

**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERA BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

MARTHA LETICIA RAMÍREZ MERCHANT

CON EL TEMA:

**“ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA
EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE
DE DIFERENTES TIPOS DE TEJIDOS VEGETALES”**

**MEDIANTE
OPCIÓN I**

TESIS PROFESIONAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

DEDICATORIAS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias de formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres María y David por darme la vida, quererme y brindarme el apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado y por ser los cimientos fundamentales tanto en mi vida como en mi formación profesional, gracias por la confianza que han tenido en mí los amo.

A mis hermanos Alejandra y David por estar a mi lado y apoyarme, por darme el motivo para esforzarme y poder ser un ejemplo a seguir, los quiero mucho.

A mis grandes amigos Erika, Ana Karen y Martín, por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencias, por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación y sobre todo por su amistad incondicional los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo, por el esfuerzo y dedicación, el apoyo y motivación otorgada, por su experiencia, orientación y los conocimientos impartidos, que gracias a ellos se pudo llevar a cabo la elaboración de este proyecto, y lograr en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

Al Dr. Reiner Rincón Rosales y al Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli por su valiosa aportación y sugerencias durante la revisión de la tesis, ayudando al enriquecimiento y mejoramiento del contenido de la misma.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	i
Lista de cuadros.....	ii
Resumen.....	iii
1.- Introducción.....	1
2.- Marco teórico.....	5
2.1.- Leguminosas.....	5
2.2.- <i>Crotalaria longirostrata</i> (Chipilín).....	6
2.2.1.- Descripción biológica de la planta.....	6
2.2.2.- Ecología y distribución.....	8
2.2.3.- Condiciones climáticas.....	8
2.3.- <i>Canavalia ensiformis</i>	9
2.3.1.- Descripción biológica de la planta.....	9
2.3.2.- Ecología y distribución.....	10
2.3.3.- Condiciones climáticas.....	10
2.4.- Beneficios de la simbiosis <i>Leguminosa-Rhizobium</i>	10
2.5.- Plantas oleaginosas.....	12
2.6.- <i>Moringa oleífera</i>	12
2.6.1.- Descripción biológica de la planta.....	12
2.6.2.- Ecología y distribución.....	14
2.6.3.- Condiciones climáticas.....	15
2.7.- Estudio proteómico en plantas	15

2.7.1.- Aspectos fundamentales en el estudio de la proteómica.....	16
2.8.- Preparación de la muestra.....	17
2.9.- Extracción de proteínas.....	18
2.10.- Métodos de rotura celular.....	19
2.11.- Métodos colorimétricos para la cuantificación de proteínas.....	21
2.11.1.- Método de Biuret.....	21
2.11.2.- Método de Lowry.....	23
2.11.3.- Método de Bradford.....	24
2.11.4.- Método de BCA (ácido bicinconínico).....	26
2.12.- Electroforesis SDS-PAGE.....	28
2.12.1.- Fundamento de la electroforesis SDS-PAGE.....	28
2.12.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	30
2.12.3.- Comportamiento de las proteínas en la electroforesis SDS- PAGE en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS)....	32
3.- Justificación.....	33
4.- Objetivos.....	34
5.- Metodología.....	35
5.1.- Ubicación del área de estudio y material vegetal.....	35
5.2.- Preparación de material biológico.....	37
5.3.- Extracción de proteínas de las hojas	37
5.3.1.- Protocolo de CHEN.....	37
5.3.2.- Protocolo de QB.....	37
5.3.3.- Protocolo de TCA.....	38

5.4.-Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	38
5.5.- Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.....	39
5.5.1.- Preparación del gel de separación.....	39
5.5.2.- Preparación del gel de apilamiento.....	40
5.5.3.- Desnaturalización de las proteínas.....	41
6.- Resultados y discusión.....	44
6.1.- Cuantificación de proteínas: Curva de calibración.....	44
6.2.- Separación de complejos proteómicos.....	47
7.- Conclusión.....	53
8.- Recomendaciones.....	54
9.- Bibliografía.....	55

Lista de figuras

Figura 1. Partes que conforman la Planta de <i>Crotalaria longistrata</i> (Chipilin)..	7
Figura 2. Partes que conforman la Planta de <i>Canavalia ensiformis</i>	9
Figura 3. Simbiosis de bacterias <i>Rhizobium</i> con leguminosas.....	11
Figura 4. Partes que conforman la Planta de <i>Moringa oleifera</i>	13
Figura 5. Destrucción mecánica de proteína.....	20
Figura 6. El complejo entre Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos causan la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} en una solución alcalina.....	22
Figura 7. La química de la reacción simplificada del método de Lowry para la cuantificación de proteínas que consiste en la reacción de biuret (paso1) y la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (paso 2).....	23
Figura 8. La química del método de Bradford para la cuantificación de proteínas.....	25
Figura 9. La química del método BCA para la cuantificación de proteínas que consisten en una reacción de Biuret (paso 1) y la formación del complejo entre ácido bicinconínico (BCA) y de iones de cobre monovalente.....	28
Figura 10. Cámara de electroforesis.....	28
Figura 11. Reacción de polimerización de la acrilamida.....	31
Figura 12. Electroforesis desnaturalizante en el gel de poliacrilamida. Estructura del SDS.....	33
Figura 13. Esquema general de diferentes protocolos para la extacción y separación de proteínas vegetales	37
Figura 14. Adición del gel preparado en el “casette” de la cámara de electroforesis SDS-PAGE.....	41
Figura 15. Cámara SDS-PAGE completa.....	42
Figura 16. “Casette” del gel montada en la caja de electroforesis.....	42
Figura 17. Esquema de adición de las muestras a los pozos de electroforesis SDS-PAGE.....	43
Figura 18. Llenado de la cámara de electroforesis.....	43
Figura 19. Recuperación del gel SDS-PAGE.....	44

Figura 20. Tinción del gel de azul de Coomassie.....	44
Figura 21. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	45
Figura 22. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% utilizando el método modificado de CHEN: en el que se muestra los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albumina de suero bovino (BSA); <i>Moringa</i> (M); <i>Crotalaria</i> (CH) y <i>Canavalia</i> (C).....	49
Figura 23. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% por el método TCA; en el que se muestra los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albumina de suero bovino (BSA); <i>Moringa</i> (M); <i>Canavalia</i> (C) y <i>Crotalaria</i> (CH).....	50
Figura 24. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% por el método QB: en el que se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albumina de suero bovino (BSA); <i>Canavalia</i> (C); <i>Crotalaria</i> (CH) y <i>Moringa</i> (M).....	51

Lista de cuadro

Cuadro 1. Preparación de la curva estándar BSA (Albumina de Sérica Bovina)	42
Cuadro 2. Soluciones y concentraciones para la preparación del gel de separación.....	42
Cuadro 3. Soluciones y concentraciones para la preparación del gel de apilamiento.....	43
Cuadro 4. Absorbancias obtenidas para la curva patrón de BSA.....	48
Cuadro 5. Porcentaje de proteína obtenidas en cada una de las plantas y por los métodos establecidos.....	48
Cuadro 6. Porcentaje de proteína reportada bibliográficamente.....	49

Resumen

La proteómica ha empezado a ser una importante herramienta en el estudio de la biología molecular de las plantas, en los últimos años se ha estado renovando constantemente para responder principalmente a la cuestión de la función de las proteínas expresadas en un organismo vivo, para la descripción de procesos biológicos, metabólicos, fisiológicos o patogénicos. El objetivo de esta investigación fue establecer y evaluar tres protocolos modificados Chen (Chen *et al.*, 2012), QB (Ni, 1996) y TCA (Alcántar-Aguirre, 2013), para el análisis de perfiles proteómicos en las plantas: *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* y también se cuantificó el porcentaje total de proteínas en cada una de las especies vegetales por medio del método de Bradford y con la técnica de electroforesis SDS-PAGE se determinó el peso molecular de las proteínas en cada planta. Los resultados indicaron que el protocolo Chen fue el más eficiente en comparación con los otros protocolos evaluados. Este protocolo emplea el compuesto detergente Tris-HCl como agente solubilizante, que permite obtener la mayor cantidad de proteínas celular. El porcentaje total en extractos proteicos obtenidos a través del protocolo Chen fue de 28.7% para *M. oleifera*, 23.36% para *C. ensiformis* y 23.28% para *C. longirostrata*. Por el contrario, el porcentaje de proteínas totales usando los protocolos QB y TCA fueron significativamente menores. La electroforesis SDS-PAGE permitió separar bandas definidas con pesos moleculares de 37 kDa para las proteínas de *M. oleifera*, 47 kDa para *C. ensiformis* y 40 kDa para *C. longirostrata*. El protocolo recomendado por Chen *et al.* (2012), fue el más adecuado para estudios proteómicos en plantas leguminosas y oleaginosas de importancia agroindustrial en Chiapas, considerando la eficiencia para obtener material proteico de calidad para las diversas pruebas de caracterización y estudio de proteínas en plantas.

1. Introducción

Las plantas han sido empleadas por cientos de años para propósitos medicinales y nutrimentales. Actualmente, la biotecnología vegetal se ha expandido masivamente, debido a la implementación de nuevas herramientas de ingeniería genética y biología molecular que han permitido el mejoramiento de cultivos de tejidos vegetales bajo condiciones controladas, dando origen a la producción de materiales de alto potencial clínico e industrial (García, 2010).

Así mismo, en la actualidad las leguminosas han cobrado gran importancia tanto en la alimentación humana como animal, debido a sus propiedades nutritivas, bajo costo y por los efectos fisiológicos asociados a su ingesta, cualidades que las convierten en un producto básico, especialmente en la población de bajos ingresos de países en vías de desarrollo, como México (Silva-Cristobal, 2007). Estas plantas tienen un alto valor económico en la agricultura, ya que se utilizan para procesar: aceites, fibras, combustible, madera, medicamentos, productos químicos y variedades hortícolas (Lewis *et al.*, 2005). Tienen un papel importante en el medio terrestre, debido a que son fijadoras de nitrógeno, independientemente que formen nódulos en la raíces con rizobios simbióticos (Sprent, 2001).

En América Latina existen reportes de una variedad inmensa de especies de leguminosas como *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* (Chipilín). *Canavalia ensiformis* es una planta de altos rendimientos en granos y forraje, constituye una de las especies más utilizadas como cultivo de cobertura y como abono verde (Puerta *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2011). Se han realizado diferentes estudios de la planta *Canavalia*, donde se reporta que tiene un principal aminoácido libre en el grano llamada Canavanina (ácido 2-amino-4-guanidinoxy butanoico), es un aminoácido no proteico análogo a la arginina. Sus propiedades tóxicas se deben a esta similaridad estructural, ya que interfiere con el metabolismo de la arginina, inhibe la síntesis de proteínas, bloquea la síntesis de RNA y DNA, afecta el sistema inmune y es un potente anti-metabolito que resulta tóxico a diferentes tipos de organismos, es por ello que esta leguminosa no es comestible para los humanos (Van-Baligooy, 1987). Sin embargo, a pesar del efecto tóxico de la *Canavalia ensiformis*, esta planta es

una fuente potencial de proteína y energía para los animales, por lo que se ha intentado eliminar o reducir la cantidad de este componente por medio de tratamientos tanto físicos como químicos, a niveles que permitan su inclusión en dietas comerciales (Martín *et al.*, 2009).

Crotalaria longirostrata (Chipilín) es una planta que se cultiva en el estado de Chiapas principalmente como platillos en la cocina tradicional (Breedlove, 1986). Adicionalmente, esta leguminosa es altamente demandante por su alto potencial proteico y por su uso comestible es debido a que la desnutrición hoy en día es un problema que aqueja principalmente a las zonas de bajo recursos económicos y con abastecimiento alimentario escaso e insuficiente (Chízar, 2009); por eso es una alternativa en algunas comunidades del estado de Chiapas. Por lo tanto, su implementación puede mejorar el estado alimenticio de la población; y al elaborar productos a base que amplíe su vida útil, con técnicas de conservación de los alimentos, económica y sencilla de realizar (Camarillo-Castillo, 2013).

Además, estas dos leguminosas se caracterizan por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con los rizobios favoreciendo el crecimiento de otros cultivos acompañantes, incrementando el valor nutritivo y alimentación de los mismos (Martín *et al.*, 2009; Córdova-Sánchez *et al.*, 2011). La utilización de este cultivo en la ganadería y en la agricultura permite el desarrollo de ambos y la protección del medio ambiente.

Por otro lado, la *Moringa oleifera* es una oleaginosa debido al alto contenido de aceite, su capacidad de resistencia a la sequía y el potencial agronómico siendo un árbol cultivable en regiones áridas y semiáridas (Rajas *et al.*, 2011). Esto es de particular importancia debido a que hoy en día se sabe que las condiciones climáticas ya no se rigen por las temporadas, esto debido a que con el paso del tiempo las estaciones del año han cambiado radicalmente de un clima caluroso en invierno hasta una sequía en verano. Como es conocido las semillas de la *Moringa* contiene un alto valor de proteínas, con capacidad coagulante, esta tecnología se ha fusionado con el tratamiento de aguas, que es de gran importancia, ya que la falta de agua dulce en nuestro planeta es una problemática real causada principalmente por la escasez de lluvias (García-

Fayos, 2007). Todas las partes de la planta de *Moringa* son comestibles desde las hojas hasta la raíz. Los estudios de *Moringa* han ido incrementando conforme los años debido a su importancia nutricional ya que el contenido de vitaminas y minerales, y principalmente el contenido de proteínas es muy sobresaliente destacando que en esta planta se encuentran todos los aminoácidos esenciales (Mathur, 2005).

Así, es conocido que las proteínas se encuentran entre las biomoléculas más estudiadas en plantas (Chambers *et al.*, 2003), por lo que la *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* (Chipilín) representan un papel muy importante por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales, fósforo y hierro (Matín *et al.*, 2009; Camarillo-Castillo, 2013; Rajas *et al.*, 2011).

Recientemente, la proteómica es una importante herramienta indispensable para el estudio de la bioquímica de las plantas con potencial nutritivo, para la descripción de procesos biológicos, metabólicos, fisiológicos o patogénicos. Algunos autores (Vihinen, 2001; Cánovas *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2004) describen el periodo actual como “la era postgenómica”. La proteómica se está renovando constantemente para responder a la cuestión de la función de las proteínas expresadas en un organismo vivo, experimentando, en los últimos diez años, una explosión de nuevos protocolos y plataformas con las continuas mejoras realizadas en todas las fases del flujo del trabajo, a partir del laboratorio (tejido y fraccionamiento de la célula, la extracción de proteínas, el agotamiento, la purificación, separación, análisis de espectrometría de masas (EM) y terminando en el ordenador algoritmos para la identificación de proteínas y herramientas bioinformática para el análisis de datos, bases de datos y repositorios).

En el sentido más amplio, el proteoma se puede definir como el conjunto total de las proteínas presentes en una unidad biológica (orgánulo, célula, tejido, órgano, individuo, especie, ecosistema) en cualquier etapa de desarrollo y bajo condiciones ambientales específicas (Chevallet *et al.*, 2007). Un experimento en proteómica está basado; en la preparación del diseño experimental, toma de muestra, el tejido, célula u orgánulo, la extracción de proteína, purificación,

separación, el análisis en EM y la identificación de la proteína (Richert *et al.*, 2004).

En muchos de los tejidos vegetales el análisis proteómico es una de las herramientas básicas para la separación e identificación de proteínas usando la técnica de Dodecil Sulfato de Sodio Electroforesis de Gel de Poliacrilamida (por sus siglas en inglés, SDS-PAGE) es de gran importancia para la separación de las proteínas. También se han utilizado para estudiar la relación evolutiva de varios cultivos de planta (Ravi *et al.*, 2003). Por lo tanto el siguiente estudio proteómico establecerá el diseño de tres protocolos de extracción de proteínas y la caracterización de las mismas para comparar la eficiencia de cada método de extracción así como saber el porcentaje de proteína de las plantas estudiadas y su peso molecular en kDa.

