

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO:

“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS EN LAS HOJAS DE *BROSIMUM ALICASTRUM* Sw.”

QUE PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO NORIEGA UTRILLA

ASESOR:

DR. EN C. VICTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; MÉXICO

DICIEMBRE DEL 2016

Agradecimientos

Al Gran Arquitecto del Universo, por permitirme vivir. Gracias por la sabiduría que me otorgas y las oportunidades que me son entregadas para crear mi bienestar personal, familiar y el de mis semejantes.

A mi madre Lesvia Utrilla Corzo, mi padre Saúl Noriega Pimentel y mi hermana Rosa Martha, mi más sincero agradecimiento y amor infinitos. Me han dado la vida y amor incondicional, ustedes saben exactamente lo que son para mí.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, por aceptarme como alumno y formarme en mi carrera profesional. Así como todo el personal que labora en esta institución, les agradezco por haberme extendido la mano en las ocasiones que lo solicité, espero algún día devolverles con el mismo entusiasmo las atenciones brindadas.

Al Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo, por ser mi maestro, mentor y amigo. Gracias por resaltar mis cualidades y creer en mi capacidad para llevar a cabo este proyecto.

A todos los amigos que encontré durante mi formación académica. Los llevaré en mi memoria y en mi corazón siempre.

A todos los individuos que participaron directa o indirectamente en el presente trabajo, el cual es resultado de todos los años de estudio, dedicación y esfuerzo. Gracias por colaborar conmigo, por las felicitaciones, los regaños, las enseñanzas y las explicaciones de conceptos importantes. Saben que cuentan conmigo, se los he demostrado.

Resumen

El árbol denominado por su nombre científico *Brosimum alicastrum* Sw., se adapta a diferentes condiciones climáticas y geográficas, es por ello que su distribución se extiende desde la Península de Yucatán, hasta el sur del estado de Sinaloa. El objetivo de este proyecto, fue analizar el contenido de metabolitos secundarios y el perfil electroforético de proteínas en las hojas de *B. alicastrum*, realizando una comparación en tres sitios experimentales (Tuxtla Gutiérrez, Cintalapa y Villaflores). Mediante técnicas de extracción y cuantificación, se determinaron la cantidad de metabolitos secundarios presentes en las hojas de distintas regiones del estado de Chiapas. Además, en un estudio preliminar se extrajeron las proteínas y se determinó su tamaño molecular mediante un perfil electroforético, utilizando la técnica de SDS-PAGE. La concentración media global de los metabolitos secundarios fue de 1.73089 mg de quercetina / g de materia seca, 5.19691 mg de rutina / g de materia seca, 445.987 mg de diosgenina / g de materia seca, 0.248598 mg de proantocianidina / g de materia seca, 0.220576 mg de umberliferona / g de materia seca y 0.0376245 mg de ácido gálico / g de materia seca. En el patrón electroforético, se demostró que las proteínas presentes en las hojas de *B. alicastrum*, oscilan entre los 37 y 50 kD de peso. Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, permiten evidenciar por primera vez la concentración de metabolitos secundarios y el tamaño de las proteínas presentes en las hojas de *B. alicastrum*, permitiendo constatar por primera vez el potencial biotecnológico y nutrimental disponible en este árbol.

Índice

Índice de cuadros.....	7
Índice de figuras	8
1.- Introducción	9
2.- Problemas a resolver.....	10
3.- Objetivos.....	11
4.-Justificación	12
5.- Marco teórico	13
5.1.- Árboles perennifolios.....	13
5.2.- <i>Brosimum alicastrum</i> Sw. (Mohú)	13
5.2.1.- Descripción biológica de la planta	13
5.2.2.- Ecología y distribución	14
5.2.3.- Condiciones climáticas.....	14
5.3.- Importancia de <i>Brosimum alicastrum</i> Sw.....	15
5.4.- Estudios metabólicos en plantas.....	15
5.4.1.- Extracción de metabolitos	15
5.4.2.- Aspectos fundamentales de los metabolitos secundarios	16
5.4.3.- Flavonas y flavonoles	16
5.4.4.- Flavonoides	17
5.4.5.- Saponinas	17
5.4.6.- Taninos.....	18
5.4.7.- Cumarinas	19

5.4.8.- Fenoles	19
5.5.- Estudio proteómico en plantas.....	20
5.5.1.- Aspectos fundamentales en el estudio de la proteómica	21
5.5.2.- Extracción de proteínas	21
5.5.3.- Métodos de rotura celular	22
5.6.- Electroforesis SDS-PAGE	22
5.6.1.- Fundamento de la electroforesis SDS-PAGE.....	23
5.6.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	24
6.- Metodología	25
6.1.- Ubicación del área de estudio	25
6.2.- Sitios de muestreo	25
6.3.- Recolección del material biológico.....	27
6.4.- Preparación de las muestras	28
6.4.1.- Conservación para la cuantificación de metabolitos secundarios (Obtención de extractos metanólicos).....	28
6.4.2.- Conservación para la cuantificación de proteínas.....	29
6.5.- Determinación de metabolitos secundarios	29
6.5.1.- Análisis cuantitativo de flavonas y flavonoles	29
6.5.2.- Análisis cuantitativo de flavonoides	30
6.5.3.- Análisis cuantitativo de saponinas.....	30
6.5.4.- Análisis cuantitativo de taninos	30
6.5.5.- Análisis cuantitativo de cumarinas	31
6.5.6.- Análisis cuantitativo de fenoles	31

6.7.- Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	32
6.7.1.- Preparación del gel de separación.....	32
6.7.2.- Preparación del gel de apilamiento	33
6.7.3.- Desnaturalización de las proteínas	33
7.- Resultados y discusión.....	35
7.1.- Cuantificación de metabolitos secundarios	35
7.1.1.- Concentración de flavonas y flavonoles	35
7.1.2.- Concentración de flavonoides	36
7.1.3.- Concentración de saponinas.....	38
7.1.4.- Concentración de taninos	39
7.1.5.- Concentración de cumarinas	41
7.1.6.- Concentración de fenoles	42
7.2.- Tamaño molecular de las proteínas	45
8.- Conclusiones.....	46
9.- Bibliografía.....	47

Índice de cuadros

Cuadro 1. Reactivos y concentraciones para la preparación del gel de separación.

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones para la preparación del gel de apilamiento.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el contenido de flavonas y flavonoles.

Cuadro 4. Tabla de medias para el contenido de flavonas y flavonoles.

Cuadro 5. Análisis de varianza para el contenido de flavonoides.

Cuadro 6. Tabla de medias para el contenido de flavonoides.

Cuadro 7. Análisis de varianza para el contenido de saponinas.

Cuadro 8. Tabla de medias para el contenido de saponinas.

Cuadro 9. Análisis de varianza para el contenido de taninos.

Cuadro 10. Tabla de medias para el contenido de taninos.

Cuadro 11. Análisis de varianza para el contenido de cumarinas.

Cuadro 12. Tabla de medias para el contenido de cumarinas.

Cuadro 13. Análisis de varianza para el contenido de fenoles.

Cuadro 14. Tabla de medias para el contenido fenoles.

Cuadro 15. Valores medios para las concentraciones de metabolitos para cada sitio de muestreo.

Índice de figuras

Figura 1. Mapa del estado de Chiapas, donde se observan las colindancias de su ubicación (INAFED, 2010).

Figura 2. Municipios del estado de Chiapas donde fueron recolectadas las muestras.

Figura 3. Consideraciones en la selección de las ramas para el muestreo (Fuente: Youngentob et al., 2016).

Figura 4. Patrón electroforético de las proteínas presentes en las muestras de *Brosimum alicastrum* Sw.

1.- Introducción

La presente investigación evidencia la importancia que tiene el árbol denominado *Brosimum alicastrum* Sw., por su nombre común “Mohú”. La distribución geográfica de esta especie se extiende desde el sur del estado de Sinaloa hasta la Península de Yucatán. Esta planta tiene un prometedor valor económico en cada una de sus partes. La semilla, el follaje y su madera tienen posibilidades a considerar en su uso. Por sus características, el “Mohú” juega un rol importante de las selvas, dada su tolerancia a las sequías y su capacidad de prosperar dentro de regiones con poca humedad (Meiners *et al.*, 2009).

El metabolismo permite que los seres vivos puedan crecer, adaptarse y realizar sus funciones biológicas. El metabolismo primario juega un papel importante donde se producen moléculas tales como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos, proteínas, etc. (Gómez, 2009).

El metabolismo secundario consiste en la producción de moléculas que no son estrictamente relacionadas al crecimiento. Estas moléculas pueden encontrarse en distintas concentraciones en todos los organismos vivos tales como bacterias, hongos, animales y vegetales. La producción de estos metabolitos varía de acuerdo a las necesidades, condiciones fisiológicas, factores bióticos o abióticos, que el organismo de estudio experimente (Sánchez, 2015).

La proteómica y la metabolómica son técnicas de estudio que permiten extraer, cuantificar y analizar a las proteínas y los metabolitos secundarios respectivamente. El estudio en las plantas de estos productos del metabolismo, se deriva a la necesidad del hombre por conocer, analizar y aprovechar todos los recursos naturales disponibles a su alcance. El potencial que este árbol tiene es amplio y diverso, por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar el contenido de metabolitos secundarios y las proteínas presentes en tres sitios de muestreo (Tuxtla Gutiérrez, Cintalapa y Villaflores).

