pueden permitir la liberación de componentes vasoactivos, incrementos en la coagulación y pérdida de la integridad de los vasos. Utilizando inhibidores de la ciclooxigenasa se ha demostrado una reducción del efecto de la PDT en arteriolas. Por otro lado la PDT puede reducir la viabilidad del tumor dado la combinación de cambios en la concentración de trifosfato de adenosina, acidosis y un incremento en la presión intersticial del tumor.

2.4.2.4 Espectro electromagnético y las fuentes de luz

Corresponde a la conocida distribución de las energías electromagnéticas, que pueden estar dispuestas según la longitud de onda, su frecuencia o su energía fotonica. En un extremo del espectro se encuentra la energía de una longitud de onda extremadamente baja y en consecuencia de frecuencia y energía fotonica muy elevadas. En este extremo del espectro se encuentran los rayos cósmicos. Los rayos cósmicos primarios son núcleos atómicos (en los que alrededor del 87% son protones) y por tanto, no son fotones. Sin embargo, poseen energías cuánticas, por lo que pueden colocarse en el espectro. Los rayos cósmicos secundarios incluyen fotones muy energéticos. Las longitudes de onda un poco más largas (frecuencia menores, fotones menos energéticos) corresponde a los rayos gamma, que se solapa en el espectro que corresponde a los rayos X. la radiación ultravioleta tiene longitudes de onda un poco más cortas que las de la parte visible. Espín, A., (2011)

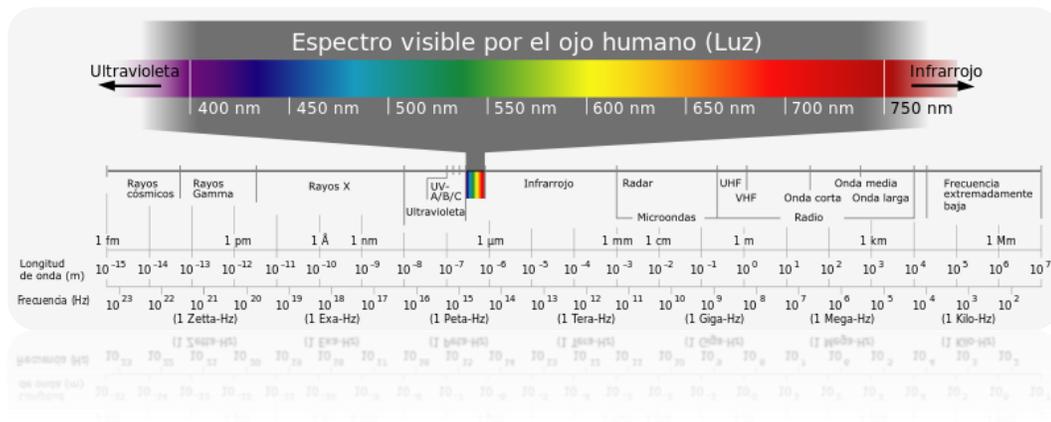


Fig. 19 tomado de (pagina web en línea) Disponible:

<http://luzvisiblejstt.blogspot.com/2011/04/indice.html> (Consulta: 2013, Octubre 20)

2.4.2.5 Luz ultravioleta

Burn, R., (2003). La radiación ultravioleta (UV) tiene longitudes de ondas más cortas que las de luz visible. Las longitudes de onda UV más próximas a la luz visible, se conoce como "UV cercano". Las longitudes de ondas más cortas se les denominan "UV lejano". Además se emplean tres categorías, UV-A, UV-B y UV-C, para identificar longitudes de onda de UV largas, medianas y cortas, respectivamente. Lo que se conoce como "luz negra" es en realidad UV (principalmente UV cercano). Cuando las radiaciones UV inciden en ciertas rocas o ciertos tipos de pintura, los objetos presentan fluorescencia, Parecen despedir luz propia al ser bombardeada por los rayos UV. Esto sucede cuando los electrones de los átomos de un material absorben rayos UV y luego despiden esta energía emitiendo luz visible de menor energía. La luz emitida hace que el material parezca resplandecer.

2.4.2.6 Radiación fotosintéticamente activa (PAR, photosynthetically active radiation).

Espin, A., (2011) .Cantidad de radiación integrada del rango de longitudes de onda que son capaces de producir actividad fotosintética en las plantas y otros organismos fotosintéticos como microalgas y bacterias. Este rango es el comprendido aproximadamente entre los 400 y los 700 nanómetros y se corresponde, también aproximadamente, con el espectro visible.

2.4.3 El grupo Hemo

Guerrero, N., y Sánchez, R., (2004).El grupo hemo son compuestos que están directamente involucrados en reacciones de oxidoreducción, oxigenación, hidroxilación y en aquellas relacionadas al transporte, almacenamiento de oxígeno y otros gases biatómicos (CO, NO). Asociados a proteínas, los hemos pueden participar en la unión de ligandos y servir de sensores durante la transducción de señales dependientes de oxígeno y óxido nítrico en rhizobium y en mamíferos. El grupo hemo se une a diversas proteínas para formar las hemoproteínas, estas se encuentran involucradas en la captación, el transporte y la transferencia del oxígeno en el organismo o en la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones mencionadas al principio. La especificidad de las enzimas por el tipo de reacción o por el sustrato depende de la porción proteínica de las mismas.

La captación, el almacenamiento y el transporte del oxígeno por la mioglobina y hemoglobina requiere del estado reducido del hierro (Fe⁺²). La oxidación de este Fe⁺³ destruye su actividad biológica. El Fe⁺² se une al anillo tetrapirrólico por cuatro posiciones de coordinación, la quinta y sexta posición quedan perpendiculares al anillo hacia arriba y abajo del mismo, mediante la quinta posición se une al nitrógeno del imidazol de un residuo de histidina de la proteína, y en la sexta puede unirse de manera irreversible al oxígeno. Esta última posición también tiene gran afinidad por el monóxido de carbono. En el caso de los citocromos el hierro se

interconvierten entre sus estados oxidado y reducido durante el transporte de los electrones, y su quinta y sexta posiciones de coordinación se unen a cadenas laterales de aminoácidos de la porción proteínica. En la catalasa y las hemoperoxidasas el hierro debe estar en su estado férrico (Fe^{+3}).

2.4.3.1 Estructura del hemo

El grupo hemos es un heterotetrámero constituido por cuatro cadenas polipeptídicas denominadas globinas: dos tipo α y dos tipo β , cada una de las cuales posee en una hendidura hidrofóbica con un grupo prostético hemo, que posee el lugar de unión del oxígeno. Las hemoglobinas son usualmente las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en los eritrocitos circulantes en la sangre de los vertebrados, teniendo como funciones principales el transporte de oxígeno (O_2) desde los pulmones hacia los tejidos periféricos y de dióxido de carbono (CO_2) desde los tejidos hacia los pulmones. A pesar de su función principal es transportar oxígeno, pueden actuar específicamente con otros 3 gases: dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), y óxido nítrico (NO), los cuales tienen roles biológicos muy importantes. A pesar de la marcada diferencia de aminoácidos, son evidentes las similitudes de las estructuras terciarias de las diferentes hemoglobinas, lo que indica que todas las hemoglobinas están evolutivamente relacionadas. El único punto de unión directa entre el grupo hemo y el centro de la proteína es la coordinación entre el hierro del grupo hemo y la histidina proximal en la posición F8. Los ligandos, tales como el oxígeno, se unen al hierro del grupo hemo en el lado opuesto, o distal, adyacente a la hélice E, por medio de la muy bien conservada histidina H7. Aminoácidos adicionales estabilizan la unión del grupo hemo por medio de interacciones no covalentes (Figura B) (Thom et al., 2013). El hierro debe encontrarse en su forma reducida (hierro ferroso, Fe^{2+}) para que se permita la unión del oxígeno; la hemoglobina oxidada o “met” (metHb, hierro oxidado, Fe^{3+}) es relativamente inestable, tiende a perder el grupo hemo y desnaturalizarse, de modo que los glóbulos rojos han desarrollado mecanismos elaborados para mantener la Hb en su estado

reducido Por ejemplo, el sistema methemoglobinoreductasa convierte metHb a su forma reducida

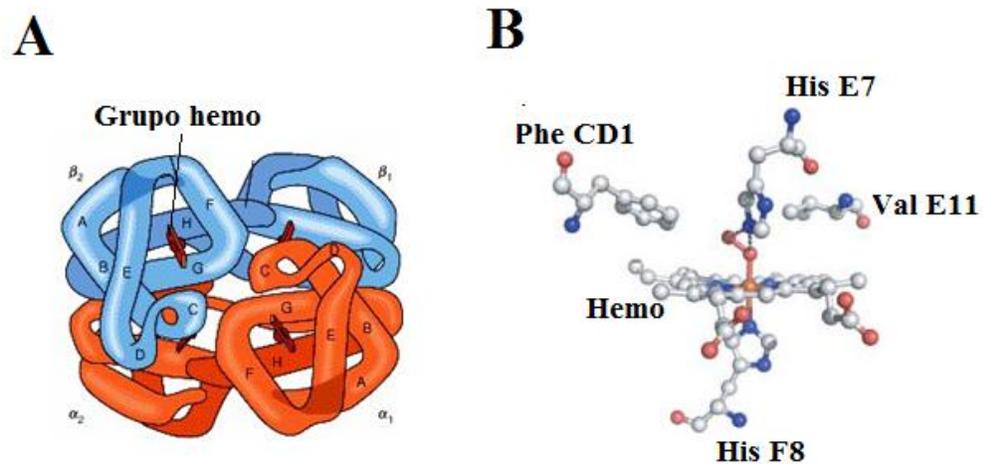


Figura 20. Representación de la estructura de la hemoglobina. (A). La hemoglobina contiene dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas, y cada una incluye un grupo hemo (en rojo). Las letras A-H señalan regiones de la α hélice. (B). Estero diagrama del bolsillo hemo de la β globina.

2.4.4 Porfirinas

Según Pino, F., y Pérez, D. (1987), Las porfirinas están implicadas en procesos biológicos redox y de transporte de oxígeno. Uno de los papeles más importantes puede encontrarse en la fotosíntesis. La estructura de las porfirinas se caracterizan por estar constituidas por cuatro anillos pirrolicos unidos por cuatro puentes de α -metenilo ($-\text{CH}=\text{}$) para formar un anillo planar (los carbonos de los anillos pirrolicos y los puentes metenilo quedan en el mismo plano). Para la descripción de las porfirinas se puede tomar como base la estructura conocida como porfina. En su anillo hay 8 átomos de hidrogeno, los cuales pueden sustituirse con diversas cadenas laterales como metilos, etilos, vinilos, propionatos entre otras. Las porfirinas se clasifican de acuerdo con sus cadenas laterales en etioporfirinas, mesoporfirinas, protoporfirinas y coproporfirinas.

Las porfirinas forman complejos con iones metálicos, principalmente con magnesio, hierro y zinc. En el caso de las clorofilas, los complejos se forman con magnesio, y con el hierro para el grupo hemo. Estos iones forman complejos con los cuatro átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos y se ubican en el anillo tetrapirrólico de manera casi plana a este.

2.4.4.1 Propiedades espectrales de las porfirinas

El espectro de absorción de las porfirinas se caracteriza por una banda intensa alrededor de 400 nm correspondiente a la transición al segundo estado excitado ($S_0 - S_2$) y una banda débil en 520 nm correspondiente a la transición al primer estado excitado ($S_0 - S_1$).

2.4.4.2 Síntesis de las porfirinas y del grupo hemo

Las porfirinas se originan a partir de la condensación del aminoácido glicina succinil-CoA, esto da lugar en tres pasos, al porfobilinogeno. La condensación de 4 moléculas de este intermediario forma el núcleo tetrapirrólico del uroporfirinogeno III, las subsiguientes modificaciones y oxidaciones dan lugar a la protoporfirina IX. La inserción de hierro como quelato en esta molécula conduce directamente a la formación del grupo hemo. Stanier, R., y col (1996).

Como se mencionó anteriormente la síntesis del grupo hemo inicia la condensación de la succinil-CoA con glicina y una descarboxilación posterior, se forma el 5 aminolevulinato (ALA). La enzima responsable de ese paso (ALA sintasa), es la enzima clave de toda la vía. El 5 aminolevulinato sale de las mitocondrias. En el citoplasma se condensan dos moléculas para formar el porfobilinogeno, que ya contiene el anillo pirrólico. La porfobilinogenosintasa es inhibida por los iones de plomo. En estos siguientes pasos se forma la estructura característica de las porfirinas, que es el tetrapirrol. En esta ruta, 4 moléculas de porfobilinogeno se combinan y forman el uroporfirinogeno III, esta reacción es

catalizada por la hidroximetilbilanosintasa, por liberación de grupos NH₂. Para la formación de este compuesto intermedio se requiere una segunda enzima, la uroporfirino III sintasa, si falta esta enzima se formara un isómero falso como es el uroporfirino I.

Tomando los 4 residuos de acetato (R1) son descarboxilados hasta grupos metilos. El uroporfirino III formado llega nuevamente a las mitocondrias. Los pasos siguientes son catalizados por enzimas localizados al lado o dentro de la membrana mitocondrial interna. La modificación de la cadena lateral termina con la formación del protoporfirino IX. En el siguiente paso se forma nuevas oxidaciones el sistema conjugado de electrones de la protoporfirina IX, finalmente se incorpora hierro bivalente al anillo. Para esto también hay una enzima especial, llamada ferroquelatasa. Koolman, J., y Rohm, K., (2004).

2.4.5 ¿De dónde viene la leghemoglobina?

2.4.5.1 Familia Fabaceae

Bustos, M., (2010). La familia Fabaceae comprende. 700 géneros y 18000 especies de plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas que son consideradas claramente monofilética en análisis tanto moleculares como morfológicos, sin embargo según Takhtajan 1997 era tratada como tres familias distintas. En las actuales reconstrucciones de filogenia, la subfamilia Caesapinoceae es considerada parafilética, mientras que las subfamilias Mimosoideae y Faboideae (o Papilionoideae) son consideradas monofiléticas. Sin embargo, actualmente el reconocimiento de la subfamilia Caesapinoceae se mantiene por razones meramente prácticas.

Las Fabaceae Son plantas cosmopolitas, siendo su distribución más frecuente en climas tropicales y subtropicales. Después de los cereales, constituyen el segundo

grupo de plantas cultivadas más importante, abarcando un 12% de las tierras agrícolas en el mundo.

En 1939, Kubo identificó en nódulos de soja una proteína, la Lb, con características similares a la mioglobina de mamíferos. Los genes que codifican las Lbs se expresan únicamente en las células infectadas de los nódulos, una vez establecida la simbiosis con los rizobios del suelo. Inicialmente, se pensó que las Lbs eran exclusivas de leguminosas, pero posteriormente se detectaron Lbs que transportan O₂ durante la FBN en otras especies de plantas (*Parasponia andersonii*, *Casuarina glauca*, *Alnus firma*) capaces de formar simbiosis. Sin embargo, estas Hbs no son exclusivas de los nódulos, expresándose en otros tejidos de la planta.

Los promotores de los genes Lb contienen motivos conservados, denominados “cajas de nodulación”, que corresponden a las secuencias AAAGAT y CTCTT, separadas entre sí por seis nucleótidos. Estos motivos no están presentes en las Hbs simbióticas de no leguminosas, ni en las Hbs no simbióticas de plantas, por lo que parecen ser la clave para la localización específica de estas proteínas en nódulos de leguminosas.

Las Lbs. facilitan el transporte de O₂ hasta la membrana simbiosomal, evitando la inactivación irreversible de la nitrogenasa. Esta función es posible gracias a la rápida asociación de la hemoproteína con el O₂ y a la lenta disociación del mismo. Su papel durante la FBN se ha comprobado en plantas de *L. japonicus* mediante el silenciamiento de los genes que codifican para las tres Lbs. de esta especie mediante la técnica de RNA de interferencia. En estos estudios, las plantas mostraban un aumento en la concentración de O₂ libre en la célula, descenso en la proporción ATP/ADP y pérdida de la actividad nitrogenasa; no obstante, cuando se les suministró N en la solución nutritiva, las plantas crecieron igual que las plantas control.

2.4.5.2 Clave artificial para el reconocimiento de las subfamilias

Flores actinomorfas, que forman capítulos, espigas o racimos. Corola con prefloración valvar y con frecuencia gamopétala. Estambres 4-8-∞, sobrepasando la corola; filamentos libres. Polen frecuentemente en políadas. Semillas con línea fisural.

2.4.5.2 .1 Mimosoideae

Flores zigomorfas, generalmente en racimos. Prefloración imbricada. Corola con pétalos libres (por lo menos en la base) y a menudo unguiculados. Estambres generalmente 10, libres o soldados. Granos polínicos libres. Semillas sin línea fisural.

Prefloración de la corola ascendente; estandarte interno. Estambres 3-10. Sépalos generalmente libres. Hojas bipinnadas o pinnadas.

Características de la subfamilia Mimosoideae

Porte: árboles, arbustos, sufrútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.

Hojas: bipinnadas, excepcionalmente pinnada (*Inga* sp.), alternas.

Flores: agrupadas, abreviadas en cabezuelas o capítulos y éstos, en muchos casos agrupados secundariamente en racimos o panojas.

Perianto: sépalos reducidos, 5; pétalos 4-5, generalmente, unidos en la base formando una copa hipógina.

Estambres: infinitos, filamentos muy largos, anteras pequeñas. En esta subfamilia los estambres exertos constituyen la parte más vistosa de la flor.

Gineceo: generalmente unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con óvulos en hilera de placentación marginal.

Fruto: comúnmente seco y dehiscente por ambas suturas, a veces indehiscente o con dehiscencia transversal.

Semillas: ranurada, con embrión largo.

2.4.5.2.2 Caelsapiniaceae

Prefloración de la corola descendente; estandarte externo. Estambres 10, generalmente 9 más 1 (diadelfo). Sépalos generalmente soldados. Hojas pinnadas o digitadas, nuca bipinnadas.

2.4.5.2.2.1 Características de la subfamilia Caelsapiniaceae.

Porte: árboles, arbustos, sufrútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.

Hojas: bipinnadas, pinnadas, bifolioladas.

Flores: zigomorfas, generalmente en racimos, simples, axilares o terminales.

Perianto: sépalos 5 libres, diminutos o no; pétalos 5, 1 (de arriba o abajo) diferenciado (estandarte) y cubierto en la base por los demás.

Estambres: generalmente 10 (o menos), libres, insertos en la copa floral.

Gineceo: unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con numerosos óvulos de placentación parietal.

Fruto: comúnmente seco y dehiscente por ambas suturas, a veces indehiscente o con dehiscencia transversal.

Semillas: con funículo elongado, a veces con arilo.

2.4.5.2.3 Características de la subfamilia Papilionoideae

Porte: árboles, arbustos, sufrútices o hierbas, perennes o anuales, también trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, de tallo voluble o con zarcillos.

Hojas: pinnadas, trifolioladas, palmatipinnada.

Flores: zigomorfas, dispuestas generalmente en racimos.

Perianto: sépalos 5, más o menos unidos y frecuentemente desiguales. Corola inserta en la base del cáliz, pétalos 5, irregulares, generalmente 2+2+1, el pétalo superior diferenciado (estandarte) más grande y encerrando a los demás, 2 pétalos laterales formando las alas y 2 inferiores unidos formando la quilla que envuelve y protege a los estambres y el gineceo.

Estambres: 10 monadelfos (9 estambres unidos por sus filamentos formando un tubo que aloja al gineceo +1 estambre libre), raramente 5.

Gineceo: unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con numerosos óvulos de placentación parietal.

Fruto: seco y dehiscente por ambas suturas, a veces folicular o indehiscente.

Semillas: con corto funículo.

2.4.5.3 *Lupinus Meridanus*

Según Briceño, B., Azocar, A., Fariñas, M., y Rada, F., (2000). El género *Lupinus* L. (Fabaceae) comprende aproximadamente 150 especies que incluye, especies herbáceas anuales y perennes, así como algunos arbustos de madera suave y árboles pequeños. Las plantas de este género se pueden encontrar en un amplio rango de

condiciones eco geográficas tanto en el nuevo como en el viejo mundo, especialmente en climas alpinos, templados y subtropicales, con una amplia distribución en América desde el oeste de los Estados Unidos a través de la cordillera Andina hasta las Pampas Argentinas. En los Andes de Venezuela, *Lupinus s.l meridanus moritz* crece desde 1800 hasta 3600 msnm.

Las plantas de este género son llamadas altramuz, chocho, lupín, lupino o tremosos (del portugués tremoços). Son plantas de tallo erecto, que habitualmente miden entre 5 dm y 2 m de altura (Figura 21A). Sus hojas están formadas por un número impar de folíolos y su aspecto es semejante al de una mano.

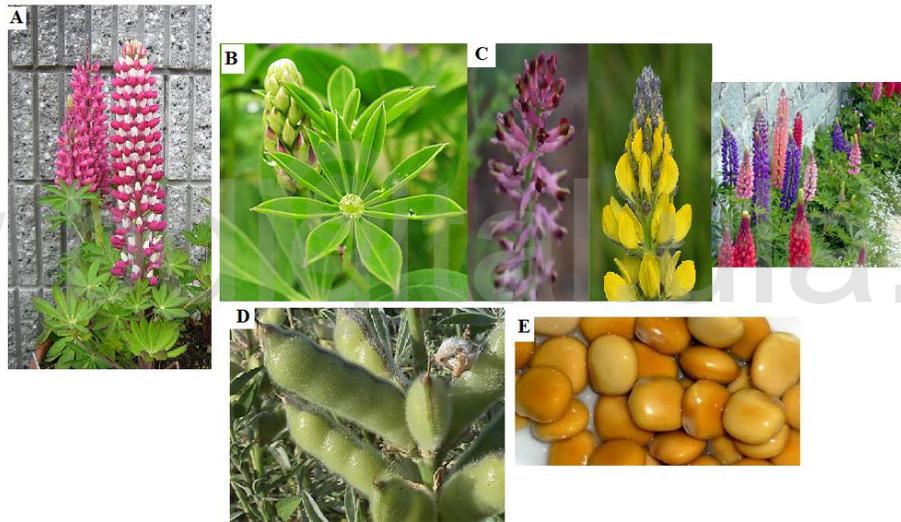


Fig. 21 Plantas del género *Lupinus*. A. Planta de *Lupinus* del tipo herbácea. B. Forma de la hoja de *L. luteus*. C. Flores de *L. albus*, *L. luteus* y *L. polyphyllus*. D. Fruto de *L. luteus*. E. Semilla de *L. albus*.

En las especies silvestres y las cultivadas con propósitos ornamentales, las flores se reúnen en largas y vistosas inflorescencias, sin embargo, las especies cultivadas para la alimentación suelen tener inflorescencias más pequeñas y poco notorias. Los colores de los pétalos varían desde el blanco al azul intenso, con predominio de tonos azulados y rosados (Figura 21C). Su fruto es una legumbre que contiene semillas con forma de esfera achatada, compuestas principalmente por

proteínas (43%), fibras (25,5%), azúcares (13,5%) y minerales (cobalto, fósforo y potasio) (Figura 21D). es una de las leguminosas de mayor interés ecológico y agronómico, por ser una de las que más fija N en el suelo, repercutiendo muy positivamente sobre la agricultura y el medio ambiente, constituyendo una de las mayores promesas de la agricultura sostenible (Antón et al., 2006).

Algunas de las especies de *Lupinus* muestran altos niveles de tolerancia a estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, *L. hispanicus* presenta una alta tolerancia a las enfermedades y una excelente adaptación a suelos pobres en nutrientes, pero contiene altos niveles de alcaloides y baja productividad en cultivo (Múzquiz et al., 1989). Se considera que los lupinos tienen un origen poliploide. *L. luteus* se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de la región Mediterránea, puede sembrarse a poca profundidad y tiene varios rendimientos dependiendo de las condiciones de cultivo. Adicionalmente, el lupino amarillo tiene el mayor contenido de proteínas y el doble de cisteína y metionina que la mayoría de los *Lupinus* (Berville et al., 2003; Glencross et al., 2004).

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Especie: *Lupinus Meridanus*

2.4.5.4 Partes de Lupinus

2.4.5.4.1 Hoja: Las hojas son órganos vegetativos, generalmente aplanados, situados lateralmente sobre el tallo, encargados de la fotosíntesis. Gonzales, A. (2013)

2.4.5.4.2 Pimpollo: Se usa para nombrar al tallo incipiente que crece en una planta, a una flor que está a punto de abrirse o un árbol que recién empieza a desarrollarse. Según la RAE.

2.4.5.4.3Nódulo:En las leguminosas es una estructura biológica compleja, actualmente se sabe que el color rojo que presenta en su interior se debe a la leghemoglobina, hemoproteína monomérica que se encuentra predominantemente en el citosol de las células infectadas, cuya función más reconocida es la de actuar como regulador del flujo de oxígeno disuelto que pueda llegar a los bacteroides, manteniendo las tensiones de oxígeno lo suficientemente bajas para que permitan cubrir las demandas respiratorias de éstos y manteniendo concentraciones de oxígeno internas apropiadas para el funcionamiento de la nitrogenasa, citando a Skwierinski, R., Jaimes,R. y Muñoz, A. (1995).



Fig22. Nódulos de *Lupinus meridanus*

Dice Silva, C., y Vinuesa, P., (2006). Son bacterias heterótrofas aerobias que viven en el suelo como saprófagos. Cuando una leguminosa compatible está presente se establece una estrecha comunicación química que es la base de la simbiosis. Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides que activan la expresión de los genes de nodulación en los Rizobios, que se encargan de producir y secretar los factores que disparan la organogénesis de los nódulos. Los Rizobios infectan las células de los

nódulos, dentro de ellas se diferencian en bacteroides y llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. La planta provee de carbohidratos a los bacteroides dentro del nódulo para sostener su metabolismo. Esta interacción es una simbiosis protocooperativa ya que no es obligatoria para ninguno de los dos simbiosomas.

2.4.5.5 Rizobios

2.4.5.5.1 Interacción Rizobios-Leguminosas.

Sadowsky y Graham, 1998; Sawada et al., 1993 (cit. Por Silva, C., y Vinuesa, P., 2006). Las bacterias que ocupan los nódulos de plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado Rizobios. La característica fenotípica que las distingue de otras bacterias es su habilidad de disparar el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o tallos de plantas hospederas específicas que con una excepción, son leguminosas.

A pesar de que la simbiosis establecida entre Rizobios y leguminosas es la interacción planta-bacteria más estudiada. Los Rizobios cubren un espectro ecológico muy amplio: se les encuentra como saprófagos en el suelo y el agua dulce, viven como rizobacterias en la rizósfera de leguminosas y otras plantas, y pueden colonizar el nicho ecológico único de los nódulos en los que, tras ser endocitados por las células del hospedero, se diferencian en bacteroides. En sus historias de vida alterna estadios de vida libre en el suelo y la rizósfera, con estadios endosimbióticos en los que se alojan en un compartimiento intracelular del tejido central del nódulo, denominado simbiosoma.