2. Marco teórico

Las plantas son organismos eucarióticos autótrofos pluricelulares, se conocen más de 300,000 especies, presentan una amplia diversidad debido a que desarrollaron la capacidad de habitar una gran cantidad de nichos ecológicos. Tienen un papel fundamental como productores de oxígeno y en la incorporación de C a la biósfera, a través de la conversión de CO₂ en azúcares por medio de la fotosíntesis. Las plantas son capaces de adaptarse a condiciones adversas del medio ambiente de manera sorprendentemente compleja, rápida y eficaz.

Las plantas son un grupo ampliamente estudiado en el campo de la biología vegetal y en la actualidad existe una gran cantidad de plantas producidas con diferentes fines. Las plantas pueden ser usadas como biorreactores para la producción de diversas proteínas. Durante varias décadas diversos sistemas de expresión han sido empleados para la producción de proteínas recombinantes incluyendo levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismos como *Escherichia coli*, algas, células, y animales. Sin embargo las plantas son un buen modelo gracias a sus bajos costos, estabilidad de la proteína, tiempo de producción, fácil escalamiento y obtención de productos recombinante (García, 2010).

La producción de proteínas implica el uso de la biotecnología a diversos niveles, incluyendo métodos de transformación, control de expresión genética, expresión en diversas plataformas, selección de la proteína a expresar, su acumulación, mantenimiento y estabilidad (Obembe *et al.*, 2010).

2.1 Leguminosas

Las leguminosas son plantas dicotiledóneas que pertenecen a la familia *Fabacea*, comprenden 750 géneros y 16 000-19 000 especies, de las cuales sólo 60 especies están domesticadas y ampliamente distribuidas en todo el mundo (Hedley *et al.*, 2001; Hoover & Zhou, 2003). En México son el segundo grupo de plantas más diverso con aproximadamente 1700 especies y 135 géneros, debido a que se encuentran en todos los tipos de vegetación, desde

aquellas que habitan en condiciones de extrema sequía y aridez, hasta las de selvas exuberantes y bosques de montaña (Estrada & Martínez, 2003).

Las leguminosas han ocupado un lugar importante en la nutrición humana, especialmente en personas de bajos ingresos de países en vías de desarrollo. Son rica en proteína como la carne, tanto que han sido denominadas como la carne de los pobres (Tharanathan & Mahadevamma, 2003), ya que contiene entre un 17% y un 24% de proteína. A su vez, las leguminosas son reconocidas por su aporte en minerales y vitaminas.

La mayoría de las leguminosas no contienen grasas y las que tienen suelen ser grasas insaturadas, el contenido puede variar dependiendo de la variedad y condiciones del cultivo, como el clima, la localización geográfica y tipo de tierra (Lee *et al.*, 2007).

Las leguminosas son una importante fuente de macronutrientes y micronutrientes, su consumo se relaciona con efectos fisiológico benéficos en el control y prevención de enfermedades (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Una de ellas es el *Crotalaria longirostrata* (Chipilín) y *Canavalia ensiformis*.

2.2 *Crotalaria longirostrata* (Chipilín)

2.2.1 Descripción biológica de la planta

El Chipilín es un arbusto delgado que a veces se mantiene por más de un año. Crece en posición vertical a 1.8 metros de altura, con ramas delgadas, verticales o arqueadas, casi cilíndrico y un poco peludo. El tallo a menudo se vuelve de color rojo oscuro a medida que madura. El conjunto de hojas son estrechamente alternas, de 18 mm de pecíolos, tienen tres, folletos oblongo-ovaladas de tallo corto, 1.25-4 cm de largo, que son pálidas y sedoso en la parte inferior figura1. Las flores en forma de racimos de 15 a 20 flores que son amarillas teñidas de manchas marrones que llegan a 2.5 cm de largo (Chízmar, 2009).



Figura 1. Partes que conforman la planta de *Crotalaria longirostrata* (Chipilín) (CONABIO, 2013)

Las vainas acanaladas de chipilín son estrechas en la base redonda, con un agudo estaño en el ápice. En su madures, las vainas son finamente vellosa, inflado de color marrón oscuro, y contienen 4-6 semillas y miden 3 mm de largo. La vaina cuando está completamente madura, sus semillas son de color arrojadas (Morton, 1994). Se propaga a través de la semilla durante la temporada de lluvias en los países de origen Salvador y Guatemala (Chízar, 2009). Las semillas se consideran tóxicas debido al contenido de un alcaloide cancerígeno, se presenta en 20% de las especies de este género.

A pesar de su popularidad en la cocina mexicana el Chipilín en Centroamérica del Sur en los E.U., todavía sigue siendo relativamente desconocido como cultivo alimentario. Esto es más probable debido al hecho de que se considera una planta nociva en los E.U., donde es capaz de crecer, específicamente Hawaii. El Chipilín también requiere una gran cantidad de nitrógeno para crecer en el noroeste. Este gran requisito hace que sea poco rentable para la producción y venta. Esto se debe a que el Chipilín en su entorno natural recibe

aproximadamente cinco veces más bacterias cuando se forma una simbiosis con relación a los rizobios adecuado a que el Chipilín crezca de manera natural (Eckert, 2011). Por lo tanto, es rara la vez que se utiliza en los E.U. en los alimentos étnicos. Debido a esto no es común el Chipilín en los mercados estadounidenses. Sin embargo, con la creciente población de América Latina inmigrantes en el noroeste, E.U., ha habido una mayor demanda de ingredientes por sus alimentos nativos como Chipilín. Si el Chipilín se vuelve más popular puede ir creciendo en un ambiente controlado, que podría ser visto por su uso comestible en lugar de su falta de crecimiento.

2.2.2 Ecología y distribución

Crotalaria longirostrata es una planta leguminosa nativamente crecida en el sur de México y América Central. Específicamente en América Central, se cultiva en el Salvador y Guatemala. El Chipilín puede ser caracterizado como una planta perenne de hojas verdes que crece hasta aproximadamente un metro y medio de altura y tiene flores amarillas. El Chipilín ha sido considerado como una de las 16 especies más importante de sus hojas comestibles en el mundo (Arias *et al.*, 2003) debido a su alto contenido nutritivo ya que sus hojas son altas en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina, y ácido ascórbico (Morton, 1994).

2.2.3 Condiciones climáticas

El Chipilín es una planta tropical que florece en el sur de México y Centro América. El clima en estas dos regiones es estable y tiene una temperatura media de 22 °C, durante todo el año, proporcionando un excelente ambiente para que el Chipilín crezca. En E.U. el clima es diferente pero espectacular, con amplios rangos de temperatura de 0 a 24 °C durante todo el año (Camarillo-Castillo, 2013). Sin embargo, no es sólo la diferencia del clima que disminuye el crecimiento del chipilín, también es la falta del tipo de bacterias fijadoras de nitrógeno que ayuda a la planta a florecer en el noroeste.

2.3 *Canavalia ensiformis*

2.3.1 Descripción biológica de la planta

Es una planta anual, erecta, con una altura de 0.6-2 m. Sus hojas constan de 3 folíolos membranáceos en forma de huevo, son ovadas de 6 a 12 cm de longitud y de color verde oscuro figura 2. Presenta inflorescencia de hasta 30 cm de largo con 10-20 flores de color rosa en pedúnculos. El fruto es lineal, ligeramente curvo de hasta 30 cm e indehisciente (Acosta & Hernández, 2012).



Figura 2. Partes que conforman la planta de *Canavalia ensiformis* (Acosta & Hernández, 2012)

Las semillas son elipsoidales, de 12-20 y de unos 2 cm cada una, de color blanco y suave con una cicatriz de semillas de color marrón que es alrededor de un tercio de la longitud de la semilla. Sus raíces tienen nódulos que fijan nitrógeno. Las semillas poseen una alta proporción de aminoácidos esenciales, a excepción de triptófano por lo que se puede incorporar en la dieta humana (en forma de harina, pastas y galletas), pero hay que asegurar un procedimiento adecuado para reducir riesgos de intoxicación. Por otra parte, se usa como fuente industrial de lectinas y ureasa. La semilla se utiliza como repelente para el control de babosas y las hojas controlan los zomposos

matando al hongo alimenticio que ellos cultivan. También se utiliza en la alimentación animal por ser importante fuente de gran valor energético y proteico (Acosta & Hernández, 2012).

2.3.2 Ecología y distribución

La *Canavalia ensiformis* es una leguminosa cuyo uso está destinado para cultivos de cobertura, producción de biomasa, abono verde y alimento de animales gracias a la facilidad de adaptación, tolerancia a la sombra, resistencia a la sequía y condiciones de humedad que esta planta posee (Martín *et al.*, 2009). Se encuentra en las regiones tropicales, subtropicales como en África Occidental, Asia, América Latina, América del Sur, la India y Pacífico-Sur (Saur & Kaplan, 1969).

2.3.3. Condiciones climáticas

Esta especie puede sembrarse entre 0 y 1800 msnm (aunque lo óptimo es hasta una altura de 900 msnm), con precipitación alrededor de 640-4200 mm/año (el rango óptimo de precipitación es de 900 a 1200 mm/año) y temperatura de 15 a 30 °C presentando como rango óptimo de 15 a 28 °C. Sumamente resistente a la sequía aunque se adapta a condiciones húmedas. Tolera la sombra y moderadamente las inundaciones. La planta *Canavalia* tolera los suelos salinos, alcalinos y los ácidos (suelos con pH de 4.3 a 8.0 y el rango ideal de pH va de 5 a 6). También crece en suelos altamente húmedos, con textura de arenoso-franco a arcillosa y en los de baja fertilidad con poco contenido de fósforo. No tolera a los suelos que presentan altos contenidos de aluminio (Acosta & Hernández, 2012).

2.4 Beneficios de la simbiosis *leguminosa-rhizobium*

Las legumbres tienen una relación simbiótica especial con bacterias dentro del género *Rhizobium*. Las Bacterias de rizobios se dividen en dos grupos principales de proteobacterias, el alfa y beta (Weir, 2011). Los rizobios son bacterias del suelo, que fijan nitrógeno cuando se encuentran nódulos dentro de la raíz de la leguminosas (Jones *et al.*, 2007).

Las leguminosas, como *Crotalaria longirostrata* (Chipilín) y *Canavalia ensiformis*, se caracterizan por la fijación de nitrógeno debido a que los rizobios son capaces de proporcionar a las leguminosas una fuente extra de nitrógeno. Los rizobios se proporcionan por alimento y refugio en la leguminosa. El primer paso en este proceso simbiótico está tomado por la leguminosa. La leguminosa excreta un compuesto llamado flavonoide. Un flavonoide es un pigmento vegetal, con muchas funciones, tales como atraer a los animales para la polinización, lo que indica a los rizobios ayudarles durante la etapa de la infección de la planta, y como un compuesto anti-hongos (Galeotti *et al.*, 2008). Cuando el flavonoides alcanzan el suelo que provocan los rizobios para secretar nodulación. La leguminosa detecta los factores de nodulación, los pelos de la raíz de la leguminosa en el suelo empiezan a curvarse, y al hacerlo, atrapan a los rizobios dentro de la raíz del cabello. Una vez en la raíz del cabello los rizobios causan un hilo de la infección, lo que crea un camino para que los rizobios puedan viajar desde la punta del pelo de la raíz hacia la leguminosa interna. Una vez plenamente dentro de la leguminosa los rizobios inician un proceso de división celular alrededor de la rosca de la infección, la creación de un nódulo en la leguminosa. En el nódulo alrededor de los rizobios se diferencian en nitrógeno fijando bacterias, y comienza a fijar el nitrógeno en la leguminosa. A cambio de la fijación el nitrógeno los rizobios se proporcionan con el oxígeno y los hidratos de carbono (Jones *et al.*, 2007). Este proceso se representa en la figura 3.

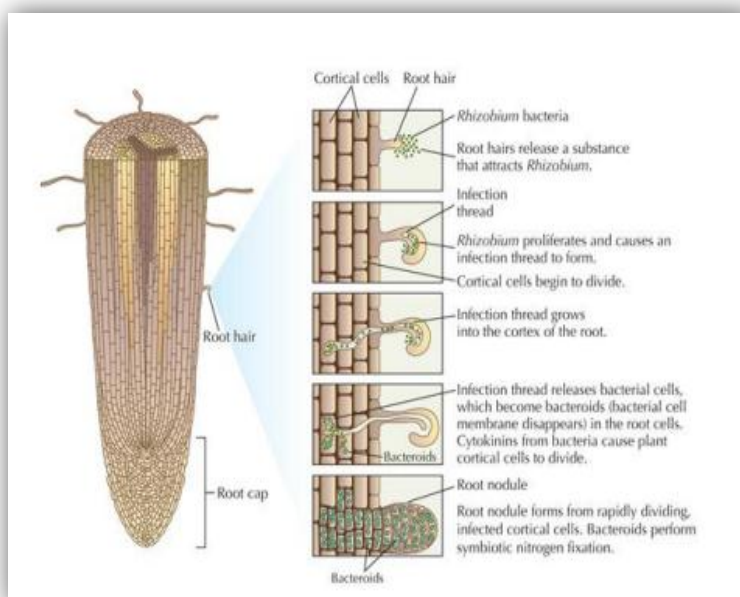


Figura 3. Simbiosis de bacterias *Rhizobium* con leguminosas (Jones *et al.*, 2007)

2.5 Plantas oleaginosas

Las plantas oleaginosas que contienen semillas tienen un alto contenido de aceites y otras grasas de los alimentos, que se utiliza como reserva de energía (Rodrigues *et al.*, 2012). Las oleaginosas también poseen cantidades razonablemente equilibradas de carbohidratos, grasas y proteínas y son caracterizadas no sólo por su composición rica en aceites, sino también por su alto nivel de proteínas. El aceite puede ser extraído de las semillas de estas plantas utilizando la tecnología apropiada, que permita ser utilizado en la alimentación humana, animal y en la producción de biodiesel, que resulta una comida sin grasa de alto valor proteico (Rodrigues *et al.*, 2012).

Los lípidos son componentes biológicos que son solubles en solventes no polares y son insolubles en agua, entre los lípidos se encuentran los aceites, dicha denominación hace referencia únicamente al estado físico líquidos de los lípidos. Los aceites son ésteres formados por la condensación (unión) de ácidos grasos con glicerol, son los compuestos más estables y no son fácilmente degradables (Cisterna, 2010). Como es el caso de *Moringa oleifera* que es una oleaginosa debido a la alta cantidad de aceite y contenido de proteína presente en las hojas.

2.6 *Moringa oleifera*

2.6.1 Descripción biológica de la planta

La *Moringa oleifera* es un árbol siempre verde de tamaño pequeño y crecimiento acelerado que usualmente alcanza de 10 a 12 m de alto. Tiene una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje plumoso de hojas pinadas en tres, y una corteza gruesa, blanquecina y de aspecto corchoso. Se valora principalmente por sus frutas, hojas, flores, raíces, todas comestibles, y por el aceite (también comestible) obtenido de las semillas. Este cultivo puede ser propagado por medio de semillas o por reproducción asexual (estacas), aún en suelos pobres; soporta largos períodos de sequía y crece bien en condiciones áridas y semiáridas (Cáceres & Díaz, 2005).

Las hojas son compuestas, de unos 20 cm de largo, con hojuelas delgadas, oblongas u ovaladas de 1 a 2 cm de largo y de color verde claro; tienen cualidades nutritivas sobresalientes, que están entre las mejores de todos los vegetales perennes. El contenido de proteína es del 27%; además tienen cantidades significativas de calcio, hierro y fósforo, así como vitamina A y C. Las flores son de color crema, numerosas, fragantes y bisexuales. Miden de 1 a 1.5 cm de largo. Éstas se encuentran agrupadas y están compuestas por sépalos lineales a lineal-oblongo, de 9 a 13 mm de largo. Los pétalos son un poco más grandes que los sépalos figura 4.