2.- Problemas a resolver

- Actualmente el aprovechamiento integral del árbol *Brosimum alicastrum* Sw. es nulo. El contenido de este reporte permite evidenciar la importancia y el potencial económico, forestal, biotecnológico y nutrimental del árbol *Brosimum alicastrum* Sw.
- Existe poca información científica relacionada con el contenido de proteínas y metabolitos secundarios, por lo que la estandarización de una técnica de extracción y cuantificación de proteínas y metabolitos secundarios para *Brosimum alicastrum* Sw., es de gran importancia.

3.- Objetivos

Objetivo general

Evaluar el contenido de metabolitos secundarios y el perfil electroforético de proteínas, presentes en las de hojas de *Brosimum alicastrum* Sw. en diferentes regiones del estado de Chiapas.

Objetivos específicos

- 1.- Establecer un protocolo para la extracción y cuantificación de metabolitos secundarios en hojas de *Brosimum alicastrum* Sw.
- 2.- Evaluar el contenido de metabolitos secundarios en hojas de *Brosimum alicastrum* Sw., provenientes de diferentes sitios experimentales.
- 3.- Establecer un protocolo para la extracción de proteínas en hojas de *Brosimum alicastrum* Sw.
- 4.- Determinar el perfil electroforético de proteínas en extractos vegetales extractos vegetales en hojas de *Brosimum alicastrum* Sw.

4.-Justificación

Las proteínas son las moléculas orgánicas más estudiadas en las plantas no solo en su contenido, también en la determinación de su estructura, propiedades y funciones biológicas. Es por ello que el estudio proteómico y los estudios de las variaciones cualitativas y cuantitativas en los patrones de expresión de proteínas, permite identificar con certeza las proteínas y enzimas implicadas en los procesos moleculares y rutas metabólicas que se desarrollan en los organismos vegetales y su potencial nutrimental y biotecnológico.

El interés actual por el árbol de *Brosimum alicastrum* Sw es la comercialización del fruto o la madera que puede producir. Sin embargo, existe poca información científica del contenido proteico y los metabolitos secundarios presentes en las hojas de este árbol; por lo que en este trabajo de investigación, se han evaluado diferentes protocolos para el análisis del contenido de proteínas y sus perfiles proteómicos así como también la cantidad metabolitos secundarios presentes en las hojas de *B. alicastrum* Sw. Permitiendo generar nuevos conocimientos a las futuras investigaciones mejorando el estudio y análisis proteómico, una inferencia hacia los mecanismos y funcionalidad de estas proteínas en los procesos bioquímicos y metabólicos presentes en las hojas de este árbol, con un gran potencial nutrimental, medicinal y biotecnológico.

5.- Marco teórico

5.1.- Árboles perennifolios

Los árboles perennifolios son la vegetación más exuberante, rica y compleja de todas las comunidades vegetales (CONABIO, 2008). Su distribución geográfica está prácticamente restringida a las zonas intertropicales. Una de las aptitudes de esta clasificación de árboles, es que las afectaciones climáticas o la falta de agua no son limitantes para el desarrollo de plántulas a lo largo de todo el año. Las zonas en que mejor se preservan aún estas especies de árboles, que conforman los bosques perennifolios son algunas partes de la Península de Yucatán, extendiéndose por la selva lacandona en el noroeste de Chiapas y hasta la región limítrofe entre Chiapas, Oaxaca y Veracruz (CONABIO, 2008).

5.2.- *Brosimum alicastrum* Sw. (Mohú)

5.2.1.- Descripción biológica de la planta

Brosimum alicastrum Sw. es un árbol perennifolio o subperennifolio, de 20 hasta 45 m de altura, con un diámetro de 50 hasta 1.5 metros. Su copa es piramidal, densa abierta e irregular, sus hojas son alternas, simples, sus láminas pueden medir de 4 a 18 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho; presentan una coloración verde brillante en el haz un verde grisáceo en el envés. Su tronco es derecho, cilíndrico con un diámetro de 1.5 a 4 metros; sus ramas son ascendentes y colgantes. Su corteza externa es lisa, con una coloración parda grisácea, con tonos amarillentos. La corteza interna es de color crema amarillento, con aspecto fibrosa o granulosa, con un abundante exudado lechoso, ligeramente dulce y pegajoso, el grosor total de esta corteza es de 7 a 12 milímetros (CONABIO, 1972).

Las flores son unisexuales, solitarias y axilares. Las masculinas están reunidas en amentos globosos, carecen de corola. Las flores femeninas están en cabezuelas ovales, con escamas más pequeñas. Sus frutos tienen una forma redonda con un

pericarpio globoso, con un diámetro de 2 a 3 cm, presentan una coloración amarilla a anaranjado o rojo cuando se encuentra en completa madurez, el sabor y el olor son dulces, estos frutos contienen aproximadamente de 2 a 3 semillas. Las semillas regularmente miden de 9 a 13 mm de largo por 16 a 20 mm de ancho, son esféricas y aplanadas en ambos extremos. Su raíz es muy fuerte, algunas raíces pueden observarse superficialmente. La sexualidad de este árbol cambia del estado masculino o femenino a partir de cierta etapa en el ciclo de vida (CONABIO, 1972).

5.2.2.- Ecología y distribución

La planta *B. alicastrum* es un componente importantes de las selvas, pero también es muy tolerante a la sequía y puede prosperar en micrositos húmedos en regiones de poca humedad (Meiners *et al.*, 2009). Esta especie no solo protege al suelo, los cuerpos de agua y la biodiversidad, también es una especie que propicia la restauración. Bajo la sombra de árboles masculinos se ha documentado una gran diversidad de plántulas de otros árboles, como el chicle y el palo mulato, lo que indica una característica amplia de coexistencia con otras especies (Meiners *et al.*, 2009).

Es un árbol originario de América tropical. Su extensión va desde el sur de México a través de Centroamérica hasta Colombia, Perú, Venezuela y en las Islas del Caribe: Cuba, Jamaica y Trinidad y Tobago (CONABIO, 1972). En México se encuentra desde Sinaloa hasta Chiapas en el litoral pacífico, en el litoral del Golfo de México desde Tamaulipas hasta Quintana Roo (Batis *et al.*, 1999).

5.2.3.- Condiciones climáticas

El árbol de *Brosimum alicastrum* Sw. prospera en sitios abarrancaos, sobre laderas calizas muy inclinadas, aunque se desarrolla mejor en llanos fértiles. Se encuentra en áreas con temperatura media anual de 18 a 27° C, con precipitaciones anuales de 600 hasta 4,000 mm de lluvias. La característica de los

suelos en donde puede crecer llega en zonas donde el pH tiene un alcance de 6.8-8.2 (CONABIO, 1972).

5.3.- Importancia de *Brosimum alicastrum* Sw.

El “Mohú” es un árbol frondoso y de hermosa simetría, en estados como Yucatán es ampliamente usado como planta de ornato y sombra, en Veracruz es usado como árbol de sombra en las plantaciones de café. El principal uso del ramón es como forraje, en donde el aprovechamiento de las hojas y ramas tiernas es usado en la alimentación de los animales de engorda, las cuales pueden presentar entre un 8% y un 30% de proteína cruda (Pardo & Sánchez, 1980). Además sus hojas pueden ser utilizadas para tratar infecciones de pecho así como la corteza usarse como tónica. Su madera posee una característica de ser muy elástica y poseer propiedades físicas que la vuelven fácil de tornear, escoplear y cepillar (Romero, 2011).

5.4.- Estudios metabolómicos en plantas

El término metabolómica se refiere al estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo peso molecular en células, tejidos o fluidos biológicos, producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos, cuya cuantificación proporciona un amplio panorama del estatus bioquímico (Férrandez *et al.* 2009).

5.4.1.- Extracción de metabolitos

La extracción es un término usado en la industria farmacéutica que implica la separación de las porciones activas de los tejidos vegetales de la parte inactiva, o los compuestos inertes mediante el uso selectivo de solventes en distintos procedimientos (Handa *et al.* 2008).

Usualmente la extracción se realiza a partir de muestras secadas por aire o liofilizadas utilizando una amplia variedad de solventes. Sin embargo, se utilizan un solvente polar como el metanol causando una buena separación de los compuestos (Colegate & Molyneux, 2008).

5.4.2.- Aspectos fundamentales de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos sintetizados por los organismos vivos, cuya producción no está relacionada directamente al crecimiento o reproducción de los mismos. A diferencia de las proteínas, que son consideradas como metabolitos primarios, la ausencia de los metabolitos secundarios no impide la supervivencia, sin embargo, estos se producen por rutas anabólicas especializadas cuando no hay crecimiento. (Patra *et al.* 2013).

En los organismos vivos, existen tres rutas biosintéticas que dan parte al metabolismo secundario, estas son: la ruta del ácido shikímico (alcaloides y fenilpropanoides, ruta de acetato-malonato (policétidos) y ruta del acetato-mevalonato (terpenos o isoprenoides) (Sánchez, 2015). Estas rutas biosintéticas dan origen, a los compuestos secundarios los cuales se dividen en tres amplios grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos nitrogenados (Sánchez, 2015).

