



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
HERBARIO MERF  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
SECCION BIOTECNOLOGIA.  
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA**



**ESTUDIO PRELIMINAR ESPECTROFOTOMÉTRICO Y  
CROMATOGRÁFICO DE LA FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVACIÓN  
DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Machaerium acuminatum* Kunth.**

**AUTORA:** María F. Laya B.

**C.I:**18375776

**TUTOR:** Meléndez Pablo

**CO-TUTOR:** Andrades Efrén

**Mérida, Febrero de 2016**



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
HERBARIO MERF  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
SECCION BIOTECNOLOGIA.  
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA**



**ESTUDIO PRELIMINAR ESPECTROFOTOMÉTRICO Y  
CROMATOGRÁFICO DE LA FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVACIÓN  
DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Machaerium acuminatum* Kunth.**

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

**AUTORA:** María F. Laya B.

**C.I:**18.375.776

**Correo:**20anllelus13@gmail.com

**TUTOR:** Meléndez Pablo

**CO-TUTOR:** Andrades Efrén

**Mérida, Febrero de 2016**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios / Elohin***

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

### ***A La Universidad de Los Andes.***

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

### ***A mis padres Freddy Laya y Mireya de Laya***

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

### ***A mis Abuelos***

*José Guerra y María Baldallo de Guerra, les amo*

### ***A mis Hermanos***

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

### ***A mis tías Sabina de Laya y Mirian Laurens***

*Por su ayuda incondicional desde los inicios de mi formación educativa hasta hoy.*

### ***A toda mi familia.***

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

### ***A mis amigos.***

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

*A todos aquellos los que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Este logro se los dedico!*

## AGRADECIMIENTOS

*Sentimientos de gratitud hacia muchas personas, que hicieron posible este logro. Producto del compromiso constante, **Quiero expresar formalmente mi agradecimiento.** Principalmente a Dios por darme las fuerzas para seguir adelante, ha guiado mis pasos y cuando estuve en los momentos más críticos de mi carrera me hizo saber que siempre hay solución ante cada problema no importa el tamaño que sea, para el nada es imposible.*

*A mis padres por darme el apoyo económico e ideológico desde el inicio de mi carrera y en cada etapa de mi vida, hoy esto es posible gracias a ustedes.*

*A mis hermanos y toda mi familia, sus palabras me llenaron de fortaleza, inspiración y valentía.*

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

*A la Dra. Nelvi Caldera por su apoyo incondicional durante mi carrera.*

*A Roció Duque y Sandra Méndez que me han brindado su orientación y parte de sus conocimientos para esta tesis.*

*A la profesora Cristina Grassi por toda la colaboración en la parte experimental de la tesis.*

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

*Gracias a todos mis amigos de la ULA y de la Iglesia Salem, que siempre estuvieron listos para brindar toda su ayuda, como olvidarlos en tan bonitas experiencias, las alegres, tristes, estresantes y demás, gracias por estar siempre ahí dándome ánimo ahora me toca regresar un poquito de todo el inmenso apoyo que me han otorgado, con todo mi cariño, está tesis es en agradecimiento a ustedes.*

## INDICE GENERAL

	PP.
<b>INDICE GENERAL</b> .....	Vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE GRAFICAS</b> .....	Xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>	
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Objetivos de la investigación.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2Objetivos específicos.....	5
1.3 Justificación de la investigación.....	6
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Antecedentes de investigaciones.....	7
2.1.1 Trabajos publicados en el exterior.....	7
2.1.2 Trabajos realizados en el Instituto de Investigación.....	9
2.2 Antecedentes Históricos.....	12
2.3 Bases teóricas.....	14
2.3.1 Fotosensibilizadores.....	14
2.3.1.1 Agentes endógenos.....	14
2.3.1.2 Agentes exógenos.....	14
2.3.1.3 Las Clorofilas.....	14
2.3.1.4 Los Carotenoides.....	15
2.3.1.5 Las Ficobiliproteínas.....	15
2.3.2 Fotosensibilización en animales de pastoreo.....	16