Figura 4. Partes que conforman la planta de *Moringa oleifera* (Cáceres & Díaz, 2005)

Las frutas son unas cápsula de color pardo, de tres lados, lineales y pendientes, con surcos longitudinales, usualmente de 20 a 45 cm de largo, aunque a veces hasta de 120 cm de largo, y de 2 a 2.5 cm de ancho que dan apariencia de vaina. Si se corta transversalmente se observa una sección triangular con varias semillas dispuestas a lo largo. Las frutas alcanzan la madurez aproximadamente 3 meses después del florecimiento. Las semillas

son carnosas, cubiertas por una cascara fina de color café. Poseen tres alas, o semillas aladas de 2.5 a 3 mm de largo. Al quitar la cascara se obtiene el endospermo que es blanquecino y muy oleaginoso (García *et al.*, 2013).

Los compuestos de *Moringa oleifera* tienen una toxicidad muy baja, contiene como principios tóxicos benzil, ácido moríngico y ácido cianhídrico. La corteza fresca contiene beta sistosterol y pequeñas trazas de alcaloides (Alfaro & Martínez, 2008).

Las hojas frescas y machacadas aplicadas a la piel producen ampollas y quemaduras, el principio activo de las raíces es la espiroquina, y tiene una acción directa sobre el miocardio (García *et al.*, 2013). Los cotiledones de la semilla presentan efectos tóxicos por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, el efecto tóxico probablemente debido a los constituyentes antimicrobianos; sin embargo, se considera que no constituye un riesgo para la salud humana a las concentraciones utilizadas con propósitos nutricionales, medicinales o de purificación de agua (Alfaro & Martínez, 2008).

2.6.2 Ecología y distribución

La *Moringa oleifera* es originaria de India y Bangladesh, se encuentra distribuida en las zonas del Sur y Sureste de Asia pasando por América Latina. Se adapta muy bien en los trópicos y subtropicos (Radovich, 2009). La *Moringa oleifera* se asocia morfológicamente con la *Moringa concanensis* y con la *Moringa peregrina*, y se denominan "árboles esbeltos", por su figura estilizada y alta. Son especies principalmente asiáticas, originaria de las faldas del sub Himalaya (valles sub Himalayos), en el norte de la India, aunque pueden encontrarse hoy día a lo largo de todo el planeta (Fuglie, 2001).

Se cultiva en las regiones tropicales de todo el mundo, la *Moringa oleifera* puede crecer en cotas de hasta 1,200 m sobre el nivel del mar, en colinas o laderas, aunque lo más normal es encontrarla en praderas y orillas de río. Puede llegar a alcanzar los seis o siete metros de altura en un año, con una recepción media anual de agua de 400 mm.

2.6.3 Condiciones climáticas

El clima de una región influye significativamente en el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. Es por ello que es indispensable conocer la respuesta fisiológica de esta especie a las condiciones ambientales para poder formular un sistema racional de siembra y manejo (Reyes-Sánchez, 2004).

La *Moringa oleifera* es una planta de origen tropical y se desarrolla en climas secos, semiáridos, semi-húmedos y húmedos. Crece bien en alturas que van desde el nivel del mar hasta los 1,200 m de altitud y prospera en temperaturas altas, considerándose óptimas para un buen comportamiento las que están entre 24 y 32 °C (Reyes-Sánchez, 2004).

En Centroamérica se encuentra en zonas con temperaturas de 6 a 38 °C. Es resistente al frío por corto tiempo, pero no menos de 2 a 3 °C. En las temperaturas menores de 14 °C no florece y solamente se puede reproducir vegetativamente (por estacas) (Armengol *et al.*, 2010).

El agua afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que actúa como constituyente, solvente, responsable de la turgencia celular y reguladora de su temperatura celular. La *Moringa oleifera* necesita al menos 700 mm anuales de lluvia aunque hay reporte de lugares del pacífico como Nicaragua donde con 300 mm crece muy bien, pero tolera una precipitación anual de 500 a 1,500 mm de lluvia anuales (Reyes-Sánchez, 2004).

2.7 Estudio proteómico en plantas

El término proteoma fue acuñado por primera vez en el congreso de Electroforesis Bidimensional de Siena (1994) y hace referencia al conjunto de proteínas expresadas por un genoma (William & Hochstrasser, 1997). En el caso de las plantas, el proteoma se correspondería con la expresión de proteínas de una planta, órgano, tejido, tipo celular u orgánulo en un estado de desarrollo determinado (Hochholdinger *et al.*, 2006) y la proteómica se definiría, por lo tanto, como el análisis sistemático de la población proteica de dichos compartimientos (Pineda-Dorado, 2007). El proteoma de cada célula viviente, a diferencia del genoma, es dinámico, alterable en respuestas al estado

metabólico de la célula y a la recepción de moléculas señal intra y extracelulares; además muchas de las proteínas que se expresan son susceptibles de modificaciones post-traduccionales (PTM, *post-translational modifications*) (Newton *et al.*, 2004). Por todo ello, surgió la necesidad de redefinir el término proteómica, en la que sea denominado era de la postgenómica, sugiriéndose que la proteómica representa el esfuerzo para establecer las identidades, cantidades, estructuras y funciones bioquímicas y células de todas las proteínas pertenecientes a un organismo, órgano u orgánulo; también estudiaría esta disciplina cómo estas propiedades varían en el espacio, el tiempo y bajo distintas condiciones fisiológicas (Kenyon *et al.*, 2002).

La proteómica se está convirtiendo en una herramienta poderosa en la caracterización funcional de plantas modelo y cultivables, debido fundamentalmente a dos motivos: al aumento de la información de secuencias de nucleótidos (Whitelegge, 2004), la alta sensibilidad y rapidez en la identificación de proteínas por espectrometría de masas (EM). La velocidad, exactitud y sensibilidad de la EM supera a otras técnicas anteriores como la secuenciación mediante el método de Edman (1970). Debido a que los avances tecnológicos en proteómica son cada vez más accesibles, los esfuerzos por catalogar y cuantificar proteomas completos son paralelos a otras aproximaciones genómicas, transcriptómicas o metabólicas. La aplicación de los datos obtenidos mediante proteómica para catalogar genes, mostrar información sobre MPT (modificación post-traduccional) de los genes identificados y su localización subcelulares es particularmente interesante (Baginsky & Gruiseem, 2006), reconociéndose que la proteómica es el nexo de unión entre genómica, genética y fisiología (Zivy & Vienne 2000).

2.7.1 Aspectos fundamentales en el estudio de la proteómica:

- 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. Con base en esto se pueden comparar los perfiles de proteína expresados en diferentes situaciones problema con el fin de caracterizar a nivel de proteína dicho evento. Por

lo tanto es una técnica comparativa de la que se puede obtener información de proteínas implicadas en transducción de señales y proteínas específicas de un estado fenotípico determinando de una enfermedad, generando herramientas para tratar el problema de una mejor manera (Girotti, 2010).

- La **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. Este tipo de proteómica incluye estudios de modificaciones postraduccionales y la afinidad ligando-receptor (Girotti, 2010).
- La **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. Esta clase de proteómica se ha potenciado por sus aplicaciones industriales, principalmente en la industria farmacéutica en la cual se buscan blancos para el uso de nuevas drogas (Girotti, 2010). Esta proteómica incluye el uso de técnicas de determinación de la estructura como difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y métodos computacionales.

La proteómica ha generado gran número de revisiones bibliográficas, pero tan solo un 7% corresponden a proteómica vegetal (ISI Web of Knowledge, 2014). Agrawal et al. (2005) hacen una revisión de la proteómica de los órganos de plantas dicotiledóneas (Ephritikhine *et al.*, 2004; Whitelegge *et al.*, 2003) de las membranas vegetales, (Cánovas *et al.*, 2004) sobre la interacción planta-organismo simbiote, y también se han publicado revisiones completas sobre proteómica de los orgánulos vegetales en general (Cánovas *et al.*, 2004, Newton *et al.*, 2004; Rossignol *et al.*, 2006) y de los plastidos en particular (Van Wijk, 2004).

2.8 Preparación de la muestra

Una buena preparación de la muestra, es conseguir extraer el máximo número de proteínas de una célula, tejido, órgano u organismo dados, es uno de los pasos más importante para lograr una buena extracción (Agrawal *et al.*, 2005).

Se recomienda el prefraccionamiento, ya que puede reducir mucho la complejidad del extracto proteico, mientras que se enriquece de proteínas poco abundantes. Otro beneficio añadido es la información funcional que se obtiene determinando los comportamientos subcelular donde las proteínas están individualmente localizados (Bertone & Snyder 2005). Las proteínas se aíslan del resto de los componentes vegetales mediante diversos métodos, entre los que destaca el empleo de fenol o de acetona-tricloroacético (Shaw *et al.*, 2003). La meta final es la solubilización de las proteínas en un tampón que se adecue al sistema de separación que se vaya a emplear.

2.9 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas es el primer y más importante paso en un estudio de proteómica, los diferentes tejidos de las plantas contienen relativamente contenidos bajos de proteína, además la extracción se dificulta debido a la presencia de proteasas (seriproteasas y metaloproteasas), que degradan las proteínas y de compuestos tales como polisacáridos, pigmentos, ácidos nucleico, lípidos y compuestos fenólicos, que pueden influir en la separación por electroforesis (Faurobert *et al.*, 2007; Méchin *et al.*, 2007). Las metodologías más utilizadas comprenden la extracción con solventes orgánicos como fenol (Wang *et al.*, 2003; Faurobert *et al.*, 2007), extracción con tampones acuosos en presencia de detergentes (Wei *et al.*, 2009), o precipitaciones directas sobre el material vegetal sin una extracción previa, en donde el reactivo más utilizado es el ácido tricloroacético (TCA) disuelto en acetona (Ménchin *et al.*, 2007). Estas metodologías se usan dependiendo de las proteínas de interés, ya que la solubilidad está asociada a la localización intracelular de estas. Para los estudios proteómicos, la comparación de los geles en dos dimensiones, técnica preferida para el análisis de la mezcla de proteínas debido a la rapidez del análisis y la calidad de los resultados, requiere de proteínas bien homogenizadas, en donde se deben de evitar rayas y manchas así como artefactos producidos por proteólisis. Por lo tanto, no hay una metodología global para la extracción, depende de muchos factores, una metodología que sirve para una planta no funciona igualmente para otra, por lo tanto la adecuación de la metodología de extracción del caso particular es

fundamental para el desarrollo del experimento. Finalmente, después de extraer el mayor número de proteínas se deben disolver en una solución compatible con el isoelectroenfoque, primera dimensión de este tipo de electroforesis (Faurobert *et al.*, 2007; Méchin *et al.*, 2007; Jorrín *et al.*, 2009). La extracción y precipitación de las proteínas, y la preparación de la muestra para la electroforesis en dos dimensiones, debe de ser lo más simple posible con el fin de incrementar la reproducibilidad del experimento. La solubilización de la muestra se hace usando una solución que contiene un agente caotrópicos como Urea y tiourea, los cuales rompen puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas haciendo que las proteínas se desplieguen y se desnaturalicen aumentando la solubilidad de las mismas; además contiene detergentes no iónicos o zwitteriónicos como el CHAPS o el Tritón X-100, los cuales previenen las interacciones hidrofóbicas y evitan la formación de agregados de proteínas, y además son útiles en la solubilización de proteínas hidrofóbicas como las proteínas de membrana; debe contener agentes reductores como el DTT o el β -mercaptoetanol, para reducir y evitar la reoxidación de los puentes disulfuros tanto intra como intermoleculares logrando una completa desnaturalización (Ferrer-Navarro, 2005; Jorrín *et al.*, 2009).

2.10 Métodos de rotura celular

El primer paso en el aislamiento de una proteína es la rotura celular, para posteriormente poder extraer la proteína con un tampón adecuado. El método de rotura a elegir depende de las características mecánicas del tejido o células de donde se va a aislar la proteína, así como su localización. Entre los métodos están:

- **Lisis celular:** Válido para células sin pared celular como las células de tejidos animales, pero no es suficiente para células vegetales o bacterias. Consiste en suspender las células en una solución hipotónica (más diluida que el interior celular). Debido a la diferencia osmótica el agua difunde al interior de la célula, causando su hinchamiento y rotura.
- **Destrucción mecánica:** Entre estos métodos se encuentran la **homogenización** (hacer pasar las células entre un tubo y un pistón de

vidrio que ajustan casi totalmente); moler en un **mortero** con arena o alúmina; **molino con perlas** de vidrio, la **prensa de French** (que hace pasar las células a gran velocidad a través de un pequeño orificio), la **sonicación** (someter las células a vibraciones de ultrasonido) figura 5.

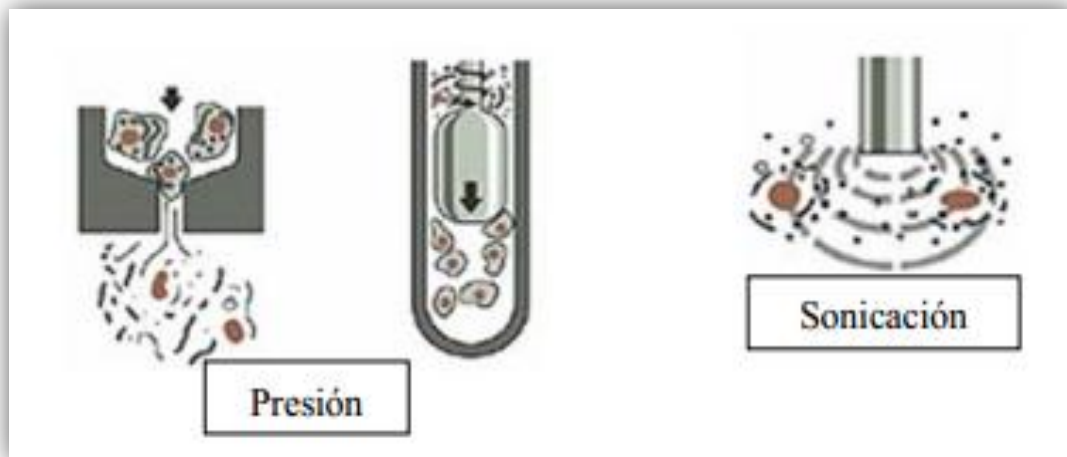


Figura 5. Destrucción mecánica de proteína (Towbin, 1979)

- **Congelación-descongelación.** La rotura se produce al someter las células a un cambio brusco de temperatura, congelando primero a **-196 °C** (con nitrógeno líquido) para triturar el material vegetal) pasándola rápidamente a temperatura ambiente (25 °C) (Towbin, 1979) .

Tras la rotura o bien, si se requiere, durante el proceso de rotura, se utilizan tampones de extracción para solubilizar las proteínas. Pueden utilizarse como tales disoluciones acuosas de tampones específicos para proteínas solubles o bien que contengan además detergentes si se pretende purificar proteínas asociadas a membranas, si bien en este caso hay que cuidar que la enzima no se desnaturalice.

Una vez que la proteína se ha extraído de su entorno natural está expuesta a muchos agentes que pueden dañarla. Los cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y la acción de las proteasas (enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos) son los principales factores que pueden desnaturalizar las proteínas (García-Pérez, 2000). Para evitar o minimizar estos factores la manipulación de las proteínas durante el proceso de purificación

suele llevarse a cabo en disoluciones tamponadas, a bajas temperaturas (4°C) y se procura que el proceso sea lo más corto posible, además en ocasiones es necesario añadir el tampón de extracción agentes protectores de grupos funcionales específicos de la proteína o bien inhibidores de proteasas (García-Pérez, 2000).

El resultado de todos estos tratamientos es una lisis u homogenizado que contiene una mezcla de enzimas, membranas y células rotas. Esta preparación se somete a centrifugación 15000 rpm para eliminar los restos celulares y separar, el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, del precipitado que además de restos celulares también contienen proteínas asociadas a membranas y que para solubilizarlas requiere un tratamiento adicional con detergentes (Chen *et al.*, 2012). En cualquier caso, la fase soluble (con o sin detergente) constituye el extracto crudo donde se encuentra la proteína de interés objeto de la purificación. A la hora de centrifugar hay que tener en cuenta que la centrífuga sea refrigerada, balancear los tubos y asegurarse siempre que los rotores estén fijos.