5.4.3.- Flavonas y flavonoles

Una gran variedad de compuestos se producen a través de la ruta de los fenilpropanoides, de la cual se derivan numerosos compuestos polifenólicos, entre ellos las flavonas (Miyahisa *et al.*, 2005). En las plantas tienen propiedades importantes en las actividades biológicas como el crecimiento de raíces, la coloración de los frutos, etc. Las flavonas comprenden un grupo de compuestos importantes, se encuentran concentraciones muy grandes de este metabolito en cereales, como el maíz y el arroz los cuales tienen un rol importante en la alimentación humana y animal (Brazier & Edwards, 2012).

Los flavonoles son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los flavonoides. Estos compuestos se distinguen por la oxidación del central anillo de pirano. Existen evidencias de que los flavonoles controlan el crecimiento de la planta y actúan directamente en el transporte de axinas, causando así la derivación de brotes y raíces (Nguyen *et al.*, 2013). Además, participación en la pigmentación

de las hojas y en su brillo, así como la relación de generación de polen para causar la germinación de frutos. Este metabolito tiene un potencial medicinal, ya que se utiliza en el tratamiento contra el cáncer, su consumo puede beneficiar evitar enfermedades cardiovasculares (Sun *et al.*, 2016).

5.4.4.- Flavonoides

Los flavonoides representan a una larga familia de moléculas de bajo peso molecular, derivados de compuestos polifenólicos producto del metabolismo secundario. Estos compuestos están dispersos en el reino vegetal desde los musgos hasta los angiospermas. Por definición, los flavonoides tienen la misma composición, la cual consiste en dos anillos aromáticos con seis átomos de carbono interconectados por un átomo heterocíclico de tres carbonos. De acuerdo a la modificación que tenga el carbono heterocíclico de tres carbonos y la participación de enzimas (metil transferasas, acil transferasas, glicosil transferasas), se puede dividir en diferentes clases estructurales tales como: flavononas, isovlaononas, flavonas, flavonoles y antocianinas (Schijlen *et al.*, 2004).

Estos compuestos se encuentran principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, así como en las frutas, verduras, semillas y flores. Desempeñan un papel importante como controladores de los niveles de los reguladores del crecimiento (auxinas), responden a la luz y su producción en ocasiones tiene un papel anti-fúngico y bactericida. Además tienen una capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Regelson & Formica, 2005).

5.4.5.- Saponinas

El término saponinas define un grupo de compuestos naturales que consisten derivados de isoprenoides, unido por un enlace covalente a una o más moléculas de azúcar. Estos compuestos secundarios, derivados del metabolismo secundario se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Su producción y acumulación está influenciada severamente por factores ambientales tales como,

la falta de nutrientes, la disponibilidad de agua o la irradiación de la luz. El rol biológico de las saponinas no está completamente entendido. En las plantas, generalmente son consideradas como parte de un sistema de defensa antimicrobiano, antifúngico, alelopático, insecticida, etc. (Jörg *et al.*, 2010).

La naturaleza de estos metabolitos secundarios es glucosídica, ya que se encuentra unida generalmente a un azúcar, el cual puede ser glucosa, galactosa, xilosa, rhamnosa, o metil pentosa a unidos a una aglucona hidrofóbica. La variabilidad de las saponinas está relacionada a la variabilidad de la estructura de la aglucona y la azúcar unida a su estructura (Regelson y Formica, 2005; Kohara, A., 2007). Además, estas moléculas tienen propiedades farmacéuticas de valor, la investigación de estos compuestos ha ido incrementando debido al potencial como agente anticancerígeno Kohara, A., 2007).

5.4.6.- Taninos

Los taninos son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólicas. Son solubles en distintos líquidos como alcohol, acetona, pero son pocos solubles en etcétera. Existen dos clases de taninos: hidrolizables y condensados. Estos compuestos están bien distribuidos en el reino vegetal, pueden ser encontrados en hojas o en tejidos vegetales tales como: ramas, madera, corteza, raíces, semillas y frutos (Barbehenn & Constabel, 2011)

.Es importante mencionar que la estructura de los taninos juegan un rol importante en el efecto biológico. Los taninos contribuyen a la formación de complejos proteicos mediante interacciones hidrofóbicas de su estructura, estos enlaces son considerados más débiles que los puentes de hidrógeno. Estos compuestos tienen una propiedad característica de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable, fijándose sobre sus proteínas (Sánchez, 2008).

Las actividades bioquímicas de los taninos, son desde funciones antioxidantes hasta daños oxidantes y toxinas. Si los taninos, liberan radicales libres, su función pueden actuar como antioxidantes. Los fines químicos de estos compuestos

dependen de su estructura química, del pH, del potencial redox y de la concentración de oxidantes y antioxidantes. El daño de insectos puede tener una fuerte inducción de producción de taninos en plantas, las cuales sugieren que contribuye a su defensa en la zona donde son atacadas (Barbehenn & Constabel, 2011).

5.4.7.- Cumarinas

Las cumarinas son un grupo muy amplio de compuestos fenólicos que se encuentran en plantas. Son compuestos heterocíclicos derivados del ácido cinámico (Sánchez, 2015) y son sujetos a numerosas modificaciones, tales como: cumarinas simples, oxigenadas, pirocumarinas, fenilcumarinas, furancumarinas y piranocumarinas (Bourgard *et al.*, 2006). Este compuesto natural es bien conocido por presentar un olor a vainilla muy agradable, existen muchos reportes del efecto causado por la presencia de este compuesto, desde zonas del tejido hasta el nivel celular. Sin embargo, no hay evidencia sólida de la función específica que provee a los tejidos celulares, hasta ahora se ha demostrado que actúa como una hormona. Contribuyen esencialmente a la persistencia de las plantas en el proceso de defensa contra fitopatógenos, son responsables de la regulación del estrés oxidativo, la regulación hormonal y respuesta al estrés abiótico. Dentro de sus posibles usos se encuentra, el uso en la heparina como anticoagulante, así como aplicaciones en el campo terapéutico en el tratamiento de la esclerosis múltiple, en la fotoquimioterapia de las células T, el tratamiento para la adicción de la nicotina y en quimioterapia de drogas resistentes a tumores (Bourgard *et al.*, 2006).

5.4.8.- Fenoles

Los compuestos fenólicos son todas aquellas sustancias que poseen en su composición hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Son uno de los principales metabolitos secundarios presentes en las plantas. Los fenoles son sintetizados por las plantas y regulados por los genes de estas (Sánchez, 2015). La estructura química de estos compuestos, permite ejercer una acción

antioxidante actuando como captores de radicales libres. También tienen actividad antimicrobiana y fúngicas, dado que se producen como sistema de protección ante ataques de patógenos. Además contribuyen a la pigmentación de partes de las plantas (ej. Las antocianinas son las responsables del color rojo, naranja, azul o violeta que se encuentra en las pieles de las frutas y hortalizas (Daisuke *et al.* 2012).

5.5.- Estudio proteómico en plantas

Las proteínas son moléculas orgánicas complejas, formadas por aminoácidos ordenados en largas hileras o cadenas polipeptídicas mantenidas por enlaces químicos entre el grupo amino (NH_2) de un aminoácido y el grupo carboxilo (COOH) del siguiente aminoácido. Las proteínas se encuentran en todos los organismos vivos, son las moléculas más abundantes (Pando & Ferreira, 2007). El término proteoma fue mencionado por primera vez en el congreso de Electroforesis Bidimensional de Siena (1994), el cual hace referencia al conjunto de proteínas que se expresan por un genoma (Willam & Hochstrasser, 1997). Cada organismo presenta un proteoma variado, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que sea objeto de estudio, los cuales a su vez, son cambiantes ante alteraciones en su ambiente, tales como situaciones de estrés, acción de fármacos o el estado fisiológico particular (Pando & Ferreira, 2007). La proteómica permite establecer las identidades, cantidades, estructuras y funciones bioquímicas y células de todas las proteínas pertenecientes de un organismo, órgano u orgánulo; también esta disciplina estudia la variación de las propiedades de las proteínas en el espacio, el tiempo y bajo distintas condiciones fisiológicas (Kenyon *et al.*, 2002).

5.5.1.- Aspectos fundamentales en el estudio de la proteómica

Aunque por definición el estudio del proteoma, permite identificar a las proteínas presentes en un organismo vivo es necesario mencionar aspectos importantes tales como (Ramírez, 2015):

- La proteómica de expresión es el estudio cuantitativo y cualitativo de la expresión o acumulación de proteínas entre muestra de una misma especie que difieren en el tratamiento.
- Proteómica funcional es el estudio de la función de las proteínas dentro de un sistema biológico y la regulación de su expresión dentro de ese sistema.
- Proteómica estructural implica la determinación y análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas expresadas, con lo cual se infiere la identidad molecular de la proteína estudiada.