La asociación con los Rizobios permite a las leguminosas colonizar exitosamente hábitats deficientes en nitrógeno, donde otras plantas crecen difícilmente. . La asociación con las leguminosas beneficia directamente a las poblaciones de Rizobios dentro de los nódulos al proporcionarles protección y

fuentes de carbono, e indirectamente a las poblaciones de la rizósfera al suministrarles compuestos necesarios para su crecimiento a través de los exudados de las raíces. Esta interacción se considera una simbiosis mutualista pero al no ser obligatoria, se trata más de una relación de protooperación que de mutualismo en sentido estricto.

2.4.5.6 Fijación de Nitrógeno.

Wagner, S., (2012) dice que el nitrógeno es un elemento crítico limitante para el crecimiento vegetal y la producción. Es un componente importante de la clorofila es el pigmento más importante que se necesita para la fotosíntesis, así como los aminoácidos que son bloques de clave de la construcción de proteínas. También se encuentra en otras biomoléculas importantes, tales como ATP y ácidos nucleicos. A pesar de que es uno de los elementos más abundantes (predominantemente en forma de gas nitrógeno (N_2) en la atmósfera de la Tierra), las plantas sólo pueden utilizar formas reducidas de este elemento. Las plantas adquieren estas formas de nitrógeno "combinado" por: 1) la adición de amoníaco y / o fertilizante de nitrato (desde el proceso de Haber-Bosch) o estiércol a suelos, 2) la liberación de estos compuestos durante la descomposición de la materia orgánica, 3) la conversión de nitrógeno atmosférico en los compuestos por procesos naturales, como rayos, y 4) la fijación biológica de nitrógeno (Vance, 2001cit Wagner, S., 2012.). La Fijación biológica de nitrógeno (FBN), descubierto por Beijerinck en 1901, se lleva a cabo por un grupo especializado de procariotas. Estos organismos utilizan la enzima nitrogenasa para catalizar la conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco (NH_3). Las plantas pueden asimilar fácilmente NH_3 para producir las biomoléculas nitrogenadas antes mencionados. Los procariotas incluyen organismos acuáticos, tales como bacterias, las cianobacterias de vida libre del suelo, como *Azotobacter*, bacterias que forman las relaciones asociativas con las plantas, tales como *Azospirillum*, y lo más importante, las bacterias, tales como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, que forman simbiosis con las leguminosas y otras plantas (Postgate

1982, cit Wagner, S., 2012). Estos organismos se resumen en la Figura 22.

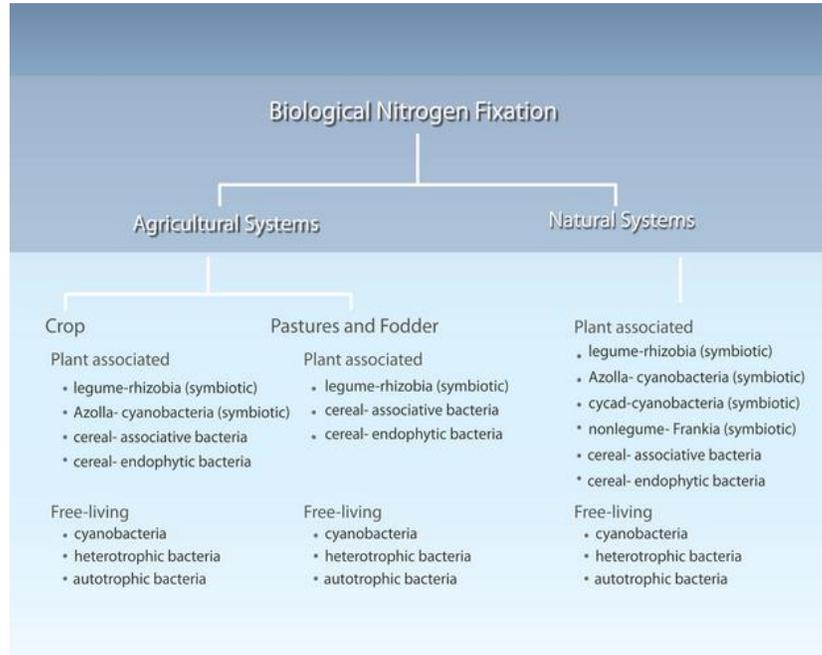
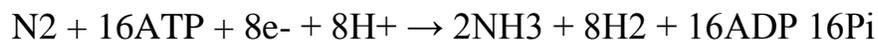


Fig. 23. Tomada de Wagner, S., (2012). Fijación biológica del nitrógeno. *Revista Nature Education Knowledge*, 3, (10), 15.

El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN, por sus siglas en español). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y permite no sólo usar el nitrógeno atmosférico, sino también revertir o reducir la degradación del suelo.

La fijación en general supone la incorporación a la biosfera de una importante cantidad de nitrógeno, que a nivel global puede alcanzar unos 250 millones de toneladas año, de las que 150 corresponden a la fijación biológica. Es un proceso altamente consumidor de energía que ocurre con la mediación de la enzima nitrogenada, según la siguiente ecuación



Esta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H₂ producido por mol de N₂ reducido (Halbleib y Luden, 2000, cit, por Flores, A., Herrera, R., y Esquivel, J., 2009). La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos (e.j. alta tasa respiratoria, compartimentalizaciones o protección conformacional) que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de conservar la enzima funcionando. La nitrogenasa es un heterodímero formado por una subunidad grande y otra pequeña.

La subunidad grande está compuesta a su vez por cuatro subunidades polipeptídicas iguales dos a dos, mientras que la subunidad pequeña está compuesta a su vez por dos subunidades aparentemente idénticas. Ambas subunidades de la nitrogenasa contienen átomos de hierro y azufre, conteniendo además molibdeno.

La información genética de la bacteria para fijar nitrógeno está dada en un cluster de genes denominado nif. Gracias a algunos experimentos genéticos y a experimentos con mutantes se ha llegado a localizar los genes del cluster nif en el cromosoma bacteriano.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son componentes importantes del suelo y requieren una fuente de energía química si no son fotosintéticas, las cuales a su vez utilizan la energía de la luz solar. Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse: anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas) (Mayz-Figueroa, 2004, cit por Flores, A., Herrera, R., y Esquivel, J.2009) Las bacterias aeróbicas dependen fuertemente de las condiciones de humedad, oxígeno y materia orgánica, y las anaeróbicas son predominantes en suelos anegados donde existen las condiciones de humedad y materia orgánica, pero el suministro de oxígeno está restringido. La FBN en los suelos tropicales con las condiciones requeridas de humedad, temperatura y materia orgánica es generalmente alta. Se

reporta que el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es particularmente elevado en la zona adyacente a la raíz (rizósfera), debido a la liberación de compuestos orgánicos que le sirven como nutrimento.

Las bacterias aeróbicas emplean dos mecanismos de protección de la nitrogenasa: la protección respiratoria, donde se produce una elevada tasa respiratoria a expensas de un alto consumo de carbono y energía, manteniendo así una concentración intracelular de oxígeno baja, y la protección conformacional, en la cual la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva. Flores, A., Herrera, R., y Esquivel, J., (2009).

2.4.5.6.1 Fijación simbiótica de nitrógeno

Muchos microorganismos fijan nitrógeno simbióticamente al asociarse con una planta huésped. La planta proporciona los azúcares de la fotosíntesis que son utilizados por los microorganismos que fijan el nitrógeno. Un ejemplo de este tipo de la fijación de nitrógeno es el agua helecho *Azolla* que posee una simbiosis con una cianobacteria *Anabaenaazollae*. *Anabaena* coloniza cavidades formadas en la base de *Azolla* frondas. Allí las cantidades significativas de cianobacterias fijan nitrógeno en las células especializadas llamadas heterocistos. Esta simbiosis se ha utilizado durante al menos 1000 años como biofertilizante en campos de los humedales en el sudeste de Asia. Otro ejemplo es la simbiosis entre actinorrícicas árboles y arbustos, como el aliso (*Alnus* sp.), con el actinomiceto *Frankia*. Estas plantas son nativas de América del Norte y tienden a prosperar en ambientes pobres en nitrógeno. En muchas áreas que son las más comunes fijadores de nitrógeno no leguminosas y son a menudo las especies pioneras en las comunidades vegetales de sucesión. Actinorrícicas plantas se encuentran en muchos ecosistemas, incluyendo alpino, xérico, chaparral, bosques, glaciares, ribera, dunas costeras y la tundra ártica (Benson&Silvester, 1993citWagner, S., 2012). A pesar de que los socios simbióticos descritos anteriormente desempeñan uno de los papeles más importantes en el mundo de la ecología y fijación del nitrógeno, con mucho, las asociaciones simbióticas

fijadoras de nitrógeno más importantes son las relaciones entre las leguminosas *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Las leguminosas importantes son utilizadas en los sistemas agrícolas incluyendo la alfalfa, habas, trébol, caupí, altramuces, cacahuete, soja y vezas. De las leguminosas en la producción agrícola, la soja se cultivan en 50% de la superficie mundial dedicada a las leguminosas, y representan 68% de la producción mundial total de leguminosa (Vance, 2001cit Wagner, S., 2012).

2.4.5.6.2 Formación de nódulos de leguminosas

Los *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* son bacterias que colonizan el sistema radicular de la planta huésped haciendo que las raíces formen nódulos que albergen las bacterias (Figura 3). Las bacterias luego comienzan a fijar el nitrógeno requerido por la planta. El acceso al nitrógeno fijo permite a la planta producir hojas enriquecidas con nitrógeno que pueden ser recicladas en toda la planta. Esto permite a la planta aumentar la capacidad fotosintética y a su vez los rendimientos de semilla rica en nitrógeno. Las consecuencias de las legumbres al no está moduladas pueden ser muy dramáticas, especialmente cuando las plantas se cultivan en suelos pobres en nitrógeno. Las plantas resultantes son típicamente de clorótico, bajo en contenido de nitrógeno, y producen muy poca semilla.

El proceso comienza cuando los rizobios son atraídos a los flavonoides liberados por las raíces de las leguminosas. Para las leguminosas como la alfalfa, el trébol y la soja (otros como altramuces y cacahuetes forman nódulos en otras formas) luego comienzan a adherirse a las extensiones de las células epidérmicas de las raíces llamados pelos radicales. El proceso de unión es en realidad un proceso de dos pasos, donde las bacterias se adhieren primero usando una Ca^{2+} - proteína de unión llamado rhicadhesin. Después de que las bacterias se acumulan y se anclan a la superficie de la raíz del cabello, a un archivo adjunto más firme que implica lectinas y / o fibril celulosa y fimbrias producido por la planta huésped y bacterias, respectivamente. El leguminoso anfitrión produce en ambos sentidos sustancias químicas producidas por los rizobios que llama factores Nod haciendo que los pelos de la raíz colonicen para

rizar y formar lo que se llama un cayado de pastor. Entonces el rizobios penetra en los pelos de la raíz y típicamente forma una estructura tubular llamada una rosca de infección. Una vez que las bacterias lleguen a la raíz misma, estimulan las divisiones de células corticales que conducen a la formación de un nódulo.

A medida que el nódulo se empieza a formar, las bacterias se rodean por una membrana de origen vegetal y se liberan dentro de las células de la planta que forma el nódulo. Posteriormente, las bacterias pierden sus paredes celulares y se someten a un profundo cambio en la morfología celular para formar grandes, células de ramificación de forma irregular llamados bacteroides. Después de esto son totalmente dependientes de la planta huésped para sus necesidades energéticas. A cambio, las bacterias fijan nitrógeno para la planta. La interacción entre las bacterias y leguminosas es tan compleja que una determinada *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* nodular acepta, sólo un selecto número de géneros de plantas. Por ejemplo, *Rhizobium meliloti* sólo nodular alfalfa, mientras que *Rhizobium leguminosa rumbiovartrifoli* sólo nodular trébol (*Trifolium*). Esta especificidad de hospedador se refiere a cruzar celda de grupo de inoculación de señalización entre las bacterias y el huésped leguminosa. Los factores Nod antes mencionados han sido identificados como oligosacáridos lipochition. Las variaciones en las estructuras de estos oligosacáridos permite determinar la especificidad del huésped de la bacteria citado por Wagner, S., (2012). Grupos de inoculación transversales principales se enumeran en la Tabla 3.

Cultivo	Las bacterias nodulantes
Alfalfa	<i>Sinorhizobiummelilotii</i>
Frijoles	<i>Rhizobiumleguminosarumbiovarphaseoli</i> y <i>Rhizobiumtropicum</i>
Trébol	<i>Rhizobiumleguminosarumbiovartrifolii</i>
Loto	<i>Mesorhizobium Loti</i>
Chícharos	<i>Rhizobiumleguminosarumbiovarviceae</i>
Haba de soja	<i>Bradyrhizobiumjaponicum</i> , <i>Bradyrhizobiummelkanii</i> , <i>Rhizobiumfredii</i>
Sesbania	<i>Azorhizobiumcaulinodans</i>

Tabla 3. Los principales grupos de inoculación cruzada de las leguminosas. Tomada de Wagner, S., (2012). Fijación biológica del nitrógeno. *Revista Nature Education Knowledge*, 3, (10), 15.

2.4.5.7 Leghemoglobina

Las hemoglobinas de las plantas constituyen un grupo diverso de hemoproteínas, y de acuerdo si han sido encontradas en plantas que formen simbiosis o no, se clasifican en (Vázquez, L., et al, 2012):

2.4.5.7.1 Hemoglobinas simbióticas, como la leghemoglobinas, se encuentran en plantas que son capaces de participar en simbiosis con microorganismos, donde su función principal es regular la cantidad de oxígeno que está disponible para las bacterias fijadoras de nitrógeno. En este grupo se pueden distinguir las leghemoglobinas, encontradas en los nódulos de plantas leguminosas fijadoras de nitrógeno; y otras hemoglobinas simbióticas (Hbs) en nódulos de plantas no leguminosas.

2.4.5.7.2 Hemoglobinas no simbióticas se han descubierto desde mediados de la década de los 90, y se piensa que son los predecesores evolutivos de las hemoglobinas simbióticas. Las hemoglobinas no simbióticas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino plantae, Se ha propuesto que su función puede ser de transportadores de oxígeno para facilitar la difusión del mismo, o como sensor de oxígeno para regular la expresión de proteínas anaeróbicas durante los periodos de baja concentración de oxígeno. Además, debido a que se ha encontrado que el ATP está involucrado en la regulación del gen de la hemoglobina, se ha propuesto la hipótesis de que las mismas pueden participar en el metabolismo energético de las plantas (Vázquez-Limón et al., 2012; Matilla y Rodríguez, 2013).

Sin embargo, de acuerdo a su afinidad por el oxígeno, se han clasificado en tres clases diferentes: la clase 1, poseen alta afinidad por el oxígeno y su función principal es secuestrar óxido nítrico (NO) a bajos niveles de oxígeno; la clase 2, tienen menor afinidad por el oxígeno y lo transportan a los tejidos en desarrollo, como es el caso de la hemoglobinas simbióticas; y la clase 3, con hemoglobinas truncadas, muy poco similares a las clases 1 y 2, y se piensa que pueden regular la entrega de oxígeno a altas concentraciones de O₂ (Gupta et al., 2011). En este apartado es de especial interés la estructura, función y genes las hemoglobinas simbióticas: las leghemoglobinas.

Según Bustos, M., (2010). En 1939, Kubo identificó en nódulos de soja una proteína, la Lb, con características similares a la mioglobina de mamíferos. Los genes que codifican las Lbs se expresan únicamente en las células infectadas de los nódulos, una vez establecida la simbiosis con los rizobios del suelo. Inicialmente, se pensó que las Lbs eran exclusivas de leguminosas, pero posteriormente se detectaron Lbs que transportan O₂ durante la FBN en otras especies de plantas (*Parasponia andersonii*, *Casuarina glauca*, *Alnus firma*) capaces de formar simbiosis Sin embargo, estas Hbs no son exclusivas de los nódulos, expresándose en otros tejidos de la planta.

Las Lbs facilitan el transporte de O₂ hasta la membrana simbiosomal, evitando la inactivación irreversible de la nitrogenasa. Esta función es posible gracias a la rápida asociación de la hemoproteína con el O₂ y a la lenta disociación del mismo. Su papel durante la FBN se ha comprobado en plantas de *L. japonicus* mediante el silenciamiento de los genes que codifican para las tres Lbs. de esta especie mediante la técnica de RNA de interferencia. En estos estudios, las plantas mostraban un aumento en la concentración de O₂ libre en la célula, descenso en la proporción ATP/ADP y pérdida de la actividad nitrogenasa; no obstante, cuando se les suministró N en la solución nutritiva, las plantas crecieron igual que las plantas control.

2.4.6 Cromatografía.

Según Alfonso 2003, la cromatografía es un grupo de métodos para separar mezclas moleculares, que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial, mientras que la otra es un líquido el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. Los componentes de la mezcla deben tener dimensiones moleculares, lo que requiere que estén en soluciones o en el estado de vapor, la afinidad relativa de los solutos por cada fase debe ser reversible para asegurarse que ocurra transferencia de masa durante la separación cromatográfica. La fase fija se denomina fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada, sobre un material de soporte inerte. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil o estacionaria.

Si la fase estacionaria es un sólido se denomina: cromatografía de absorción, mientras que si es un líquido se denomina cromatografía de partición. Si la fase móvil es un líquido el proceso se denomina cromatografía liquido-sólido, cuando la fase móvil es un gas el proceso se denomina cromatografía gas-sólido. Si la fase fija es un

líquido y la fase móvil también, se denomina cromatografía líquido- líquido, si es un gas: cromatografía gas-líquido. Alfonso 2003

Existen otros tres modos de cromatografía en los cuales la fase estacionaria es un sólido y se clasifica de manera diferente a las demás debido a la naturaleza exclusiva de su proceso de separación. Estas son: cromatografía de intercambio iónico, por exclusión por tamaño y de afinidad. Alfonso 2003

2.4.7 Espectrofotometría

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. (Nieves y otros 2015).

El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. En espectroscopia el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400nm) y el visible (400-780nm). (Nieves y otros 2015).

2.4.8 Los extractos

Son preparados farmacéuticos que por condiciones de higiene, preparación en su fabricación son envasados que se realizan en laboratorios especializados, pero a nivel informativo equivale a preparar un jugo, en el que se adiciona agua destilada u otro medio y las plantas medicinales, por lo general se consideran tres tipos de extractos (Olaya, 2003).

Según Thompson, citado por Olaya 2006, se consideran tres tipos de extractos:

- Los extractos fluidos que son aquellos en los que el volumen del líquido de extractos es igual al volumen de la planta seca que se haya usado.
- Los extractos blandos son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta tener una consistencia de unguento.
- Los extractos secos que son a los que se le ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino. Este tipo de extracto cuyo proceso consiste en secar la planta, pulverizarla y encapsularla es un método ideal para administrar las plantas de sabor amargo.

Según Ortuño, 2006, los extractos son fundamentalmente para aquellas plantas medicinales que no contienen aceites esenciales, pero si otros compuestos activos con variadas propiedades. También para plantas cuya pequeña concentración de aceite esencial ofrece un rendimiento muy bajo en la destilación, o bien se destruye con el calor.

En general, los extractos son productos más diluidos que los aceites esenciales, aunque pueden ser bastante concentrados y por eso son recomendables

para la fabricación de jarabes, jabones con propiedades cosméticas, lociones y alimentos (Ortuño, 2006).

2.5 Sistema de Hipótesis

Es posible encontrar fotosensibilidad en los componentes de la ruta biosintética del hemo en la leghemoglobina del *Lupinus meridanus* utilizando luz visible y luz ultravioleta.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de la investigación

Según Tamayo, M., (2009), los tipos de investigación como la exploratoria, descriptiva, correlacional, explicativa son el punto de partida para el análisis y comprensión de los enfoques investigativos y las denominaciones de investigación cuantitativa e investigación cualitativa. Cuando se habla de investigación cualitativa o cuantitativa, se hace relación a sus variables o hechos objetos de estudio, en la cuantitativa el referente es numérico y para la cualitativa el referente es conceptual. Su orientación y enfoque varían, la orientación en la cuantitativa es la verificación de hipótesis, mientras que en la cualitativa es el descubrimiento de hechos o supuestos, lo cual hace que el enfoque sea analítico.

El enfoque cuantitativo se orienta fundamentalmente a la medición de variables y sus relaciones, por lo cual deben ser verificadas para establecer la prueba de la hipótesis y validar de esta forma las teorías anunciadas. Por el control riguroso que se establece de sus unidades de análisis, permite generalizar sus resultados a poblaciones más amplias, y por consecuencia estandarizar los conocimientos. Para el enfoque cualitativo se dice que es de orden explicativo, sin proceder a comprobaciones rígidas de la realidad objeto de estudio., permitiendo de forma rápida de llegar a situaciones y contextos sociales como grupos y comunidades, pues su diseño flexible enfrenta de forma ágil a las poblaciones objeto de estudio, en donde lo subjetivo e interioridad de los autores y protagonistas se asume como fuente de conocimiento.

Este trabajo de grado presentara un enfoque mixto ya que se aplicará una parte cualitativa, en la que se explicara el resultado obtenido en la parte cuantitativa, que se determinará por los procesos de la fotosensibilidad pero en este enfoque cuantitativo no se llevará a cabo un muestreo estadístico.

3.2 Tipo y Diseño de la Investigación

En los tipos de investigación tenemos distintos estudios con alcances exploratorios, descriptivos, correlacionales o explicativos. En este trabajo de grado según la bibliohemerografía consultada y el problema a investigar el cual es ¿Qué posibilidad hay de encontrar, fotosensibilidad en los componentes de la ruta biosintética del hemo en leghemoglobina del *Lupinus meridanus*? Se determina que va a ser una investigación exploratoria - descriptiva, ya que se trabajará con la fotosensibilidad de las posibles porfirinas presentes en los extractos de *Lupinus meridanus*. Estos estudios no han sido desarrollados antes, por ello es algo desconocido que se quiere estudiar a fondo, especialmente en el nódulo de la raíz de la planta, que como se sabe esta poco expuesto a la luz, pero en contrapartida, contiene la mayor concentración de porfirinas de la planta, también se dice que es descriptiva por el hecho de que se especificara a detalle la ruta biosintética de las porfirinas de esta leguminosa y se recogerá resultados de ella.

Para el desarrollo de este trabajo se emplea el diseño experimental, que es un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos que sería la variable independiente, en el caso de este trabajo sería el grupo hemo y las porfirinas de los nódulos de *Lupinus meridanus*. Para ello se evaluarán los distintos cambios de fotosensibilidad con luz visible y luz ultravioleta, para observar los efectos o cambios que se producen en los extractos, siendo esto último la variable dependiente.

3.3 Población y muestra

En esta investigación, la población se encontrará representada por 10 plantas de *Lupinus meridanus* siendo una leguminosa endémica de los páramos del estado Mérida, que crece entre 1800 y 3600 m.s.n.m., luego de la selección de esta planta se extraerá una muestra de su raíz.

Este trabajo de grado trabajará con un muestreo no probabilístico el cual citando a Arias, F., (2012) ``es un procedimiento de selección en el que se desconoce la probabilidad que tienen los elementos de la población para integrar la muestra (p85).

3.4 Materiales y Métodos.

3.4.1 Materiales No Biológicos

- ✓ Alcohol etílico.
- ✓ Bisturí
- ✓ Bolsas negras.
- ✓ Bolsas ziplocs.
- ✓ Cava.
- ✓ Colador.
- ✓ Cubetas de cuarzo.
- ✓ Equipo de disección
- ✓ Equipo de jardinería
- ✓ Frascos ámbar con tapa de rosca
- ✓ Gradillas.
- ✓ Hielo.
- ✓ Lamina de aluminio.
- ✓ Micropipetas.
- ✓ Mortero.
- ✓ Papel óptico.
- ✓ Papel parafilm

- ✓ Piceta con agua destilada.
- ✓ Pipetas serológicas.
- ✓ Propipeta.
- ✓ Puntillas azules blancas y amarillas.
- ✓ Tirro.
- ✓ Tijera
- ✓ Tubos de ensayo de 5ml sin tapa de rosca.
- ✓ Tubos Eppendorf.
- ✓ Tul.

3.4.2 Materiales Biológicos

- ✓ Hojas de la planta *Lupinus meridanus*
- ✓ Pimpollos de la planta *Lupinus meridanus*
- ✓ Nódulos de la planta *Lupinus meridanus*
- ✓ Cepa GY5027 E. coli

3.4.3 Métodos

3.4.3.1 Estrategia para la recolección de las muestras.

Se realizó la recolección de las planta leguminosas *Lupinus meridanus* para realizar las pruebas de espectrofotometría, cromatografía, electroforesis, análisis microbiológico, fotoprotección y actividad biológica. La recolección se realizó en Apartaderos sector matica de rosa, perteneciente al municipio Rangel, Estado Mérida, Venezuela. Apartaderos es un pequeño poblado del páramo merideño que se encuentra a una altura de 3.505 m.s.n.m., está ubicado en la intersección de tres valles: el del río Chama que fluye hacia la ciudad de Mérida, el del río Santo Domingo que baja hacia los llanos de Barinas y el del río Motatán, que desciende hacia la ciudad de Valera. Posee las siguientes coordenadas: una latitud 8°55'00"N y una longitud de 71°05'00"O, con una temperatura variable entre 7°C a 15°C, la

precipitación media anual es de 1079 mm. Las muestras tomadas fueron las raíces, hojas, nódulos y pimpollos, a los cuales se les añadió etanol para protegerlos, esterilizarlos y comenzar su extracción, seguido se colocaron en bolsas negras con hielo dentro de la cava y se llevaron a la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB), llevándolas a la nevera para su posterior realización de extractos y experimentos.