2.11 Métodos colorimétricos para cuantificación de proteínas

2.11.1 Método de Biuret

Biuret (Gornall *et al.*, 1949; Robinson & Hogden, 1940) es el método más antiguo para la cuantificación de proteínas y que está disponible comercialmente. Se trata de un solo reactivo y una sola incubación de 20 min. El ión de cobre divalente en el reactivo forma un complejo con los grupos amida de la proteína y se reduce a un ion monovalente en virtud de condiciones alcalinas figura 6. El complejo púrpura formado absorbe a 550 nm y la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteínas. Por lo tanto, no es tan alta la interferencia de compuestos tales como ácidos nucleicos que absorben a longitudes de onda cortas (McClements, 2003).

El complejo se forma entre un ion de cobre y de cuatro a seis enlaces peptídicos cerca uno del otro (Mehl *et al.*, 1949; Pierce, 2009; Rising & Yang, 1933). Por lo tanto, los péptidos pequeños no reaccionan, en lugar tripéptidos y

mayor se requieren polipéptidos o proteínas para formar el complejo (Pierce, 2009).

El método tiene una sensibilidad baja y corto rango dinámico de 1 a 10 g/L en 1 ml de volumen de la muestra se mide en una cubeta con un espectrofotómetro de luz VIS. Biuret es bastante insensible al tipo de proteínas, como la absorción implica enlaces peptídicos comunes a todas las proteínas (McClements, 2003). Sin embargo, las proteínas con un porcentaje anormalmente alto o bajo de los aminoácidos con grupos laterales aromáticos darán lecturas altas o bajas, respectivamente (Layne, 1957).

Las muestras biológicas no contienen prácticamente ningún producto químico, que pueda interferir con el método de manera significativa (Gornall *et al.*, 1949). Sólo Tris (hidroximetil aminometano) (Robson *et al.*, 1968), sales de amonio, el cobre reduciendo agentes (Harris & Bashford, 1987; Pierce, 2009), y el glicerol (Zishka & Nishimura, 1970) se han enumerado en la literatura como agentes, lo que puede causar un error de la medición de la absorbancia. El reactivo contiene hidróxido de sodio, y la reacción de Biuret se realiza en un medio alcalino. A pesar de las desventajas, la simplicidad y exactitud del método aumenta la facilidad de uso, si la gran cantidad de proteína requerida no es una preocupación.

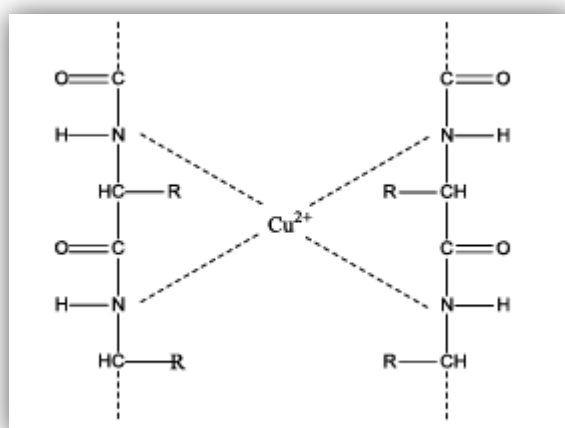


Figura 6. El complejo entre Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos causan la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ en una solución alcalina (Pierce, 2009)

2.11.2 Método de Lowry

Lowry (Lowry *et al.*, 1951), descrito por primera vez en 1951, es el método más ampliamente citado colorimétricamente. Se compone de dos pasos figura 7. El primer paso es la reacción de Biuret. En el segundo paso, el ácido fosfotungstato y fosfomolibdato en un reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los grupos radicales de tirosina, triptófano, histidina, cistina y cisteína en proteínas, y los reduce a molibdeno y azul tungsteno (Peterson, 1979).

El ión de cobre monovalente cataliza la última reacción (Pierce, 2009). La absorbancia proporcional a la concentración de proteína se mide a 750 nm en un espectrofotómetro de luz VIS.

La adición del reactivo de Folin-Ciocalteu mejora la sensibilidad de la reacción de Biuret. Sin embargo, el método es engorroso, ya que hay dos adiciones de reactivos además de la preparación de los reactivos. El tiempo total de incubación es de 40 minutos. Además, la agitación en vórtex debe seguir inmediatamente después de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu para obtener resultados exactos, debido a la inestabilidad de este reactivo en condiciones alcalinas. Los reactivos preparados son estables sólo durante unas pocas semanas o meses. El reactivo de cobre contiene hidróxido de sodio corrosivo como en el método de Biuret. Afectando la seguridad en el laboratorio de mediciones de rutina.

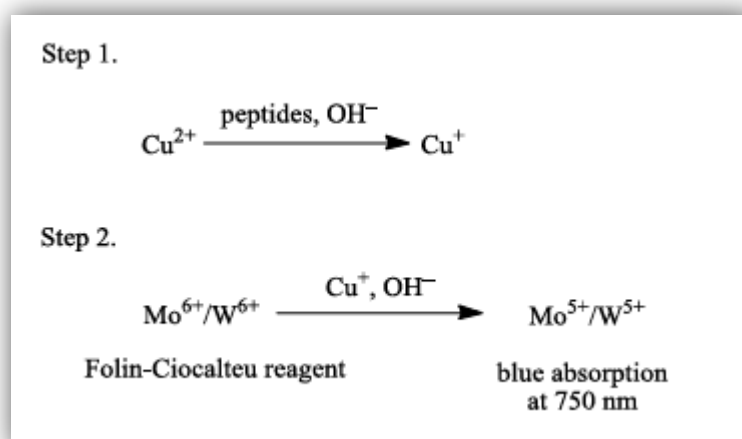


Figura 7. La química de la reacción simplificada del método de Lowry para la cuantificación de proteínas que consiste en la reacción de Biuret (paso 1) y la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (paso 2) (Pierce, 2009)

El rango de medición de las concentraciones de proteína por el método original es 25-500 mg/L en un volumen de muestra de 200L, pero diferentes proveedores han sido capaces de extender en las modificaciones desarrolladas (Bio-Rad DC, 2010; Pierce, 2009).

En una modificación, el tiempo de incubación también se ha disminuido a 15 minutos (Bio-Rad DC, 2010). Una amplia variedad de contaminantes, tales como detergentes, agentes reductores y quelantes, compuestos de amonio y ácidos o tampones fuertes, interfiere con el método original Lowry, ya que precipitan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La respuesta del ensayo se ve afectada por el contenido de la tirosina y el triptófano de la proteína y la variabilidad de la proteína es bastante grande a temperatura ambiente. El calentamiento de la proteína durante el ensayo se requiere para igualar la respuesta de diferentes proteínas (Dorsey *et al.*, 1977).

2.11.3 Método de Bradford

El método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) es fácil de usar, ya que sólo tiene una adición de reactivo. Explota la desprotonación del tinte azul de Coomassie Brillante G-250 tras la unión a la proteína y el aumento en la absorbancia a 595 nm figura 8. La forma protonada del colorante es estable en solución bajo condiciones fuertemente ácidas y absorbe a 470 nm.

Tras la formación del complejo entre el tinte y la proteína, la forma desprotonada del colorante se estabiliza y el cambio de la absorbancia máxima tiene a una longitud de onda más larga.

El tinte interactúa con la proteína a través de fuerzas de van der Waals entre las regiones hidrofóbicas de la proteína y la región no polar del colorante, y la interacción electrostática entre el colorante cargado negativamente y grupos amino cargados positivamente de proteína (Georgiou *et al.*, 2008). Principalmente residuos de arginina, histidina y lisina (atracción electrostática) y en menor medida la tirosina, triptófano y fenilalanina (interacción hidrófoba) son responsables de la interacción (Compton & Jones, 1985). La cantidad de complejo formado depende de la concentración de proteína de la muestra y se detecta como un aumento de la absorbancia a 595 nm.

Las concentraciones de proteína son de 0.25-1.5 g/L en un volumen de muestra 100 μ L pueden ser cuantificados con un protocolo estándar, en el que 5 ml de reactivo de color se mezcla con la muestra, se incuban durante 2 min y la absorbancia a 595 nm se lee con 3 ml en cubeta con un espectrofotómetro de luz VIS. Los agregados pueden formar y conducir a una pérdida de señal en el tiempo (Held, 2006). A altas concentraciones de proteínas, el colorante libre reduce significativamente y la curva estándar se convierte en no lineal. Teniendo en cuenta el agotamiento del colorante mediante el uso de la relación de absorbancia a 595 y 465 nm mejora la linealidad (Bearden, 1978).

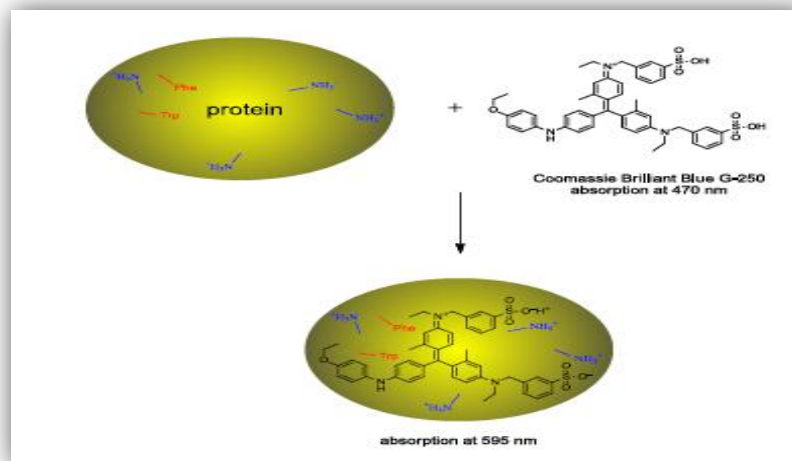


Figura 8. La química del método de Bradford para la cuantificación de proteínas (Bearden, 1978)

La medición no requiere luz UV y cubetas de cuarzo. Sin embargo, el reactivo de color tiñe las cubetas y se recomiendan cubetas desechables. El método es rápido y sencillo, con sólo una adición de reactivo a temperatura ambiente. La saturación de la absorbancia es completa en dos minutos y estable durante una hora.

La inexactitud, falta de sensibilidad, y el rango dinámico corta sobre un intervalo de concentración de 10 veces, estas son las limitaciones para el método. Las diluciones o concentraciones de la muestra a menudo son necesarias antes de la medición. El método es compatible con sales, caotrópico, agentes quelantes y ácidos nucleicos.

Como una desventaja la respuesta es propensa a la interferencia de detergentes que se encuentran en las muestras de extracto de proteínas de lisados celulares. El detergente se une en la proteína y cubre los sitios de unión para el tinte.

El reactivo contiene también metanol tóxico y corrosivo ácido fosfórico, lo que aumenta los riesgos de un peligro (Pierce, 2010). La unión del colorante azul brillante G-250 de Coomassie en la proteína depende del contenido de grupos amino de la proteína, y la respuesta puede variar incluso 38% entre diferentes proteínas (Pierce, 2009). Los Aminoácidos libres, péptidos y proteínas de bajo peso molecular no interactúan con el tinte azul de Coomassie Brillante G-250. Las proteínas o péptidos por debajo de 3 kDa no pueden someterse a ensayo con el método de Bradford (Pierce, 2009). Esto puede ser tomado como una desventaja desde el punto de vista de la variabilidad de la proteína.

2.11.4 Método de BCA (ácido bicinonínico)

El BCA (Smith *et al.*, 1985) este método combina la reacción de Biuret con la detección colorimétrica de iones de cobre monovalente por el Ácido Bicinonínico (BCA) con la intención de mejorar la sensibilidad del método de Biuret. Después de la reducción del ión cobre divalente, Cu^+ reacciona con BSA y forma un complejo con dos moléculas de BSA Figura 9.

El complejo es de color y absorbe a 562 nm. Los aumentos de absorbancia son lineales con el aumento de la concentración de proteína. Aunque el método consta de dos reacciones, sólo se requiere la adición del reactivo, que está en contraste con el método de Lowry. Un análisis de un solo paso se activa debido a la estabilidad del reactivo bicinonínico en medios básicos y permite un método fácil de usar. Sin embargo, debido a la mayor reactividad entre los enlaces peptídicos y cobre a altas temperaturas, se requiere calentamiento para aumentar la absorbancia en presencia de proteínas, mejorar la sensibilidad, menor variabilidad de proteína a proteína, y acortar los tiempos de incubación.

Aunque la saturación de la señal tarda más a temperatura ambiente, la absorbancia puede ser medida antes del punto final dentro de 2 horas a los 37

°C o 60 °C, las muestras se incuban durante 30 min y después de la incubación las muestras se enfrían a temperatura ambiente antes de leer. Debido a que el punto final no se alcanza en un tiempo razonable, todas las lecturas deben realizarse dentro de un intervalo de tiempo corto, por lo que los resultados de absorbancia de los estándares y las muestras son comparables. Debido al calentamiento, un tiempo de incubación largo, y la medición antes de la saturación, el uso del método disminuye. Además, el método tiene la misma desventaja que Biuret y Lowry, el reactivo contiene un agente corrosivo y no es seguro. Concentraciones de BCA de 0.1-1.2 g/L pueden ensayarse con un procedimiento estándar en un volumen de muestra de 100 µL usando una cubeta.

El método tolera contaminantes, en especial detergentes, mejor que el método de Lowry, el reactivo BCA no precipita tan fácilmente como el reactivo de Folin-Ciocalteu en la presencia de ambos detergentes no iónicos e iónicos.

Sustancias que reducen los compuestos de cobre y amonio interfieren con la reacción de Biuret (primera etapa) en el método de Lowry. La formación de complejo de Cu^+ -BCA (segunda etapa) en el método BCA está influenciada por la presencia de los mismos aminoácidos reactivos en la proteína como el método de Lowry. Por lo tanto, la variabilidad de proteína a proteína es similar al método de Lowry (Pierce, 2009).

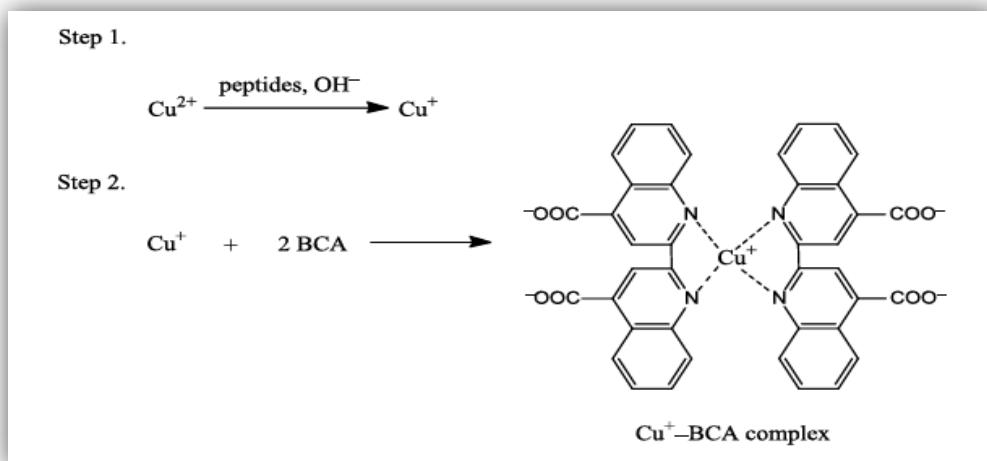


Figura 9. La química del método BCA para la cuantificación de proteínas que consisten en una reacción de Biuret (paso 1) y la formación del complejo entre ácido bicinconínico (BCA) y de iones de cobre monovalente (Pierce, 2009)

2.12 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es un método analítico, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico figura 10, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937. *Raymond* y *Weintraub* en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplea agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

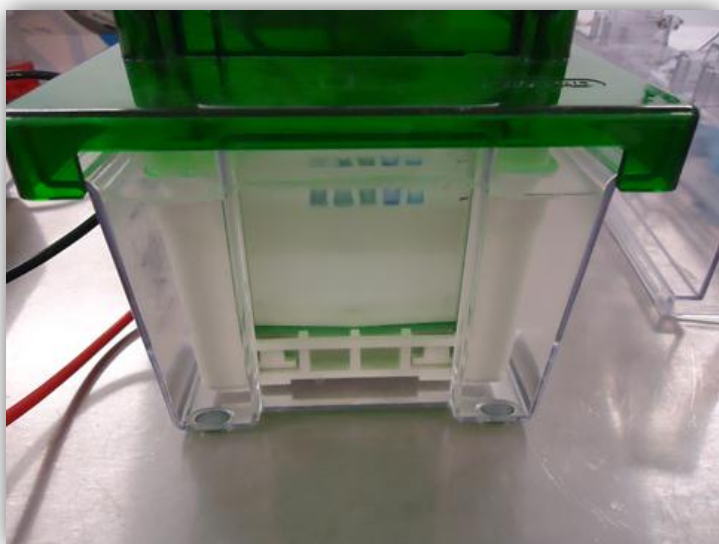


Figura 10. Cámara de electroforesis

2.12.1 Fundamentos de la electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos – y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente

criterio de pureza. Se puede conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencia de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y números de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

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, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de unión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un exclusivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética (Chávez *et al.*, 1990).