2.3.2.1 Fotosensibilización primaria.....	16
2.3.2.2 Fotosensibilización hepatógena.....	16
2.3.2.3 Fotosensibilidad de etiología incierta.....	17
2.3.3 La Radiación solar.....	17
2. 3.3.1 La radiación infrarroja.....	18
2. 3.3.2 Las radiaciones ultravioleta.....	18
2. 3.3.2.1 Efecto De La Radiación Ultravioleta.....	19
2. 3.3.2.2 Factores ambientales que influyen en la Intensidad De Radiación Ultravioleta.....	20
2. 3.3.2.2.1 La posición del sol.....	20
2. 3.3.2.2.2 Latitud.....	20
2. 3.3.2.2.3 Altitud.....	20
2. 3.3.2.2.4 Capa de ozono.....	20
2. 3.3.2.2.5 Reflexión del suelo.....	20
2. 3.3.2.2.6 Nubosidad.....	21
2.3.4 Terapia fotodinámica.....	21
2.3.5 Quimiopreención.....	22
2.3.6 Cromatografía.....	22
2.3.7 Espectrofotometría.....	23
2.3.8 Los extractos.....	24
2.3.8.1 Métodos de extracción.....	24
2.3.8.1.1Maceración.....	25
2.3.8.1.2Percolación.....	25
2.3.8.1.3 Digestión.....	25
2.3.8.1.4 Variables en el proceso de extracción.....	26
2.3.9 Familia Fabaceae Lindley. Características comunes.....	26
2.3.9.1 Importancia económica de la Familia.....	27
2.3.9.2El género <i>Machaerium</i> Pers.....	28
2.3.9.2.1Aspectos Químicos- Bioactivos.....	29
2.3.9.2.2 Etnobotánica-medicinal.....	30

2.3.9.3 <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth.....	33
2.3.9.3.1 Clasificación Taxonómica.....	33
2.3.9.3.2 Botánica.....	34
2.3.9.3.3 Holótipo e Isótopo.....	34
2.3.9.3.4 Habita.....	34
2.3.9.3.5 Distribución.....	35
2.3.9.3.6 Fenología y Ecología.....	35
2. 4 Hipótesis.....	37

### **CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO**

3.1 Enfoque de la investigación.....	38
3.2 Tipo y Diseño de investigación.....	38
3.3 Población y muestra.....	39
3.4 Materiales y Métodos.....	39
3.4.1 Materiales.....	39
3.4.1.1 Compuestos químicos.....	40
3.4.1.2 Equipos Utilizados.....	41
3.4.1.3 Material biológico.....	41
3.4.2 Métodos.....	42
3.4.2.1 Estrategias para la recolección de las muestras.....	42
3.4.2.2 Metodología para la obtención de los extractos etanólicos.....	45
3.4.2.3 Preparación de los extractos.....	46
3.4.2.4 Calculo de P/V y concentraciones.....	47
3.4.2.5 Espectrofotometría: Ensayo de fotosensibilidad y fotoactivación.....	47
3.4.2.6 Cromatografía en capa fina.....	48

### **CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 Material biológico utilizado.....	49
4.1.2 Peso del tubo con bagazo de las hojas.....	50
4.1.3 Peso del tubo con bagazo de las hojas lavado y secado.....	50
4.1.4 Peso seco (p.s) de los extractos de las hojas.....	50
4.1.5 Peso del tubo para trasvasar (extracto concentrado y diluido de la	

semilla).....	50
4.1.6 Peso del tubo con bagazo de la semilla.....	50
4.1.7 Peso del tubo con bagazo lavado y secado.....	50
4.2 Resultados de la fotosensibilidad y fotoactivación evaluados por espectrofotometría.....	52
4.3 Resultados de la cromatografía.....	78
<b>CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	86
<b>REFERENCIAS</b> .....	87
<b>ANEXOS</b> .....	99

www.bdigital.ula.ve



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reporte Fitoquímico.....	<b>pp.</b> 31
<b>Tabla 2.</b> Especies de <i>Machaerium</i> y clases de metabolitos encontradas....	32
<b>Tabla 3.</b> Datos de recolección de <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth en Venezuela.....	36
<b>Tabla 4.</b> Peso de las partes de la planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth.....	49
<b>Tabla 5.</b> Cantidades utilizadas para preparación de extractos etanólicos y relación P/V.....	49
<b>Tabla 6.</b> Cantidades de extractos utilizados en la cromatografía.....	78
<b>Tabla 7.</b> Referencia de las bandas cromatográfica.....	79
<b>Tabla 8.</b> Cromatografía observada en luz visible, luz UV onda corta (254 nm) y luz UV onda larga (365nm).....	80