5.5.2.- Extracción de proteínas

Los métodos utilizados en la extracción de proteínas son muy diversos, existen aquellos que comprenden la extracción por solventes orgánico como el fenol (Faurobert *et al.* 2007), así la extracción con tampones acuosos en presencia de detergentes (Wei *et al.*, 2009), o usando precipitaciones del material vegetal sin un tratamiento previo, en donde el reactivo más utilizado es el ácido tricloroacético disuelto en acetona (Menchin *et al.* 2007). Estas metodologías son utilizadas dependiendo para determinar las proteínas de interés, ya que la solubilidad está asociada a la localización intracelular de estas (Ramírez, 2015). Por lo tanto, no existe un método global para la extracción de proteínas. Sin embargo la extracción y la precipitación de las proteínas, debe ser lo más simple posible con la finalidad de incrementar a reproducibilidad de la electroforesis en dos dimensiones (Ramírez, 2015).

5.5.3.- Métodos de rotura celular

Las proteínas no se encuentran aisladas en la naturaleza, por lo que el primer paso es el aislamiento de una proteína mediante los distintos métodos de rotura celular, que permiten extraerla y localizarla (Ramírez, 2015):

- Lisis celular: Consiste en suspender las células en una solución hipotónica, que permite mediante la presión osmótica causada por el agua, el interior de la célula se hinche y posteriormente se rompa. Este método es comúnmente utilizado en células de tejidos animales.
- Destrucción mecánica: Este método básicamente es la homogenización total de las células utilizando morteros, molino, prensas o someter a las células a las vibraciones de ultrasonido.

Posterior al proceso de rotura, se utilizan tampones de extracción para solubilizar las proteínas. Tales como disoluciones acuosas en tampones específicos para proteínas solubles, que permitan purificar proteínas asociadas a las membranas sin que las enzimas no se desnaturalicen (Ramírez, 2015).

5.6.- Electroforesis SDS-PAGE

El término Electroforesis fue empleado por primera vez en 1937, por *Tiselius*. Posteriormente *Raymond* y *Weintraub* en 1959 emplearon en esta técnica un gel de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis permite analizar la separación de las biomoléculas en relación de su masa carga y bajo la acción de un campo eléctrico. En 1970 se introduce el dodecilsulfato de sodio (SDS) para determinar el peso molecular de proteínas, obteniendo así la terminación (SDS-PAGE).

5.6.1.- Fundamento de la electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis utiliza la influencia de un campo eléctrico, causando la migración de solutos iónicos. Estas partículas migran del cátodo o ánodo (electrodos + y -) en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, es decir, a la resistencia que ofrece el medio. Por lo tanto:

$$V = q E / f$$

Esta velocidad de migración es dependiente de la densidad de la relación carga/peso, del voltaje aplicado y de la porosidad del gel utilizado en la electroforesis. EL voltaje no puede ser incrementado para acelerar la migración, ya que se generaría un uso excesivo de calor, al igual que el voltaje no puede ser muy bajo dado que la separación en la corrida en electroforética sería muy escasa (Chávez *et al.*, 1990). Dada la sensibilidad de este método, también es utilizado para la determinación de otros parámetros tales como: peso molecular, punto isoeléctrico y números de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Ramírez, 2015).

Las proteínas son moléculas que se combinan con los iones hidrogeno y con otros iones presentes en disolución, dando un lugar a la carga de la molécula. Dado que la mayoría de las macrobiomoléculas poseen una carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de dissociarse, esta carga puede ser modificada por el pH del medio, causando interacción con otras macromoléculas. Las proteínas pueden poseer una carga neta negativa, positiva o igual a cero por el pH del medio donde se encuentren. Por lo tanto, la primera dimensión corresponde a una separación por punto isoeléctrico por medio de un isoelectroenfoco (IFE), en una

tira de IEF que tiene un gradiente de pH lineal entre el cátodo y el ánodo (Newton *et al.*, 2004).

5.6.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado ampliamente, dado que es químicamente inerte y de propiedades uniformes. El uso de este compuesto permite formar geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten una buena visualización de las bandas electroforéticas durante un tiempo prologando. Además, tienen la ventaja de que al variar la concentración de polímeros se puede controlar el tamaño del poro (Álvarez, 2011). Este polímero retrasa el desplazamiento de las proteínas de una forma proporcional a su masa molecular (Lehninger, 2009).

6.- Metodología

6.1.- Ubicación del área de estudio

Los procedimientos experimentales relacionados con la extracción y cuantificación e identificación de bandas de las proteínas, así como el proceso de extracción y cuantificación de los aminoácidos presentes en las hojas del árbol *Brosimum alicastrum* Sw. Se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas analíticas en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), ubicado en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México ($16^{\circ} 45' 26.2''$ LN y $93^{\circ} 10' 24.8''$ LO; altitud=584 msnm).

6.2.- Sitios de muestreo

El estado de Chiapas está delimitado por los paralelos $17^{\circ}59'$ y $14^{\circ}32'$, de latitud norte; y los meridianos $90^{\circ}22'$ y $94^{\circ}14'$ de longitud oeste. Colinda al norte con Tabasco; al este con la República de Guatemala; al sur con la República de Guatemala y el océano Pacífico; al oeste con el océano Pacífico, Oaxaca y Veracruz–Llave (INAFED, 2010).



Figura 1. Mapa del estado de Chiapas, donde se observan las colindancias de su ubicación (INAFED, 2010).

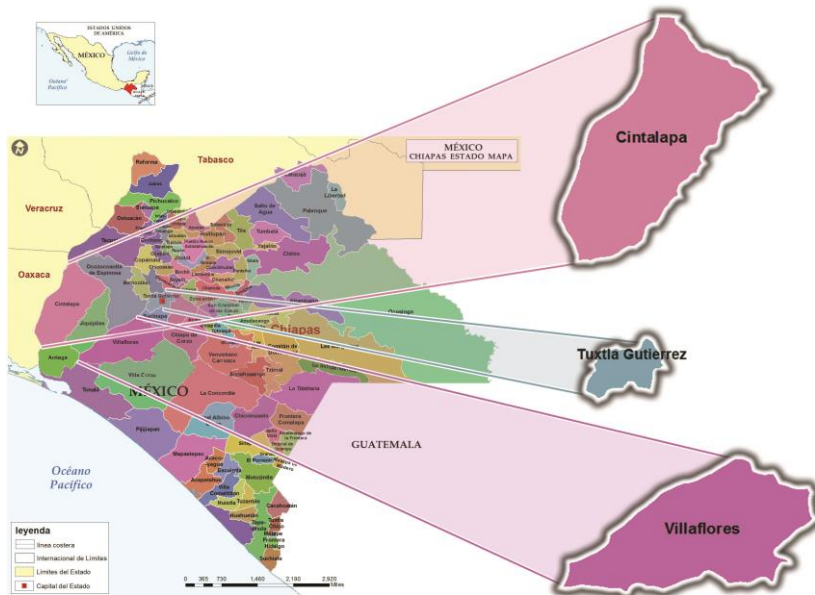


Figura 2. Municipios del estado de Chiapas donde fueron recolectadas las muestras.

Las muestras fueron recolectadas en los siguientes sitios experimentales (INEGI, 2010):

- Sitio de Cintalapa: se encuentra en el extremo oeste del Estado de Chiapas, las coordenadas geográficas donde se encuentra son $16^{\circ} 39' N$ y $93^{\circ} 44' W$ su altitud es de 540 msnm. Limita al norte, con el municipio de Tecpatán, al oeste con el Estado de Oaxaca, al este con Jiquipilas y Ocozocoautla de Espinosa y al sur con Arriaga. Este municipio tiene un clima cálido subhúmedo, con un rango de temperaturas de 18 a 28° y de precipitación de $900 - 3000$ mm. El suelo dominante en esta región es el leptosol, cambisol y regosol.
- Sitio Tuxtla Gutiérrez: está ubicado en la Depresión Central, sus coordenadas geográficas son $16^{\circ} 45'' N$ y $93^{\circ} 07'' W$ su altitud es de 522 msnm. Limita al norte con el municipio de San Fernando y Osumacinta, al este con Chiapa de Corzo, al sur con Suchiapa y al oeste con

Ocozocoautla y Berriozábal. Cuenta con un clima cálido subhúmedo, con lluvias en verano con una precipitación de 1000 a 3500 mm y un rango de temperatura de 20 a 28°C. El suelo predominante es el leptosol, regosol y vertisol.

- Sitio de Villaflores: Localizado en los límites de la Depresión Central y de la Sierra Madre, donde predominando el relieve montañoso. Sus coordenadas geográficas son 16° 14" N y 93° 16" W su altitud es de 560 msnm. Limita al norte con los municipios de Suchiapa, Jiquipilas y Ocozocoautla, al este con Chiapa de Corzo y Villa Corzo, al sur con Villa Corzo y Tonalá, al oeste con Jiquipilas y Arriaga. Las condiciones climáticas con subhúmedo con lluvias en verano, el rango de temperatura de 14 a 26°C, el rango de precipitación oscila entre los 1000 y 3500 mm.

6.3.- Recolección del material biológico

Todas las muestras colectadas se basaron de acuerdo a la metodología ligeramente modificada de Youngentob *et al.* (2016). Brevemente, se seleccionaron 5 árboles con la misma edad y con mayor vigor en cada sitio de muestreo en un área no mayor a 1 hectárea, recolectado 10 hojas por cada árbol. La ubicación fue determinada con un geo-localizador para poder recolectar muestras en experimentos posteriores. Es importante mencionar que se eligieron hojas sin enfermedades o daño, solo hojas limpias y en buen estado fueron seleccionado para incurrir al análisis. Posterior a la recolección las hojas fueron almacenadas en una bolsa de papel celofán para evitar contaminación o transpiración. Cada muestra fue enumerada y clasificada para cada árbol seleccionado.