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácido nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. El pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas (García-Pérez, 2000).

El punto isoelectrico es el pH al que un polianfólito tiene carga neta cero. El concepto es particularmente interesante en los aminoácidos y también en las proteínas. A este valor de pH la solubilidad de la sustancia es casi nula.

Para calcular se debe de utilizar los pKa.

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

(Los pKa a considerar para esta ecuación, en una tabla de pH, son los que contienen a la especie química con carga igual a cero, cuando tiene más de un pKa).

Las moléculas complejas, tales como las proteínas, se combinan con los iones hidrógeno y con otros iones presentes en la disolución, dando lugar a la carga neta de la molécula. A la concentración de iones hidrógeno, o al pH, para el cual la concentración del ion híbrido de una proteína es máxima y el movimiento neto de las moléculas de soluto en un campo eléctrico es prácticamente nulo, se le denomina punto isoeléctrico.

Las proteínas son moléculas anfotéricas y pueden poseer carga neta negativa, positiva o igual a cero dependiendo del pH del medio en el cual se encuentra. El punto isoeléctrico es aquel en el cual la suma de las cargas positivas y negativas es igual a cero. La primera dimensión corresponde a una separación por punto isoeléctrico por medio de un isoelectroenfoque (IEF), en una tira de IEF que tiene un gradiente de pH lineal entre el cátodo y el ánodo (Newton *et al.*, 2004).

2.12.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo normalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida figura 11. La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniforme, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insoluble en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Álvarez-Contreras, 2011). El gel de poliacrilamida actúa como un matiz molecular, retrasando el desplazamiento de

las proteínas en una forma aproximadamente proporcional a su masa molecular (Lehninger, 2009). Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metileno-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se produce por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato (Álvarez-Contreras, 2011).

La reacción de polimerización se inicia por un sistema redox de catálisis. El TEMED cataliza la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de APS y que actúa como iniciador.

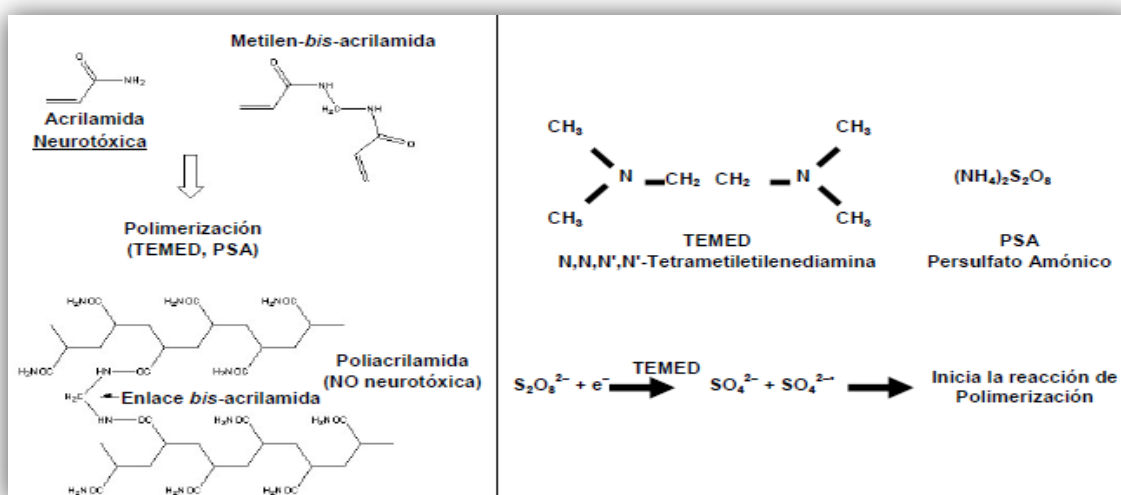


Figura 11. Reacción de polimerización de la poliacrilamida (Álvarez-Contreras, 2011)

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida.

La bis-acrilamida es el agente entrecruzador más comúnmente empleado en este tipo de electroforesis. O Gaal y otros en 1984, plantearon que la bis-acrilamida puede actuar como terminador de la cadena en el proceso de polimerización y concentraciones altas pueden disminuir el tamaño de poro máximo de gel.

2.12.3 Comportamiento de las proteínas en la electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación.

La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en el gel de poliacrilamida es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ figura 12. El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad (Álvarez-Contreras, 2011). Después de la electroforesis, las proteínas se visualizan añadiendo un colorante, tal como el azul de Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel (Lehninger, 2009).

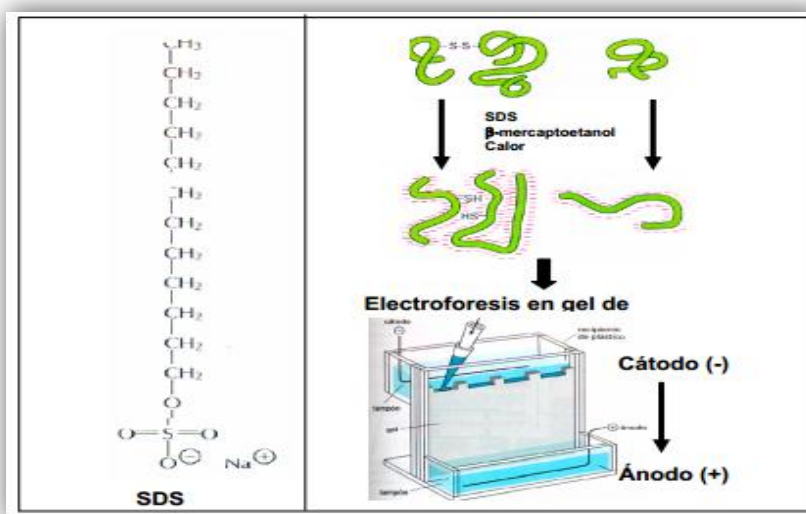


Figura 12. Electroforesis desnaturalizante en el gel de poliacrilamida. Estructura del SDS (Álvarez-Contreras, 2011)

3. Justificación

Las proteínas se encuentran entre las moléculas más estudiadas en plantas, incluyendo la determinación de su estructura, propiedades y función biológica. Es por ello que la proteómica y sus estudios de variaciones cualitativas y cuantitativas en los patrones de expresión de proteínas han llegado a tener un gran avance en la identificación de proteínas y enzimas implicadas en los procesos moleculares y rutas metabólicas que se desarrollan en los organismos vegetales.

El interés por las plantas tales como: *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* cultivadas en el estado de Chiapas ha crecido en los últimos años, ya que se consideran fuentes alimenticias ricas en nutrimentos y principalmente en proteínas. Sin embargo, existe poca información técnica científica del contenido proteico en estas plantas; por lo que en esta investigación, se evaluó diferentes tipos de protocolos para el análisis de los perfiles proteómicos. El establecimiento de estos tipos de protocolos permitirá elucidar el contenido y tamaño de las proteínas en plantas que son cultivadas en el estado de Chiapas permitiendo que en futuras investigaciones mejorar el estudio y análisis proteómico y poder inferir los mecanismos y funcionalidad de estas proteínas en los procesos bioquímicos y metabólicos de estas plantas con potencias nutrimental, medicinal y biotecnológico.

4. Objetivos

Objetivo general

Establecer protocolos para el análisis de perfiles proteómicos en plantas leguminosas y oleaginosas cultivadas en el estado de Chiapas.

Objetivos específicos

1.- Establecer y evaluar diferentes protocolos para la extracción de proteínas en plantas de *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* cultivadas en el estado de Chiapas.

2.-Determinar el porcentaje total de proteína en extractos vegetales de *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* usando la técnica colorimétrica de Bradford.

3.- Determinar los perfiles proteómicos de las plantas de *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* por medio de la técnica de electroforesis SDS PAGE.

5. Metodología

5.1 Ubicación del área de estudio y material vegetal

Los procedimientos experimentales relacionados con la extracción y cuantificación e identificación de bandas de las proteínas de las plantas 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° 45' 26.2" LN y 93° 10' 24.8" LO; altitud=584 msnm).

En este experimento se utilizaron hojas de *Moringa oleifera*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria longirostrata* (Chipilín). Las hojas se recolectaron a partir de plantas sanas y libres de enfermedades cultivadas en parcelas experimentales y se conservaron a 4° C hasta su empleo. La estrategia experimental general para la extracción y cuantificación e identificación de bandas de las proteínas se muestra en la figura 13.

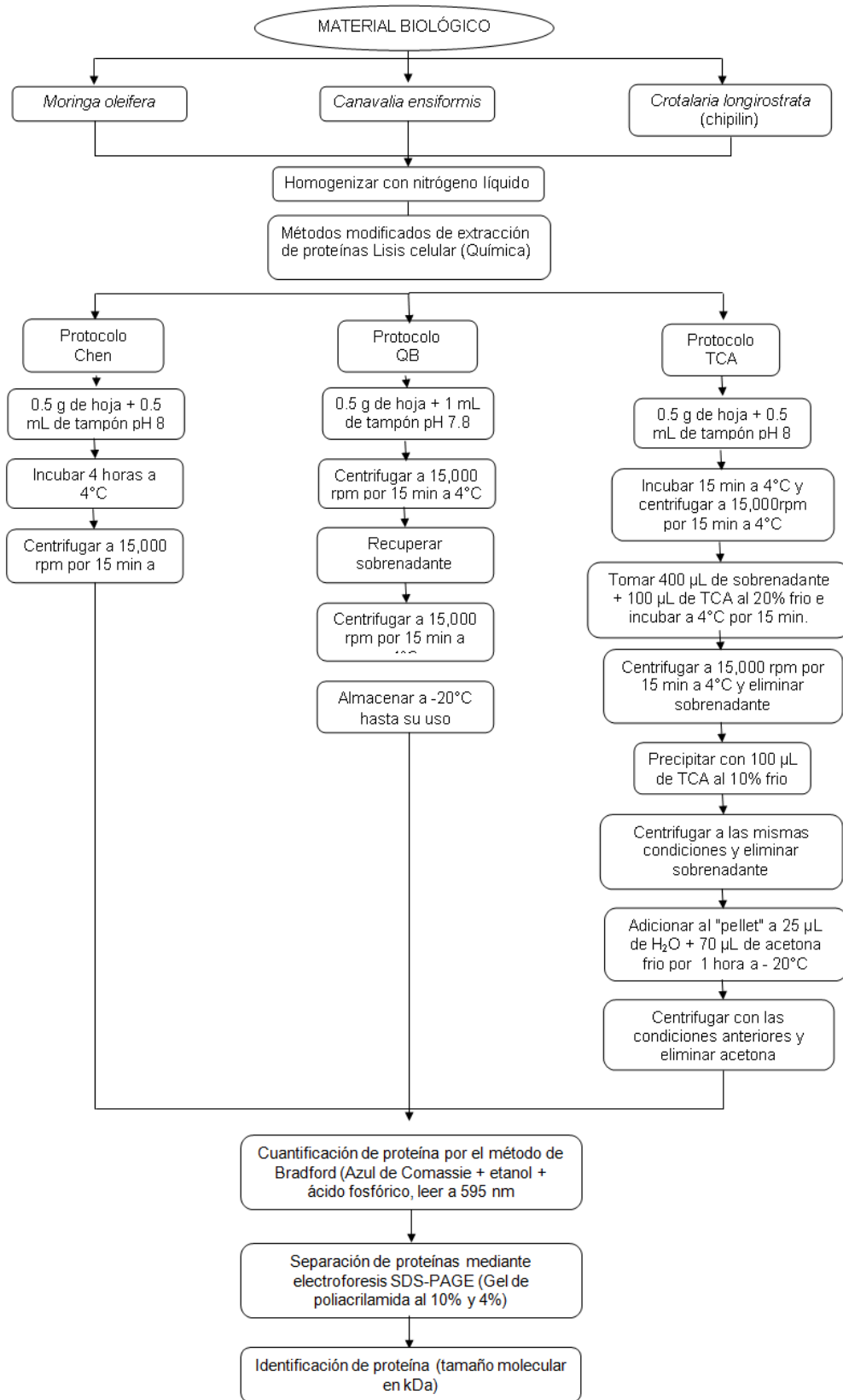


Figura 13. Esquema general de diferentes protocolos para la extracción y separación de proteínas vegetales

5.2 Preparación del material biológico

De cada una de las plantas en estudio, se obtuvo 0.5 g de hojas con la ayuda de una balanza analítica marca Ohaus, modelo PA214 y posteriormente fueron homogenizadas mediante la maceración con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de malla 100, el cual fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml para iniciar el proceso de extracción de las proteínas.

5.3 Extracción de proteínas de hojas

Para la extracción de proteínas a partir de las hojas se emplearon tres protocolos diferentes, que a continuación se indican:

5.3.1 Protocolo Chen

Para la separación de complejos proteicos, en cada una de las muestras se le adicionó 0.5 ml de tampón de extracción, el cual contiene [Tris-HCl + ácido ascórbico + glicerina + polivinilpolipirrolidona + β -mercaptoetanol; pH 8.0], posteriormente se incubó a 4 °C durante 4 horas, y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 4 °C en un equipo Hermle tipo Z326K (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany) de acuerdo al método modificado reportado por Chen *et al.* (2012).

5.3.2 Protocolo QB

El segundo protocolo modificado fue reportado por Ni (1996). Primeramente, se pesó 0.5 g de las muestras y se le agregó 1 mL de tampón QB [KPO₄ 2M + EDTA + Tritón X-100 + glicerol + dH₂O; pH 7.8]. Después, la muestra se mezcló vigorosamente en vortex de marca Scientific modelo TX 5 hasta la eliminación de grumos, posteriormente se incubó a 4 °C durante 15 minutos y en seguida se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4 °C en un equipo Hermle tipo Z326K (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany). El sobrenadante de cada una de las muestras fue transferido en tubos Eppendorf estéril, y nuevamente se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 4 °C para obtener un sobrenadante completamente libre de materia sólida. Las muestras fueron almacenada hasta su uso a -20°C.

5.3.3 Protocolo TCA

Este protocolo fue reportado por Alcántar-Aguirre (2013). Primeramente, se pesó 0.5 g de muestra homogenizada y se le adicionó 0.5 mL de tampón [Sacarosa + EDTA + Tris-HCl + polivinilpolipirrolidona; pH 8]. Se incubó a 4 °C por 15 minutos y se centrifugó a 15 000 rpm a 4 °C durante 15 min en un equipo Hermle tipo Z326K (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany). De las muestras obtenidas se tomó 400 µL del sobrenadante y se transfirió en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se le adicionó 100 µL TCA (Ácido Tricloroacético) al 20% frío, posteriormente se incubó a 4 °C por 15 minutos y se centrifugó a 15 000 rpm a 4 °C por 15 min. Se eliminó el sobrenadante, y el “pellet” resultante se precipitó con 10 µL de TCA al 10% frío, y se centrifugó a las mismas condiciones antes mencionadas, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se le adicionó 25 µL de dH₂O y 70 µL de acetona frío y se dejó reposar durante 1 hora a -20 °C, y finalmente se centrifugó a 15 000 rpm a 4 °C por 15 min y se eliminó la acetona.