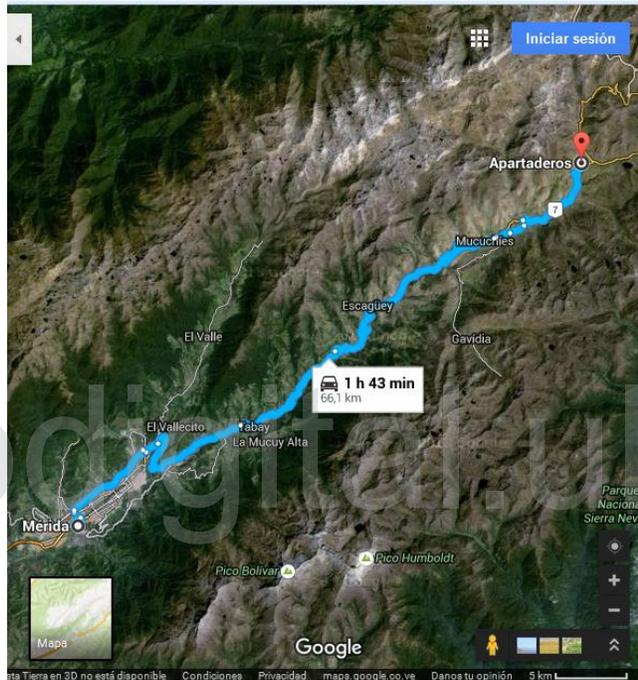


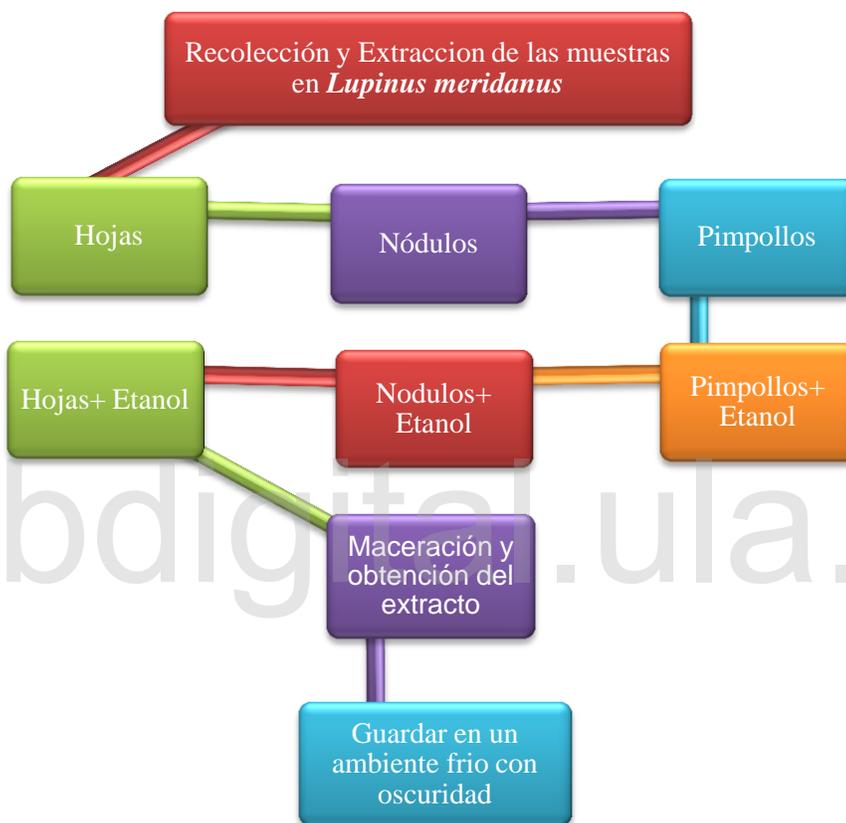
Fig24. Ubicación donde se realizó la recolección (Programa Google Earth)



Fig25. Recolección de las muestras

A las plantas recolectadas fueron pesadas sus raíces, hojas y pimpollos, posteriormente se extrajeron los nódulos de las raíces para realizar seguidamente la pesada correspondiente.

3.4.3.2 Metodología para la obtención de los extractos.



Para realizar el extracto etanólico, se usó el método de extracción rápida usado en la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB).

Este método tiene la virtud de llegar a un extracto crudo rápidamente, usando solventes biopermisivos y bioamables, lo cual evita la biotransformación, bioconversión y biodegradación del material. Además, permite que algunas

macromoléculas sean extraídas junto con metabolitos, moléculas orgánicas e inorgánicas. Desarrollándose de la siguiente manera:

- En un mortero se colocaron las hojas y se les agregó 10ml de etanol se maceró, posteriormente se decantó, recuperando 2,5ml de extracto, este fue envasado en un frasco ámbar con el rótulo HOJAS.

- Para preparar el extracto de los nódulos, de igual forma fueron colocados en un mortero y se les agregó 375 ml de etanol, se maceraron posteriormente se filtró con un tul y fue envasado en un frasco ámbar con el rotulo NÓDULOS.

- En la preparación del extracto del pimpollo, se procedió de la misma manera colocando en un mortero agregándole 35mL de Etanol, se maceraron, posteriormente se decantó, recuperando 6,8ml de extracto siendo envasado en un frasco ámbar con el rotulo PIMPOLLO.

Cabe acotar que todo este procedimiento se realizó en el cuarto oscuro del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB), guardando cada extracto en una bolsa negra y depositándolos en el refrigerador a -20°C. Las alícuotas se destinaron para ensayos de fotosensibilidad, cromatografía, electroforesis, fotoprotección, actividad biológica y análisis microbiológico.

3.5 Experimentos realizados

3.5.1 Cromatografía en capa fina.

Se realizó una cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas Merck TLC silica gel 60 F₂₅₄ N° 1.05554_0001 20x20cm ajustada a 10 cm por cada lado, para activar la misma, se colocó durante 60 minutos en una estufa a 60° C.

Posteriormente se dibujó la línea de siembra y la línea frente del disolvente a un centímetro del borde inferior y superior respectivamente calculándose el sitio de

siembra aproximado. Con ayuda de micropipetas se colocó en la corrida 5 μ L del extracto de las hojas, 10 μ L para el extracto del pimpollo y 20 μ L en el extracto del nódulo.

Se empleó como fase móvil un solvente compuesto por: 100mL de acetato de etilo, 17mL de metanol y 13mL de agua destilada. La corrida completa se realizó en 35 minutos. Después de la corrida la placa fue secada a 60°C en la estufa por una hora y se fotografió, luego fue observada en una lámpara ultravioleta (Minera light, UVSL-25) en onda larga y corta.

Posteriormente se repitió la cromatografía nuevamente agregando 20 μ L mas de extracto tanto al nódulo como al pimpollo para tratar de observar mejor la banda azul brillante y observar bien el Rf, luego de una hora secándose a 60°C en la estufa, se llevo al cuarto oscuro y se observo con la lámpara de luz UV.

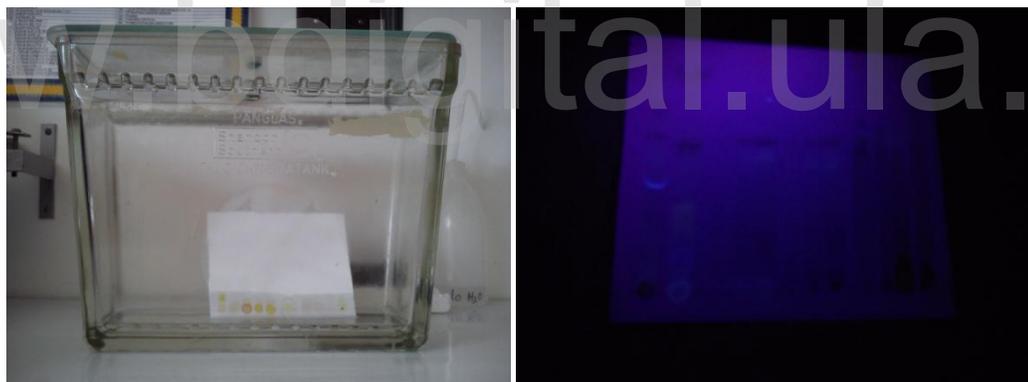


Fig26. Placa en cubeta de cromatografía **Fig27.** Placa en lámpara UV

La corrida se realizó hasta que el solvente alcanzó la línea de frente. Después de la corrida, la placa se colocó en una estufa á 37° C por una hora. Se observo en luz blanca, luz UV onda corta 254nm y luz UV onda larga 365nm, luego se guardó en una estufa á 37° C envuelta en papel marrón. La lámpara utilizada es marca Mineralight Modelo UVL-25, 115 Volts, 60 Hz, 0,15Amps / Ultra-Violet Products INC. San Gabriel California, U.S.A.

3.5.2 Espectrofotometría: Ensayo de fotosensibilidad.

Para determinar si existe alguna fotosensibilidad o fotoactivación en la sección de Biotecnología se ha diseñado un sistema usando la irradiación de monocromador del espectrofotómetro para sensibilizar/activar los extractos y al mismo tiempo detectar los cambios de absorción en las diferentes longitudes de onda. Para ello se hace un espectro ascendente en una dilución determinada y un espectro descendente en la dirección contraria. Ambas muestras son alícuotas distintas de la misma dilución.

Para el extracto de la hoja se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente analizado en la región visible desde 400nm a 500nm luego de de 500nm a 600nm y por ultimo de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a una velocidad de barrido turbo. La dilución empleada fue de 60/540, 60ul del extracto de hojas en 540uL de etanol. Posteriormente se realizó otro barrido espectrofotométrico ascendente, analizando esta vez en la región ultravioleta que va desde 190nm a 290nm y de 290nm a 390nm en el barrido descendente de 290nm a 390nm y 190nm a 290nm, con un intervalo de longitud de 2 en 2, a una velocidad de barrido medio. La dilución empleada fue de 1/200 usando 5ul del extracto y 1250ul de etanol.

En el extracto del pimpollo también se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente analizado en la región visible desde 400nm a 500nm luego de de 500nm a 600nm y por ultimo de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a una velocidad de barrido turbo. La dilución empleada fue de 60/540, 60ul del extracto de pimpollo en 540uL de alcohol, luego se procedió a realizar un barrido ascendente pero esta vez en la región ultravioleta, desde 190nm a 290nm y de 290nm a 390nm en el barrido descendente fue de 290nm a 390nm y 190nm a 290nm con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a velocidad de barrido turbo, la dilución empleada en esta parte fue de 60/540, 60ul del extracto de pimpollo en 540ml de alcohol.

Para el extracto etanólico tanto de la flor blanca como la morada, se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente en la región visible, desde 400nm a 500nm, de 500nm a 600nm y de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a velocidad de barrido turbo. La dilución utilizada fue de 1/10.

Finalmente en el extracto del nódulo se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente analizado en la región visible desde 400nm a 500nm luego de de 500nm a 600nm y por ultimo de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a una velocidad de barrido turbo. La dilución empleada fue de 1/10. Posteriormente se realizó otro barrido espectrofotométrico ascendente analizando esta vez la región ultravioleta que va desde 190nm a 290nm y de 290nm a 390nm en el barrido descendente va de 290nm a 390nm y 190nm a 290nm, con un intervalo de longitud de 2 en 2, a una velocidad de barrido medio. La dilución empleada fue de 1/200 usando 7ul del extracto y 1400ul de etanol.

Se utilizó etanol como blanco para ajustar el equipo a cero y celdas de cuarzo para todas las mediciones en el espectrofotómetro GENESYS 10 BIO.

3.5.3 Electroforesis

Se desarrolló la técnica de Laemmli (1970), para verificar la integridad de la Leghemoglobina. En líneas generales se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Para preparar el gel se mezclaron en dos tubos separados, las preparaciones de gel separador y espaciador, eliminando el aire por medio de la creación de vacío. Se ensambló el molde para el gel utilizando vidrios de 0.75 mm de espesor. Se le agregó a la mezcla para el separador 50 µl de persulfato de amonio. Con una pipeta de 10 ml, colocada en una de las esquinas superiores de los vidrios del molde para el gel, se añadió un total de 3.5 ml de esta mezcla al molde. Inmediatamente se agregaron 200 µl de isopropanol sobre el gel para evitar el contacto con el aire, y se dejó gelificar entre 30 a 45 min. Una vez que gelificó la muestra correspondiente al gel separador, se descartó el isopropanol y se agregó al buffer espaciador 50 µl de persulfato de

amonio. Se utilizó de la misma manera que el buffer separador. Se colocó inmediatamente el peine para 0.75 mm, y se dejó gelificar durante 30 min. Una vez gelificado, se procedió a quitar el peine deslizándolo suavemente y se lavó delicadamente con agua destilada para algunos residuos no gelificados.

Una vez realizados los 2 geles, se llevó a cabo la preparación de las muestras. Cargándose 10 µl de las mismas en los pozos del gel con una micropipeta y puntas largas descartables para geles en el siguiente orden:

1er Gel

Carril 1 (Cristales de borde)

Carril 2 (Cristales de fondo)

Carril 3 (Sobrenadante cristales)

Carril 4 (Bromelina)

Carril 5 (Sobrenadante cristales)

Carril 6 (Sobrenadante Bromelina)

Carril 7 (Bromelina anticancerígena)

Carril 8 (Sobrenadante cristales borde)

Carril 9 (Sobrenadante anticancerígena)

Carril 10 (Leghemoglobina)

2do Gel

Carril 1 (Leghemoglobina)

Carril 2 (Lavado de nódulos)

Carril 3 (Nódulos)

Carril 4 (Acíbar)

Carril 5 (Pimpollo)

Carril 6 (Hoja)

Carril 7 (Flor Blanca)

Carril 8 (Flor Morada)

Carril 9 (Patrones)

Seguidamente se llenó la cámara con el amortiguador de corrida: 180 ml en el tanque inferior y 120 ml en el superior. Se colocó el gel en la cámara y se corrió la muestra a 200 V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (aproximadamente 60 min). Se separaron los vidrios que contienen el gel con cuidado, se sacó el gel y se eliminó la parte del gel espaciador cortándolo con una hoja de bisturí. Se tiñó el gel con el colorante Coomassie, sumergiéndolo durante 1 hora con agitación constante. Luego se eliminó el exceso de colorante con varios de cambios de decolorante.



Fig 28. Geles de electroforesis realizados

www.bdigital.ula.ve

3.5.4 Actividad biológica y Fotoprotección.

Para realizar este experimento se debe proceder a evaporar previamente el etanol de los extractos, para ello se pesaron 4 tubos eppendorf y se les colocó a cada uno 1ml de cada extracto. Se dejaron abiertos a 60°C durante 24hrs, posteriormente se pesaron los tubos con cada uno de los extractos secos y se supo el peso de cada extracto, por la diferencia entre ambos valores. (Tubo con extracto seco menos tubo vacío). Posteriormente se le añadieron 100uL de agua destilada estéril para resuspenderlos.

3.5.4.1 Preparación de los extractos

En tubos eppendorf fueron rotulados y forrados con papel aluminio para mantener la oscuridad, se colocaron 100μL de los extractos de hoja, pimpollo y

nódulo de *Lupinus meridanus* en cada tubo, se agito 1 minuto hasta disolver bien, luego estos se llevaron a una caja oscura con los extractos originales para proceder a hacer el experimento.

3.5.4.2 Procedimiento:

Se tomaron tres placas del medio de cultivo Mueller Hinton preparado anteriormente y se rotularon una con O (oscuridad), otra con U.V y otra con B (luz blanca). Este ensayo se hizo conjuntamente con las muestras de otro grupo de tesistas (Jennifer Flores y Andreina Cárdenas 2015). Estas muestras fueron usadas en este trabajo debido a que son controles que relacionan dos estudios previos (Andrade, A. y Rivas, N. 2014 y Flores, J. y Cárdenas, A. 2015) con los extractos usados en este trabajo, Por lo tanto estas muestras cedidas por dichas tesistas sirvieron como controles también en la electroforesis. Al señalar en las placas se identificó de esta manera:

OSCURIDAD, U.V y LUZ BLANCA
Andreina y Jennifer muestras 1 Flor blanca y 2 Morada (FB, FM)
Rocio muestra 3 Hoja (RH)
Rocio muestra 4 Pimpollo (RP)
Rocio muestra 5 Nódulo (RN)
Con Bacteria (+) mas extracto
Sin Bacteria (-) mas extracto

Además, en cada placa se colocó un control que fue cloruro de sodio (solución salina fisiológica), y una bacteria que es la cepa de *Escherichia coli* GY5027 que es muy sensible a la luz UV, que se usa para mutagénesis y para evaluar propiedades carcinogénicas de los extractos.

Se desarrolló de la siguiente manera:

En las capsulas de petri, se realizaron círculos donde se enumero del 1 al 10, colocando intercaladamente 10 μ L de la cepa GY5027 y sobre ésta 3 μ L del extracto correspondiente.

En condiciones de oscuridad se agregaron 3ul del extracto etanólico de la flor blanca, flor morada, hoja, pimpollo y nódulo en los sitios correspondientes de la placa con Agar Trypticasa Soja, éste se dejó evaporar durante 5 minutos, posteriormente se sembraron 10ul de la cepa GY5027 (en Caldo Trypticasa de Soja) en los sitios correspondientes cubriendo la capsula con papel aluminio y se metió en la estufa a una temperatura de 37°C por 24 horas.

Finalmente en el caso de la placa irradiada con UV y luz blanca, se irradió una placa durante 30 segundos con lámpara UV a una distancia de 48cm y otra placa se irradió con luz blanca a la misma distancia durante 5 minutos. Todo esto se realizó con la ayuda de una plantilla enumerada para ubicar cada muestra y su control. Por último las placas se envolvieron por completo en papel aluminio y se incubaron por 24 horas á 37° C.

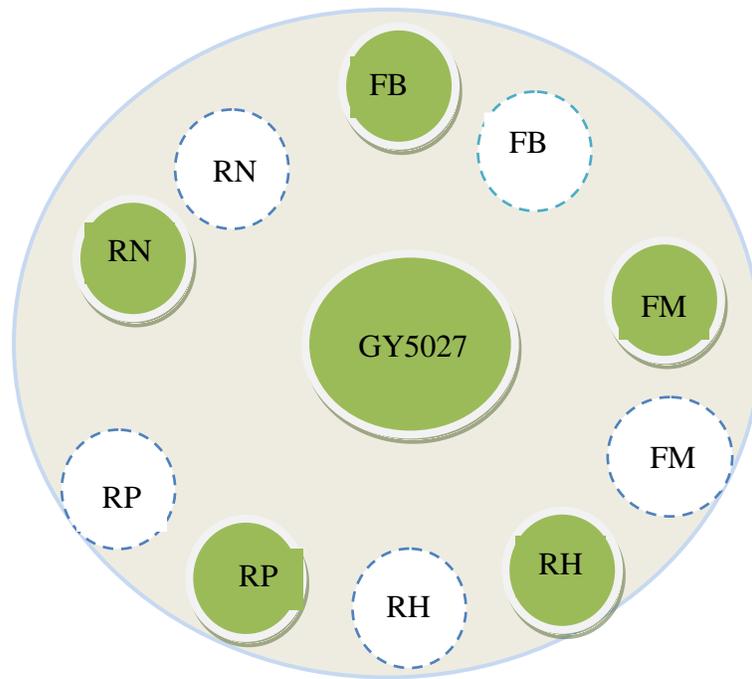


Fig29. Distribución de las muestras en las tres placas (UV, O y B)

Después de realizar el experimento anterior, de acuerdo a sus resultados, se realizó un aislamiento en una nueva placa de Muller Hinton, dividiendo la placa en 8 partes iguales e identificando el nombre de cada muestra de la siguiente manera: 1) FM-O 2) FM+O 3) FM+UV 4) FB-UV 5) RH-O 6) RN-O 7) RP-O 8) RN-UV, incubándose a 38°C por 24hrs en la estufa.

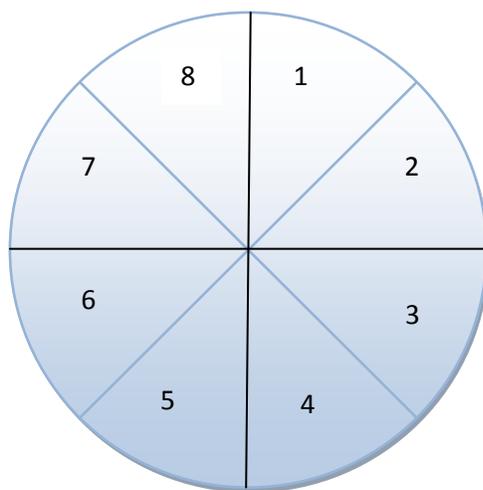


Fig30. Distribución de las muestras en aislamiento

Al siguiente día al observar los resultados se procedió a sembrar otra placa, para después irradiar la mitad con luz UV y así determinar su sensibilidad, esto se hará del lado contrario a los números debido a que se sembró de izquierda a derecha y el lado donde se encuentra más muestras es donde se inicia el trazo. Las muestras se enumeraron del 1 al 12 donde del 1 al 7 se encuentran las muestras de flores, en el 8 se encuentra RH-O, 9 RN-O, 10 RP-O, 11 RN-UV y 12 siendo el control de la cepa GY5027. Con este aislamiento se espera que la cepa presente en las muestras de flor blanca y morada muera cuando se irradie con UV, caso contrario de las muestras de hoja, pimpollo y nódulo que se espere permanezca viva.

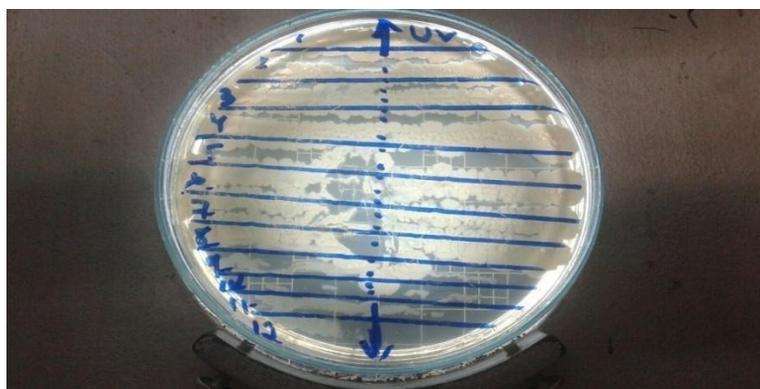


Fig31. Sensibilidad de los extractos con luz UV

Posteriormente se procedió a realizar un segundo aislamiento en un agar de método estándar, tomando solamente las 4 cepas 1)RH-O, 2)RN-O, 3)RP-O y 4)RN-UV, tomándose la muestra desde el área que fue irradiada con UV, metiéndose en la estufa a 37°C por 24 horas.

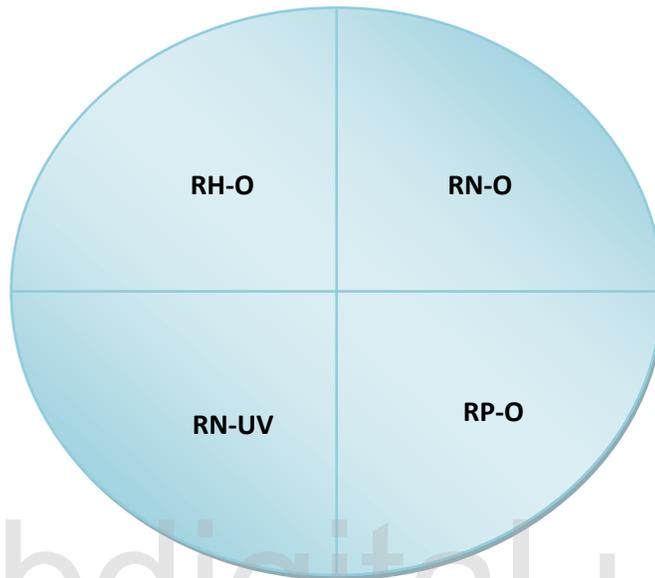


Fig32. Distribución de las muestras en el aislamiento N°2

Después de revisar las muestras que se reaislaron al siguiente día, se observó crecimiento, por lo tanto se procedió a sembrar en dos tubos de ensayo, los cuales se dividieron de la siguiente manera:

Tubo 1) RN-O, RP-O, RN-UV

Tubo 2) RH-O

Posteriormente se metieron a la estufa por 24 horas a 37°C. Por último, al día siguiente se realizaron las fijaciones de ambas muestras y tinción de Gram para así determinar la morfología celular de las bacterias presentes y también realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados en la recolección de las muestra.

Al llegar a Apartaderos sector matica de rosa se seleccionaron 10 plantas de *Lupinus meridanus* el cual se extrajeron 10 raíces con un peso de 45,82g de estas se obtuvieron 11,32g en nódulos también se recolectó 38,34g de hojas y 34,04g de pimpollos, se les añadió etanol para protegerlos, esterilizarlos y comenzar su extracción, seguido se colocaron en bolsas negras con hielo dentro de la cava y se llevaron a la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB), llevando a la nevera los frascos rotulados y envueltos en una bolsa oscura para protegerlos de la luz, para su posterior realización de extractos y experimentos.

4.2 Extracción de las muestras.

El día 20-11-2014 se procedió a pesar los 6 tubos eppendorf donde se depositarían extractos de cada muestra pesando:

1)1,06g 3)1,09g 5)0,98g

2)1,00g 4)1,07g 6)1,13g

Luego se sacaron las muestras de hojas y pimpollos de la nevera, separando cada una en un mortero, se trituraron hasta obtener el suficiente extracto, seguido se filtro pasando el extracto por un tul. En seguida con una pipeta se saco cierta cantidad

del extracto de hoja en los primeros 3 tubos de eppendorf forrados con papel aluminio para mantener la oscuridad, el extracto sobrante que fue 2,5ml se guardó en un frasco ámbar rotulado como (A hojas) y el bagazo se guardó de nuevo en el frasco ámbar original, esto se realizó de igual forma con el extracto del pimpollo solo que los eppendorf con aluminio usados fueron los n°4,5 y 6, el extracto sobrante fue de 6,8ml guardándolo en un frasco ámbar rotulado como (B pimpollo) .

El día 27/11/2014 se realizó la extracción de los nódulos, al igual que en la extracción de las hojas y los pimpollos, primero se pesaron los 2 tubos eppendorf obteniendo:

A1: 1,0g A2:1,02g

Luego se sacó la muestra de nódulos de la nevera, colocándola en el mortero, se trituró hasta obtener el suficiente extracto, seguido se filtro pasando el extracto por un tul. En seguida con una pipeta se sacó cierta cantidad del extracto de nódulos en los eppendorf A1 y A2 forrados con papel aluminio para mantener la oscuridad.

Cabe acotar que todo este procedimiento se realizó en un cuarto oscuro y después de tal extracción se guardó de nuevo en una bolsa negra llevándolo a la nevera para su posterior uso.

4.3 Resultados en la cromatografía de capa fina.

En la tabla N° 4 se muestran los Rf correspondientes a las bandas visualizadas en UV onda larga 365nm y también se muestran los Rf correspondientes a las bandas visualizadas en UV onda corta 254nm, también se presentan los resultados obtenidos en la cromatografía de la **Muestra 7:** Extracto etanólico de la hoja de *Lupinus meridanus* sembrada a un volumen de 5µl. **Muestra 8:** Extracto etanólico de “pimpollo” sembrado a dos diferentes volúmenes 10 y 20µl de *Lupinus meridanus*. **Muestra 9:** lavado de nódulos de *Lupinus meridanus* sembrado a un volumen de 20µl y la **Muestra 10:** Extracto etanólico de nódulo de *Lupinus meridanus* sembrado a

diferentes volúmenes de 10 y 20 μ l, en esta tabla se expresarán las condiciones de luz en la cual las bandas son más evidentes que serían (UV onda corta y UV onda larga), también se muestran el número de bandas con sus respectivos valores de Rf.