El equipo básico utilizado para la recolección fueron guantes, casco, tijeras, cinta métrica, geo-localizador, bolsas de papel y vernier. Existe una consideración importante al seleccionar una rama ideal, esta debe tener un diámetro de entre 3 y 5 cm (Youngentob *et al.*, 2016). La rama adecuada debe tener un ángulo de entre

45-90°, esa inclinación ayudará a aislar la fuerza y realizar un corte más eficaz (Figura 3).

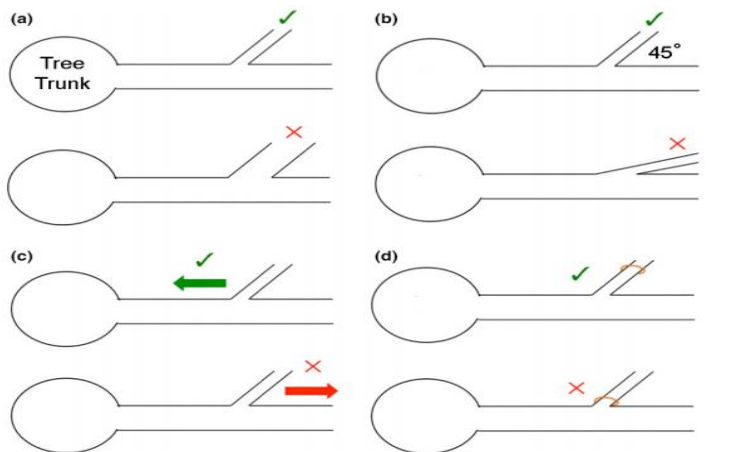


Figura 3. Consideraciones en la selección de las ramas para el muestreo (Fuente: Youngentob *et al.*, 2016).

6.4.- Preparación de las muestras

Las muestras obtenidas de los municipios fueron estrictamente seleccionadas, considerando que las hojas tuvieran un tamaño uniforme, así como un aspecto totalmente inocuo y sin ninguna alteración física de su constitución. Las hojas seleccionadas fueron lavadas con jabón líquido y puestas a secar a temperatura ambiente para su almacenamiento. Es importante mencionar que se utilizaron dos métodos distintos de conservación de las muestras, dado que de acuerdo a los objetivos planteados se determinarían la cantidad de proteínas y metabolitos secundarios presentes.

6.4.1.- Conservación para la cuantificación de metabolitos secundarios (Obtención de extractos metanólicos)

Las hojas de *Brosimum alicastrum* Sw. Se secaron en un horno a 45°C durante 12 horas para remover el exceso de agua. Posterior al secado se pesaron 5 g del material vegetal y se pulverizó para luego ser colocado en un matraz Erlenmeyer

al cual se le adicionó 70 ml de metanol (Sigma-Aldrich) al 100%, esta mezcla fue sometida a sonicación en un sonicador (Bandelin SONOREX Digital 10 P Ultrasonic baths) durante dos horas a temperatura ambiente, la mezcla obtenida fue filtrada y almacenada en tubos falcon de 50 ml y finalmente centrifugada en una centrifuga (Thermo scientific, SHKA 200) a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue evaporado al vacío en un rotavapor (Rotvapor R-215) a una temperatura de 45°C y el residuo fue suspendido en 5 ml de metanol para su almacenamiento en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C (Chang *et al.*, 2002).

6.4.2.- Conservación para la cuantificación de proteínas

Se pesaron 0.5 g hojas recién cortadas de *Brosimum alicastrum* Sw. Posteriormente fueron maceradas en un mortero con pistilo agregando nitrógeno líquido, para luego ser almacenadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C (Chang *et al.*, 2002).

6.5.- Determinación de metabolitos secundarios

6.5.1.- Análisis cuantitativo de flavonas y flavonoles

A 250 μ l de la muestra diluida, se le adicionaron 750 μ l de etanol (J.T. Baker) al 95%, 50 μ l de cloruro de aluminio al 10% (Fluka), 50 μ l de acetato de potasio 1M y 1400 μ l de agua destilada. Posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min, la absorbancia de esta mezcla fue medida a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). Para la preparación del blanco, la cantidad de cloruro de aluminio al 10% se sustituye por la misma cantidad de agua. Para la curva patrón de este experimento se preparó una solución madre de quercetina (Sigma-Aldrich). Donde a 10 ml de quercetina fueron disueltas en etanol (J.T. Baker) y fue diluida a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La concentración de flavonas y flavonoles fue expresada en mg equivalentes de quercetina \cdot g de materia seca⁻¹ (Chang *et al.*, 2002).

6.5.2.- Análisis cuantitativo de flavonoides

A 100 μl del extracto diluido, se le agrego 1000 μl de Metanol (J.T Baker) y 50 μl de una solución de 2-aminoetildifenilborato (Sigma-Aldrich) al 1% en metanol y se dejó reposar a una temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente la absorbancia de las muestras fue monitoreada a una longitud de onda de 404 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). La curva patrón fue realizada con una solución estándar de rutina 0.1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones (0, 10, 20, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los resultados fueron expresado en mg equivalentes de rutina $\cdot\text{g}$ de materia seca⁻¹ (Chang *et al.*, 2002).

6.5.3.- Análisis cuantitativo de saponinas

Se tomó una alícuota de 200 μl del extracto diluido en metanol al 80%, posteriormente colocado en un tubo de ensaye. Se agregaron 200 μl del reactivo vainillina al 8% en etanol y luego 2000 μl de ácido sulfúrico al 72% (v/v) poco a poco en las paredes internas del tubo. Después de mezclar bien la solución, los tubos fueron colocados en un baño de agua caliente a 60°C durante 10 minutos, transcurrido ese tiempo los tubos fueron enfriados en agua helada durante 4 minutos, y finalmente la absorbancia de las muestras fue leída a 520 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). La concentración de saponinas, fue calculada en base a la curva patrón de calibración obtenida a partir de una solución de diosgenina 1 $\text{mg}\cdot\text{g}$ de materia seca⁻¹ (Sigma-Aldrich) en metanol al 80%. Los resultados fueron expresados en $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de diosgenina (Wagner & Bladt, 1996).

6.5.4.- Análisis cuantitativo de taninos

A 400 μl del extracto diluido, se le adicionaron 1000 μl de vainillina (J.T. Baker) al 1% en metanol, se agregaron también 1000 μl de ácido sulfúrico (AVANTOR) al 7.2 N en metanol. Las muestras fueron colocadas en un agua caliente a 35°C durante 15 minutos para finalmente medir la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). La concentración de

taninos totales fue determinada por medio de una curva patrón con las siguientes concentraciones de proantocianidina (Sigma-Aldrich): 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 mg/ml. Los resultados fueron expresados en términos de equivalentes de proantocianidina en $\text{mg} \cdot \text{g}$ de materia seca⁻¹ (Sherman & Kowalska, 2008).

6.5.5.- Análisis cuantitativo de cumarinas

Se tomaron alícuotas de 50 μl del extracto, los cuales fueron agregados a tubos de ensaye, posteriormente se le adicionaron 1000 de metanol (Sigma-Aldrich) al 80% y 1500 μl de acetato de plomo (J.T Baker) al 80%. La mezcla fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos en un ambiente obscuro. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000) a una longitud de onda de 320 nm. La concentración de cumarinas totales fue determinada por medio de una curva patrón de umberliferona (Sigma-Aldrich): 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 mg/ml. Los resultados fueron expresados en términos de equivalentes de umberliferona en $\text{mg} \cdot \text{g}$ de materia seca⁻¹ (Singleton *et al.*, 1999).

6.5.6.- Análisis cuantitativo de fenoles

A 20 μl del extracto, los cuales fueron agregados a tubos de ensaye por triplicado, se le agregaron 1500 μl de agua destilada y 100 μl del reactivo Folin-Ciocalteu, se dejó reposar 5 minutos para agregar 300 μl de una solución de carbonato de sodio al 20%. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min a 40°C. Finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro (HACH® DR 5000). Para determinar la concentración de fenoles totales, se realizó una curva estándar de ácido gálico a distintas concentraciones (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 mg/ml). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico $\cdot \text{g}$ de materia seca⁻¹. (Singleton *et al.*, 1999).

6.6.- Extracción de proteínas de las hojas mediante el protocolo de CHEN

A las muestras previamente tratadas y almacenadas, se les adicionó 0.5 ml del buffer de extracción, el cual su contiene [Tris-HCl + ácido ascórbico + glicerina + polivinilpolipirrolidona + β -mercaptoetanol; pH 8.0], posteriormente las muestras fueron incubadas durante 4 horas a una temperatura de 4°C. Finalmente se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany). Esta metodología fue descrita por Chen *et al.* (2012), modificándose ligeramente a las particularidades del experimento.