5.4 Cuantificación de proteína

El contenido de proteínas fue cuantificado mediante el método de Bradford. Brevemente, se preparó el reactivo Bradford (azul de Coomassie + Etanol + ácido fosfórico), el cual se aforó a 1 L y se filtró con papel Whatman No. 42; obteniendo un color canela. La curva patrón fue preparada basándose en las concentraciones y volúmenes de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y agua mencionado en el Cuadro 1. Cada una de las muestras fue incubada durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU700, E.U).

Cuadro 1. Preparación de la curva estándar BSA

Concentración estándar BSA (µg/ml)	Vol. Sol. Stock (µL)	Vol. Agua (µL)	Vol. Total (µL)
0	0	1000	1000
1	10	990	1000
5	50	950	1000
10	100	900	1000
15	150	850	1000
30	300	700	1000
60	600	400	1000
80	800	200	1000
100	1000	0	1000

5.5 Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

5.5.1 Preparación del gel de separación

El gel de separación fue preparado al 10% usando los reactivos mencionados en el cuadro 2.

Cuadro 2. Soluciones y concentraciones para la preparación del gel de separación.

Reactivos	Cantidad
Acrilamida/bis 30%	1.25 ml
Tris-HCl 1.5 M	1.25 ml
SDS 10%	50 μ l
Persulfato de amonio 1%	250 μ l
dH ₂ O	2.42 ml
TEMED	5 μ l

NOTA: Después de adicionar el TEMED se mezcla por inversión e inmediatamente se vierte en el espacio entre los vidrios como se observa en la figura 14.

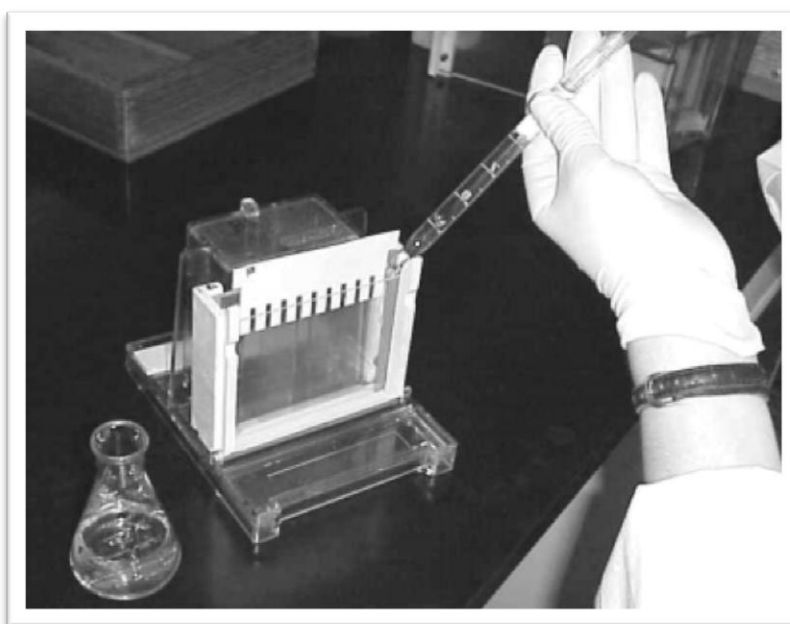


Figura 14. Adición del gel preparado en el “casette” de la cámara de electroforesis SDS-PAGE.

5.5.2 Preparación de gel de apilamiento

El gel de apilamiento fue preparado al 4% usando los reactivos mencionados en cuadro 3.

Cuadro 3. Soluciones y concentraciones para la preparación del gel de apilamiento.

Reactivos	Cantidad
Acrilamida/bis 30%	0.32 ml
Tris-HCl 0.5 M	0.62 ml
SDS 10%	25 μ l
Persulfato de amonio 1%	125 μ l
dH ₂ O	1.41 ml
TEMED	2.5 μ l

Se mezcla la solución por inversión, y se cargó de igual manera que el paso anterior y se colocó el peine para pozos de 1.5 mm (cuidar que no queden burbujas formadas) figura 15.

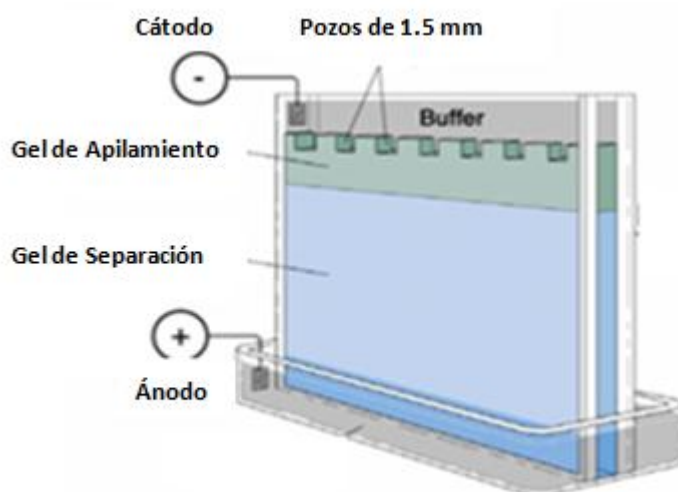


Figura 15. Cámara SDS-PAGE completa

Después que el gel polimerizó se separa el peine formándose los pozos para cargar las muestras. Posteriormente, los geles polimerizados en el “casset” se colocaron en la caja de electroforesis figura 16.

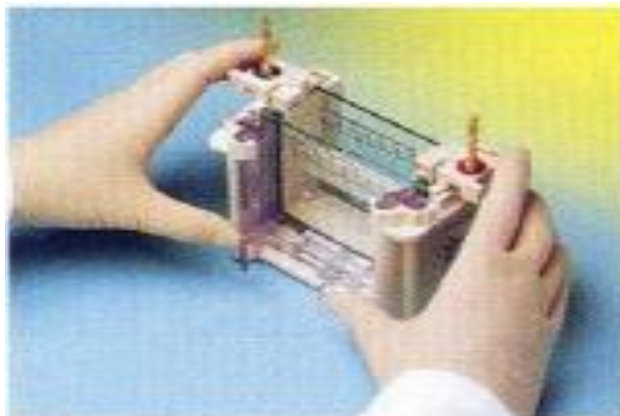


Figura 16. “Casette” del gel montada en la caja de electroforesis

5.5.3 Desnaturalización de las proteínas

Para la realización de electroforesis SDS-PAGE, primeramente las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C a 3000 rpm durante 5 minutos en un termobloque con agitación (Thermomixer Compact Eppendorf, USA).

Se le adicionó 10 μ L de BSA (1mg/mL) + 10 μ L de buffer Laemmli Sample 1x, y para el caso de las muestras se le adicionó 10 μ L del sobrenadante + 10 μ L de buffer Laemmli Sample 1x, se colocaron en tubos Eppendorf de PCR de 0.5 mL. Se cargaron las muestras en cada pozo en una cantidad de 5 – 15 μ L con cuidado para evitar que este se salga figura 17. En uno de los carriles se cargó una mezcla de marcadores de tamaño molecular (TM) y en otro pozo como control positivo se cargó BSA (1 mg/ mL), seguida de las muestras de cada tipo de planta.

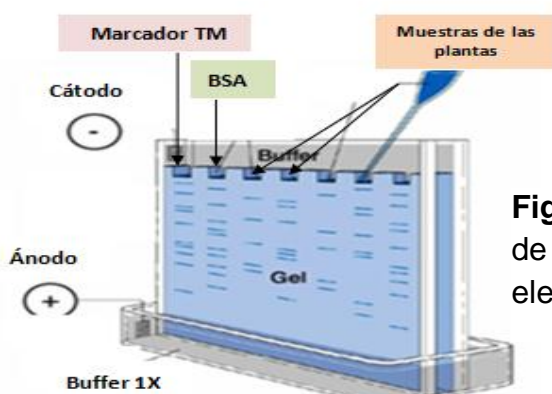


Figura 17. Esquema de adición de las muestras a los pozos de electroforesis SDS-PAGE

Una vez cargadas las muestras, se llenó lentamente el tanque superior con la solución amortiguadora de corrida 1X (180 mL en el tanque inferior y 120 mL en el tanque superior) hasta cubrir completamente los pozos. Teniendo cuidado de no provocar que las muestras se salgan de su respectivos pozos y se mezclen con las otras figura 18.

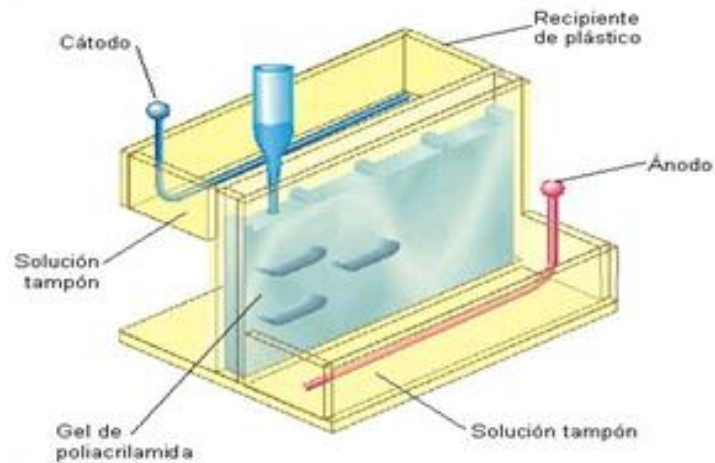


Figura 18. Llenado de la cámara de electroforesis

Se inició la corrida del gel usando un voltaje de 50 volts por 15 min y 40 volts por 2:30 horas una vez que las proteínas recorrieron al otro extremo del gel, se detuvo la corrida. Se desarmó con cuidado el equipo y se obtuvo el gel. Se despegan las dos placas de vidrio, despegando con mucho cuidado el gel figura 19.



Figura 19. Recuperación del gel SDS- PAGE

Una vez obtenido el gel se sumergió en una solución para teñir de azul de Coomassie [ácido acético 10% + metanol 40% + azul de Coomassie 0.1%+ agua destilada] figura 20 y se colocó en una agitadora durante 30 min, después se desechó la solución para teñir y se le adicionó solución desteñidora [ácido acético 10% + metanol 40% + agua destilada] hasta que el gel quede completamente claro (cambio de solución cada 15 min) y las bandas de proteínas son visibles.



Figura 20. Tinción del gel de azul de Coomassie

6. Resultados y discusión

Para el establecimiento de los protocolos de extracción de proteínas de diferentes plantas se utilizaron los protocolos modificados de Chen (Chen *et al.*, 2012), QB (Ni, 1996) y TCA (Alcántar-Aguirre, 2013), a los cuales se les realizaron ajustes tanto en el tiempo de incubación con la solución de extracción, el tiempo de corrida o migración y el voltaje para la electroforesis SDS-PAGE, que nos permitieron alcanzar los objetivos planteados; estas condiciones se evaluaron en el laboratorio utilizando plantas con interés nutricional y medicinal en el estado de Chiapas (*Moringa*, *Crotalaria* y *Canavalia*), de tal manera que se pudo analizar las ventajas y desventajas de cada protocolo para su posterior uso en la determinación de los perfiles proteómicos de dichas plantas.

6.1 Cuantificación de proteínas: curva de calibración

Los valores de absorbancia de la curva de calibración figura 21 para cada una de las diluciones del BSA (0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/mL}$) con el reactivo de Bradford se muestran en el cuadro 4.

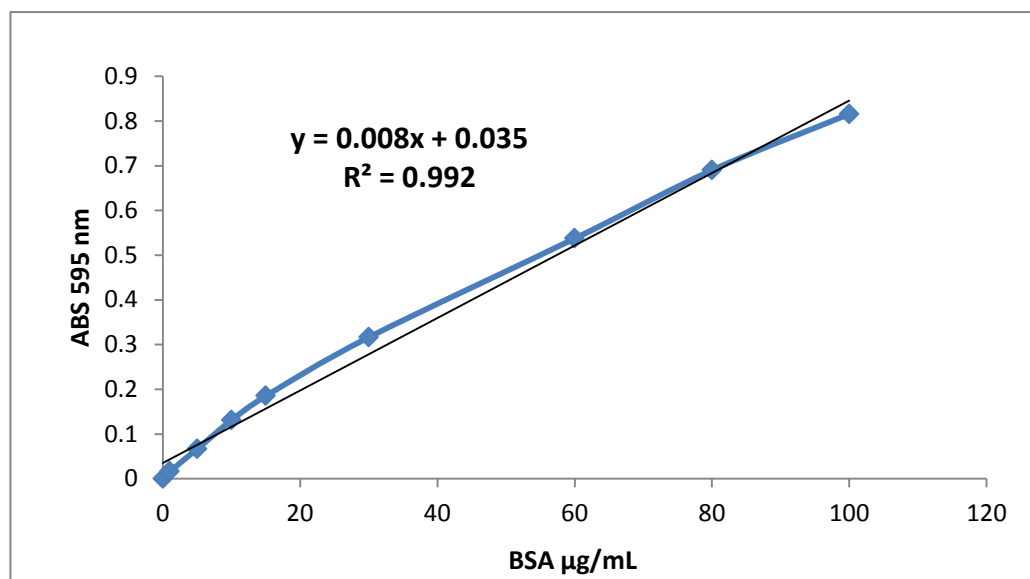


Figura 21. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

En la gráfica se encontró que el valor del coeficiente de correlación R^2 fue 0.992 y el valor de la pendiente fue 0.008

Cuadro 4. Absorbancias obtenidas para la curva de calibración con BSA

Concentración Estándar BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
0	0
1	0.016 ± 0.005
5	0.066 ± 0.006
10	0.131 ± 0.005
15	0.185 ± 0.01
30	0.316 ± 0.003
60	0.537 ± 0.01
80	0.690 ± 0.01
100	0.815 ± 0.01

Los valores del contenido de proteínas totales por el método de Bradford se muestran en el cuadro 5, en donde se puede apreciar el porcentaje obtenido en cada una de las plantas *Canavalia*, *Moringa* y *Crotalaria*, de acuerdo a los protocolos de extracción propuestos de Chen, QB y TCA.

Cuadro 5. Porcentaje de proteína obtenida en cada una de las plantas en los diferentes protocolos

Protocolo	% de Proteínas por el método de Bradford		
	<i>Canavalia</i>	<i>Moringa</i>	<i>Crotalaria</i>
Chen	23.36 ± 0.02	28.7 ± 0.01	23.28 ± 0.01
QB	6.87 ± 0.03	6.62 ± 0.005	7.23 ± 0.03
TCA	4.70 ± 0.02	4.08 ± 0.03	4.65 ± 0.02

En donde se reveló que con el protocolo de Chen se obtuvieron los valores más altos del contenido de proteína cruda fresca presente (*Moringa* 28.7%, *Canavalia* 23.26% y *Crotalaria* 23.28%) en las hojas de las plantas de estudio comparado con los otros dos protocolo establecidos, mientras Borges (2013) y Estupiñán et al. (2007) reportaron valores similares (cuadro 6). Así, Borges (2013) reportó que las hojas de *Moringa oleifera* tuvieron un contenido de proteínas igual (28.7%) al de este estudio utilizando el protocolo de extracción de Osborne & Voogt (1978) el cual consistió en la utilización de una harina desgrasada, en donde se dispersó en agua pH 7, se sometió a agitación mecánica por 60 min y se centrifugó 15000 rpm durante 40 min. El sobrenadante, después de una extensa diálisis contra agua destilada en membranas apropiadas (tamaño de poro alrededor de 10 KDa) durante 24-36 horas, se centrifugó de nuevo, lo que resultó en el sobrenadante albúminas y en el precipitado parte de las globulinas, y el residuo se sometió a re-extracción en las mismas condiciones. El residuo precipitado se extrajo con NaCl 0,5 M pH 7 y después el sobrenadante se dializó como se describe anteriormente y se centrifugó de nuevo, lo que resultó en el precipitado una porción de las globulinas. El residuo de la extracción de NaCl se extrajo sucesivamente con etanol al 70% y NaOH 0,1 N para separar prolamina y las fracciones glutelina, respectivamente, a partir del residuo final. Los porcentajes de proteína extraída en cada etapa se calcularon con respecto al contenido total de proteína en la harina desgrasada y se analizaron mediante la determinación de nitrógeno. Estupiñán et al. (2007) reportaron que las hojas de *Canavalia ensiformis* tuvieron un contenido de proteínas más bajo (18%) comparado con este estudio, ellos determinaron el contenido de proteínas con el método de Kjeldahl, utilizando un aparato de digestión y destilación, midiendo la cantidad de nitrógeno que contenía la muestra y se convirtió el nitrógeno en proteína multiplicando por el factor 6.38 (Flores *et al.*, 2008). Por otro lado el contenido de proteína en las hojas de *Crotalaria* fue similar al encontrado para *Canavalia*. Para nuestro conocimiento esta es la primera investigación en la que se reportan el contenido de proteínas en esta planta de interés comercial y nutrimental en Chiapas.