www.bdigital.ula.ve

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pp.</b>
<i>Figura 1.</i> Espectro electromagnético.....	19
<i>Figura 2.</i> Planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth .....	33
<i>Figura 3.</i> Materiales utilizados en la parte experimental.....	40
<i>Figura 4.</i> Cubetas de cuarzo.....	40
<i>Figura 5.</i> Solventes utilizados.....	40
<i>Figura 6.</i> Espectrofotómetro GENESYS 10 BIO.....	41
<i>Figura 7.</i> Cámara cromatográfica.....	41
<i>Figura 8.</i> Planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth. entre sector Barragán y La Yuca, Barinas...	41
<i>Figura 9.</i> Vista satelital de la Vegetación - entre sector Barragán y La Yuca, Barinitas.....	42
<i>Figura 10.</i> Especímenes de la planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth.. hoja verde (madura)...	43
<i>Figura 11.</i> Especímenes de la planta <i>M. acuminatum</i> Kunth.. hoja verde –morada.....	43
<i>Figura 12.</i> Especímenes de la planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth.. hoja morada (inmadura).....	44
<i>Figura 13.</i> Fruto de la planta <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth. ....	44
<i>Figura 14.</i> Base seminal Fruto de <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth.....	44
<i>Figura 15.</i> Semilla de <i>Machaerium acuminatum</i> Kunth. ....	44
<i>Figura 16.</i> Bagazo de hoja verde.....	51
<i>Figura 17.</i> Bagazo de hoja verde – morada.....	51
<i>Figura 18.</i> Bagazo de hoja morada.....	51
<i>Figura 19.</i> Bagazo de la Semilla.....	51
<i>Figura 20.</i> Tubo con Bagazo de la hoja morada y verde-morada.....	51
<i>Figura 21.</i> Tubo Bagazo de la hoja verde.....	51
<i>Figura 22.</i> Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz visible.....	82
<i>Figura 23.</i> Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz visible.....	82
<i>Figura 24.</i> Cromatografía de los extractos etanólico de hojas y semillas a luz UV onda corta.....	83
<i>Figura 25.</i> Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz UV onda larga.....	83

## LISTA DE GRAFICAS

	<b>pp.</b>
<b>GRÁFICA 1.</b> Expectro ascendente, de los extractos etanolicos de hoja morada a (190-290 nm.).....	53
<b>GRÁFICA 2.</b> Expectro descendentes, de los extractos etanolicos de hoja morada a (190-290 nm).....	53
<b>GRÁFICA 3.</b> Extractos etanólicos de hoja morada ascendente de (290-390)...	54
<b>GRÁFICA 4.</b> Extractos etanólicos hoja morada descendentes de (290-390).....	54
<b>GRÁFICA 5.</b> Extracto etanólico de hoja verde (Ascendente de 190-290).....	55
<b>GRÁFICA 6.</b> Extracto etanólico de hoja verde descendente de (190-290).....	55
<b>GRÁFICA 7.</b> Extracto etanólico de semilla ascendente de (190-290).....	56
<b>GRÁFICA 8.</b> Extracto etanólico de semilla descendente de (190-290).....	56
<b>GRÁFICA 9.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de hoja Morada (190- 290).....	57
<b>GRÁFICA 10.</b> División de los espectros Ascendentes-Descendentes de la hoja Morada 190- 290).....	57
<b>GRÁFICA 11.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de hoja Morada (290- 390).....	58
<b>GRÁFICA 12.</b> División de los espectros Ascendentes-Descendentes de la hoja Morada 290- 390).....	59
<b>GRÁFICA 13.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde a (190 – 290 nm).....	60
<b>GRÁFICA 14.</b> División de los espectros Ascendentes / Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde a (190 – 290 nm).....	60
<b>GRÁFICA 15.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde a (290 – 390 nm).....	61
<b>GRÁFICA 16.</b> Division de los espectros Ascendentes-Descendentes de los	61

extractos etanolicos de hoja Verde a (290 – 390 nm).....	
<b>GRÁFICA 17.</b> Resta 2 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390).....	62
<b>GRÁFICA 18.</b> Resta 3 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390).....	62
<b>GRÁFICA 19.</b> Resta 4 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390).....	63
<b>GRÁFICA 20.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (190 – 290 nm).....	63
<b>GRÁFICA 21.</b> División de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (190- 290nm).....	64
<b>GRÁFICA 22.</b> Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (290 – 390 nm).....	64
<b>GRÁFICA 23.</b> División de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (290- 390nm).....	65
<b>GRÁFICA 24.</b> Espectros diferenciales Ascendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja verde a (190- 290nm).....	65
<b>GRÁFICA 25.</b> Espectros diferenciales descendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja verde a (190- 290nm).....	66
<b>GRÁFICA 26.</b> Extracto etanólico de la semilla y hoja morada Ascendente de (190-290).....	66
<b>GRÁFICA 27.</b> Espectros diferenciales Ascendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja Morada a (190- 290nm).....	67
<b>GRÁFICA 28.</b> Espectros diferenciales descendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja Morada a (190- 290nm).....	68
<b>GRÁFICA 29.</b> Resta de los espectros Ascendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm).....	68
<b>GRÁFICA 30.</b> División de los espectros Ascendentes de los extractos	69

etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm).....	
<b>GRÁFICA 31.</b> Resta de los espectros Descendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm).....	69
<b>GRÁFICA 32.</b> División de los espectros Descendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm).....	70
<b>GRÁFICA 33.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (400-700 nm).....	71
<b>GRÁFICA 34.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (400-500 nm).....	71
<b>GRÁFICA 35.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (500-600 nm).....	72
<b>GRÁFICA 36.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (600-700 nm).....	72
<b>GRÁFICA 37.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde -morada (400-700 nm).....	73
<b>GRÁFICA 38.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (400-500 nm).....	73
<b>GRÁFICA 39.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (500-600 nm).....	74
<b>GRÁFICA 40.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (600-700 nm).....	74
<b>GRÁFICA 41.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (400-500 nm).....	75
<b>GRÁFICA 42.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (500-600 nm).....	75
<b>GRÁFICA 43.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (600-700 nm).....	76
<b>GRÁFICA 44.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (400-500 nm).....	76