Tabla 4. Referencia de las bandas cromatográficas

Numero de la banda	Rf
1	0,95
2	0,68
3	0,51
4	0,39
5	0,33
6	0,18
7	0,15
8	0,95
9	0,68
10	0,40
11	0,34
12	0,16
13	0,95
14	0,68
15	0,33
16	0,21
17	0,95
18	0,68
19	0,65
20	0,38
21	0,33
22	0,23
23	0,55

24	0,34
25	0,18
26	0,70
27	0,65
28	0,55
29	0,47
30	0,42
31	0,35
32	0,23
33	0,54
34	0,19
35	0,21
36	0,86
37	0,27
38	0,51
39	0,46
40	0,23
41	0,12

Tabla 5. Orden y concentración de los extractos etanólicos de la hoja, pimpollo, lavado de nódulos y nódulos, de izquierda a derecha (últimos 4) colocados en la placa cromatográfica N°1.

Muestra	Orden	Volumen
Hoja	7	5ul
Pimpollo	8	10ul
Lavado de nódulos	9	20ul
Nódulo	10	10ul

Tabla 6. Orden y concentración de los extractos etanólicos de pimpollo y nódulos, de izquierda a derecha (2 primeros) colocados en la placa cromatográfica N°2.

Muestra	Orden	Volumen
Pimpollo	1	20ul
Nódulo	2	20ul

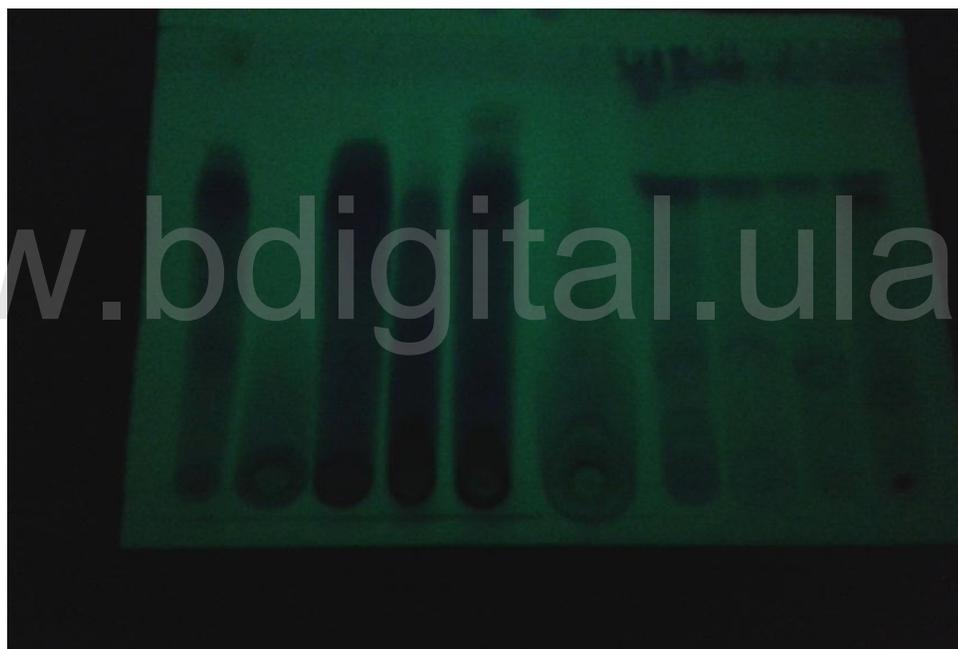


Fig33. Cromatografía N°1 en Luz UV onda larga.



Fig34. Cromatografía N°2 en Luz UV onda larga.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 7. Cromatografía N°1 observada en luz UV onda larga (365nm).

Rf	Extracto N°7 Hoja (5ul)	Extracto N°8 Pimpollo (10ul)	Lavado de N°9 nódulo (20ul)	Extracto N°10 Nódulo (10ul)
1	0,95	0,95	0,95	0,95
2	0,68	0,68	0,68	0,68
3	0,65	0,65
4	0,51
5	0,39	0,40	0,38	0,38
6	0,33	0,34	0,33	0,33
7	0,18	0,23	0,23
8	0,15	0,16

Tabla 8. Cromatografía N°2 observada en luz UV onda larga (365nm).

Rf	Extracto N°1 Pimpollo (20ul)	Extracto N°2 Nódulo (20ul)
1	0,95	0,95
2	0,75
3	0,63	0,60
4	0,51
5	0,46	0,46
6	0,32	0,34
7	0,26	0,22

En esta cromatografía de onda larga, se puede apreciar dos muestras que arrojaron cifras importantes para el desarrollo de esta tesis, la cuales fueron: N°7 extracto hoja y N°10 extracto nódulo presente en la cromatografía N°1 y cromatografía N°2. En el caso de la hoja se presenta una sola banda que absorbe en el espectro UV de 290 a 390, justamente en la longitud de onda 344nm (ver grafica 1) que posee una absorbancia de 0,787 con un Rf=0,68. Pasando al extracto del nódulo, este posee dos bandas de absorción que son posibles candidatas para la fotoprotección en onda larga con un Rf=0,60-0,65. Este extracto presenta un pico en la división de 342nm (ver grafica 9.1) entre ascendente y descendente, es posible que este resultado sea distinto al de la hoja.

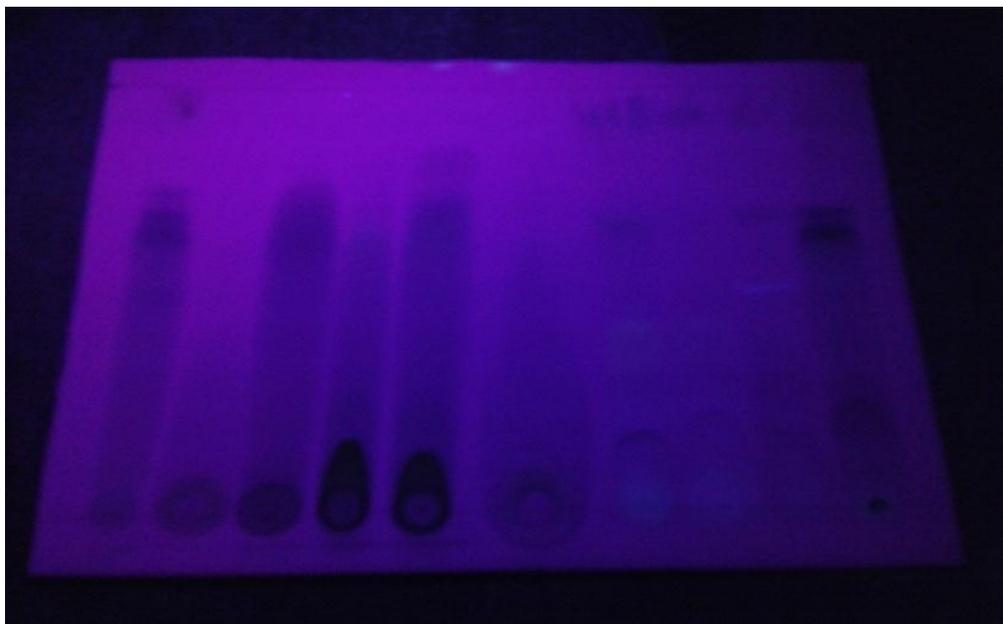


Fig35. Cromatografía N°1 en Luz UV onda corta

www.bdigital.ula.ve

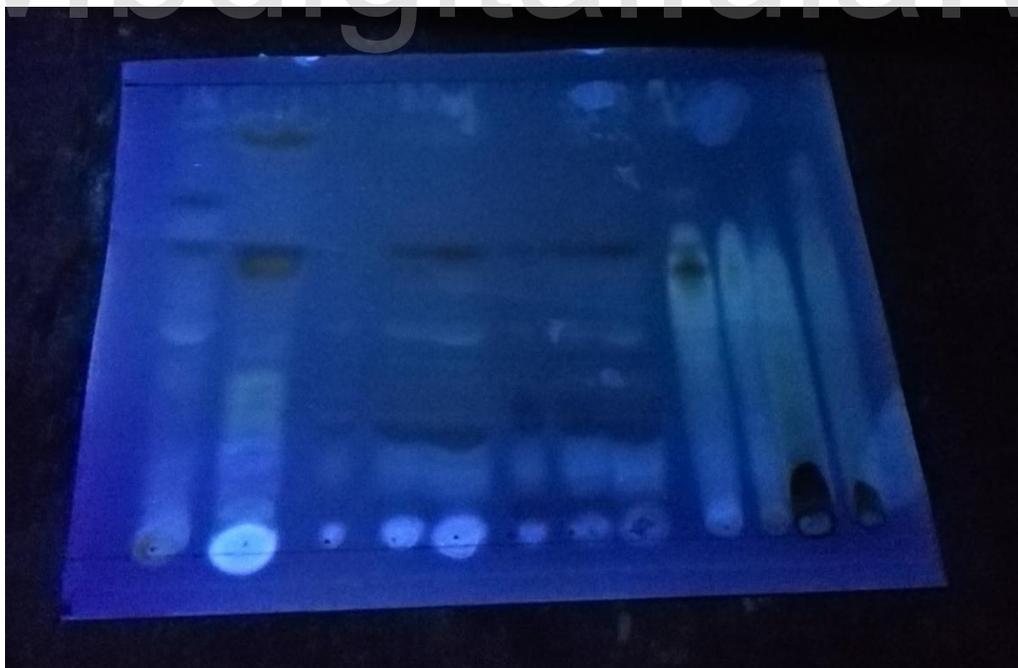


Fig36. Cromatografía N°2 en Luz UV onda corta.

Tabla 9. Cromatografía N°1 observada en luz UV onda corta

Rf	Extracto N°7Hoja (5ul)	Extracto N°8Pimpollo (10ul)	Lavado de N°9 nódulo (20ul)	Extracto N°10Nódulo (10ul)
1	0,95	0,95	0,95	0,95
2	0,86
3	0,68	0,70	0,68	0,69
4	0,65
5	0,55	0,55	0,54
6	0,34	0,35	0,34
7		0,23	0,27
8	0,18	0,19

Tabla 10. Cromatografía N°2 observada en luz UV onda corta

Rf	Extracto N°1 Pimpollo (20ul)	Extracto N°2 Nódulo (20ul)
1	0,95	0,95
2	0,75
3	0,65	0,62
4	0,47	0,46
5	0,42
6	0,37
7	0,23	0,23
8	0,12

Las bandas más importantes de la cromatografía en UV onda corta serían: N°7 extracto hoja y N°10 en la primera cromatografía realizada y N°2 en la segunda cromatografía, ambas son extracto de nódulo. En el caso de la hoja las dos bandas que más absorben son $R_f=0,18$ y $0,68$ absorbiendo en el espectro UV de 190 a 290nm específicamente en la longitud de onda 220nm (ver grafica 1) que presenta una absorbancia de 1,257 y la longitud de onda 260nm (ver grafica 1) con una absorbancia de 1,018. Para el extracto del nódulo que son las muestras N°2 y N°10 al igual que en el extracto de la hoja posee dos bandas de gran absorbancia con un $R_f=0,86$ y $0,95$ absorbiendo en el espectro UV de 190 a 290nm particularmente en la longitud de onda 214nm (ver gráfica 7) presentando una absorbancia de 1,087 y la longitud de onda 262nm con una absorbancia de 0,886.

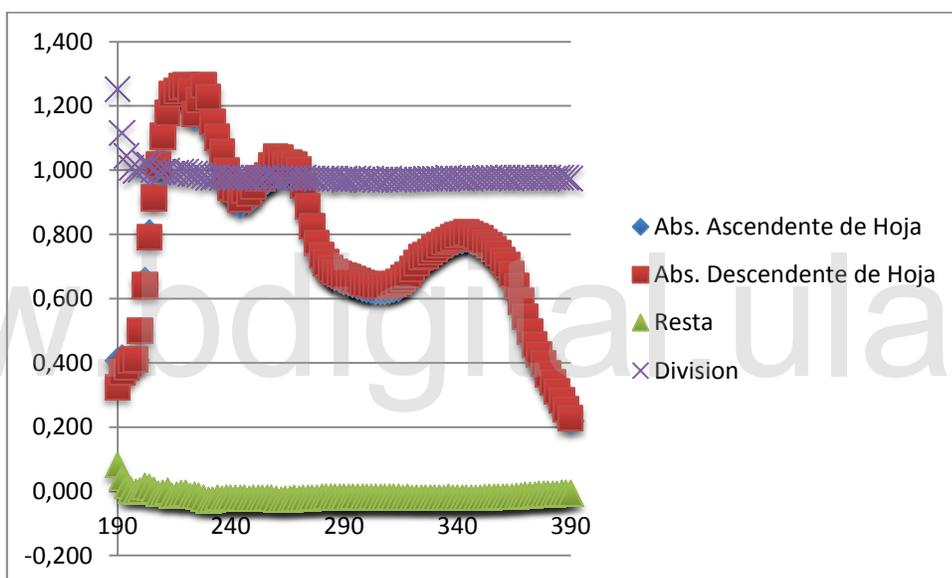
Se presume que las porfirinas del nódulo seguro son las bandas que aparecen con un R_f entre 0,86 y 0,95 (mayor probabilidad 0,86). La otra banda que se ve rondar en la onda corta con un R_f alrededor de 0,65 puede ser otra porfirina o un derivado, pero aun no hay seguridad en esto, al igual que otras bandas que tienen el mismo aspecto es decir: una fuerte absorción alrededor de la banda y una fuerte reflexión de luz rosada en el centro. Finalmente se piensa que la banda que más fotoprotege es la que posee un alcance de 260-262 que tiene un R_f de 0,6 a 0,65. (Ver gráfica 7)

4.4 Resultados de la fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría.

4.4.1 Espectrofotometría de la Hoja.

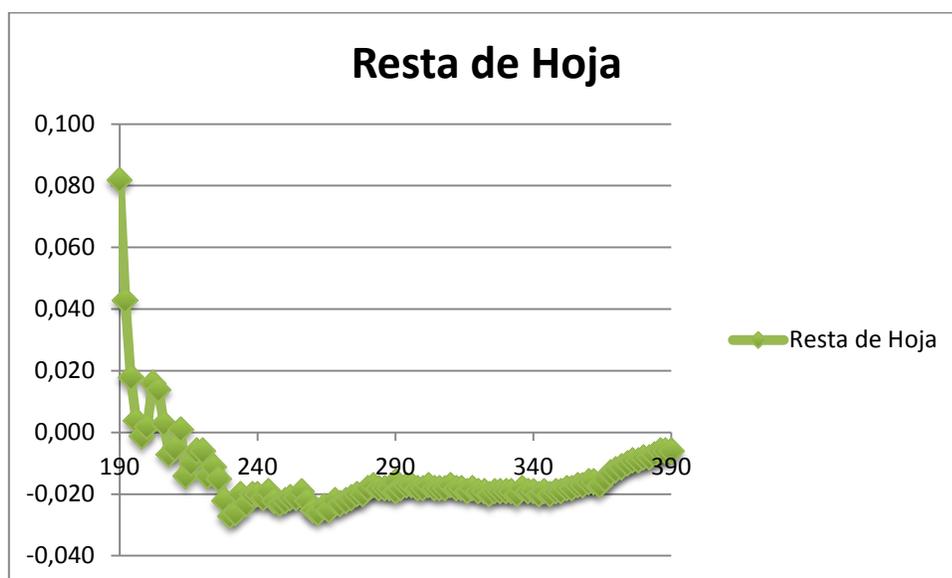
Se realizó un espectro ascendente (A) (190-390nm) y descendente (D) (390-190nm) para el extracto etanólico de la hoja (muestra 1) de *Lupinus meridanus*. Sin exposición a la luz blanca. En este experimento se incluyen los espectros originales y los espectros diferenciales (resta y división) para obtener los valores y las tendencias comparativas.

En los experimentos se trató de poner en evidencia la fotosensibilidad de las muestras ascendente y descendente, y la relación diferencial comparativa de ambos espectros. Los espectros se midieron en cubetas de cuarzo, el ascendente. El blanco fue etanol, los espectros diferenciales se compararon al restar o dividir el espectro ascendente (A) y el descendente (D). Se trató de obtener los valores donde los espectros son diferentes, lo cual revelaría un resultado interesante en cuanto a fotosensibilidad.

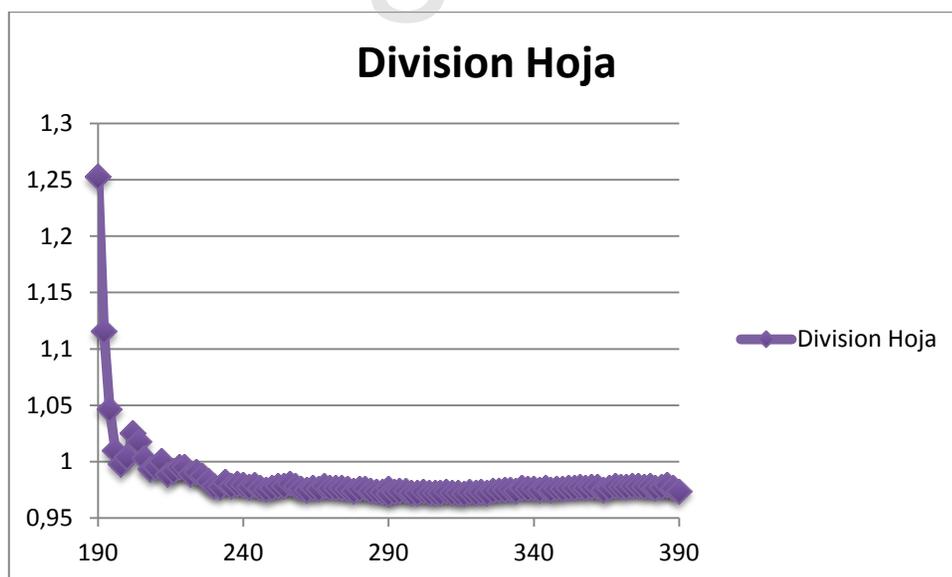


GRÁFICA 1. Espectro ascendente, descendente, resta y división, de los extractos etanólicos de la hoja.

A continuación se muestran las gráficas 2 y 3 que corresponden a la resta y división.



GRÁFICA 2. Resta de los espectros (Ascendentes-Descendentes) en el extracto de hoja



GRÁFICA 3. División de los espectros (Ascendentes-Descendentes) en los extractos de hoja.

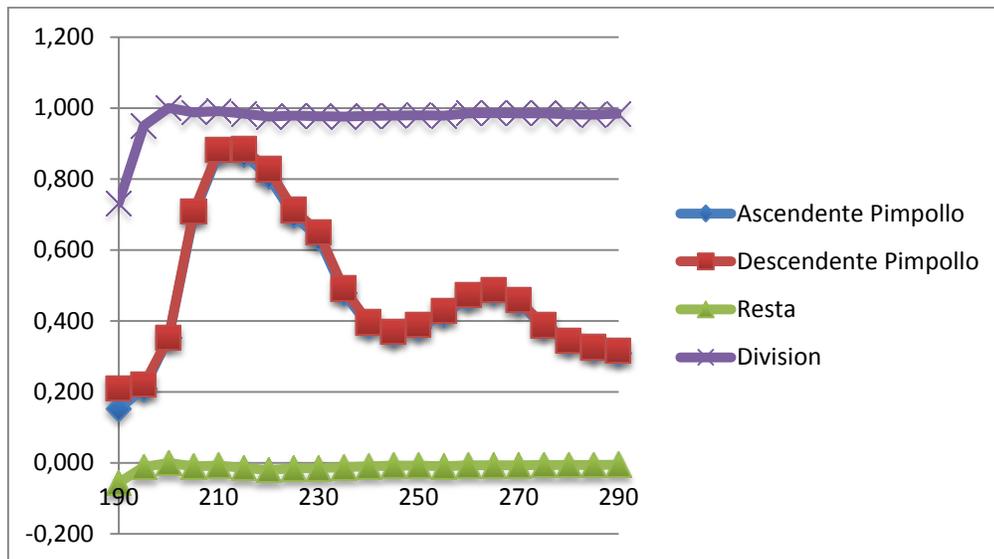
Se procedió a realizar los espectros reales y los diferenciales. Los espectros diferenciales nos permiten observar cómo cambian las moléculas a medida que estas van siendo irradiadas por luz, siendo irradiados primero de manera ascendente y por último descendente graficándose posteriormente tanto los espectros originales como diferenciales. La diferencia o la división pueden arrojar un resultado en el cual el ascendente sea mayor que el descendente o a la inversa. En el primer caso se obtendrá un resultado positivo en la diferencia y mayor que 1 en la división y en caso contrario se obtendrán valores inversos.

Como se puede observar en la grafica n°2 el comportamiento fue muy semejante de los espectros ascendente y descendente con una diferencia en la región de 194nm. Los espectros diferenciales arrojaron en la resta y la división, un valle a 190nm seguido de un plató entre 196-390nm.

4.4.2 Espectrofotometría del Pimpollo.

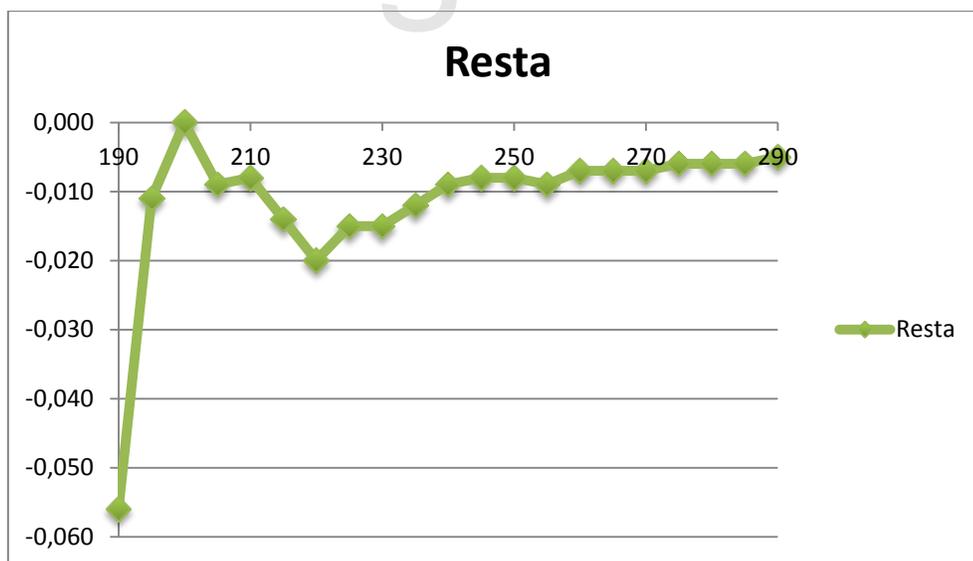
En el caso del extracto etanólico del pimpollo (muestra 2) de *Lupinus meridanus*. Se realizó un espectro ascendente (A) (190-390nm) y descendente (D) (390-190nm) sin exposición a la luz blanca. En este experimento se incluyen los espectros originales y los espectros diferenciales (resta y división) para obtener los valores y las tendencias comparativas.

En los experimentos se trató de poner en evidencia la fotosensibilidad de las muestras ascendente y descendente, y la relación diferencial comparativa de ambos espectros. Los espectros se midieron en cubetas de cuarzo, el ascendente. El blanco fue etanol, los espectros diferenciales se compararon al restar o dividir el espectro ascendente (A) y el descendente (D). Se trató de obtener los valores donde los espectros son diferentes, lo cual revelaría un resultado interesante en cuanto a fotosensibilidad.