Es conocido (FAO 2000; Alcaraz-Ariza 2012) que diferentes factores influyen en el contenido de proteínas en las plantas tales como la edad de la planta, condiciones climáticas, el tipo de suelo, la especie y los componentes que contiene cada uno de los tampones, ya que no hay una metodología global para la extracción, y una metodología que sirve para una planta no funciona igual para la otra (Faurobert *et al.*, 2007; Méchin *et al.*, 2007; Jorrín *et al.*, 2009), debido a que el protocolo elegido dependerá del tipo de muestra de partida, de la localización subcelular de la proteína y de las condiciones óptimas que requiera el anticuerpo para reconocer el epítipo proteico.

Cuadro 6. Porcentaje de proteínas reportadas bibliográficamente

Planta	% de Proteína	Bibliografía
<i>Canavalia ensiformis</i>	18	Estupiñán <i>et al.</i> , 2007
<i>Moringa oleifera</i>	28.7 25.1, 26.4 y 29 30.3	Borges, 2013 Moura <i>et al.</i> , 2009 Moyo & Masica, 2011
<i>Crotalaria longirostrata</i>	23.8	No reportado (Wed of Science, 20141208)

6.2 Separación de complejos proteómicos

En el protocolo de Chen, se observó que las proteínas fueron separadas en base a su peso molecular en un gel desnaturizante (SDS- PAGE) al 10%. Como se muestra en la figura 22, las proteínas migraron de manera uniforme en cada una de las muestras M (*Moringa*), CH (*Crotalaria*) y C (*Canavalia*), en donde se presenta un patrón electroforético homogéneo y legible, en las hojas de *Moringa* se observa un peso molecular de 37 kDa. Torres-Castillo *et al.* (2013) reportaron que las hojas de *Moringa oleifera* contiene proteína con un peso molecular 33 a 39 kDa utilizando un método de extracción con una solución tampón de (Tris-HCl 0.1 M) con un pH final de 8 en donde se determinó la separación de la proteína mediante la electroforesis de poliacrilamida al 10% después de un protocolo adaptado de Laemmli (1970).

Mientras que en las hojas de *Crotalaria* se apreció un peso molecular de 40 kDa similares a las hojas de *Canavalia* con peso molecular de 47 kDa, para nuestro conocimiento es la primera investigación en las que se reportan los pesos moleculares en las hojas de dichas plantas de interés comercial y nutricional.

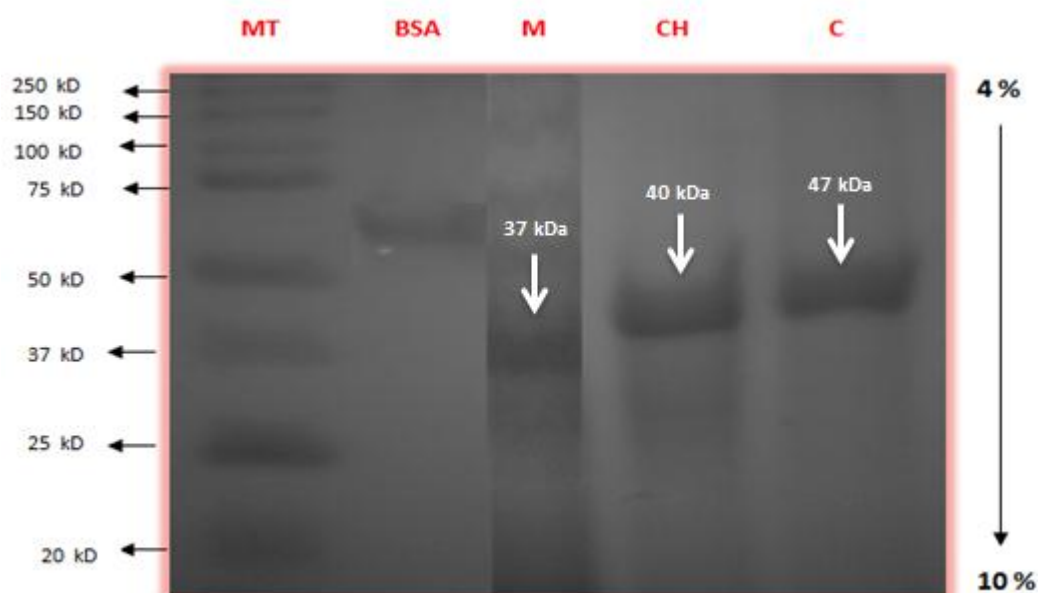


Figura 22. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% utilizando el protocolo modificado de CHEN: en el que se muestra los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albumina de suero bovino (BSA); *Moringa* (M); *Crotalaria* (CH) y *Canavalia* (C)

En los protocolos de TCA y QB las proteínas fueron separadas con las mismas condiciones al protocolo anterior. Como se muestran en la figuras 23 y 24, se observó que hubo presencia de bandas, pero a su vez no fueron desplazadas de manera uniforme en el gel, en el método de TCA C (*Canavalia*) presentó un peso molecular de 40 kDa y CH (*Crotalaria*) con peso molecular de 42 kDa; mientras que en el método QB C (*Canavalia*) presentó un peso molecular de 47 kDa y CH (*Crotalaria*) un peso molecular de 46 kDa; caso contrario de M (*Moringa*) donde no se observó ninguna banda en dichos geles.



Figura 23. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% por el método TCA; en el que se muestra los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albúmina de suero bovino (BSA); *Moringa* (M); *Canavalia* (C) y *Crotalaria* (CH)

Esto puede deberse al proceso que se le aplicó para extraer a la proteína o la solución tampón que no fue el adecuado al tipo de proteínas que se encuentran en las plantas, así como también puede existir interferencia en cuanto al tiempo de contacto entre la proteína y el tampón ocasionando con ello una desnaturalización muy lenta o muy extrema por lo que las bandas no se pudieron separar de manera correcta, o factores como la temperatura, tiempo de incubación y tiempo de corrida. Se pudo notar que las bandas eran muy anchas y que a su vez se formaban manchas evitando una apreciación de bandas, por lo cual se veían como bandas fantasmas provocando que no se pudiera identificar con precisión su peso molecular de dichas plantas.

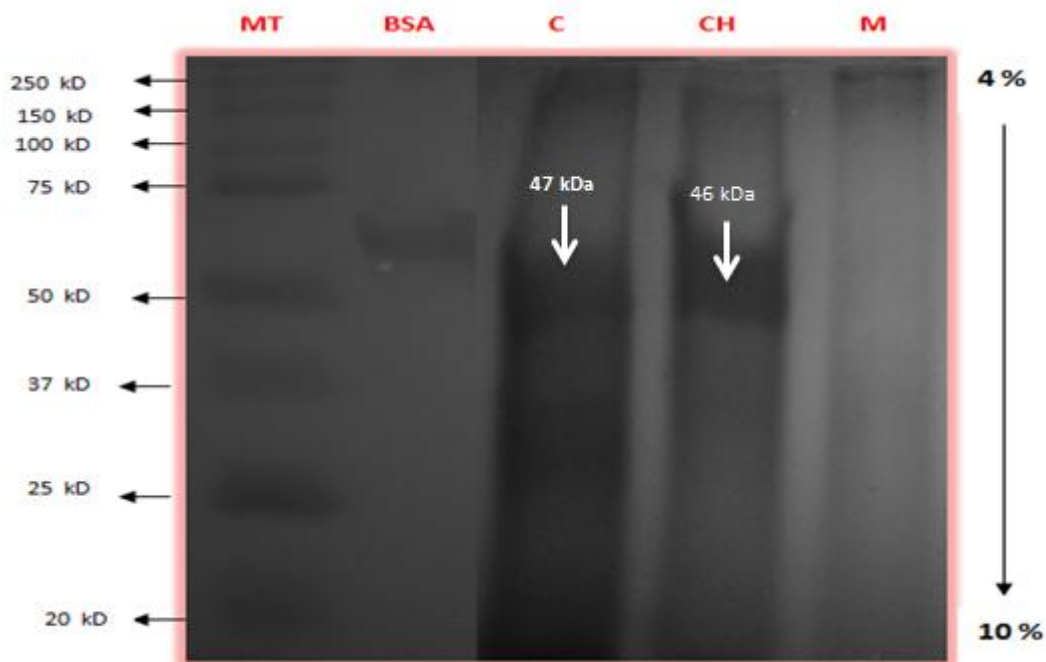


Figura 24. Gel de poliacrilamida en gradiente del 4% al 10% por el método QB: en el que se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT); albumina de suero bovino (BSA); *Canavalia*(C); *Crotalaria* (CH) y *Moringa* (M)

Se conoce que las soluciones tampones, son métodos de extracción de proteínas que actúan como un proceso químico de lisis celular con la ayuda de detergentes que va dirigida a enriquecer la proteína de interés dentro del extracto final. La estructura química de los detergentes permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas. Así también, la elección de la sustancia detergente, depende en parte de la localización, dentro de la célula, de la proteína de interés, citoplasmática, unida a la membrana, dentro de los orgánulos celulares como el núcleo y las mitocondrias (Towbin *et al.*, 1979).

Por lo mencionado anteriormente podemos deducir que en esta investigación el protocolo de extracción de proteínas quien dio los resultados más adecuados fue el protocolo de Chen donde el contenido de proteína para *Moringa*, *Canavalia* y *Crotalaria* fueron 28.7%, 23.26% y 23.28% respectivamente (cuadro 5), como en la separación de complejos proteicos, *Moringa* presento un peso molecular de 37 kDa, *Canavalia* 47 kDa y *Crotalaria* 40 kDa (figura 22). Los componentes de la solución tampón, y el tiempo de contacto con las muestras (4 horas) permitió desnaturalizar completamente a las proteínas desdoblándolas con mayor facilidad, ya que contiene el detergente Tris-HCl (pH 8) el cual permitió solubilizar a las proteínas citoplasmáticas (solubles). El

citoplasma de la mayoría de célula contiene elevadas concentraciones de proteínas, las cuales contienen muchos aminoácidos con grupos funcionales que son ácidos débiles o bases débiles (Lehninger, 2009), la glicerina permitió incrementar la densidad de la disolución de la muestra, ácido ascórbico que actuó como inhibidor de proteasa (Towbin *et al.*, 1979) y el β -mercaptoetanol que evitó la oxidación de cisteínas y rompió los puentes disulfuros intracatenarios. En las proteínas hay puentes disulfuros entre los residuos de Cys (para formar cistina) de una misma cadena (intracatenarios) de algunas proteínas con estructuras cuaternarias (Morales-Sánchez & Gallo-Ramírez, 2006).

En el protocolo de TCA, aunque los componentes de la solución tampón fueron similares al método de Chen, donde se utilizó el detergente Tris-HCl (pH8) el cual permitió solubilizar a las proteínas citoplasmáticas (solubles), sacarosa que permitió incrementar la densidad de la disolución de la muestra, EDTA que actuó como inhibidor de proteasas (Towbin *et al.*, 1979), se utilizó la solución de TCA que permitió precipitar a las proteínas desnaturizándolas, donde se obtuvo porcentajes de proteína para *Canavalia* 4.70%, *Moringa* 4.08% y *Crotalaria* 4.65% (cuadro5) y en la separación de complejos proteicos presentaron pesos moleculares de *Canavalia* 40 kDa, *Crotalaria* 42 kDa y en *Moringa* que no hubo presencia de bandas (figura 23), para este trabajo no fue el mejor protocolo para la extracción de proteínas de las plantas de interés, como principal factor se le atribuyo al TCA, debido a que este reactivo posiblemente no funciona para todas las proteínas o también que la concentración de la proteína de la solución de partida fue muy bajo (Koontz, 2014), ocasionando que no hubiera una desnaturalización completa y así evitando que la proteína se pudiera desdoblar.

En el caso del protocolo QB la solución tampón no fue la adecuada para la extracción de proteínas de las plantas de interés, esto se puede deber a los componentes que conforma la solución tampón, debido a que el Triton X-100 (pH 7.8) solo pudo solubilizar las proteínas de membrana. En la membrana mitocondrial o nuclear es donde regula el movimiento de materiales hacia dentro y fuera de la célula y donde se encuentran los genes (Morales-Sánchez

& Gallo-Ramírez, 2006), glicerol que permitió poner más densa a la disolución de la muestra, el EDTA que actuó como inhibidor de proteasas (Towbin *et al.*, 1979), esto ocasionó que no se pudiera extraer la mayor cantidad de proteína cruda en las plantas, donde se observó que la cuantificación de proteínas para *Canavalia*, *Moringa* y *Crotalaria* fueron 6.87%, 6.62% y 7.23% respectivamente (cuadro 5), mientras que en la separación de los complejos proteicos se observó pesos moleculares para *Canavalia* 47 kDa y *Crotalaria* 46 kDa mientras que en *Moringa* no se observó ninguna banda. Por otra parte el pH final de las soluciones tampón es de suma importancia, así como también el tiempo de incubación que se le da a la muestra biológica con la solución tampón ya que de este depende la precipitación de las proteínas (desnaturalización). Esto se debe a que los enlaces que mantienen la conformación globular se rompen y la proteína adopta la conformación filamentosa, facilitando el doblamiento de las proteínas. Todos los procesos biológicos son dependientes del pH; un pequeño cambio en el pH produce un gran cambio en la velocidad de proceso (Lehninger, 2009).

La electroforesis es un método muy sensible, por motivo a ello en la realización de los geles del método TCA y QB pudo haberse presentado interferencias como la temperatura que afecta en la movilidad de las proteínas, la pureza de los reactivos utilizados en especial al SDS ya que este puede favorecer a la unión de la proteína con impurezas del grupo alcali sulfato lo que ocasiona la formación de múltiples bandas en el gel, la velocidad de polimerización es importante pues una polimerización muy rápida ocasiona una deformidad de las bandas porque ocurre una contracción no uniforme del gel, en este caso debe reducirse el TEMED y el persulfato de amonio o adicionar ferrocianuro de potasio, con el objetivo de hacer más lenta esta, el tiempo de corrida es muy importante pues corridas muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación minimizando la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda y la preparación de la muestra es necesario lograr una completa desnaturalización de las proteínas para así evitar la aparición de bandas fantasmas en la electroforesis (bandas dobles por la concentración de β -mercaptoetanol o el tiempo de incubación)(García-Pérez, 2000).

7. Conclusión

De los tres protocolos de extracción de proteínas (tampones) para los tejidos vegetales mencionados en este trabajo, el que dio mejor eficiencia en cuanto a los resultados reportados bibliográfica mente es el método de Chen, tomando en consideración la cuantificación de proteínas por Bradford en donde presentaron un porcentaje de: *Moringa* 28.7%, *Canavalia* 26.36% y *Crotalaria* 23.28%; y la resolución de las bandas en la electroforesis de SDS-PAGE en donde las proteínas de *Moringa* presentaron un peso molecular de 37 kDa, *Canavalia* de 47 kDa y Chipilín 40 kDa. Las condiciones más adecuadas para la realización de la electroforesis SDS-PAGE fueron 50 volts por 15 minutos para el gel de apilamiento y 40 volts por 180 minutos para el gel de separación, ya que la utilización de voltajes altos y tiempos cortos impiden que las muestras avancen en su espacio necesario para su correcta separación.