6.7.- Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

6.7.1.- Preparación del gel de separación

El gel de separación fue preparado al 10% utilizando los siguientes reactivos que se mencionan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reactivos y concentraciones para la preparación del gel de separación.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1250 μ l
Tris-HCl [1.5 M]	1250 μ l
SDS al 10%	50 μ l
Persulfato de amonio al 1%	250 μ l
dH ₂ O	2420 μ l
TEMED	5 μ l

6.7.2.- Preparación del gel de apilamiento

El del de apilamiento fue preparado al 4% utilizando los siguientes reactivos:

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones para la preparación del gel de apilamiento.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1250 μ l
Tris-HCl [1.5 M]	1250 μ l
SDS al 10%	50 μ l
Persulfato de amonio al 1%	250 μ l
dH ₂ O	2420 μ l
TEMED	5 μ l

6.7.3.- Desnaturalización de las proteínas

Las muestras tratadas con el extracto descrito por Chen *et al.* (2012), fueron desnaturalizadas a 95°C a a 3000 rpm durante 5 minutos en una termobloque con agitación (Thermomixer Compact Eppendorf, USA).

En un tubo Eppendorf para PCR de 0.5 ml se preparará 10 μ l de BSA (1 mg/ml) + 10 μ l de buffer Laemmli Sample 1x. De las muestras provenientes del termociclador, se agregaron en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 ml 10 μ l del sobrenadante + 10 μ l de buffer Laemmli Sample 1x.

En el primer carril del gel para electroforesis se agregó 10 μ l del marcador de tamaño molecular, el segundo carril se agregaron 10 de BSA previamente tratado, y los carriles posteriores las muestras de *Brosimum alicastrum* Sw.

Una vez cargadas todas las muestras, el tanque superior fue llenado lentamente con la solución amortiguadora de corrida 1X, hasta cubrir completamente los pozos. El voltaje utilizado para la corrida del gel fue de 50 volts por 15 minutos y posteriormente 40 volts por 2.30 horas. Terminado el tiempo de corrida, en la

cámara de electroforesis fue desarmada, y cuidadosamente se desprendió el gel de las placas de vidrio.

Finalmente el gel obtenido de la electroforesis, fue sumergido en una solución de azul de Commassie que permite teñir a las proteínas, cuyos componentes son: ácido acético al 10% + metanol al 40% + azul de Commassie al 0.1% + agua destilada. El gel fue sometido a agitación durante 30 min. Para desteñir el gel se le adiciona una solución desteñidora, cuyos componentes son: ácido acético al 10% + metanol al 40% + agua destilada. El tiempo aproximado en esta última solución fue de 15 minutos, ya que se termina este proceso hasta que las bandas de proteínas son visibles.

7.- Resultados y discusión

7.1.- Cuantificación de metabolitos secundarios

7.1.1.- Concentración de flavonas y flavonoles

Los metabolitos secundarios en las plantas fueron extraídos en los diferentes sitios experimentales. En este estudio la concentración de flavonas y flavonoles en las diferentes zonas de monitoreo, es decir, zona baja, media y alta del árbol. El cuadro 3, corresponde a los valores de la concentración de flavonas y flavonoles, en él se indica que existe una diferencia mínima significativa en la concentración de flavonas y flavonoles, con respecto a las zonas del árbol donde fueron recolectadas las muestras ($P = 0.0000$). Sin embargo, no existe una diferencia estadística significativa en la comparación realizada en los sitios de muestreo ($P = 0.3763$). La concentración media (Cuadro 4) más alta de este metabolito fue en la zona alta (2.55984 mg de quercetina / g de materia seca) comparado con los valores obtenidos, en la zona media (1.58027 mg de quercetina / g de materia seca) y en la zona baja (1.05077 mg de quercetina / g de materia seca). Con respecto a los sitios de muestreo, la producción de este metabolito (1.96154 mg de quercetina / g de materia seca) fue mayor en Tuxtla Gutiérrez comparado con las concentraciones de 1.5458 y 1.68533 mg de quercetina / g de materia seca obtenidas en Cintalapa y Villaflores respectivamente.

La relación de estos compuestos en las plantas, es otorgar el color y el brillo de las hojas, es por ello que existe una diferencia significativa en cada zona del árbol estudiada, donde la parte alta tienen la mayor concentración de este metabolito, dado que el árbol es relativamente joven (10 años aproximadamente), se encuentra en proceso de crecimiento, por lo que la concentración aumenta en la parte alta por el constante crecimiento que tiene.

Cuadro 3. Análisis de varianza para el contenido de flavonas y flavonoles.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	1.34298	2	0.671489	1.00	0.3763
B:Zona del árbol	17.5781	2	8.78904	13.11	0.0000
RESIDUOS	26.8187	40	0.670467		
TOTAL (CORREGIDO)	45.7397	44			

Cuadro 4. Tabla de medias para el contenido de flavonas y flavonoles.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>
MEDIA GLOBAL	45	1.73089
Sitio		
Cintalapa	15	1.5458
Tuxtla Gutiérrez	15	1.96154
Villaflores	15	1.68533
Zona del árbol		
Alta	15	2.55984
Baja	15	1.58207
Media	15	1.05077

7.1.2.- Concentración de flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que tienen diferentes tipos de actividad biológica, tales como pigmentación en frutas, hojas y en su caso se producen como respuesta contra patógeno (Regelson & Formica, 2005). Por lo que su análisis en las plantas de *B. alicastrum* en diferentes zonas es importante. En este estudio los resultados indican que existe diferencia mínima significativa entre los sitios de muestreo y las zonas del árbol donde las muestras fueron tomadas (Cuadro 4). El valor más bajo (2.67 mg de rutina/g de materia seca) de acuerdo a la edad (Cuadro 5), fue encontrado en las hojas del sitio de Villaflores, comparado con los valores en los sitios de muestreo de Cintalapa (5.76 mg de rutina/g de materia seca) y Tuxtla Gutiérrez (7.15 mg de rutina · g de materia

seca). La biosíntesis de este metabolito secundario se ha demostrado que la producción puede ser regulada por los fotoperiodos de la planta. Los fotoperiodos largos proveen una acumulación de flavonoides en las hojas, mientras que los cortos no tienen esta actividad. La cantidad de la luz recibida es influenciada por diferentes factores, respectivos de cada área, así como la ubicación geográfica de cada sitio de muestreo. La altitud tiene un efecto en la concentración de metabolitos secundarios, así como las condiciones climáticas (Jaakola, 2010). Es por ello, la diferencia en la altitud de los diferentes sitios de muestreo, da como resultados las diferencias mínimas significativas. La altura y el exuberante follaje que presenta este árbol, indica que la parte alta es donde existe la mayor concentración de este compuesto y la parte baja la menor concentración (Cuadro 6).

Cuadro 5. Análisis de varianza para el contenido de flavonoides.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	158.293	2	79.1463	10.90	0.0002
B:Zona del árbol	338.138	2	169.069	23.29	0.0000
RESIDUOS	290.354	40	7.25885		
TOTAL (CORREGIDO)	786.784	44			

Cuadro 6. Tabla de medias para el contenido de flavonoides.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>
MEDIA GLOBAL	45	5.19691
Sitio		
Cintalapa	15	5.76078
Tuxtla Gutiérrez	15	7.15951
Villaflores	15	2.67043
Zona del árbol		
Alta	15	9.05636
Baja	15	2.95137
Media	15	3.58299

7.1.3.- Concentración de saponinas

La concentración de saponinas presentes en las hojas de *B. alicastrum*, presentó una diferencia mínima significativa ($P = 0.0000$) en las zonas del árbol (parte baja, media y alta). En la comparación realizada para cada sitio de muestreo no se observó esta diferencia mínima significativa (Cuadro 6). El valor más alto fue encontrado en la zona media donde se determinó una concentración de (545.515 mg de diosgenina / g materia seca), en la parte baja (427.538 mg de diosgenina / g materia seca) y en la parte alta (364.907 mg de diosgenina / g materia seca) (Cuadro 7). En la comparación realizada por cada sitio de muestreo, Cintalapa y Villaflores obtuvieron las concentraciones más altas de saponinas totales (457.315 y 457.217 mg de diosgenina / g materia seca) respectivamente, mientras que Tuxtla Gutiérrez se determinó que la concentración media fue menor (423.428 mg de diosgenina / g materia seca).

Las saponinas son compuestos bioactivos que se producen generalmente por las plantas para contrarrestar la interacción con patógenos y herbívoros. Su biosíntesis está relacionada como sistema de defensa, la variación de esta acumulación de saponinas se debe al nivel donde se recibe la necesidad de protección, ya sea contra herbívoros o microorganismos (Jörg *et al.*, 2010).

Los sitios de muestreo tienen una concentración de saponinas muy similares, lo que se puede deber a un microorganismo herbívoro o herbívoro que consuma las hojas de este árbol. Sin embargo, se produjo mayor cantidad de este metabolito en la parte baja y media, lo que indica que en esa área donde más se necesita la producción, por el alcance de herbívoros y la sombra que recibe esa zona, dada la altura y exuberante follaje la parte alta presentó una menor concentración.