<b>GRÁFICA 45.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (500-600 nm).....	77
<b>GRÁFICA 46.</b> Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (600-700 nm).....	77

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
HERBARIO MERF  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
SECCION BIOTECNOLOGIA.  
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA



**ESTUDIO PRELIMINAR ESPECTROFOTOMÉTRICO Y CROMATOGRÁFICO  
DE LA FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOACTIVACIÓN DE LOS EXTRACTOS  
ETANÓLICOS DE *Machaerium acuminatum* Kunth.**

**AUTORA:** María F. Laya B.  
**TUTOR:** Meléndez Pablo  
**CO-TUTOR:** Andrades Efrén

www.bdigital.ula.ve

**RESUMEN**

En este trabajo se evaluó la fotosensibilidad y la fotoactivación de extractos etanólicos de las hojas tiernas, maduras y de semillas de *Machaerium acuminatum* Kunth. recolectadas en la vía Barinitas-Mérida, sector Barragán-La Yuca, a una altura de 545 m.s.n.m., la identificación del espécimen se realizó en Herbario MERF. Los extractos y el resto de los experimentos se realizaron en la oscuridad y manteniendo los mismos a temperatura por debajo de 5 °C, la técnica principal desarrollada con los extractos es el barrido espectrofotométrico ascendente y descendente de diluciones de los diferentes extractos en la región ultravioleta onda corta (190-290nm) y onda larga (290-390nm). Los valores obtenidos fueron procesados en una tabla de Excel por diferencia y división de cada uno, emparejando el resultado del valor obtenido en cada longitud de onda, entre el espectro ascendente y descendente. Se realizó un barrido espectrofotométrico en la región visible a cada uno de los extractos, una corrida cromatográfica en capa fina a varias concentraciones de cada uno de los extractos, como controles. En los resultados de fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría, se demostró: Existe di sincronía con el pico a 210 nm en la hoja verde ascendente con respecto a la descendente, lo que demuestra la existencia de una fotosensibilidad, expresada por una posible variación molecular. Además en el caso del extracto de la hoja verde, estudiada en el rango de 290 – 390 nm, posee un diferencial Ascendente – Descendente que se muestra como una doble sigmoidal con una “zona perfecta” desde 332 – 340 nm. Hay una serie de picos de absorción especiales, en los espectros

diferenciales de la semilla y la hoja morada, el mayor pico a 280 nm son proteínas y el valle a 260 son ácidos nucleicos. Hemos concluido que la semilla tiene un mayor contenido de proteínas que la hoja morada y el resultado es a la inversa para los ácidos nucleicos. En los espectros y la cromatografía de la semilla hay menor expresión de los tejidos fotosintéticos y más de los tejidos reproductivos, debido a que del fruto se separó el ala de la base seminal, siendo la parte más nutritiva por su contenido proteico, ácidos nucleicos y carbohidratos. Esto se aplica en los espectros visibles y ultravioleta. En los espectros de las hojas se evidencia la presencia de las clorofilas (A) a 440 con otro pico menos marcado a 664 y (B) a 466. La semilla tiene clorofila (A) y carece de clorofila (B), en su lugar contiene clorofila (C) con gran fotoactividad revelada en el pico a 634 nm. Se recomienda identificar las celdas fotovoltaicas naturales presentes en las formas inmaduras del tejido vegetal que tiene “forma de escalera”, un adecuado estudio de fotosensibilidad en la zona perfecta (332 – 340 nm) y realizar ensayos de las sustancias fotosensibles encontradas, como herramienta para la terapia fotodinámica.