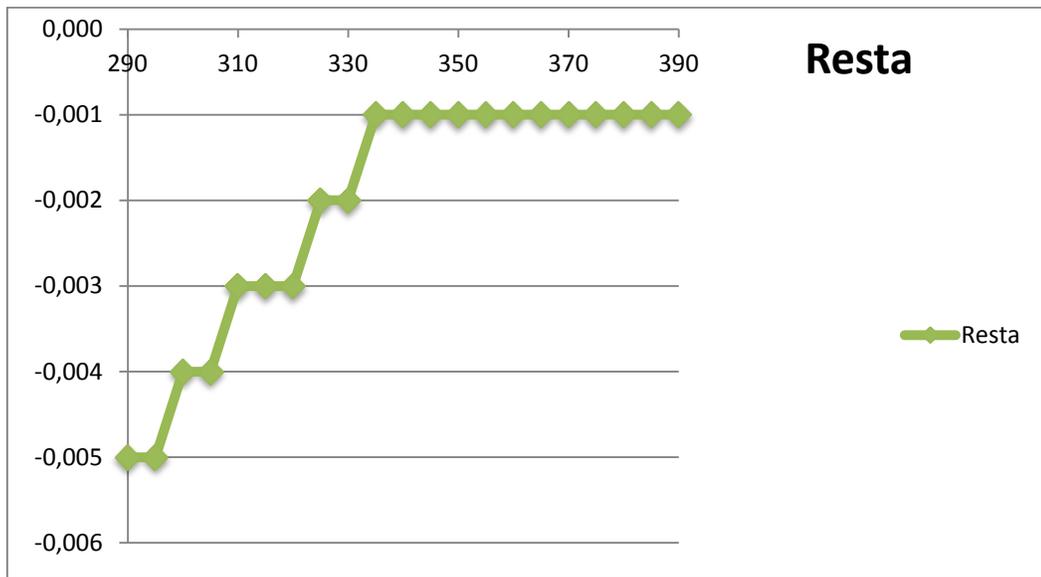


GRÁFICA 4. Espectro ascendente, descendente, resta y división, de los extractos etanólicos del Pimpollo

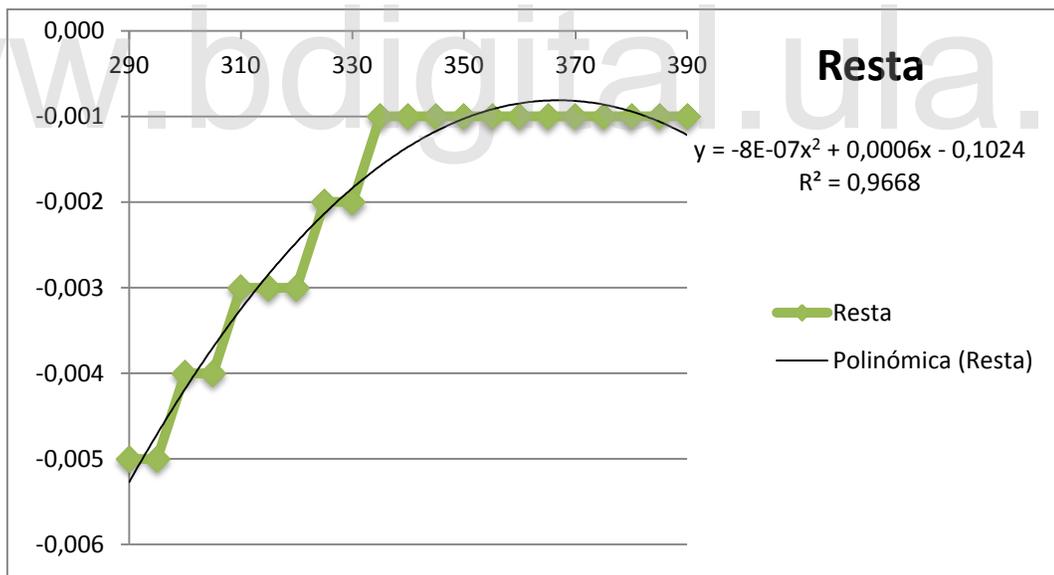
A continuación se muestran las gráficas 5, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5 que corresponden a la resta y división



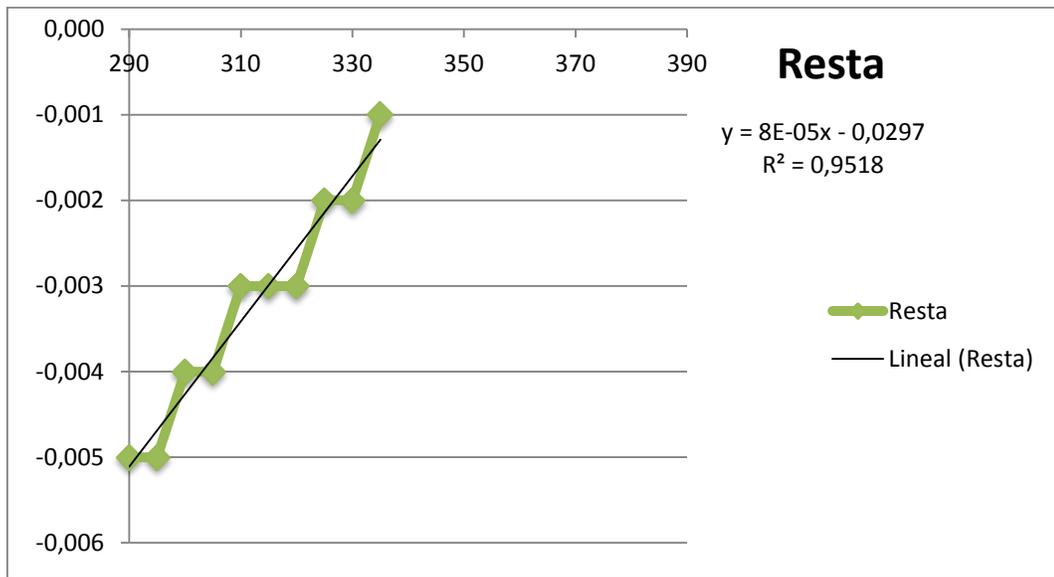
GRÁFICA 5. Resta de los espectros (Ascendente- Descendente) de 190 a 290nm en el extracto del pimpollo



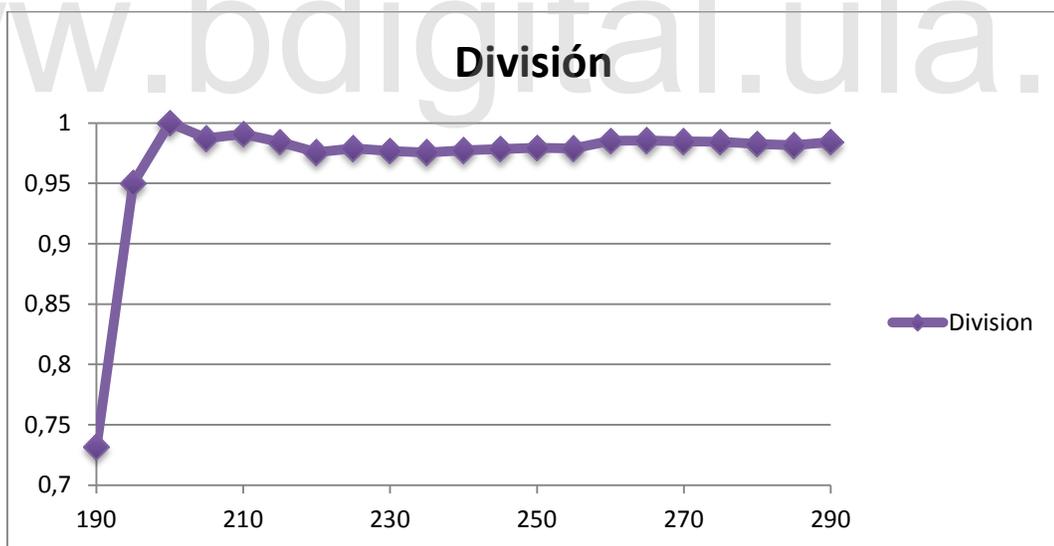
GRÁFICA 5.1 Resta de los espectros (Ascendente- Descendente) de 290 a 390nm en el extracto del pimpollo.



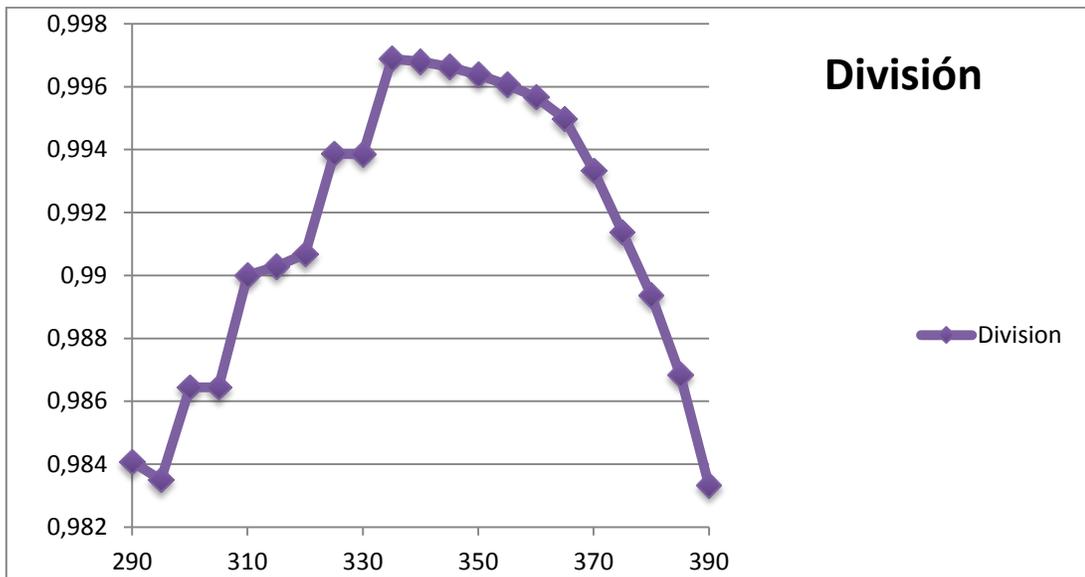
GRÁFICA 5.2 Resta (Polinómica) en el extracto del pimpollo.



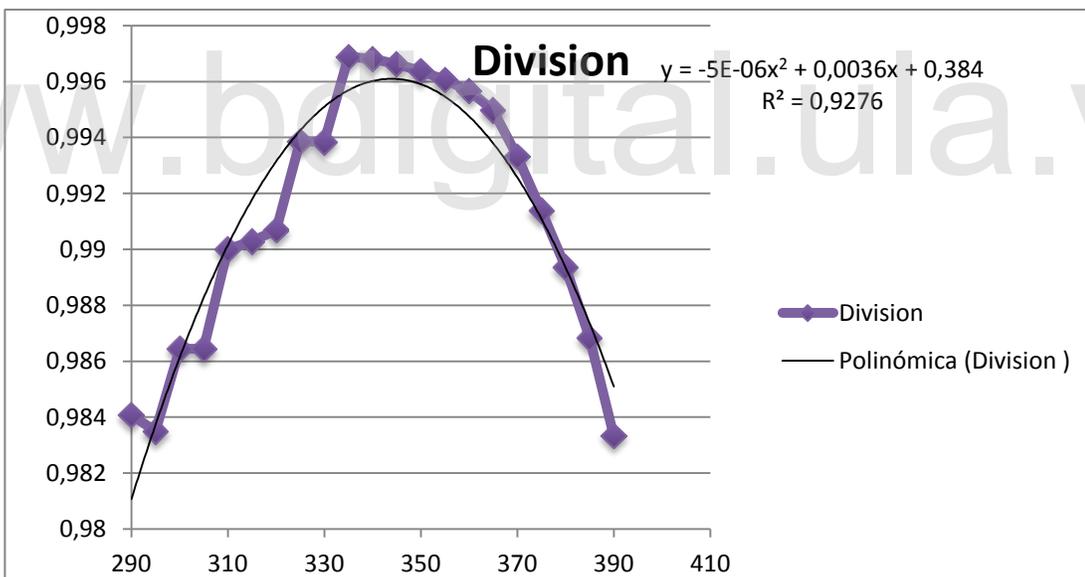
GRÁFICA 5.3 Resta (lineal) en el extracto del pimpollo.



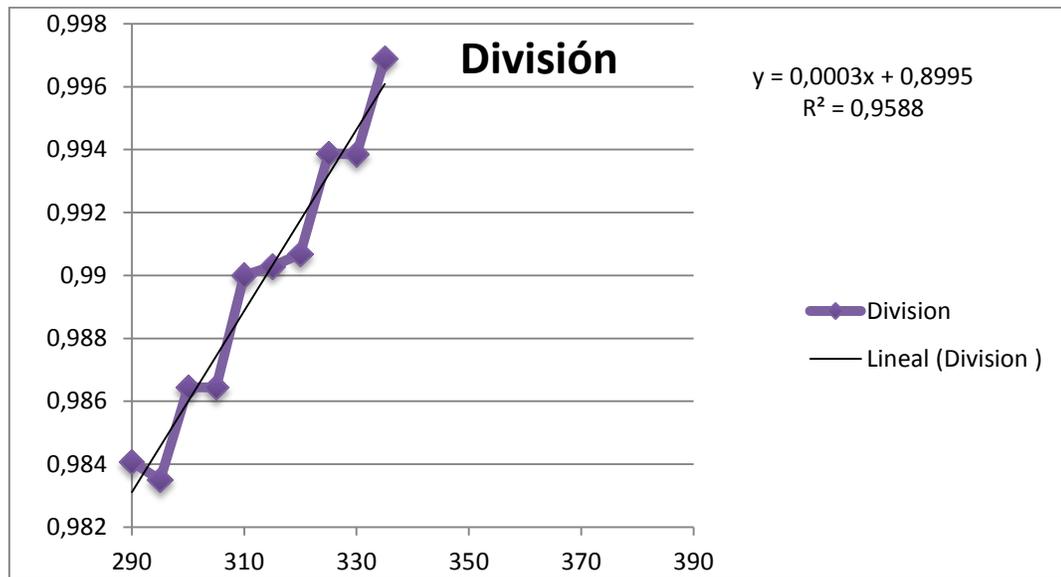
GRÁFICA 6. División de los espectros(Ascendente- Descendente) en el extracto del pimpollo



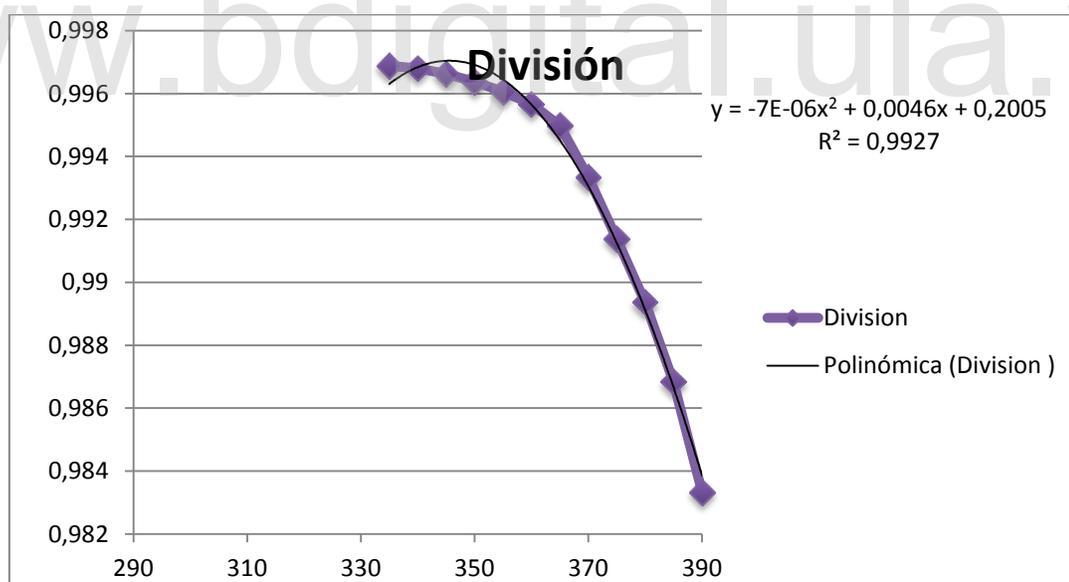
GRÁFICA 6.1 División de los espectros (Ascendente- Descendente) en el extracto del pimpollo.



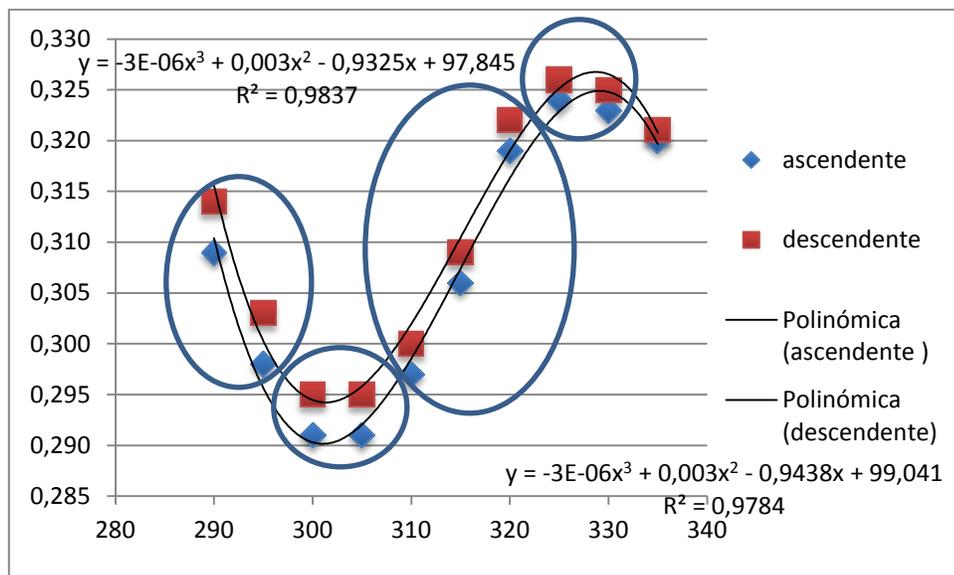
GRÁFICA 6.2 División (Polinómica) en el extracto del pimpollo.



GRÁFICA 6.3 División(lineal) en el extracto del pimpollo.



GRÁFICA 6.4 División (Polinómica) en el extracto del pimpollo.



Gráfica 6.5 Relación (Polinómica) Ascendente-Descendente

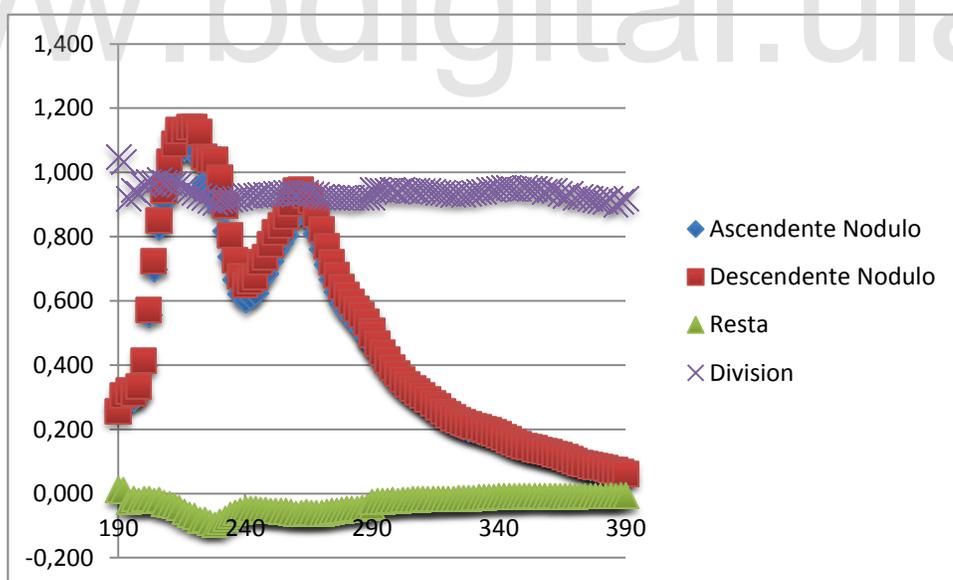
En el caso del pimpollo, se obtiene en UV onda corta, resultados similares a los de la hoja pero en onda larga cambia el resultado en dos espectros en los cuales la absorción máxima en onda larga la encontramos en 325nm mientras que en la hoja se encuentra a 344nm (ver grafica 4). Como se dijo antes, esta última banda se presume que tiene un Rf de 0,68 en el extracto de la hoja y es posiblemente, como se verá más adelante, la banda en la cual probablemente se le puede asignar el papel de fotoprotección UV de la cepa GY5027.

También se presenta una diferencia en la resta y en la división de onda larga, en el rango de 210 á 335nm, en el cual se observa una especie de “escalera” (ver grafica 5,5.1,5.2), para la cual se ha analizado otros casos similares. Puede tratarse de un sistema de varias moléculas fotosensibles acopladas por las reacciones de fotoactivación (el mínimo son dos moléculas). Lo curioso es que sube en escalones y baja como una campana continua. Esta es una Distribucion Normal pero Asimétrica.

4.4.3 Espectrofotometría del Nódulo.

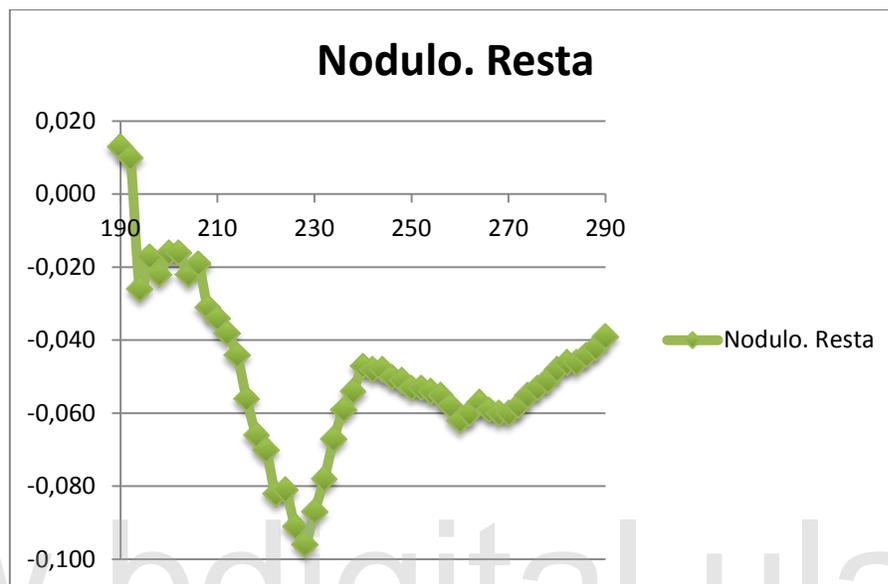
Finalmente en el extracto etanólico del nódulo (muestra 3) de *Lupinus meridanus*. Se realizó un espectro ascendente (A) (190-390nm) y descendente (D) (390-190nm) sin exposición a la luz blanca. En este experimento se incluyen los espectros originales y los espectros diferenciales (resta y división) para obtener los valores y las tendencias comparativas.

Al igual que en los experimentos anteriores se trató de poner en evidencia la fotosensibilidad de las muestras ascendente y descendente, y la relación diferencial comparativa de ambos espectros. Estos se midieron en cubetas de cuarzo. El blanco usado fue etanol, los espectros diferenciales se compararon al restar o dividir el espectro ascendente (A) y el descendente (D). Se trató de obtener los valores donde los espectros son diferentes, lo cual revelaría un resultado interesante en cuanto a fotosensibilidad.

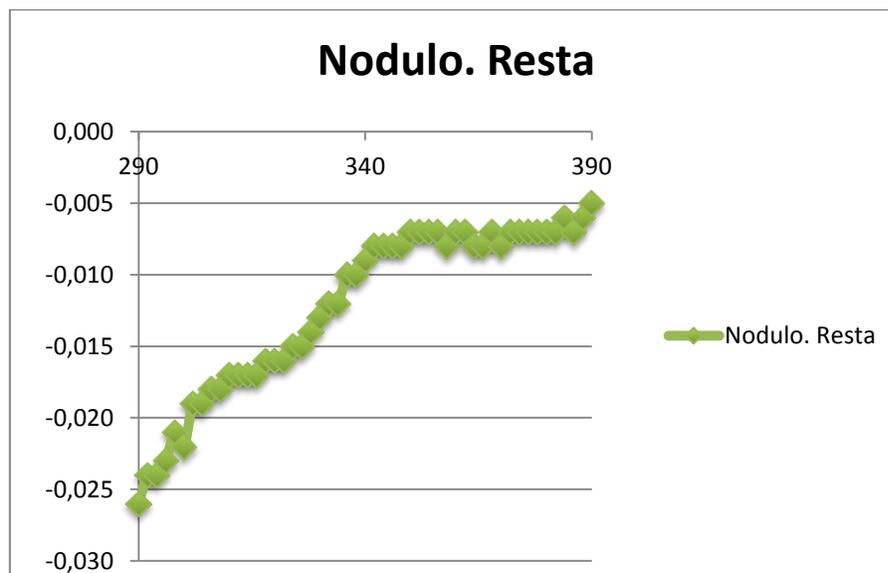


GRÁFICA 7 Espectro Ascendente, Descendente, resta y división del extracto etanólico del Nódulo.

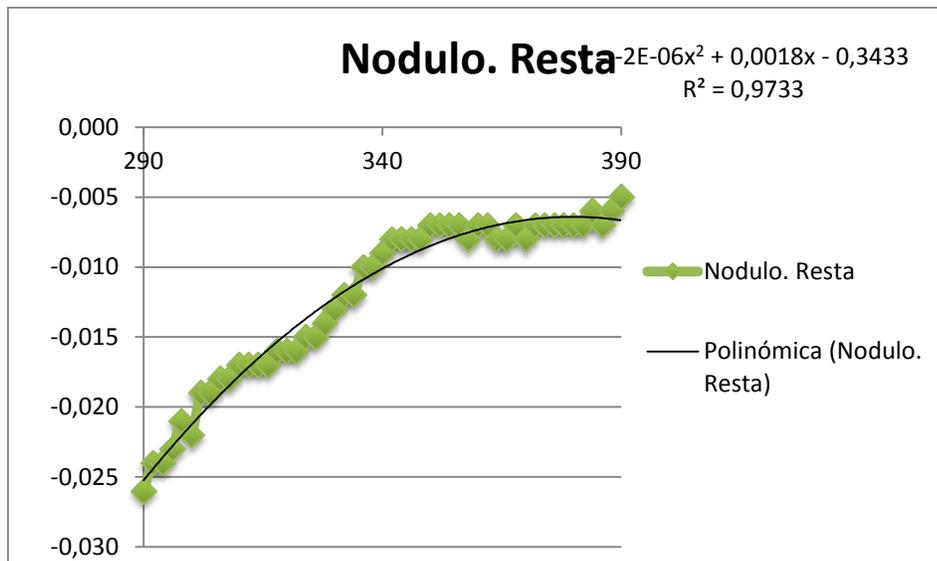
A continuación se muestran las gráficas 8, 8.1, 8.1.1, 8.1.2, 8.1.3.8.1.4, 9 y 9.1 que corresponden a la resta y división



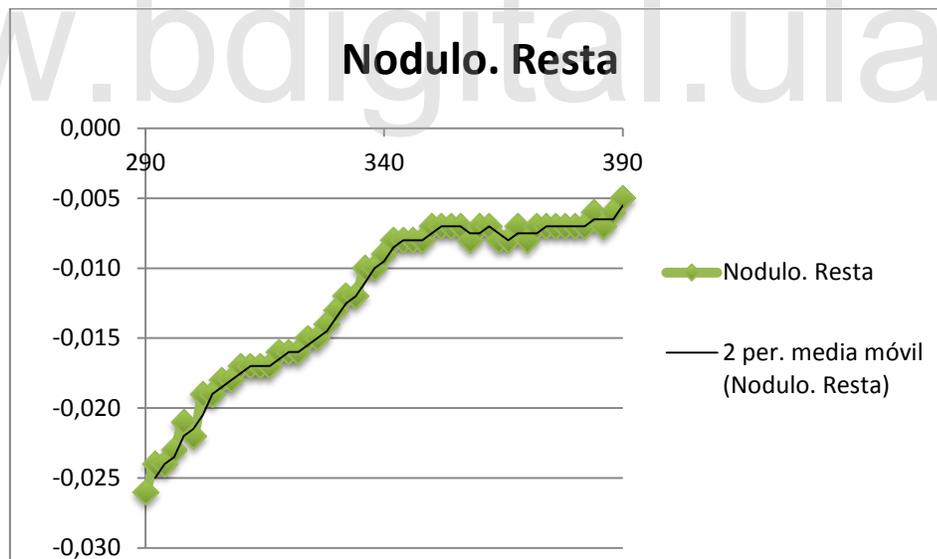
GRÁFICA 8. Resta de los espectros (Ascendentes-Descendentes) en el extracto del nódulo.