Cuadro 7. Análisis de varianza para el contenido de saponinas.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	11450.1	2	5725.03	1.45	0.2458
B:Zona del árbol	252302.	2	126151.	32.03	0.0000
RESIDUOS	157555.	40	3938.87		
TOTAL (CORREGIDO)	421307.	44			

Cuadro 8. Tabla de medias para el contenido de saponinas.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>
MEDIA GLOBAL	45	445.987
Sitios		
Cintalapa	15	457.315
Tuxtla Gutiérrez	15	423.428
Villaflores	15	457.217
Zona del árbol		
Alta	15	364.907
Baja	15	427.538
Media	15	545.515

7.1.4.- Concentración de taninos

La concentración de taninos varía a lo largo del tiempo de vida de las plantas. En los vegetales se cree que este actúa a modo de protección contra el ataque de microorganismos e insectos, causando un efecto astringente e insecticida (Barahona, 1999). Los resultados obtenidos indican que la diferencia significativa del contenido de estos metabolitos secundarios presentes en las hojas de *B. alicastrum* se encuentra en los sitios de muestreo (Cuadro 8), con un valor de P (0.0426). La mayor concentración de este compuesto (Cuadro 9), fue encontrada en el sitio de Cintalapa con un valor (0.253297 mg de proantocianidina / g materia seca), en el caso de Tuxtla Gutiérrez y Villaflores se encontraron concentraciones (0.248686 y 0.243811 mg de diosgenina / g materia seca) respectivamente. En el análisis por la zona del árbol no hubo una diferencia mínima significativa (P =

0.1671), la mayor concentración de taninos (0.252034 mg de diosgenina / g materia seca) fue determinada en la parte baja, mientras que en la parte media y alta se obtuvieron concentraciones menores (0.245019 y 0.248741 mg de diosgenina / g materia seca) respectivamente (Cuadro 9).

La producción de taninos está relacionada a las condiciones particulares tales como disponibilidad de agua, pH, estrés biológico, etc. Sus efectos en las plantas pueden ser benéficos o maléficos dependiendo su estructura química. También se producen como respuesta ante ataques de herbívoros (Barbehenn & Constabel, 2011). Las concentraciones encontradas demuestran que las condiciones de particulares de cada sitio de muestreo, propician las rutas de biosíntesis de estos compuestos secundarios del metabolismo.

Cuadro 9. Análisis de varianza para el contenido de taninos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	0.000674943	2	0.000337472	3.42	0.0426
B:Zona del árbol	0.000369515	2	0.000184757	1.87	0.1671
RESIDUOS	0.00394815	40	0.0000987037		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0049926	44			

Cuadro 10. Tabla de medias para el contenido de taninos.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>
MEDIA GLOBAL	45	0.248598
Sitio		
Cintalapa	15	0.253297
Tuxtla Gutiérrez	15	0.248686
Villaflores	15	0.243811
Zona del árbol		
Alta	15	0.248741
Baja	15	0.252034
Media	15	0.245019

7.1.5.- Concentración de cumarinas

Mediante el uso técnicas espectrofotométricas, se determinó la concentración de cumarinas presentes en las hojas de *B. alicastrum*. Los resultados demuestran (Cuadro 10) que la cantidad presente de este metabolito, tiene una diferencia mínima significativa en cada sitio de muestreo ($P = 0.0001$) y cada zona del árbol (0.0000) donde se tomaron las muestras para llevar a cabo el análisis. Las concentraciones medias (Cuadro 11) para cada sitio (Cintalapa, Tuxtla Gutiérrez y Villaflores) fue de (0.202479, 0.237315, 0.221934 mg de umberliferona / g materia seca) respectivamente. En la zona alta (Cuadro 11) se obtuvo un valor (0.19571 mg de umberliferona / g materia seca), la zona media (0.253185 mg de umberliferona / g materia seca) y en la zona baja (0.212833 mg de umberliferona / g materia seca).

Las cumarinas al igual que los taninos tienen una función de respuesta ante condiciones de estrés abiótico, protección contra fitopágenos, así como la relación entre el estrés oxidativo (Bourgard et al., 2006; Barbehenn & Constabel, 2011). Estudios previos a la familia (moraceae) han extraído estos compuestos, mediante el uso solventes el hexano, y se han determinado las fracciones presentes mediante la técnica de cromatografía en columna. La diferencia existente en la producción de metabolitos secundarios de este tipo, está relacionada a la ubicación geográfica o la influencia ambiental de cada sitio de muestreo (Pistelli et al., 2000). Es por ello, que los resultados encontrados evidencian que las condiciones particulares de cada sitio de muestreo producen este metabolito. Dada la cantidad de metabolito determinado, probablemente se relacione con la actividad de un microorganismo que prospere en las mismas condiciones que *B. alicastrum*.

Cuadro 11. Análisis de varianza para el contenido de cumarinas.

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	0.00914306	2	0.00457153	12.20	0.0001
B:Zona del árbol	0.0261245	2	0.0130623	34.86	0.0000
RESIDUOS	0.0149888	40	0.000374721		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0502564	44			

Cuadro 12. Tabla de medias para el contenido de cumarinas.

Nivel	Casos	Media
MEDIA GLOBAL	45	0.220576
Sitio		
Cintalapa	15	0.202479
Tuxtla Gutiérrez	15	0.237315
Villaflores	15	0.221934
Zona del árbol		
Alta	15	0.19571
Baja	15	0.212833
Media	15	0.253185

7.1.6.- Concentración de fenoles

La concentración de fenoles presentes en las hojas de *B. alicastrum* evidencian una diferencia mínima significativa (Cuadro 13) en los sitios de muestreo ($P = 0.0005$), además las zonas del árbol analizadas también presentan esta diferencia estadística ($P = 0.0000$). La concentración más alta de este metabolito (Cuadro 14) fue determinada en el sitio de Villaflores (0.0414197 mg de ácido gálico / g de materia seca), en el sitio de muestreo ubicado en Cintalapa se obtuvo (0.0344132 mg de ácido gálico / g de materia seca), y finalmente la concentración más baja fue en el sitio de Tuxtla Gutiérrez (0.0344132 mg de ácido gálico / g de materia seca).

La concentración distintiva en cada sitio de muestreo y parte del árbol, puede deberse a las condiciones particulares, así como de los factores bióticos y abióticos que propicien las rutas biosintéticas de estos compuestos derivados del metabolismo secundario. Es probable que por la actividad antifúngica y antimicrobiana que tienen en las plantas (Daisuke *et al.* 2012), este árbol tenga un microorganismo que crezca en las mismas condiciones que *B. alicastrum*.

Cuadro 13. Análisis de varianza para el contenido de fenoles.

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sitio	0.000375856	2	0.000187928	9.40	0.0005
B:Zona del árbol	0.0049969	2	0.00249845	124.95	0.0000
RESIDUOS	0.000799816	40	0.0000199954		
TOTAL (CORREGIDO)	0.00617257	44			

Cuadro 14. Tabla de medias para el contenido fenoles.

Nivel	Casos	Media
MEDIA GLOBAL	45	0.0376245
Sitio		
Cintalapa	15	0.0370406
Tuxtla Gutiérrez	15	0.0344132
Villaflores	15	0.0414197
Zona del árbol		
Alta	15	0.0517586
Baja	15	0.0264667
Media	15	0.0346481

Cuadro 15. Valores medios para las concentraciones de metabolitos para cada sitio de muestreo.

Grupos de metabolitos secundarios	Sitios de muestreo		
	Cintalapa	Tuxtla Gutiérrez	Villaflores
Flavonas y flavonoles (mg quercetina / g de materia seca)	1.5458 ^b	1.96154 ^b	1.68533 ^b
Flavonoides (mg de rutina / g de materia seca)	5.76078 ^b	7.15951 ^b	2.6795137 ^a
Saponinas (mg de diosgenina/ g de materia seca)	457.315 ^b	423.428 ^b	457.217 ^b
Taninos (mg de proantocianidina / g de materia seca)	0.253297 ^a	0.248686 ^{ab}	0.243811 ^b
Cumarinas (mg de umberliferona / g de materia seca)	0.202479 ^b	0.237315 ^c	0.221934 ^a
Fenoles (mg de ácido gálico / g de materia seca)	0.0370406 ^b	0.0344132 ^b	0.0414197 ^a

Las filas con las letras iguales no presentan una diferencia mínima significativa ($P > 0.05$) con respecto al sitio de muestreo, mientras que los valores con letras diferentes si presentan ($P < 0.005$).

7.2.- Tamaño molecular de las proteínas

El patrón electroforético demostró que las proteínas presentes en las hojas de *Brosimum alicastrum* Sw., oscilan entre los 37 y 50 kD de peso. Esto puede deberse a la edad de los árboles donde fueron recolectadas las muestras, ya que son relativamente jóvenes, y tienen una altura de 10 metros. Es importante mencionar que esta especie, puede alcanzar una altura de hasta 45 metros de acuerdo a lo reportado por Meiners *et al.* (2009).