**Palabras Clave:** *Machaerium acuminatum* Kunth, extractos etanólicos, fotosensibilidad, fotoactivación y terapia fotodinámica.

www.bdigital.ula.ve





UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
HERBARIO MERF  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
SECCION BIOTECNOLOGIA.  
MÉRIDA- ESTADO MÉRIDA



**PRELIMINARY SPECTROPHOTOMETRIC AND  
CHROMATOGRAPHIC PHOTOSENSITIVITY AND PHOTOACTIVATION  
OF ETHANOL EXTRACTS OF *Machaerium acuminatum* Kunth.**

**AUTORA:** María F. Laya B.  
**TUTOR:** Melendez Pablo  
**CO-TUTOR:** Andrades Efrén

**ABSTRACT**

In this paper photosensitivity and photoactivation of ethanol extracts of the tender, ripe seeds and leaves *Machaerium acuminatum* Kunth was evaluated. Barinitas collected in Merida route, Barragan-La Yuca sector at a height of 545 m.s.n.m., specimen identification was carried out in MERF Herbarium. Extracts and other experiments were performed in the dark and maintaining the same at a temperature below 5 ° C, the main technique developed with extracts is spectrophotometric scan up and down of dilutions of different extracts wave ultraviolet region short (190-290nm) and long wavelengths (290-390nm). The values obtained were processed in an Excel table difference and division of each, matching the result of the value obtained in each wavelength, between the upstream and downstream spectrum. a spectrophotometric scan in the visible region I was performed at each of the extracts, chromatographic run thin at various concentrations of each of the extracts as controls layer. In the results evaluated by spectrophotometry photosensitivity, it demonstrated: There di sync with the peak at 210 nm in the green sheet upward relative to the downward, demonstrating the existence of a photosensitivity, expressed by a possible molecular variation. Also in the case of green leaf extract , studied in the range of 290-390 nm , it has a differential Ascending - Descending shown as a double sigmoidal with a " perfect area " from 332-340 nm . There are a number of special absorption peaks in the differential spectrum and the purple seed leaf, the tallest peak at 280 nm are proteins and valley 260 are nucleic acids. We have concluded that the seed has a higher protein content than the purple leaf and the result is reversed for nucleic acids. In the spectra and chromatography of the seed is no lower expression of photosynthetic and reproductive tissues tissues, because fruit wing seminal basis

separated, the most nutritious part by its protein content, nucleic acids and carbohydrates. This applies in the visible and ultraviolet spectra. In the spectra of leaves presence of chlorophylls (A) 440 is evidenced by another peak less marked 664 and (B) to 466. The seed chlorophyll (A) and lacking chlorophyll (B) instead contains chlorophyll (C) with high photoactivity revealed in the peak at 634 nm. It is recommended to identify the natural photovoltaic cells present in the immature forms of plant tissue has "ladder-shaped", a proper study of photosensitivity in the perfect area (332-340 nm) and perform tests of photosensitive substances found, as a tool for photodynamic therapy.

**Keywords:** *Machaerium acuminatum* Kunth, ethanol extracts, photosensitivity, photoactivation and photodynamic therapy.

www.bdigital.ula.ve

## INTRODUCCIÓN

La fotosensibilidad está dada por sustancias que al absorber luz promueven reacciones fotoquímicas sobre moléculas sustrato (Pujol *et al.* 2011). Actualmente es usada como Terapia fotodinámica utilizando tintes fotosensibles, que a la luz visible y combinados en presencia de oxígeno molecular *Singlete*, producen especies citotóxicas, que causa la muerte de tumores malignos, microorganismos y virus (Rodrigues, 2007). Pujol *et al.* (2011) demostraron, que la Floxina B y la Hematoporfirina IX, son sensibilizadores fotodinámicos que tienen efecto foto insecticidas con alta toxicidad sobre moscas plagas.

A pesar que las radiaciones solares son un factor importante en la salud y el desarrollo humano, en contraste a ello exponerse a estas radiaciones de manera inadecuada y sin protección, causan el envejecimiento cutáneo, la aparición de enfermedades fotoinducidas y el cáncer de piel (Trujillo *et al.* 2015); así como la exacerbación del Lupus eritematoso cutáneo (Kim, 2013). Este efecto negativo no solo se limita a humanos, Cano Celada (2008) menciona las alteraciones de la piel causada por la ingestión de sustancias fotodinámicas de plantas, que provocan una fotosensibilización primaria o de tipo hepatógena en animales de pastoreo. Es por ello, que las radiaciones UV se convirtieron en un tema importante de la salud pública, así como las estrategias de foto-protección solar, que se usa como una actividad preventiva y terapéutica frente al cáncer de piel y el foto-envejecimiento (Didier *et al.* 2014). Es fundamental en la práctica de la salud enseñar, fomentar y mantener medidas de auto-cuidado en la comunidad, desarrollando actividades basadas en la educación sobre sustancias químicas que protejan la estructura y función de la piel humana, frente a los daños de las radiaciones UV (Didier *et al.* 2014).