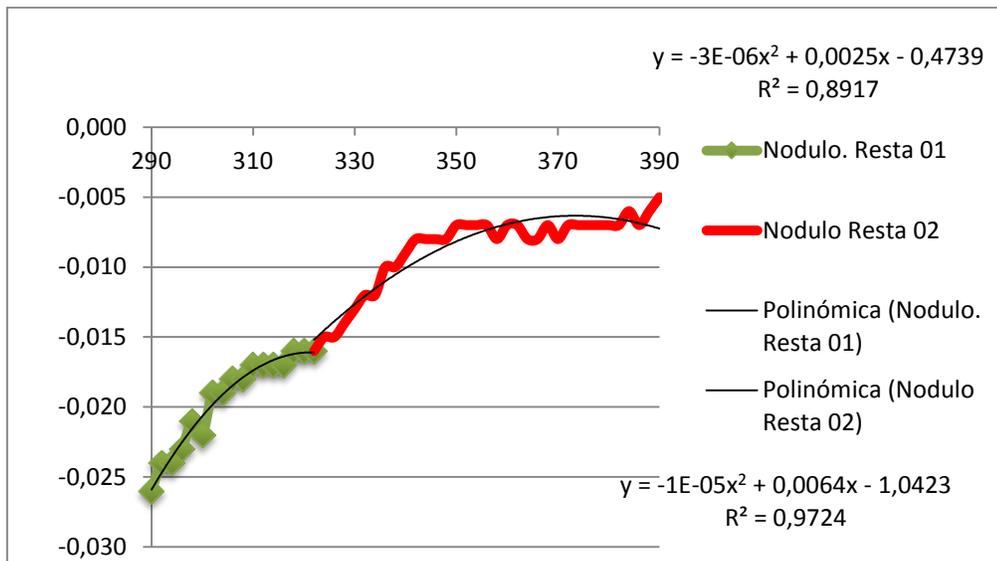
GRÁFICA 8.1. Resta de los espectros (Ascendentes-Descendentes) en el extracto del nódulo.



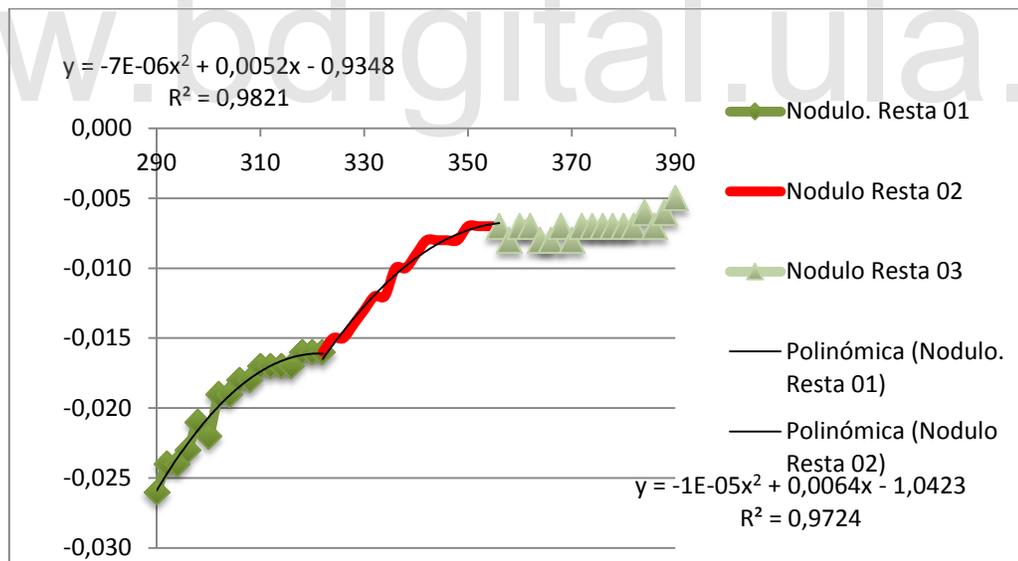
GRÁFICA 8.1.1 Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.



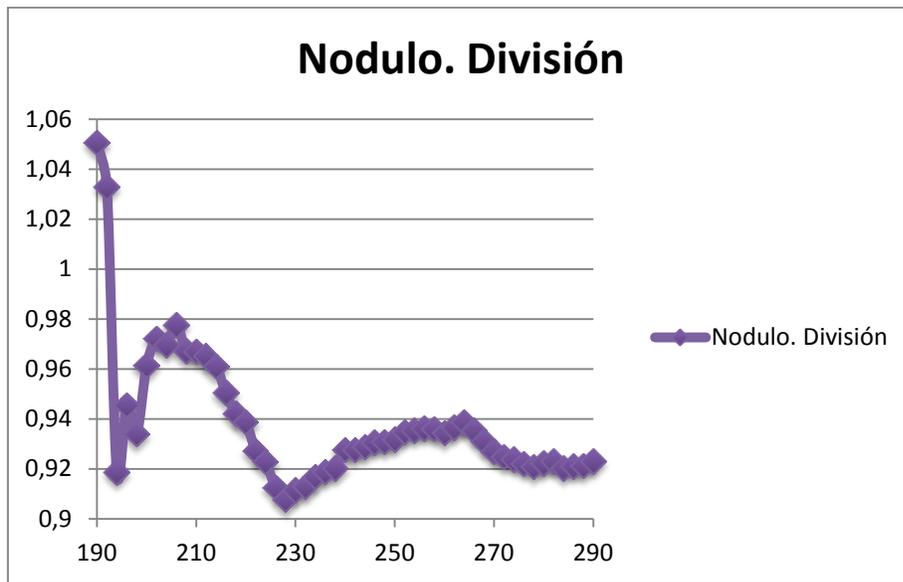
GRÁFICA 8.1.2 Resta (Media móvil) en el extracto del nódulo.



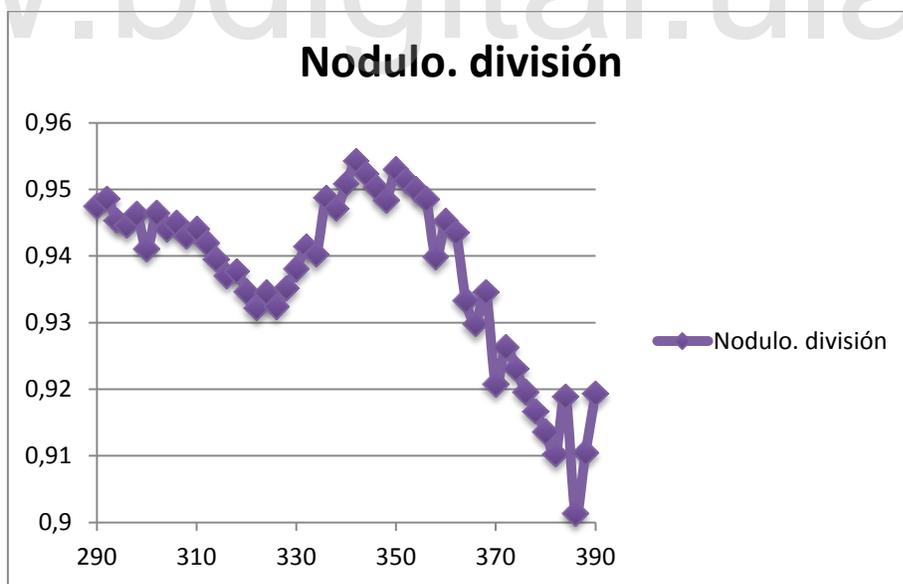
GRÁFICA 8.1.3 Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.



GRÁFICA 8.1.4 Resta (Polinómica) en el extracto del nódulo.



GRÁFICA 9 División de los espectros (Ascendentes-Descendentes) de 190 a 290nm en el extracto del nódulo.



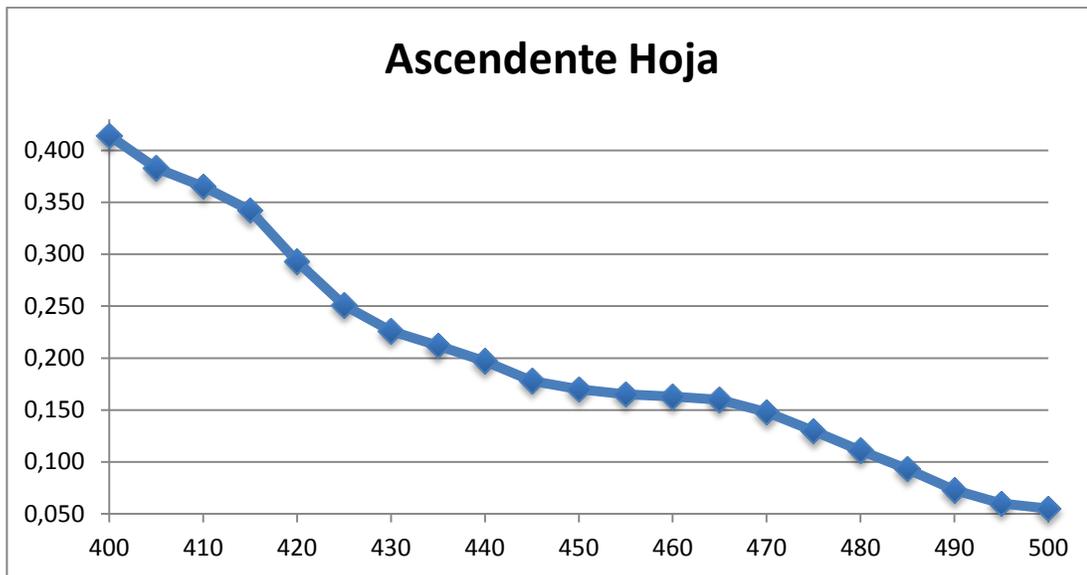
GRÁFICA 9.1 División de los espectros (Ascendentes-Descendentes) de 290 a 390nm en el extracto del nódulo.

En este mismo sentido se observa en los espectros del nódulo, que la banda de absorción de 325nm y 344nm presentes en el pimpollo y la hoja respectivamente, se encuentra ausente. Sin embargo como veremos más adelante, el nódulo a diferencia del pimpollo y de manera similar a la hoja presenta fotoprotección. Esto lo interpretaran como una diferencia significativa que se induce a pensar que la fotoprotección del nódulo se explica por otras moléculas distintas a estas. También arrojó un resultado interesante, observándose una “Absorción bimodal” en la resta del espectro ascendente y descendente en onda larga (290-390nm). Este resultado es similar al obtenido por Laya (2015) en los espectros diferenciales de resta y división en el extracto etanólico de la hoja verde que va de 290 a 390nm en la planta *Machaerium acuminatum Kunth*. En la absorción bimodal del nódulo aparece una primera curva con un incremento lineal, presentando un centro de 322nm y una segunda curva con un centro de 342nm, esta zona es considerada perfecta en la espectrofotometría de la grafica diferencial (ascendente- descendente) de la resta.

4.4.4 Espectrofotometría de la Hoja en luz visible.

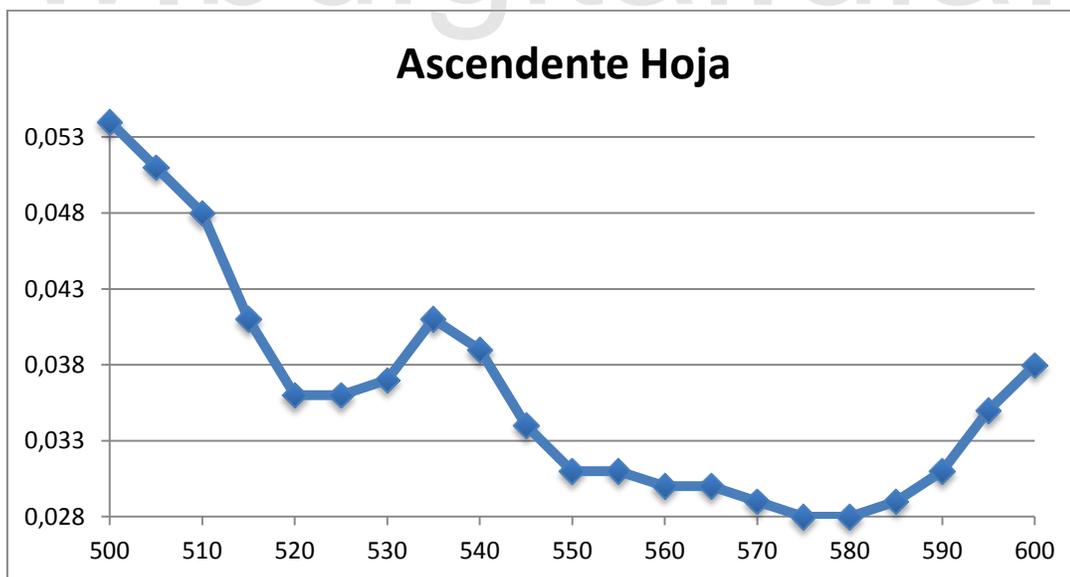
Se realizaron 3 corridas en la región visible de 400–500nm otra de 500–600nm y de 600-700nm en la búsqueda de moléculas que puedan tener fotosensibilidad además de las clorofilas.

Observándose en los diferentes espectros ascendentes del extracto etanólico de la hoja, se presentan los picos de absorción de luz visible indicando la presencia de las clorofilas A y B ubicadas en las longitudes de 415, 465, 600 y 665nm. Además de ellas se pudo evidenciar otro compuesto que absorbe a 530 y 545nm(ver Gráfica 10.1).con la formación de un pico que podría ser Betaxantina o algún derivado de la misma, esta deducción se pudo confirmar gracias a, Marañón, V., y Rizo, L. (2011).

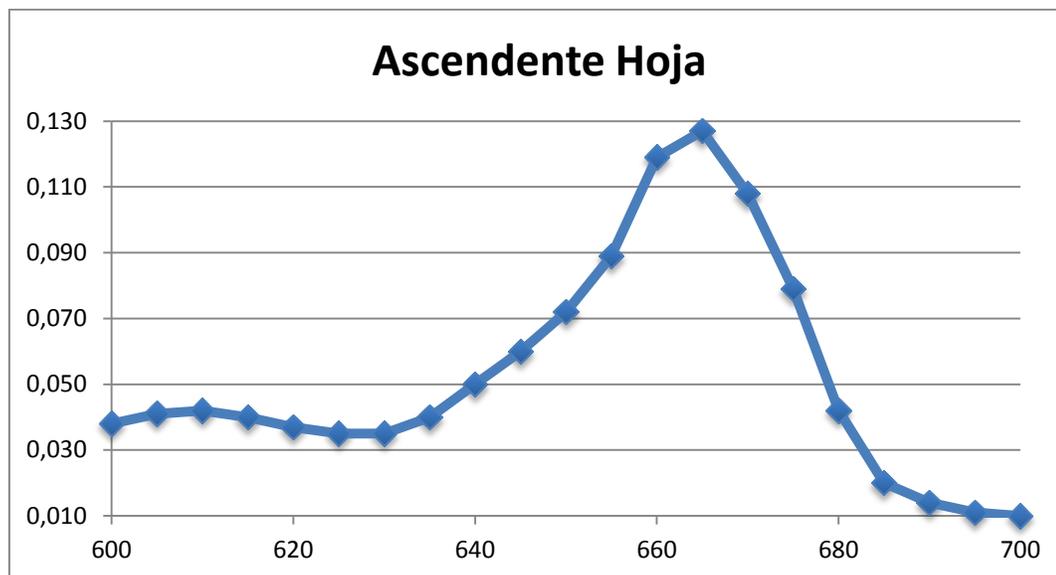


GRÁFICA 10 Extracto etanólico de hoja ascendente (400-500nm)

www.bdigital.ula.ve



GRÁFICA 10.1 Extracto etanólico de hoja ascendente (500-600nm)

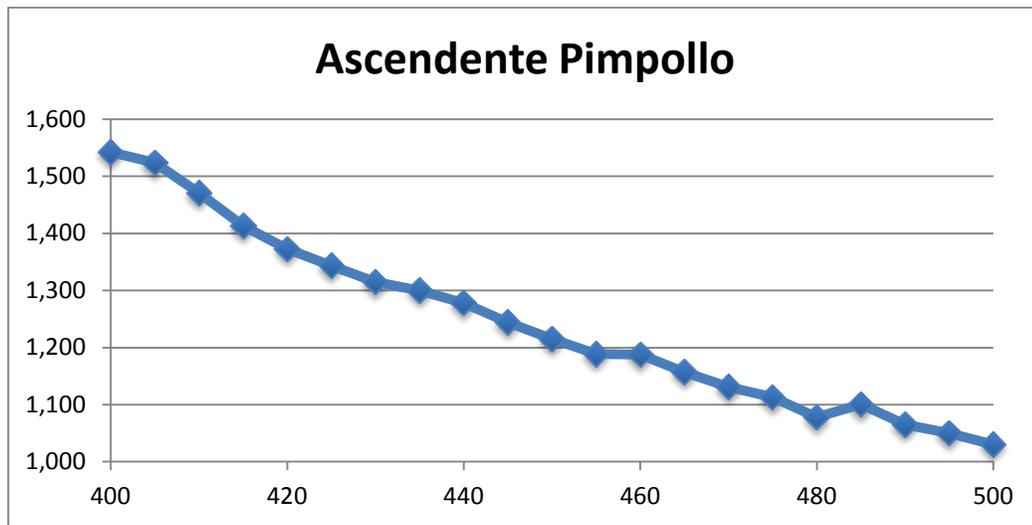


GRÁFICA 10.2 Extracto etanólico de hoja ascendente (600-700nm)

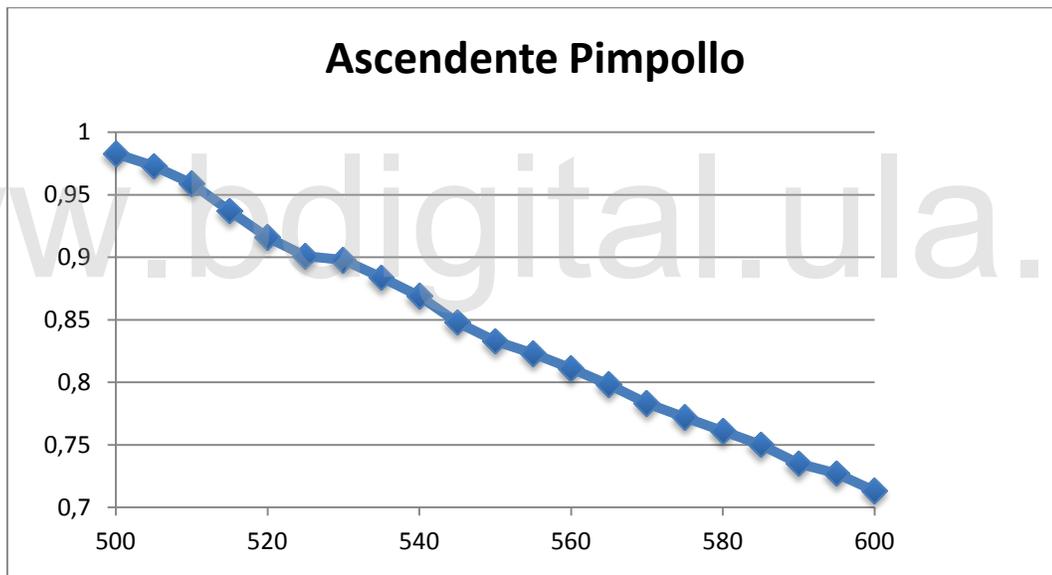
www.bdigital.ula.ve

4.4.5 Espectrofotometría del pimpollo en luz visible.

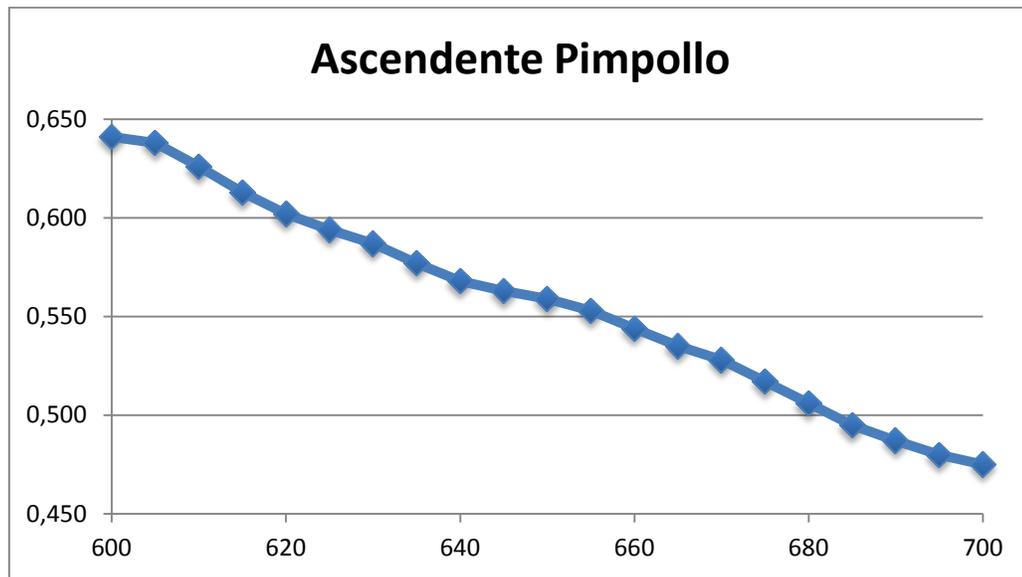
En el caso del extracto etanólico del pimpollo, insinúa la presencia de clorofila A y B, como se observa en las graficas (11,11.1 y 11.2) con longitudes de onda de 415, 500, 600 y 665nm., el cual es completamente normal debido a que posee un tejido verde, al igual que en la hoja presenta en la longitud 535nm la formación de un pico que podría ser Betaxantina o algún derivado de esta.



GRÁFICA 11 Extracto etanólico de pimpollo ascendente (400-500nm)



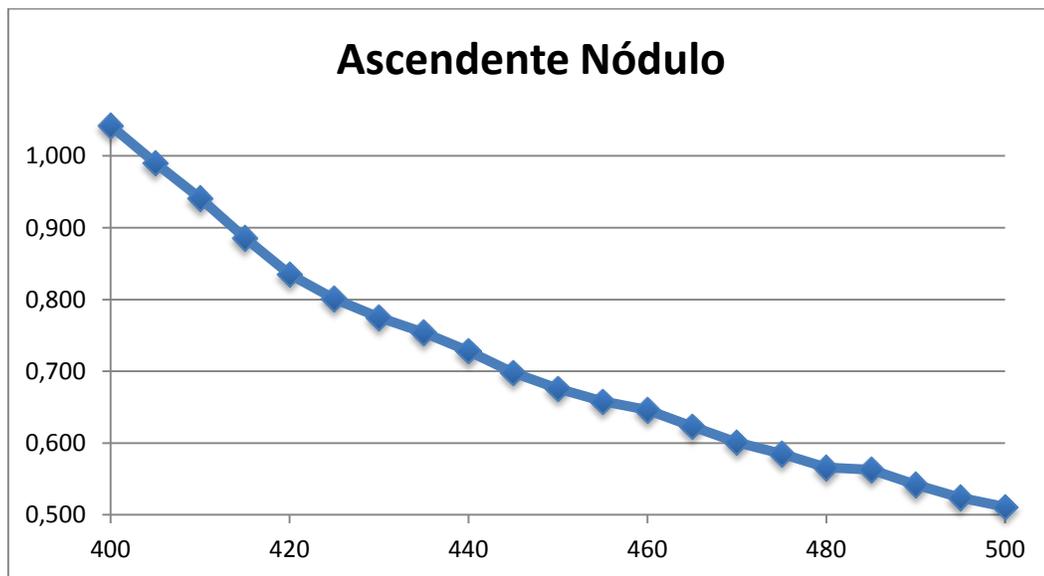
GRÁFICA 11.1 Extracto etanólico de pimpollo ascendente (500-600nm)



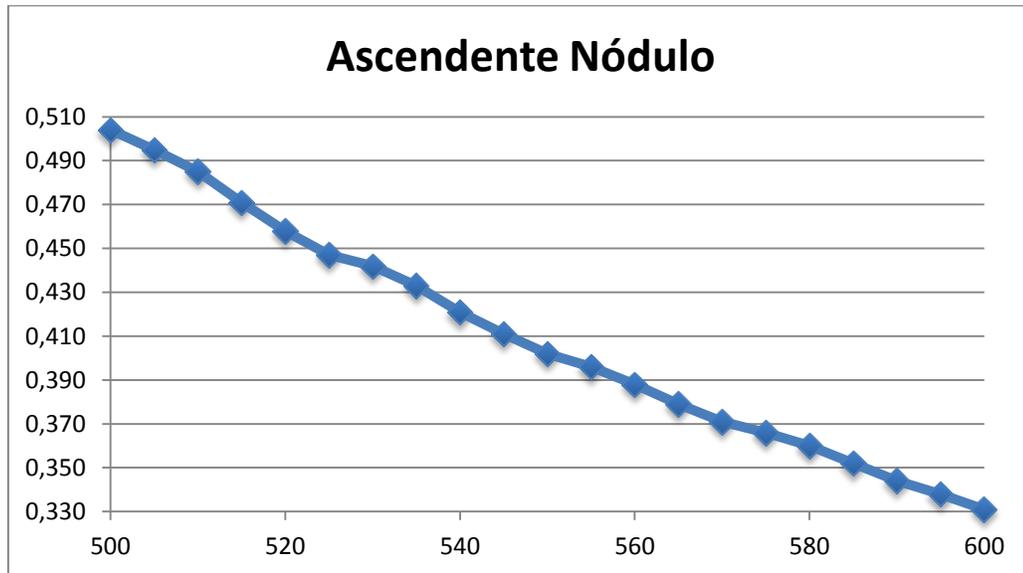
GRÁFICA 11.2 Extracto etanólico de pimpollo ascendente (600-700nm)

4.4.6 Espectrofotometría del Nódulo en luz visible.

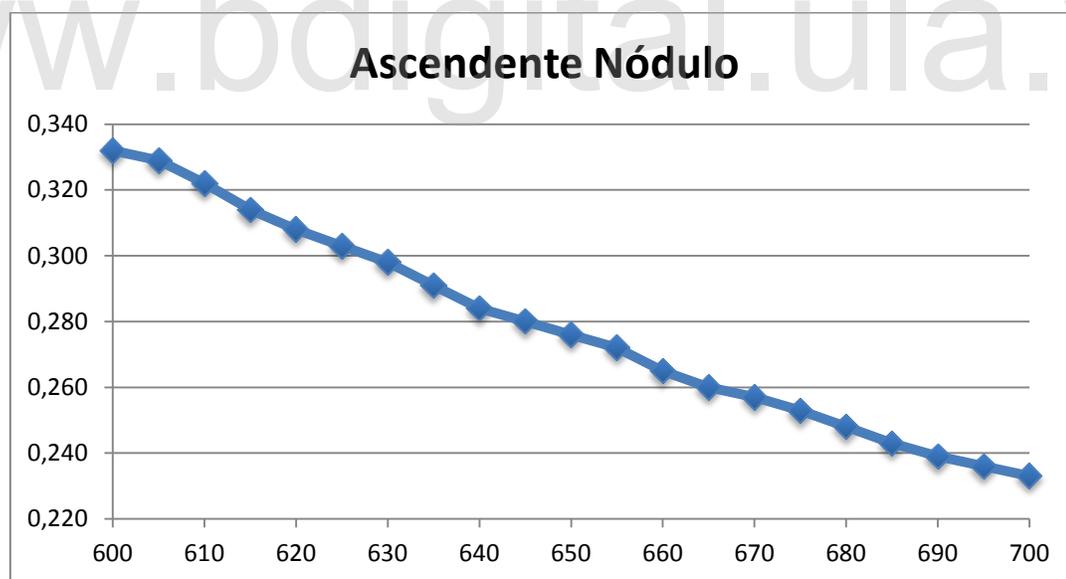
En el caso del nódulo no presenta ninguna absorbancia importante, en los diferentes espectros de luz visible a los que se sometió dicho extracto.