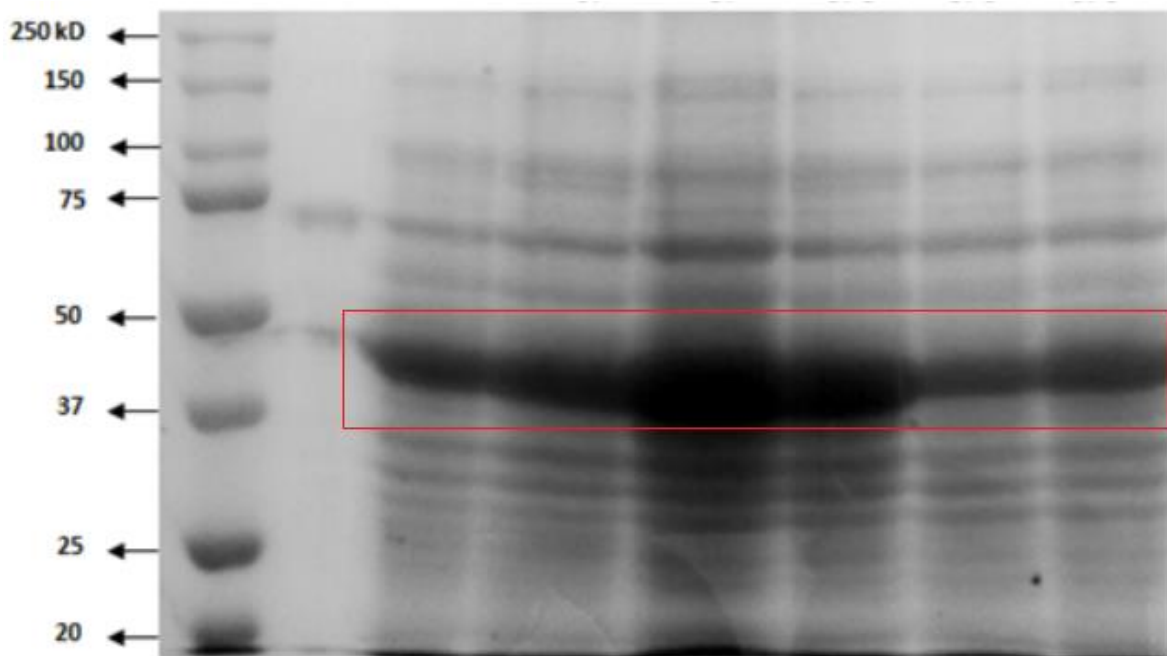


Figura 4. Patrón electroforético de las proteínas presentes en las muestras de *Brosimum alicastrum* Sw.

8.- Conclusiones

Esta investigación permitió establecer por primera vez, un protocolo para la extracción de metabolitos secundarios mediante el uso de metanol como solvente, así como la determinación del contenido de flavonas y flavonoles, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas y fenoles presentes en las hojas de *Brosimum alicastrum* Sw., utilizando técnicas espectrofotométricas que permitieron cuantificar las concentraciones de estos compuestos en diferentes sitios de muestreo (Cintalapa, Tuxtla Gutiérrez, Villaflores).

Las condiciones particulares de cada sitio de muestreo, proveen diferencias significativas en la producción de metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, cumarinas y fenoles), por lo que recomiendo ampliamente realizar estudios dirigidos al comportamiento de las rutas biosintéticas en diferentes condiciones tales como: la relación de pH en el suelo, la capacidad de retención de agua, aplicación de abonos orgánicos, etc. Ya que las condiciones estudiadas en esta investigación, son en el completo estado natural de *B. alicastrum*, por lo que la participación de microorganismos que prosperen en las mismas condiciones, pueden afectar de manera significativa la producción de estos compuestos.

Además, es un estudio preliminar se estableció un protocolo para cuantificar proteínas usando un buffer de extracción descrito por Chen *et al.*, (2012), y revelando el tamaño molecular de estas utilizando un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, las cuales oscilan en un rango de 37 y 50 kDa de peso. El tamaño de las proteínas puede estar relacionado por la edad de los árboles. Es importante mencionar, que las hojas actualmente son utilizadas como alimento forrajero para el ganado bovino. La falta de información científica, crea la posibilidad de una investigación más amplia, creándose así todos los recursos que permitan explotar los recursos naturales que contiene esta magnífica especie.

9.- Bibliografía

1. Alvares, I. (2001). Purificación y Caracterización Bioquímica de la Aminopeptidasa (tcAPE) de la Semilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Maestría en Ciencias, Institución de Enseñanza e Investigación de Ciencias Agrícolas Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.
2. Barahona, R. (1999). Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterization and study of their nutritional impact from the standpoint of structure activity relationships. Doctoral Tesis, Kansas State University, USA.
3. Barbehenn, R. & Constabel, P. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. Elsevier Journal.
4. Bourgard, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, E., Kellner, S. & Mater, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Springer Science+Business.
5. Brazier, M. & Edwards, R. (2012). Metabolic engineering of the flavone-C-glycoside pathway using polyprotein technology. Centre for Novel Agriculture Products, Department of Biology, University of York, UK.
6. Colegate, S. & Molyneux. (2008). Bioactive natural products. Detection, Isolation and structural determination. London: Taylor & Francis Group.
7. CONABIO (2008). Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. (pp. 88-92). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
8. Chen, K., Wu, H., Chen, J., Cheng, X., Jing, X. & Wang, X. (2012). Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*. Plant Biotechnology Reports.
9. Chávez, M., Díaz, J., Pérez, U. & Delfín, J. (1990). Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
10. Daisuke, K., Hayato, Y., Kunihiro, M., Takashi, O. & Kiyofumi, S. (2012). Production of Aromatic Compound by Metabolically Engineered *Escherichia*

- coli with an Expanded Shikimate Pathway. Applied and Environmental Microbiology.
11. Faurobert, M., Chaib, J. & Pelpoir, E. (2007). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. Methods in Molecular Biology, 355. Plan Proteomics, Methods and protocols.
 12. Fernández, C., Vela, M. & Ibarra I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. México. Acta Pediátrica de México
 13. Gómez, O. (2009). Evaluar la producción de metabolitos secundarios de tres cepas de interés industrial. Memoria de residencia profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
 14. Handa, S.S., Khanuja, S.P., Longo, G. & Rakesh, D.D. (2008). Extraction Technologies for medicinal and aromatic plants. Trieske, Italy: International centre for science and high technology.
 15. Hernández, V., Munguía, A. & Monforte, G. (2015). Caracterización de la producción con árboles de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.) y sus derivados para el desarrollo sustentable de la región sur del estado de Yucatán.
 16. Jaakola, Laura & Hohtola, Anja. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant, Cell & Environment.
 17. Jörg, M., Kuzina, V., Andersen, Sven & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoids saponins. Elsevier Journal.
 18. Kohara, A., Nakajima, C., Yoshida, S. & Muranaka, T. (2007). Characterization and engineering of glycosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaceous plants. Elsevier journal.
 19. Lehninger, A. (2009). Principios de Bioquímica, 5ta. Edición. Editorial Omega.
 20. Mechin, V., Damerval, C. & Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone, Methods in Molecular Biology 335. Plan Proteomics, Methods and Protocols.

21. Meiners, M., Sánchez, C. & Blois, S. (2009). El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
22. Miyahisa, I., Funa, N., Ohnishi, Y., Martens, E., Moriguchi, T. Horinouchi, S. (2006). Combinatorial bioynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*. Springer-Verlag.
23. Newton, R., Brenton, A., Smith, C. & Dudle, E. (2004). Plant Proteome Analysis by Mass Espectrometry: principios, problemas, pitfalls and recen developments. Phytochemistry.
24. Ngiuen, H., Hyeok, K., Youn, W., Trinh, N., Hong, S. & Lee, H. (2013). TTG1-mediated flavonol biosynthesis alleviates root growth inhibition in response to ABA. Sppringer-Verlag.
25. Pardo, T. & Sánchez M. (1980). *Brosimum alicastrum* (ramón, capomo, ojite, ojoche). Recurso silvestre desaprovechado. México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
26. Patra B., Schulttenhofer C., Wu Y., Pattanaik S. & Yuan L. (2013). Transcriptional regulation o secondary metabolite biosynthesis in plants. Journal of Biochimica et Biphysica Acta.
27. Ramírez, M. L. (2015). Establecimiento de protocolos para la extracción y separación de proteínas por SDS-PAGE de diferentes tipos de tejidos vegetales. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
28. Regelson & Fornica J. (2005). Review of the biology of querce tin and related bioflavonoids. Food Chemical Toxicology.
29. Sánchez, M. E. (2008). Influencia de la inoculación combinada de *Sinorhizobium* / *Azospirillum* sobre el crecimiento y la producción de taninos en *Acaciella quitssima*. Memoria de residencia profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
30. Sánchez, Y. (2015). Evaluación del efecto toxico de metabolitos secundarios presentes en las fracciones y extractos metanólicos de Rhoe

discolor y *Callisia fragrans* y su efecto sobre el virus de la influenza. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.

31. Schilen, E., Vos, Ric., Tunen., Arjen & Bovy, Arnaud. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry. Plant Research International*, Netherlands.
32. Sun, W., Liang, L., Meng, X., Li, Y., Gao, F., Liu, X., Wang, S., Gao, X. & Wang, L. (2016). Biochemical and Molecular Characterization of a Flavonoid 3-O-glycosyltransferase Responsible for Anthocyanins and Flavonols Biosynthesis in *Freesia hybrida*
33. Wei, B.S. (2011). The current taxonomy of rhizobia. New Zealand Rhizobia website.