Desde del siglo XIX, el ser humano ha experimentado a través de investigaciones desarrolladas, numerosos beneficios que nos proporcionan las plantas, debido al descubrimiento de sustancias activas, que pueden encontrarse en su estado natural o después de someterse a procesos de transformación química (Virtuoso *et al.*, 2005). La familia de Las leguminosas (Fabaceae) contienen 727 géneros y cerca de 19325 especies en el mundo (Lewis *et al.* 2005). Siendo una

importante fuente de diversas sustancias como, polifenoles, fibra soluble, x-galactósidos, isoflavonas que le confiere propiedades de alimento funcional (Dávila *et al.* 2003) y flavonoides utilizados como tratamientos quimiopreventivos (Jang *et al.* 2003). Sumado a esto predominan las propiedades antibacterianas que posee dicha familia (Virtuoso *et al.* 2005).

El género *Machaerium*, está subordinado a la subfamilia Papilionoideae dentro de la tribu Dalbergieae Bronn ex DC.; dicha tribu consiste de 19 géneros y aproximadamente 300 especies (Polhill, 1981). En 1944, Pittier presenta un estudio de las papilionáceas de Venezuela, incluyendo 16 géneros con 84 especies para la tribu Dalbergieae, y describe brevemente 28 especies de *Machaerium* disponiendo así, un gran potencial botánico disponible para la búsqueda de sustancias bioactivas. Las plantas del género *Machaerium* han demostrado tener un amplio espectro de sustancias fotoquímicas y acciones farmacológicas, dentro de las cuales resalta la presencia de neoflavonoides, isoflavonas y pterocarpanos (Oliveira *et al.* 1971); triterpenos, isoflavinas, fenilcumarinas y quinoides (Kurosawa *et al.* 1978a ; Ogiyama y Yasue, 1973;); isoflavonoides (Kurosawa *et al.* 1978b); N-Metilprolinas (Adrián-Romero *et al.* 2007). Además, han mostrado propiedades antiinflamatorias (Da Silva *et al.* 1994); anti-giardiales, (El-Sohly, Joshi y Nimrod, 1999); antimicrobiano, citoprotector y antioxidante. (Díaz *et al.* 2011).

Teniendo en cuenta, la importancia del potencial fotosensible en las plantas de este género, se estudió de forma preliminar, mediante la espectrofotometría y cromatografía, la fotosensibilidad y fotoactivación de los extractos etanólicos de *Machaerium acuminatum* Kunth. Estos tratados bajo condiciones de oscuridad, revelaron la presencia de moléculas sensibles en los rangos de luz UV estudiado.

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### 1.1 Planteamiento del problema

En las últimas décadas, conforme al estilo de vida de las personas y las modificaciones de la capa de ozono, la incidencia del cáncer de piel y otras entidades dermatológicas se han incrementado, entre ellas el fotoenvejecimiento, la fotosensibilidad, la fotodermatosis, destacándose la fotocarcinogénesis, por el incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno y una disminución de la capacidad antioxidante de la piel, que conduce al aumento en la incidencia de lesiones pre - malignas y malignas. (Trujillo *et al.* 2015). Estos efectos nocivos de la radiaciones UV no sólo se limita a humanos sino que también se refleja en especies vegetales agrícolas, ocasionando daños fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, afectando la productividad de dichas especies (López, 2014). De igual manera las investigaciones de Cano Celada (2008) detallan, que existen sustancias fotodinámicas como la filoteritina, proveniente de la clorofila de algunas plantas, que provocan cuadros de fotosensibilización primaria o de tipo hepatógena en animales de pastoreo, al exponerse a radiaciones solares. Cabe destacar, que existen cuadros de fotosensibilidad de etiología incierta, asociadas al consumo de muchas leguminosas, como *Medicago denticulada* Willd., *Trifolium* L. (House *et al.* 1996). *Brassica rapa* L., *Medicago sativa* L., *Erodium cicutarium* L. entre otras (Ropana, 2009). En este caso es importante identificar las sustancias involucradas para evitar estas reacciones, que afectan la producción de industria ganadera.

Por otra parte, existen investigaciones que demuestran la presencia de Isoflavonas, triterpenos, flavonoides y Cinnamylfenoles, en plantas pertenecientes al género *Machaerium*, dichos compuestos están relacionados a tratamientos quimiopreventivos (Jang *et al.* 2003) y actividad citotóxica sobre

células cancerígenas (Seo *et al.* 2001). Sin embargo, no se ha evaluado la presencia de sustancias fotosensibles en la leguminosa *Machaerium acuminatum* Kunth. hallazgo que aportaría un gran avance en las posibles fototerapias y tratamientos antineoplásicos por fotosensibilidad.

Es por ello que para el desarrollo de esta investigación se plantean las siguientes interrogantes:

¿Presentan fotosensibilidad contra luz UV y luz blanca los extractos etanólicos de semillas y hojas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth preparados en la oscuridad?

¿Presentan fotoactivación los extractos etanólicos de semillas y hojas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth. preparados en la oscuridad?

www.bdigital.ula.ve

## **1.2 Objetivos de la investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

- Determinar la fotosensibilidad y fotoactivación de los extractos etanólicos de hojas y semillas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth. preparados en la oscuridad.