GRÁFICA 12 Extracto etanólico de nódulo ascendente (400-500nm)



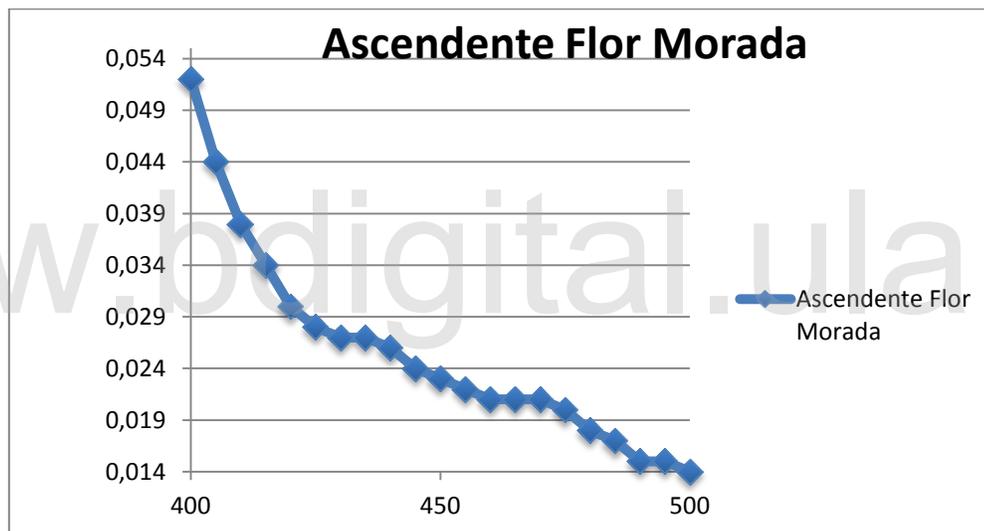
GRÁFICA 12.1 Extracto etanólico de nódulo ascendente (500-600nm)



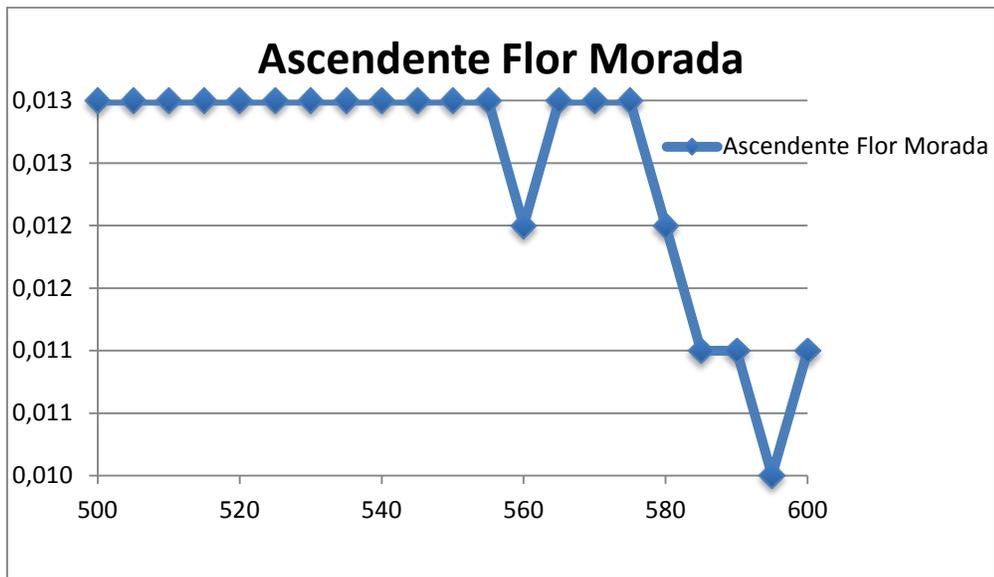
GRÁFICA 12.2 Extracto etanólico de nódulo (600-700nm)

4.4.7 Espectrofotometría de la Flor morada en luz visible.

Observándose en los diferentes espectros ascendentes del extracto etanólico de la flor morada, se presentan los picos de absorción de luz visible indicando la presencia de dos clorofilas ubicadas en las longitudes de 420 y 470nm (Grafica N°13), también hay presencia de un pico con una absorción de 565nm indicando la posible existencia de la Ficoeritrocianina en el extracto de la flor morada, el cual es un pigmento del fotosistema II, esto se pudo deducir consultando(uam.es). El resto de los espectros se considera de poca importancia, ya que no se observan mayores puntos de absorción.

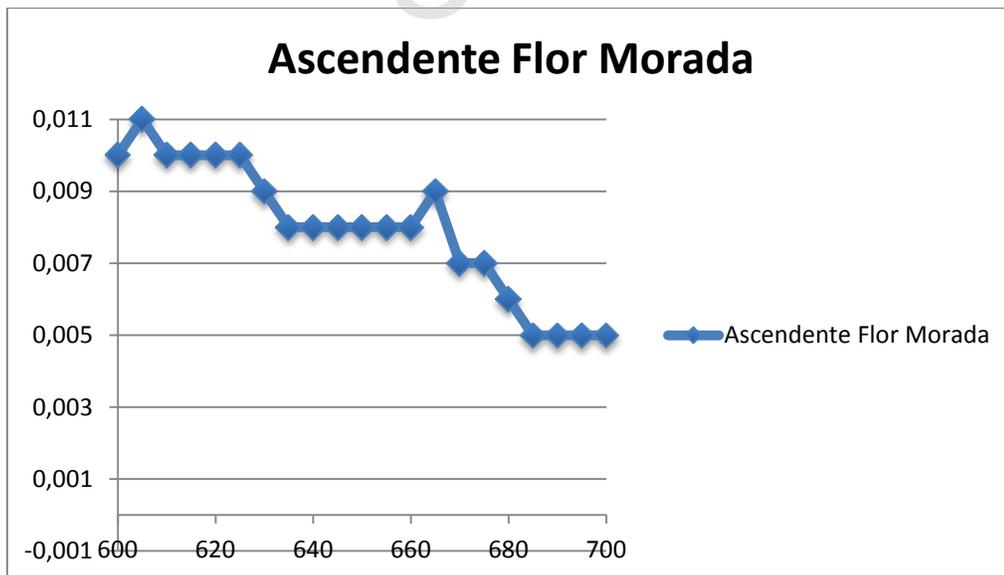


GRÁFICA 13 Extracto etanólico de flor morada ascendente (400-500nm)



GRÁFICA 13.1 Extracto etanólico de flor morada ascendente (500-600nm)

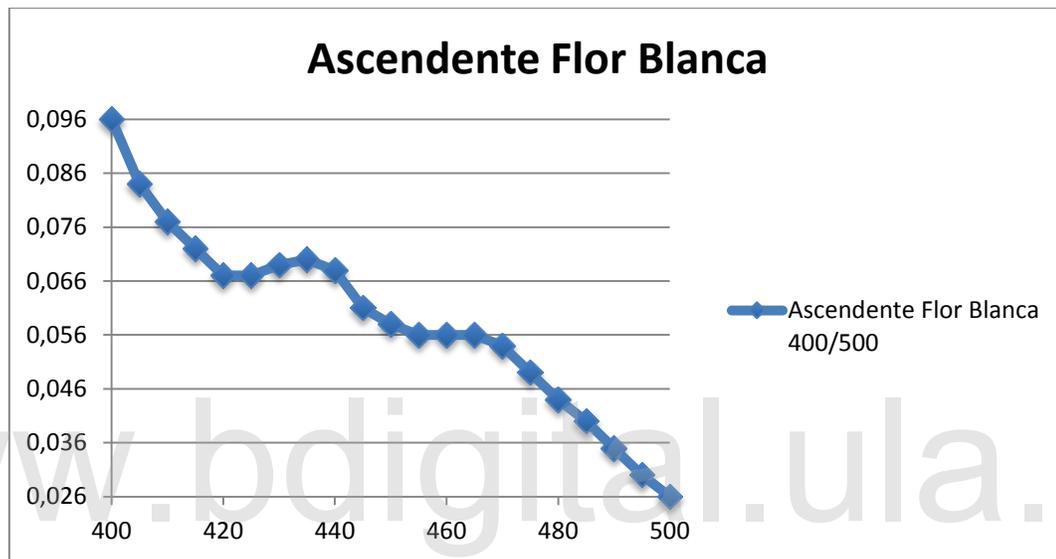
www.bdigital.ula.ve



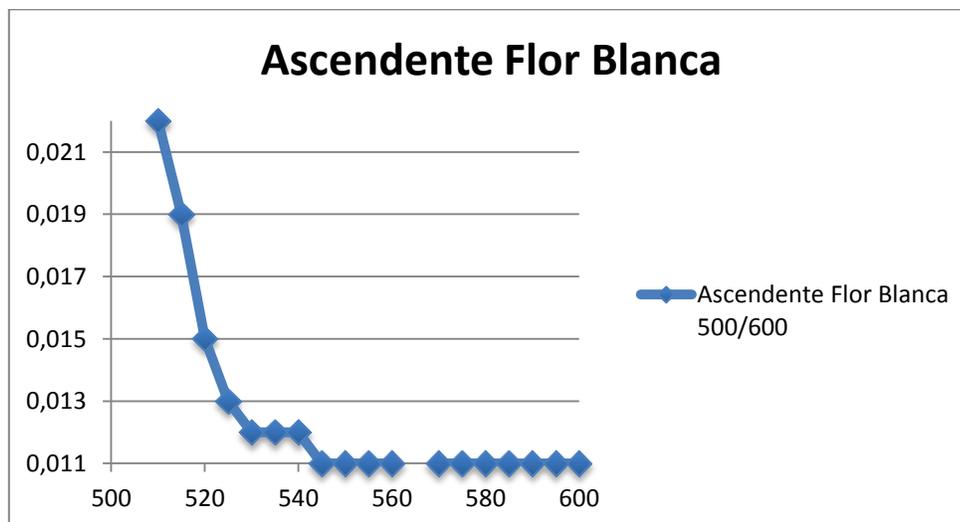
GRÁFICA 13.2 Extracto etanólico de flor morada ascendente (600-700nm)

4.4.8 Espectrofotometría de la Flor Blanca en luz visible.

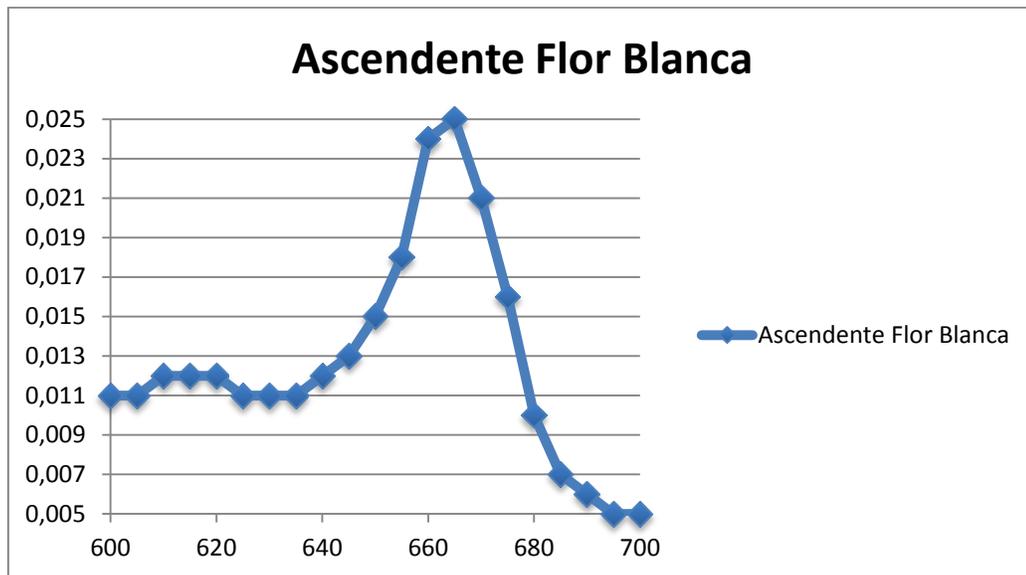
Finalmente en el caso del extracto etanólico de la flor blanca, al igual que en la flor morada presenta los mismos picos de absorción que se encuentran en 420 y 470nm indicando la presencia de dos clorofilas (Grafica N°14). El resto de los espectros se consideran de poca importancia, ya que no se observa mayores puntos de absorción.



GRÁFICA 14 Extracto etanólico de flor blanca ascendente (400-500nm)



GRÁFICA 14.1 Extracto etanólico de flor blanca (500-600nm)



GRÁFICA 14.2 Extracto etanólico de flor blanca (600-700nm)

Se puede inferir a partir de los resultados obtenidos a partir de la flor blanca y morada que debido a la sucesión en su aparición, que primero es verde, luego blanca y finalmente morada, que la clorofila va disminuyendo a medida que se da esta disminución.

4.5 Resultados en Electroforesis PAGE-SDS

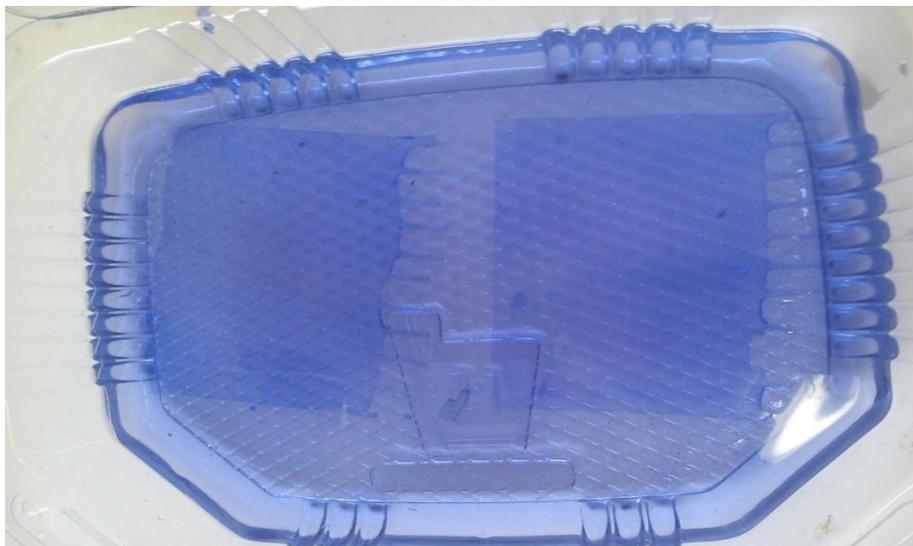


Fig37.Dos gels de electroforesis realizados



Fig38. Gel N°1

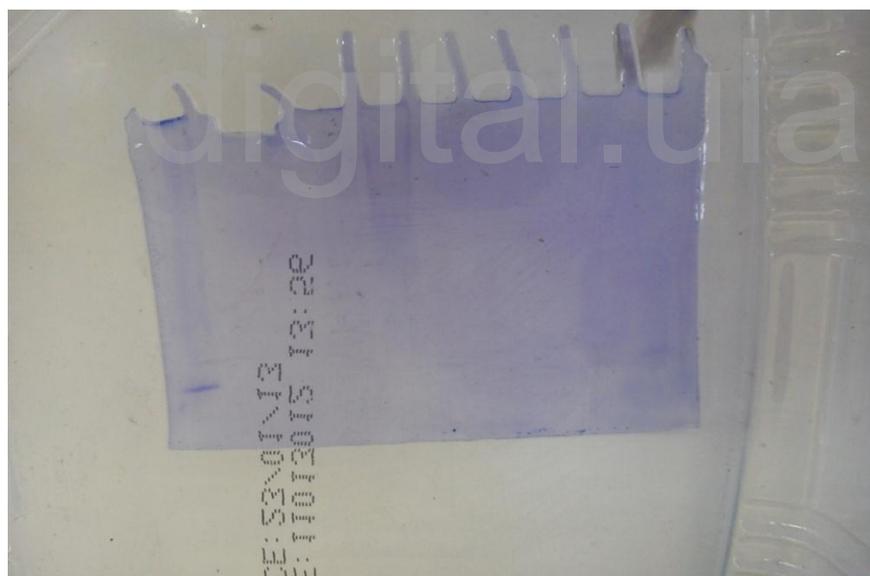


Fig39. Gel N°2

En el gel 1 se usaron patrones de peso molecular purificados en la Mención Biotecnología farmacéutica B2014, siendo: Bromelina, fracción anticancerígena1, fracción anticancerígena 2 y Leghemoglobina. El gel numero 2 corresponde con el

experimento para determinar las bandas de proteína y sus pesos moleculares en los extractos usados en este trabajo.

Electroforesis N°1 (cálculos de los Rf) el recorrido total del frente del gel fue 7cm. Este valor es el divisor para los recorridos individualizados que también se miden en cm.

- ✓ Bromelina: **M1**: $5,6/7=0,8$ **M2**: $5,8/7=0,83$ **M3**: $6,2/7=0,89$
- ✓ Sobrenadante de cristales: **M1**: $5,5/7=0,79$
- ✓ Bromelina Anticancerígena: **M2**: $5,7/7=0,81$
- ✓ Sobrenadante anticancerígeno: **M3**: $6,1/7=0,87$
- ✓ Leghemoglobina: **M4**: $6,7/7=0,96$
- ✓ Banda C (desconocida): $2,7/7,2=0,37$ y $2,6/7=0,36$

Electroforesis N°2

- ✓ Leghemoglobina: **M1**: $3,9/4,2=0,93$
- ✓ Flor Blanca: **M1**: $3,4/4,2=0,81$
- ✓ Acíbar: A1: $2,2/4,4=0,50$ A2: $2,4/4,4=0,54$

En el anexo se puede observar la tabla generada por los cálculos obtenidos en el gel 1, la tabla generada por los cálculos obtenidos en el gel 2 y la grafica de la curva de calibración del logaritmo del peso molecular en función del Rf de las bandas en los marcadores usados para la calibración , obteniendo los siguientes resultados, para el gel 1, B: cristales de borde posee un PM:40.833Dalton M1: Bromelina, (Cisteino Proteasa aislada y purificada a partir de la infrutescencia de la piña. Gautam, S., et al. (2010). PM: 28KDa, M2: Fracción anticancerígena de los cristales de Bromelina PM: 28KDa, M3: Fracción anticancerígena del sobrenadante de la Bromelina PM: 22KDa y M4: Leghemoglobina de *Lupinus meridanus* PM: 18.957

Dalton. Según estos resultados la banda D de proteína tiene un peso molecular calculado en 71.872Dalton esta no corresponde a ningún componente conocido de la Bromelina y tendió a desaparecer después de la decoloración..En el caso del gel 2, el pimpollo presenta 2 bandas con un peso molecular de 40.833Dalton y 60.449Dalton, que corresponden al componente 2 y 1 de la nitrogenasa (Guasch, L., De Felipe, M. y Fernández, M. 2001).A1 y A2: Son bandas de proteína del extracto del Acíbar de *Aloe vera*, con PM de: 107.63Dalton y A2:91.579Dalton respectivamente. HO: Es la banda de proteína que apareció en la flor blanca, que por el peso molecular 30.778Dalton y por las características fisiológicas y ambientales, debería ser la Hemo Oxigenasa, que es una enzima que se presenta cuando hay estrés lumínico por irradiación UV, según Yannarelli, G. et al.(2006) En el carril de la leghemoglobina se observan dos bandas muy tenues, N1 con un PM: 33.946Dalton y N2 que se observa con un peso molecular de 30.250Dalton en el carril del extracto del nódulo, ambas bandas pueden corresponderse al dímero de la leghemoglobina, ya que es el equivalente al doble de su peso. No pudimos poner en evidencia el monómero de esta proteína en el extracto de nódulo.

A continuación, se presentarán los cálculos de la concentración de proteína y la contaminación por ácidos nucleicos en los extractos usados en este trabajo en su forma original. Dichos cálculos se obtuvieron por medio de la tabla de Warburg, O. and Christian W. (1941)

Tabla 11. Cálculos de la concentración de proteína y la contaminación por ácidos nucleicos

Muestra	A280/A260	Factor de corrección	Acido Nucleico %	mg/ml proteína
Hoja	0,70	0,48	11,00	64,53
Pimpollo	0,72	0,51	9,5	33,22
Nódulo	0,65	0,38	13	45,52
Flor morada	0,85	0,66	5,50	13,06
Flor blanca	0,85	0,66	5,50	13,2

Cálculos: $Abs_{280}/Abs_{260} = (X \text{ resultado})$ de acuerdo al resultado se ubica en la tabla el factor de corrección (x) $Abs_{280} = (X \text{ resultado})$ se multiplicara (x) por la dilución realizada, en este caso 200, obteniéndose mg/ml proteína.

Tabla 12. Método de Warbureg y Crhistian

A_{280}/A_{260}	Correction factor	Nucleic Acid (in %)	A_{280}/A_{260}	Correction factor	Nucleic Acid (in %)
1.75	1.12	0	0.85	0.66	5.50
1.63	1.08	0.25	0.82	0.63	6.00
1.52	1.05	0.50	0.80	0.61	6.50
1.40	1.02	0.75	0.78	0.59	7.00
1.36	0.99	1.00	0.77	0.57	7.50
1.30	0.97	1.25	0.75	0.55	8.00
1.25	0.94	1.50	0.73	0.51	9.00
1.16	0.90	2.00	0.71	0.48	10.00
1.09	0.85	3.00	0.67	0.42	12.00
1.03	0.81	3.50	0.64	0.38	14.00
0.98	0.78	3.50	0.62	0.32	17.00
0.94	0.74	4.00	0.60	0.29	20.00
0.87	0.68	5.00			

4.6 Determinación de la fotoprotección-UV y fototoxicidad de los extractos etanólicos secados y resuspendidos en agua.

En este experimento se trató de evaluar la fotosensibilidad y la fotoprotección U.V de los extractos de la hoja, pimpollo, nódulo, flor blanca y flor morada. Para determinar la cantidad efectiva del extracto seco usado en cada caso, 1ml de cada uno de ellos fue secado totalmente a 60°C durante 48 horas, obteniendo valores de: extracto 1hoja= 9,3mg, extracto 2pimpollo=9,1mg y extracto3nódulo= 9,6mg, los datos de los extractos de flor blanca y flor morada esta reportado en la tesis de Flores y Rivera 2015. Luego al extracto seco se resuspendieron en 100µL de agua destilada estéril, utilizándose así en el ensayo como extracto concentrado 10x.

En condiciones de oscuridad se agregaron 10ul de la cepa GY5027 en fase de crecimiento exponencial (en Caldo Tripticasa de Soja con una absorbancia de 0,13) en los sitios correspondientes por duplicado, dejándose secar por 5 minutos posteriormente se agregaron 3ul del extracto etanólico resuspendido en agua de hoja, pimpollo, nódulo, flor blanca y flor morada en los sitios correspondientes.

Finalmente, se irradió una placa durante 30 segundos con lámpara UV a una distancia de 48cm, otra placa se irradió con luz blanca a la misma distancia durante 5 minutos y la tercera se mantuvo en oscuridad. Todo esto se realizó con la ayuda de una plantilla enumerada para ubicar cada muestra y su control.

En el primer ensayo se pudo observar en el control de oscuridad que los extractos etanólicos de hoja, pimpollo, nódulo, flor blanca y flor morada no mostraron toxicidad a las concentraciones ensayadas, pero presenta un precipitado de color ambarino (combinación entre dorado y verde) sin presencia de colonias bacterianas, el único que puede tener una pequeña inhibición del crecimiento es la muestra de pimpollo mas la cepa GY5027.

Los ensayos de luz blanca y en oscuridad, sirvieron para comparar ya que no se observó actividad biológica porque la bacteria creció en todas las muestras y no se manifestó nada significativo que alterara dicho crecimiento. El control con agua destilada no presenta toxicidad ni en la luz ni en la oscuridad.



Fig40. Resultados en oscuridad

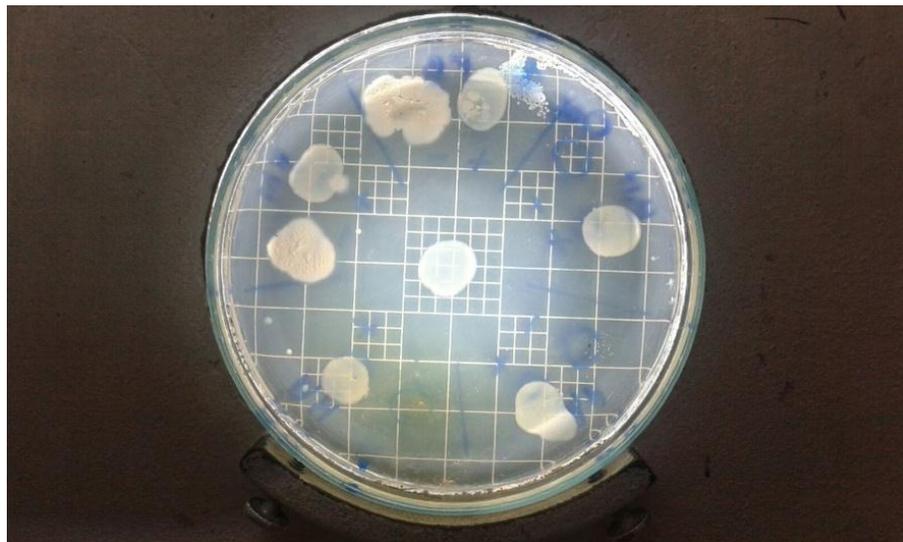


Fig41. Resultados en luz blanca

En la figura 42 se demuestra que el extracto de hoja (posición 3) presenta aproximadamente un 50% de fotoprotección y el extracto de nódulo (posición 5) mostró aproximadamente un 40% de fotoprotección-UV. El extracto de pimpollo (posición 4 de la placa de Petri), no presenta fotoprotección, en la cepa *Escherichia coli* GY5027.

En este trabajo tuvimos acceso a los extractos etanólicos de la muestra de flor blanca y flor morada de la planta *Lupinus meridanus*, de las tesis de Jennifer Flores y Andreina Rivera 2015. En este trabajo se realizó el ensayo de fotoprotección con estos extractos, poniendo en evidencia una fotoprotección -UV de 100% en el extracto de la flor blanca. El extracto de la flor morada no presentó fotoprotección-UV.