8.- Recomendaciones

Este trabajo da pauta para continuar la investigación en plantas de interés comercial, clínico e industrial realizando el porcentaje de proteínas y todos los pasos de análisis proteómicos, desde la preparación de la muestra, electroforesis 1D, electroforesis 2D y espectrometría de masa hasta llevarla a una base de datos para la identificación de las proteínas.

Se recomienda no almacenar por mucho tiempo las muestras vegetales, ni las soluciones preparadas.

Elegir el protocolo adecuado para lo que se requiera extraer de la planta.

La solución de buffer de corrida 1X utilizar máximo 3 veces.

9. Bibliografía

Acosta, M. M. & Hernández, G. R. (2012). Cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos en muestras forrajeras y raciones totales a base de leguminosas: *Canavalia ensiformis* (Canavalia), *Vignasinensis* (Frijol mono), y Gramineas: *Sorgumvulgaris* (Sorgo). Universidad del Salvador Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, el Salvador, Centro América.

Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H. & Rakwal, R. (2005). System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Technologies in proteome establishment. *J. Chromatogr.* 815, 109-123.

Alcántar-Aguirre, F. (2013). Interracción física y funcional de la hexocinasa con la porina (VDAC) en la membrana externa mitocondrial de betabel (*Beta vulgaris* L.) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México.

Alcazar-Ariza, F. J. (2012). Temperatura, luz, atmósfera, viento. Universidad de Murcia España.

Alfaro, N. C. & Martínez, W. (2008). Uso Potencial de la Moringa (*Moringa oleífera*) para la Producción de Alimentos Nutricionalmente Mejorados. Consejo Nacional de Ciencia y 156 Tecnología (CONCYT), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT). Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala.

Alvares-Contreras, I. E. (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 en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.

Arias, L., Losada, H., Rendon, A., Grande, D., Vieyra, J., Soriano, R., Rivera, J. & Cortes, J. (2003). Evaluation of chipilín (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico. *Livestock Research for Rural Development* (15) 4

Armengol, N., Pérez, A., Reyes, F. & Sánchez, T. (2010). Características y potencialidades de *Moringa oleífera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. Revista Pastos y Forrajes, *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*, Central España Republicana, Matanzas, Cuba.

Baginsky, S. & Gruissem, W. (2006). *Arabidopsis thaliana* proteomics: from proteome to genome. *J. Exp. Bot.* 57, 1485-1491.

Bearden, J. C., Jr. (1978). Quantitation of Submicrogram Quantities of Protein by an Improved Protein-dye Binding Assay. *Biochim. BiophysActa.* 533, 525-529.

Bertone, P. & Snyder, M. (2005). Prospects and Challenges in proteomics. *Plant Physiol.* 138, 560-562.

Bio-Rad RC DC. Protein Assay, Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. (accessed 2/7/2010).

www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110107A.pdf

Borges, E., Barbieri, M., Augusto, V., Apareci, M. & Arantes-Pereira L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Food Chemistry Journal.*

Breedlove, D.E. (1986). Flora de Chiapas. Listados Floríst. México 4, 1-246.

Cáceres-Montes, C. & Díaz-Ayala, J. C. (2005). Propuesta de Tratamiento de Aguas de Desecho de una Industria Química de Adhesivos utilizando Extracto Acuoso de la Semilla de *Moringa oleifera* (Teberinto). Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador.

Camarillo-Castillo, F. (2013). *Evaluation the Nitrogen Needs and Efficiency of Rizhobia Strains to Provide Nitrogen to Chipilín (Crotalaria Longirostrata HOOK. AND y ARN)*. Tesis de Maestría en Ciencias, University of Massachusetts – Amherst. Estados Unidos.

Cánovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. D. & Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics.* 4, 285-298.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem Cells. 113, 645-655.

Chávez-Planes, M. A., Díaz-Brito, J., Pérez, U. & Delfín, J. (1990). Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana.

Chen, K., Wu, H., Chen, J.F., Cheng, X.F., Jing, X. & Wang, X.Y. (2012). Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*. *Plant Biotechnology Reports.* 6, 113-122.

Chevallet, M., Diemer, H., Van-Dorssealer, A., Villiers, C. & Rabilloud, T. (2007). Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics*. 7, 57–70.

Chízmar, F. C. (2009). Plantas comestibles de Centroamérica. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio.

Cisterna, P. (2010). Eliminación de grasas y aceites por tratamiento biológico de fangos activos. Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, España.

Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). (2013). La biodiversidad en Chiapas: Estudio de Estado. CONABIO/ Gobierno del Estado de Chiapas, México.

Compton, S. J. & Jones, C. G. (1985). Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Anal. Biochem.* 151, 369–374.

Córdova-Sánchez, S., Castelán-Estrada, M. & Salgado-García, S. (2011). Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (Leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 15, 31-50.

Crespo, G., Ruiz, T. & Álvarez, J. (2011). Efecto del abono verde de *Tithonia* (*T. diversifolia*) en el establecimiento y producción de forraje de *P. purpureum* cv. Cuba CT-169 y en algunas propiedades del suelo. *Revista Cubanade Ciencia Agrícola*. 45, 79.

Dorsey, T. E., McDonald, P. W. & Roels, O. A. (1977). A Heated Biuret-Folin Protein Assay Which Gives Equal Absorbance With Different Proteins. *Anal. Biochem.* 78, 156–164.

Dueñas, M., Hernández, I. & Estrada, I. (2006). Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chemistry*. 98, 45-100.

Eckert, D. D. (2011). Efficient Fertilizer Use-Nitrogen. *Rainbow Plant Food*.

Ephritikhine, G., Ferro, M. & Rolland, N. (2004). Plant membrane proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 943-962.

Estrada, A. E. & Martínez, A. M. (2003). Los géneros de leguminosas del Norte de México. Ed. Brit Press. México. 1-2.

FAO, (2000). Los principales factores ambientales y de suelos que influyen sobre la productividad y el manejo. *Manual on integrated soil management and conservation practices*.

Faurobert, M., Chaïb, J. & Pelpoir, E. (2007). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. *Methods in Molecular Biology*, 335. Plant Proteomics, Methods and Protocols.

Ferrer-Navarro, M. (2005). Análisis de los proteomas de dos micoplasmas: *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Flores-Marges, J. P., Sapien-Medrano, G., Corral-Díaz, B. & Figueroa-Viramontes, U. (2008). Calidad nutricional de duena forraje en suelos tratados en biosólidos y agua residual en el Valle de Juárez, Chihuahua. *Cienc. Frontera*. 6, 105-116.

Fuglie, L. J. (2001). *The Miracle Tree. The Multiple Attributes of Moringa*. Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation.

Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M. & Lanzotti, V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*. 1, 44-48.

García-Fayos, B. (2007). Metodología de Extracción *In Situ* de Coagulante Naturales para la Clarificación de Agua Superficial. Aplicación en Países en Vías de Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

García, J.D. (2010). Plantas como fábricas de proteínas recombinantes humanas. Universidad Libre – Seccional Pereira. Universidad de California Riverside.

García-Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. La Boratorios Beterá. Cuba.

García-Torres, A., Martínez-Cubias, R. & Rodríguez-Díaz, I. (2013). Evaluación de los usos potenciales del término de (*Moringa oleífera*) como generador de materia prima para la industria química. Universidad del Salvador, Escuela de Ingeniería Química e Ingeniería de alimentos. Ciudad Universitaria, Salvador.

Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G. & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 Binding to Proteins: a Hydrophobic Assay for Nanogram Quantities of Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 391-40

Girotti, M. R. (2010). Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.

Harris, D. A. & Bashford, C. L. (1987). *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry: a Practical Approach*, Practical Approach Series, IRL Press Limited: Oxford, UK.

Hedley, C. L., Cunningham, I. & Jones, A. (2001). Introduction. En: Carbohydrates in grain legume seeds. CABI Publishing, UK. 11-13.

Held, P. (2006). Fluorimetric Quantitation of Protein using the Reactive Compound Fluorescamine. *Nature Methods*, Application Notes. www.nature.com/app_notes/nmeth/2006/063006/full/an1794.html

Hochholdinger, F., Sauer, M., Dembinsky, D., Hoecker, N., Muthreich, N., Saleem, M. & Liu, Y. (2006). Proteomic dissection of plant development. *Proteomics*. 6, 4076-4083.

Hoover, R. & Zhou, Y. (2003). In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes. A review. *Carbohydrate Polymers*. 54, 401-417.

ISI Web of Knowledge, (2014). <http://wokinfo.com/espanol/>

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium “*National Institute of Health*”. 5, 619-633.

Jorrín-Novo, J., Maldonado, A., Echevarría-Zomeño, S., Castillejo, M., Curto, M., Valero, J., Sghaier, B., Donoso-Redondo, I. & Valledor, L. (2009). Plant proteomics update (2007–2008), Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of proteomics*. 72, 285– 314.

Kenyon, G. L., De Marini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., Moos, W. H., Petsko, G. A., Ringe, D., Rubin, G. M. & Sheahan, L. C. (2002). Natural Research Council Steering Committee. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol. Cell Proteomics*. 1, 763-78

Koontz, L. (2014). TCA Precipitation. Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *MethodEnzymol.*3, 447–454

Lee, S. C., Htoon, A. K. & Paterson, J. L. (2007). Alkaline extraction of starch from Australian lentil cultivars matilda and digger optimised for starch yield and starch and protein quality. *Food Chemistry.* 102, 551-559.

Lehninger, A. L. (2009). Principios de bioquímica, 5ta. Edición. Editorial Omega.

Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. (2005). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew. Page 592.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*193, 265–275.

Martín, G. M., Rivera, R. & Arias, L. (2009). Efecto de la *Canavalia ensiformis* y micorrizas arbusculares en el cultivo del maíz. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 43, 1-2.

Mathur, B. (2005). Treesforlife. Recuperado el 4 de mayo de 2012, de Treesforlife:ments/Moringa_Book_Sp(screen).pdf
<http://www.treesforlife.org/sites/default/files/docu>

McClements, D. J. (2003). Analysis of Proteins.
www.unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html

Méchin, V., Damerval, C. & Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone. *Methods in Molecular Biology* 335. Plant Proteomics, Methods and Protocols.

Mehl, J. W., Pacovska, E. & Winzler, R. J. (1949). The Amount of Copper Bound by Protein in the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.*177, 13–21.

Morales-Sánchez, D. & Gallo-Ramirez, L. (2006). Plataformas de Proteómica. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Morton, J. F. (1994). PITO (ERYTHRINA BERTEROANA) AND CHIPILIN. *Economic Botany.* 48, 130-138.

Moura, A. S., Souza, A. L. G., Oleivera-Junior, A. M. & Silva, M. L. (2009). Caracterización físico-química de folha, flor e vagem da Moringa oleifera Lamarck. In encontro nacional de Moringa Aracajo SE, Brazil: UFC.

Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A. & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringaoleífera* Lam.) leaves. Africa Journal of Biotechnology. 10, 12925-12933.

Newton, R. P., Brenton, A. G., Smith, C. J. & Dudley, E. (2004). Plant Proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. Phytochemistry. 65, 1449-1485.

Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J. M. & Quail, P. H. (1996). GT-2: In vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. Plan cell 8, 1041-1059.

Obembe, O., Popoola, J., Leelavathi, S. & Reddy, S. (2010). Advances in plant molecular farming. Biotechnology Advances. 29, 210-222.

Osborne, D. R. & Voogt, P. The analysis of nutrient in foods. London, Uk: Academic Press. 251.

Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall. *Anal. Biochem.*100, 201–220.

Pierce Coomassie (2010). Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Instructions, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL. www.piercenet.com/files/2160129.pdf (accessed 28/10/2010).

Pierce Protein Handbook. (2009). Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL. www.piercenet.com/Files/1601669_PAssayFINAL_Intl.pdf

Pineda-Dorado, M. (2007). Técnicas de imagen y proteómicas aplicadas al seguimiento de la interacción virus-planta huésped. Estación Experimental del Zaidín de Granad. Universidad de Granada, España.

Puertas, F., Arévalo, E. & Zúñiga, L. (2008). Establecimiento de cultivos de cobertura y extracción total de nutrimentos en un suelo de trópico húmedo en la amazonia Peruana. *Ecología Aplicada.* 7, 1-2.

Radovich, T. (2009). Farm and Forestry production and marketing profile for Moringa. PermanentAgricultureResources.

Raja, S., Bagle, B.G. & More, T.A. (2011). Evaluation of drumstick genotypes suitable for semi-arid ecosystem of western India. *Indian Journal of Horticulture*. 68, 79-85.

Ravi, M., Geethanjali, S., Sameeyafarheen, F. & Maheswaran, M. (2003). Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa L.*) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*. 133, 243-252.

Reyes-Sánchez, N. (2004). Marango: Cultivo y utilización en la alimentación animal. Universidad Nacional Agraria (UNA), Dirección de Investigación, Extensión y Posgrado (DIEP), Nicaragua.

Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van-Dorsseleer, A., Leize-Wagner, E. & Rabilloud, T. (2004). About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics*. 4, 909–16.

Rising, M. M. & Yang, P. S. (1933). The Biuret Reaction, III. The Biuret Reaction of Amino Acid Amides. *J. Biol. Chem.* 99, 755–765.

Robinson, H. W. & Hogden, C. G. (1940). The Biuret Reaction in the Determination of Serum Proteins: I. A Study of the Conditions Necessary for the Production of a Stable Color Which Bears a Quantitative Relationship to the Protein Concentration. *J. Biol. Chem.* 135, 707–725.

Robson, R. M., Gall, D. E. & Temple, M. J. (1968). Determination of Proteins in "Tris" Buffer by the Biuret Reaction. *Anal. Biochem.* 24, 339-341.

Rodrigues, I. M., Coehlo, F.J. & Carvalho, M. G. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*. 109, 337-346.

Rosignol, M., Peltier, J. B., Mock, H. P., Matros, A., Maldonado, A. M. & Jorrín, J. V. (2006). Plant proteome analysis: *Proteomics*. 6, 5529-5548.

Saur, J. & Kaplan, L. (1969). Canavalia beans in American prehistory. *American Antiquity*. 34, 417-424.

Shaw M. M. & Riederer, M. B. (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 3, 1408-1417.

Silva-Cristobal, L. (2007). Estudio de la digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de leguminosas de mayor consumo en México. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto

Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

Sprent, J. I. (2001). Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Tharanatan, R. N. & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology.* 14, 507-518.

Van-Balگوoy, JNA. (1987). Separation of canavanine by high performance liquid chromatograph. 43, 34-37.

Van Wijk, K. J. (2004). Plastid proteomics. *Plant physiol. Biochem.* 42, 963-977.

Vihinen, M. (2001). Bioinformatics in proteomics. *Biomolecules Engineering.* 18, 241-248.

Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S. & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds *Electrophoresis.* 24, 2369–2375

Wei, Z., Wie, H., Lin, Q., Cheng, X., Tong, M., Zhu, L., Chen, R. & He, G. (2009). Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvatalugens*). A proteomic approach. *Proteomics.* 9, 2798–2808.

Weir, B.S. (2011). The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website.

Whitelegge, J. P. (2004). Mass spectrometry for high throughput quantitative proteomics in plant research: lesson from thylakoid membranes. *Plant Physiol. Bioch.* 42, 919-927.

Whitelegge, J. P. (2003). Thylakoid membrane proteomics. *Photosynth. Res.* 78, 265-277.

Williams, K. L. & Hochstrasser, D. F. (1997). Proteome research: new frontiers in functional genomics. En: *Introduction to the Proteome.* Springer, Nueva York.

Zishka, M. D. & Nishimura, J. S. (1970). Effect of Glycerol on Lowry and Biuret Methods of Protein Determination. *Anal. Biochem.*34, 291–297.

Zivy, M. & de Vienne, D. (2000). Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol. Biol.* 44, 575-580.