### **1.2.2Objetivos específicos**

- Preparar extractos etanólicos de semillas y hojas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth. En la oscuridad.
- Evaluar el nivel de fotosensibilidad en luz UV y luz blanca de los extractos etanólicos de la planta *M. acuminatum* Kunth
- Evaluar el nivel de fotoactivación de los extractos etanólicos de la planta *M. acuminatum* Kunth.

### 1.3 Justificación de la investigación

En el presente, las modificaciones desfavorables de la capa de ozono se han incrementado y como consecuencia se sufre el aumento considerable de la penetración de los rayos ultravioletas a la tierra, los cuales producen un observable efecto nocivo en la piel, entre estas Lesiones inducidas que producen tenemos, la foto-sensibilidad, foto-dermatosis, inmunodepresión, el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis, sumado a esto en un contraste positivo, dichas radiaciones son herramientas útiles para la fototerapia, razones que demandan llevar a cabo investigaciones que prevean posibles soluciones y nuevas alternativas de una forma conveniente y práctica.

Por tal motivo en el presente estudio se proyecta el uso de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth para determinar si esta posee fotosensibilidad y fotoactivación ante la luz UV y luz blanca.

Como se ha descrito anteriormente, el género *Machaerium* presenta grandes propiedades y contienen sustancias fitoquímicas y bioactivas en diversas especies, algunas de las cuales son usadas para tratar diferentes enfermedades. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica que nos indique presencia de moléculas fotosensibles y fotoactivadoras de *Machaerium acuminatum* Kunth. Por esta razón en este trabajo se utilizaron los extractos etanólicos en la oscuridad, deduciendo un largo periodo de tiempo para su almacenamiento y conservación.



## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de investigaciones

Las investigaciones que se plantean a continuación guardan correlación con el proyecto planteado, ya que buscan a través de productos naturales determinar sustancias fotosensibles y fotoactivas, mostrando sus efectos y utilidad; entre dichas investigaciones realizadas tenemos:

##### 2.1.1 Trabajos publicados en el exterior

“Evaluación el efecto antibacteriano por el método de difusión en agar y dilución en caldo; el efecto citoprotector y antioxidante sobre células de fibroblastos dérmicos 3T3, tratadas con peróxido de hidrogeno” (Díaz *et al.* 2011). En este estudio se determinó la capacidad secuestrante de radicales libres por el método del 2,2-difenil-2-picrihidracil (DPPH) y el poder reductor de los extractos etanólicos de las hojas de *Machaerium floribundum* Benth. Presentando buena actividad antibacteriana contra las bacterias que inducen el acné.

“Tratamiento de Carcinoma Basocelular con terapia fotodinámica sistémica” (Castro, *et al.* 2012). Esta investigación tuvo como objetivo Evaluar en pacientes venezolanos, la respuesta terapéutica del Carcinoma Basocelular al ser tratados con terapia fotodinámica usando un compuesto fotosensibilizador derivado de las clorinas, a quienes se les inyectó por vía intravenosa el fotosensibilizador Photolon. Después de un tiempo de tres horas, se iluminó la zona o zonas tumorales con un diodo láser de longitud de onda de 662nm. Se trataron 43 lesiones en 16 pacientes con una respuesta favorable en todos los casos tratados, con desaparición de cualquier evidencia clínica del o los tumores, lo cual se comprobó histopatológicamente. Los pacientes no presentaron

complicaciones atribuibles al tratamiento y permanecieron en control sin evidencia de enfermedad oncológica por 24 meses.

Extractos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Machaerium hirtum* Vell. Stelle: Los extractos estandarizados para el tratamiento de enfermedades crónicas: *Machaerium hirtum* Vell. Stelle. (Tangerina, 2012). Esta investigación se llevó a cabo utilizando la planta *M. hirtum* Vell., que popularmente es usada para el tratamiento de la diarrea, tos y cáncer, se realizó un estudio químico para identificar las sustancias presentes. La primera etapa consistió en el aislamiento de sustancias a partir de un extracto etanólico al 70% de las hojas de *M. hirtum* mediante cromatografía de permeación en gel, seguida por purificación de sustancias por HPLC-RI. La identificación de las sustancias se llevó a cabo por Resonancia Magnética Nuclear y por espectrometría de masas. El perfil químico del extracto fue establecido por HPLC-PDA y la cuantificación de sustancias se basó en su aglicona, el método de calibración externa, obteniendo como resultado la identificación de flavonas saponarina ( $8,69 \pm 0,46$  mg / g de extracto), isovitexin ( $6,44 \pm 0,45$  mg / g de extracto), isoorientina, por debajo del límite de cuantificación (LDC) y swertisina estuvo presente en el perfil cromatográfico en co-elución con otra sustancia. Estos resultados son fundamentales para normalización del extracto etanólico al 70% obtenido de las hojas de *Machaerium hirtum* Vell.