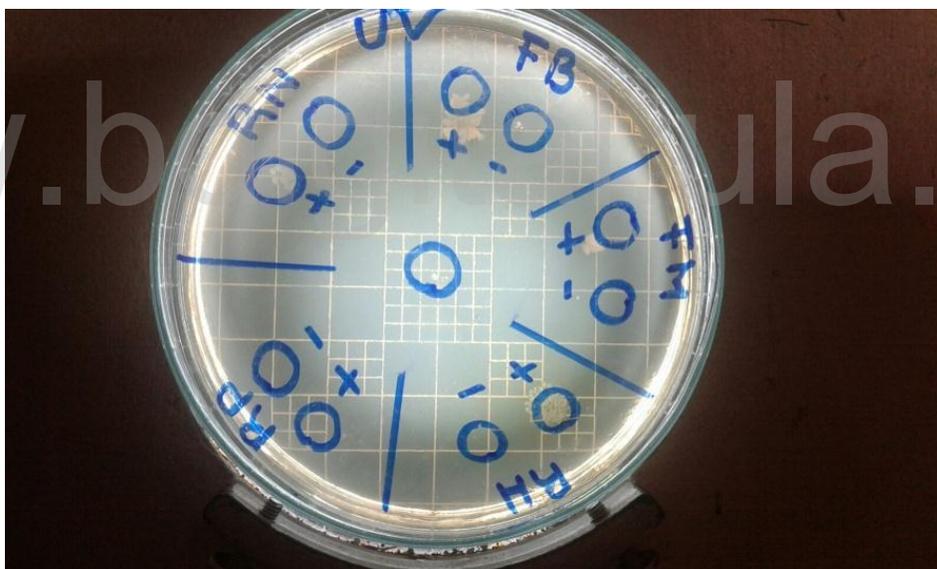


Fig42. Fotoprotección con luz UV

Posterior a la fotoprotección se realizó un aislamiento, montando otro cultivo con agar Mueller Hinton, debido a que hubo crecimiento en la placa de oscuridad y UV, obteniendo como resultado dos tipos (traslúcida y opaca) en las siguientes muestras.

RH-O = Traslucido	}	No posee GY5027
RP-O = Traslucido		
RN-O = Traslucido		
RN-UV=Traslucido		
FM-O= Opaca (No GY5027)		
FM+O= Opaca/Traslucida (Posible GY5027)		
FM+UV= Opaca/Traslucida		
FB+UV= Opaca/Traslucida		



Fig43. Aislamiento N°1

Como se observa en la figura 43 no se pudo aislar ninguna muestra por lo tanto, se procedió a aislar de nuevo, en otra placa para después irradiar la mitad con la campana de flujo laminar con luz UV por 45 segundos, colocándose en la estufa a 37°C por 24 horas resultando en las muestras del 1 al 7 (muestras de flores blancas y moradas) la presencia de resistencia a la luz UV. En el caso de las muestras 8(RH-O), 9(RN-O), 10(RP-O) y 11(RN-UV) poseen poco crecimiento en la región irradiada con luz UV comparado con la otra mitad que se sometió a solo oscuridad por ultimo tenemos la muestra 12 que sería el control de la cepa GY5027 presentando sensibilidad a los rayos UV debido a que no hubo crecimiento.



Fig44. Aislamiento N°2 irradiado la mitad con luz UV y la otra se dejó en oscuridad

Después de esto, se procedió a reaislar en un agar de método estándar las 4 cepas que se consideraron, según los experimentos anteriores que pueden poseer fotoprotección, los cuales fueron: 1) RH-O, 2) RN-O, 3) RP-O, 4) RN-UV metiéndolo a la estufa a 37°C por 24hrs. Al día siguiente se revisaron las muestras reaisladas observando que hubo crecimiento, debido a esto se procedió a sembrar en dos tubos de ensayo, llevándose a la estufa a 37°C por 24 horas. Finalmente al otro día se le realizó una coloración de Gram a las muestras sembradas en los tubos de ensayo, para así determinar la morfología celular de las bacterias presentes y también realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, como resultado final tal cual como se observa en las figuras 45 y 46 hay presencia de bacilos Gram-negativos.

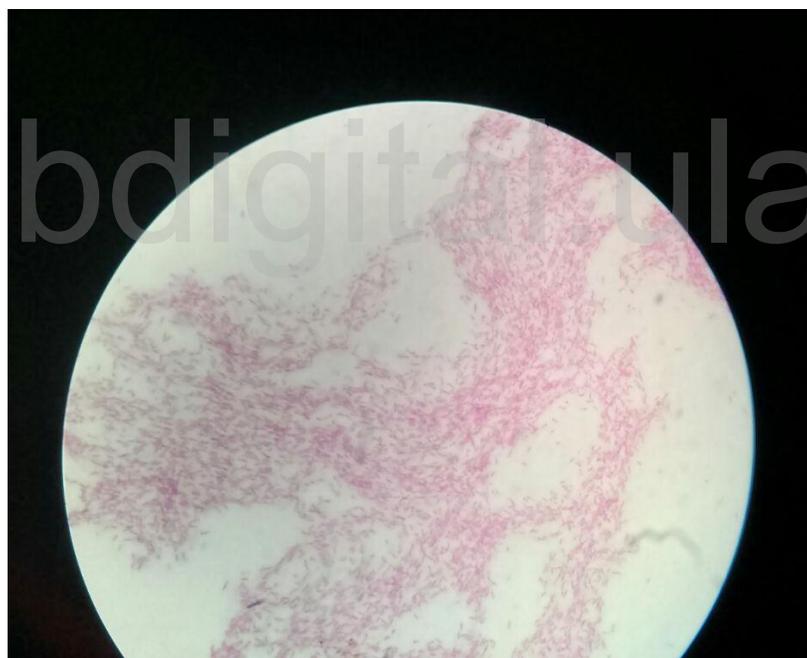


Fig45. Coloración N°1 muestras (RN-O, RP-O y RN-UV)

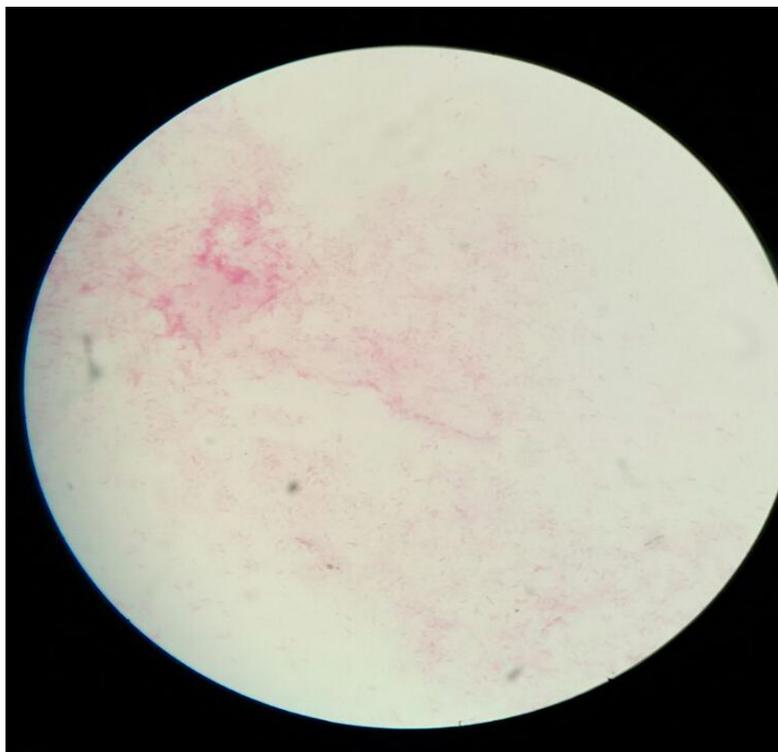


Fig46. Coloración N°2 muestra (RH-O)

CONCLUSIONES

1. La recolección de 10 plantas, se realizó exitosamente según lo planificado, conjuntamente con la recolección de la tesis de Flores y Rivera (2015). Entre los dos trabajos se recolectaron las hojas, pimpollos y nódulos radicales (estos tres para hacer *in situ* los extractos etanólicos para este trabajo) y la parte blanca y morada, por separado de la flor, estos dos para hacer *in situ* los extractos etanólicos, de la tesis de Flores y Rivera (2015). En este trabajo se usaron estos dos últimos extractos para la observación de los espectros visibles, fotoprotección, actividad biológica/toxicidad, análisis microbiológico y electroforesis.

2. Se pudo determinar la correlación entre la cromatografía y la espectrofotometría en los extractos de la hoja y el nódulo, demostrando primero que posiblemente las bandas de Rf: 0,18 y 0,68 del extracto de la hoja absorben en el UV onda corta (190-290nm), a 220nm y 260nm respectivamente. Es posible que la banda de Rf 0,18 (220nm) sea la que fotoprotege a la cepa de ensayo GY5027 (ver fotoprotección). Segundo, en el caso del nódulo este mismo análisis nos lleva a concluir que el resultado relevante en la cromatografía son las bandas de Rf 0,60-0,65 (342nm de absorción). Este compuesto es posiblemente el que promueve la fotoprotección en el ensayo con la GY5027 (ver fotoprotección).

3. Se ha detectado en la cromatografía revelada en onda corta (254nm) en el extracto del nódulo, como era de esperar algunas porfirinas, con Rf entre 0,86, 0,95 probablemente haya otra a Rf: 0,60.

4. La espectrofotometría del extracto del pimpollo arrojó un resultado interesante en la resta y la división en la escala de 190 a 290nm. Este resultado revela una Distribución Normal Asimétrica, indicando que posiblemente estemos en presencia de un sistema de varias moléculas fotosensibles. Igualmente en el nódulo se observó una “Absorción bimodal” en la resta del espectro ascendente y descendente

en onda corta (190-290nm). Este resultado es similar al obtenido por Laya (2015) en el extracto etanólico de la hoja verde de *Machaerium acuminatum Kunth*

5. Los espectros obtenidos en la región visible son controles y los mismos dieron los resultados esperados.

6. En la electroforesis, se pudo determinar la presencia del dímero de la leghemoglobina, las dos subunidades principales de la nitrogenasa en el nódulo y una banda de proteína en la flor blanca, que posiblemente se trate de la Hemo Oxigenasa, que es una enzima que se presenta cuando hay estrés lumínico por irradiación UV.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

- Se recomienda, caracterizar analíticamente las bandas que ejercen fotoprotección en el rango UV onda corta, especialmente las que están alrededor de 220nm. Trabajos previos de la sección de Biotecnología han demostrado que estas moléculas fotoprotectoras se encuentran en el rango 206 y 225nm, dependiendo de la altura que se recolecta y la parte de la planta que se utilice.
- Hacer un estudio de las 2 o 3 bandas de porfirinas que estén presentes en *Lupinus meridanus* para posteriores aplicaciones biotecnológicas.
- Caracterizar mejor la parte estructural y cinética del fenómeno óptico energético que tiene “forma de escalera” en el espectro UV onda larga del extracto de pimpollo.
- Analizar en el extracto del pimpollo las posibles aplicaciones energéticas y terapéuticas en el cáncer de piel, debido al comportamiento de “celdas acumuladoras de energía lumínica” que expresa este extracto.
- Estudiar en detalle la posible expresión de la Hemo oxigenasa presente en la flor blanca de *Lupinus meridanus* y sus potenciales usos en la biotecnología.

REFERENCIAS

- ✓ Alfonso, G. (2003). *Remington Farmacia*. Tomo I. 20 ed. Buenos Aires. Editorial Panamericana. 686
- Apaza, T, L. N. (2009). *Elaboración y evaluación de una forma galénica de origen vegetal con actividad fotoprotectora*.
- ✓ Andrade, A. y Rivas, N. (2014). Estudios de la fotosensibilidad y fotoactividad de los extractos etanólicos de la flor *Lupinus meridanus* en el páramo merideño. Tesis de grado. Facultad de farmacia y Bioanálisis. ULA.
- ✓ Andrades, E.D.J., Leal, A.A., Chávez, A.C., Andrade-Grassi, S.E., y Grassi, H.C. (1998). *estructura y función de Leghemoglobinas de Lupinus meridanus: caracterización preliminar*. Memorias XIX reunión latinoamericana de rhizobiología. P.13-14.
- ✓ Arias, F., (2012). *El proyecto de investigación*. Caracas-Venezuela: Editorial Episteme. P. 27-85.
- ✓ Barragán, N.A.; Gutt, V.F.; Silva, P.J.; Andrades, E.D.J.; León, V. (1998). *Purificación y caracterización bioquímica de las leghemoglobinas de Lupinus meridanus*. Memorias XIX reunión latinoamericana de rhizobiología. P.32.
- ✓ Briceño, B., Azocar, A., Fariñas, M., y Rada, F., (2000). Características anatómicas de dos especies de *Lupinus L.* de los andes Venezolanos. *Pittieria*, 1, (29 y 30), P. 21-22.
- ✓ Burn, R., (2003). *Fundamentos de química*. Madrid- España: Editorial Pearson Educación. P. 122
- ✓ Bustos, M., (2010). *Regulación de la expresión de antioxidantes y hemoglobinas de Lotus japonicus en respuesta a estrés y hormonas*, Tesis doctoral. Realizado en el Departamento de nutrición vegetal de la estación experimental de Aula Dei (CSIC). Zaragoza - España P. 9-10
- ✓ Castellanos, C., Frailan, D., y Baez, M., (2012). *Biotecnología*. Trabajo presentado en la universidad nacional experimental de la fuerza armada UNEFA, Marzo, Caracas.

- ✓ Chavez, A.C., Andrades, E.D.J. y Grassi, H.C. (1999). Proposición de un método aplicable a la agricultura: el porcentaje de carga de la leghemoglobina como parámetro evaluador de cultivos de leguminosa de uso comercial. **RABSUV**, 1, (01), 13-15.
- ✓ Espin, A., (2011). **Sistema híbrido de iluminación para el desarrollo de plantas**. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ✓ Flores, A., Herrera, R., y Esquivel, J., (2009). La fijación biológica de nitrógeno por microorganismos, su importancia en la agricultura y conservación del medio ambiente. **Revista Ciencia cierta**, 5, (19), 15-16
- ✓ Flores, J. y Rivera, A. (2015). **Determinación preliminar de la composición de moléculas fotosensibles de la flor *Lupinus meridanus***. Trabajo de grado. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.
- ✓ Freifelder, D., (2003). **Técnicas de bioquímica y biología molecular**. Barcelona: Editorial Reverté, S.A. P. 157- 206
- ✓ Gautam, S., Mishra, S., Dash, V., Amit, G., and Rath, G. (2010). Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. **Thai J. Pharm**, 34, 67-76.
- ✓ Gilaberte, Y., Serra, C., Guillén, B., Herasc, M., Ruiz, R., Rodríguez, D., y Fernández, L., (2006). **Terapia fotodinámica en dermatología**. Huesca- España. P. 84
- ✓ Gilaberte, Y., Serra, C., Guillén, B., Herasc, M., Ruiz, R., Rodríguez, R., y Fernández, L. (2006). **Terapia fotodinámica en dermatología**. Huesca- España. P.84
- ✓ Gonzales, A. (2013). **Morfología de Plantas Vasculares**. Argentina. P. 1.
- ✓ Grassi, H.C.; Medina, G.E.; Andrades, E.D.J. (1998, Septiembre). **Caracterización inmunoquímica de la leghemoglobina de *Lupinus meridanus***. Ponencia presentada en el XIX reunión latinoamericana de rizobiología, Monagas.

- ✓ Guasch, L., De Felipe, M. y Fernández, M. (2001). Effects of different O₂ concentrations on nitrogenase activity, respiration, and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *Journal of plant physiology*, 158, (1395-1402).
- ✓ Guerrero, N., y Sánchez, R., (2004). Biosíntesis del grupo hemo. *Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. Juan Badiano*, 23, (3), P.99.
- ✓ Gutt, V., (1985). *caracterización físico química de la leghemoglobina del Lupinus meridanus, diferenciación de rayos X y electrones. Análisis de composición de aminoácidos*. Trabajo de grado, Facultad de ciencias, Universidad de los Andes. Venezuela.
- ✓ Hicks, J.J. (2000). *Bioquímica*. Ubicación: México D.F: McGraw- Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. P. 767-775.
- ✓ <http://dle.rae.es/?w=diccionario>
- ✓ <https://www.uam.es/docencia/LAvanFis/FR/GuionFR.pdf>
- ✓ Koolman, J., y Rohm, K., (2004). *Bioquímica texto y atlas*. España: editorial Panamericana. P.- 192.
- ✓ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680–685.
- ✓ Lascano, A., Kuznitzky, R., Garay, L., Duccase, C., y Albertini, R., (2005, 09- 23). Factores de riesgo para carcinoma basocelular. Estudio de casos- controles en Córdoba. *Revista medicina Buenos Aires*, 6, P. 1.
- ✓ Lincoln, T., y Zeiger, E., (2006). *Fisiología Vegetal*. Madrid- España: Editorial Universitat Jaume. P.247.
- ✓ Lopez, A., (2006). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid- España: Ediciones Mundi Empresa. P.1555
- ✓ Madriz, L., (2001). *Determinación de la estructura primaria y secundaria de la leghemoglobina de Lupinus s.l meridanus Moritz*. Tesis de grado. Facultad de farmacia, Universidad de los Andes, Venezuela.

- ✓ Marañón, V., y Rizo, L. (2011). *Caracterización de las propiedades ópticas de de Betacianina y Betaxantinas por espectroscopia UV-Vis y barrido en Z. Sociedad mexicana de Ciencia y Tecnología de superficies y materiales*, 24, (4), 113-120.
- ✓ Medina, G.E., (1987). *Estudio estructural del sitio de biosíntesis de la leghemoglobina de Lupinus meridanus*. Trabajo especial de grado. Presentado en la facultad de ciencias. Universidad de los Andes. Venezuela.
- ✓ Medina, G.E., Andrades, E.D.J. and Serrano, J.A. (1990, Julio). **Physicochemical and ultra structural characterization of leghemoglobin's site of synthesis (caracterización fisicoquímica y ultra estructural del sitio de síntesis de la leghemoglobina)**. Ponencia presentada en la IV jornada de microscopia electrónica de la universidad de oriente, Sucre.
- ✓ Moreno, G., Luna, A., Alvarado, A., y Campos, A., (2007). Terapia Fotodinámica. *Medicina Cutánea Ibero Latino americana*, 35, (6), P.1-2.
- ✓ Muñoz, E., (2001). *Biotecnología y Sociedad*. Madrid- España: Cambridge. P.19-20
- ✓ Nieves, A., Bárcena, A., Fernández, E., Galván A., Jorrín J., Peinado, J., Toribio, F. y Túnez I. (2005) *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. P.1-2.
- ✓ Olaya, J y Méndez, J. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales*. Bogotá. Convenio Andrés Bello. 11-14.
- ✓ Pino, F., y Pérez, D. (1987). *Análisis de elementos – traza por espectrofotometría de absorción molecular UV- visible*. P.57
- ✓ Quinde, C. y Sánchez, N. (2013). *Extracción, purificación parcial y secado de la enzima bromelina obtenida a partir del corazón de la piña (ananas comosus)*. Tesis de grado. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil- Ecuador.
- ✓ Salsbrusy, F.B y Koss, C.W. (2000). *Fisiología de las plantas bioquímica vegetal*. Ubicación: Madrid- España: Thomson editores spain. P. 449-451.

- ✓ Salsbrusy, F.B y Koss, C.W. (2000). *Fisiología de las plantas, desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Ubicación: Madrid- España: Thomson editores Spain. P. 959-963.
- ✓ Silva, C., y Vinuesa, P., (2006). *Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios*. Madrid- España. P. 351- 353
- ✓ Silva, P., (1985). *caracterización físico química de la leghemoglobina del Lupinus meridanus. Resonancia magnética*. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Universidad de los Andes. Venezuela.
- ✓ Silva, P.J., Gutt, V.F., Barragán, N.A., León, V., Andrades, E.D.J. (1998). *Cristalización y estudio biofísico de la leghemoglobina de Lupinus meridanus*. Memorias XIX Reunión latinoamericana de Rhizobiología. P.33
- ✓ Skwierinski, R., Jaimes, R., y Muñoz, A. (1995). Variaciones diarias y estacionales de actividad nitrogenasa y concentración de la leghemoglobina y su relación con factores climáticos. *Revista de agronomía tropical*, 45, (2), 171-187.
- ✓ Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., y Pantier., P., (1996). *Microbiología*. España: editorial Reverté, s.a. P.134
- ✓ Tamayo, M., (2009). *El proceso de la investigación científica*. México: Limusa. P .45-47.
- ✓ Wagner, S., (2012). Fijación biológica del nitrógeno. *Revista Nature Education Knowledge*, 3, (10), 15.
- ✓ Warburg, O. and Christian W. *Biochem. Z.*, 310, 384
- ✓ Yannarelli, G., Noriega, G., Batlle, A., and Tomaro, M. (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *An International Journal of Plant Biology*, 224, (5), 1154-1162.

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve



www. [instituto-venezolano.org.ve](http://www.instituto-venezolano.org.ve)



www.bdigital.ula.ve





www.bdigitalula.ve

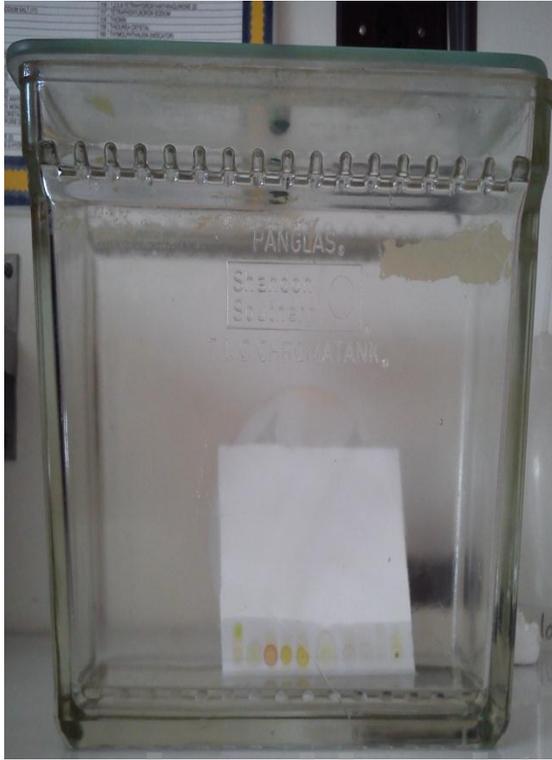




www.bdigital.ula.ve







www.bdigital.ula.ve





Espectrocolorímetro

www.bdigital.ula.ve





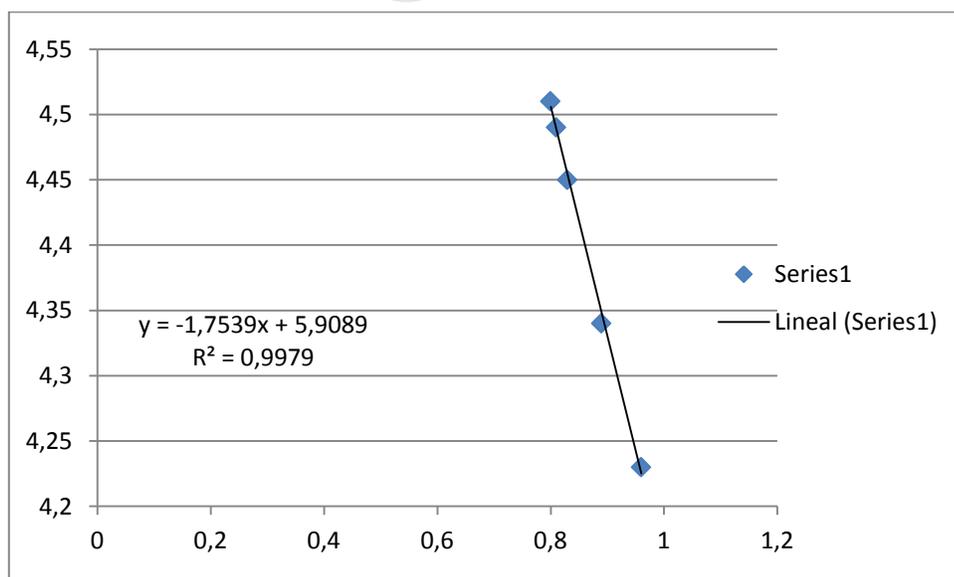
Lampara de flujo laminar



Estufa



www.bdigital.ula.ve



Curva de calibración en electroforesis.

Muestra	Cristales Borde	Cristales Fondo	Sobrenadante Cristales	Bromelina	Sob. Crist.	Sob. Brome	Bromelina Anticancerígena	Sob. Crist. borde	Sob. Antic.	LegHb
D	-----	0,60	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B	0,74	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M1	-----	-----	-----	5,6/0,8	5,5/0,79	-----	-----	-----	-----	-----
M2	-----	-----	-----	5,8/0,83	-----	-----	5,7/0,81	-----	-----	-----
M3	-----	-----	-----	6,2/0,89	-----	-----	-----	-----	6,1/0,87	-----
M4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6,7/0,93

Tabla. Gel de electroforesis (PAGE –SDS) con los patrones de peso molecular usados.

M1: Bromelina, (Cisteino proteasa) PM: 32KDa, M2: Fracción anticancerígena de los cristales de Bromelina PM: 28KDa, M3: Fracción anticancerígena del sobrenadante de la Bromelina PM: 22KDa y M4: Leghemoglobina de *Lupinus meridanus* PM: 18KDa. Según estos resultados la banda D de proteína tiene un peso molecular calculado de 71.872Dalton y la banda B que posiblemente es un componente 2 de la nitrogenasa posee un PM: 40.833Dalton.

Muestra	LegHb	Lavado Nódulos	Nódulo	Acíbar	Pimpollo	Hoja	Flor blanca	Flor morada	P
A1				0,50					
A2				0,54					
N1			0,79						
N2/HO	-----	-----	0,81	-----	-----	-----	0,81	-----	-----
M4	0,93	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabla. Gel N°2 de electroforesis (PAGE –SDS) con las muestras de este trabajo y otras muestras, para determinar pesos moleculares.

A1 y A2: Son bandas de proteína del extracto del Acíbar de *Aloe vera*, con PM A1:107.634Dalton y A2:91,579Dalton, respectivamente. HO: Es la banda de proteína que apareció en la flor blanca que por el peso molecular de 30.778Dalton y por las características fisiológicas ambientales, debería ser la Hemo Oxigenasa, que es una enzima que se presenta cuando hay estrés lumínico por irradiación UV, N1 y N2: son bandas determinadas como el dímero de la leghemoglobina con un PM N1:33.946 Dalton y N2:30.250 Dalton, M4: corresponde a la leghemoglobina de *Lupinus meridanus* con un PM de 18.957Dalton.