“Toxicología de la fotosensibilización en ganaderías de leche” (Ochoa Ochoa, 2012). Este estudio explica de forma detallada, la fotosensibilización en ganaderías de leche que se da cuando una sustancia fotodinámica penetra en la piel y es afectada por la luz ultravioleta suficiente, para activar el agente fotodinámico que desprende energía, provocando la lesión de la piel, la cual se da en las zonas despigmentadas. Ochoa Ochoa, Describe los procesos toxicológicos de fotosensibilización que se da en los bovinos de leche y los daños que ocasionan en la población ganadera, implicando la fotosensibilización primaria, secundaria o hepatógena donde la filoteritina es el agente fotodinámico; la terciaria debida al porfirismo congénito

bovino dada por la porfirina y por último la de etiología incierta, que la relaciona con plantas que existen en los pastizales de ganaderías lecheras. También aporta información de terapias farmacológicas como antimicrobianos y antiinflamatorios, protectores hepáticos, entre otros; y a su vez las medidas de control a emplear.

“Envenenamiento por *Enterolobium contortisiliquum* Vell. en el ganado en el noreste de Brasil”. (Olinda *et al.* 2015). En esta investigación se informa un brote de fotosensibilización en el ganado, causada por vainas de *Enterolobium contortisiliquum* Vell. Leguminosa encontrada en el noreste de Brasil. Entre los signos clínicos incluyen disminución del apetito, postración, pérdida de peso, edema subcutáneo, dermatitis e ictericia. Los animales presentan anemia leve, actividades séricas elevadas de AST, LDH y GGT, con aumento de las concentraciones de urea en suero, las concentraciones séricas de creatinina, proteínas totales y albúmina estaban dentro de los rangos normales. En la necropsia, el hígado estaba aumentado de tamaño y de forma difusa naranja. La superficie subcapsular de los riñones Mostró estrías blanquecinas irregulares intercalados con zonas oscuras. Histológicamente, la piel mostró dermatitis, y el hígado tenía vacuolización centrolobular y necrosis de los hepatocitos así como Nefrosis tubular tóxica. También se observó que el envenenamiento por *E. contortisiliquum* Vell. se diferencia de la fotosensibilización causada por otras plantas, incluyendo *Brachiaria* spp, *Panicum dichotomiflorum* Michx y *humboldtiana froelichia* Roem. & Schult.

### **2.1.2 Trabajos realizados en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en la sección de Biotecnología.**

“El Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa madura y verde de los frutos de *Couroupita guianensis* Aubl”. (Soto y López, 2012) En este trabajo se evaluó el efecto de la luz sobre los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa del fruto maduro y verde de *Couroupita guianensis*

Aubl. La metodología empleada incluye la recolección in situ, traslado, procesamiento en la oscuridad, extracciones acuosas y etanólicos, revelando la existencia de una fotosensibilidad del extracto de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl., por medio de la espectrofotometría, así como un efecto de fotoprotección U.V. en un ensayo usando bacterias sensibles a la luz. (ob. Cit.)

“Moléculas potencialmente fotosensibles, fotoactivables en el zumo de la pulpa madura, verde y hojas del noni, *Morinda citrifolia* L.” Méndez y Rosales (2013). Este trabajo se enfoca a la identificación de compuestos derivados del fruto verde, maduro y hojas de *Morinda citrifolia* (noni), comprobando si posee propiedades fotosensibles y fotoactivables que puedan utilizarse como terapias fotodinámicas, relacionadas a la cura del cáncer de piel y diferentes enfermedades cutáneas, así como la elaboración de cosméticos medicinales. (ob. Cit.)

“Evaluación preliminar de la fotoactivación y fototoxicidad del acíbar de plantas de Sábila (*Aloe* spp.)” Flores (2014). Se hizo consideración de que el Acíbar extraído en condiciones de oscuridad corresponde a la forma natural de éste en la planta. En la investigación del Acíbar de *Aloe arborescens* (3B) se evidencia Aloe Emodin (221nm) y Aloenin (307) como compuestos que son sensibles a la luz de alta longitud de onda. *Aloe maculata* presenta un pico de Aloenin (245-251) que aparece con la luz. Asimismo se encuentra un pico de 307 nm que aparece con la luz blanca (4A) y el pico de 297nm de Aloesin que aparece con la luz UV de baja longitud de onda. También se observa que el pico de alrededor de 221nm de Aloe Emodin aparece con la luz blanca. (ob. Cit.)

“Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de extractos etanólicos de la hoja y epitelio de *Annona muricata* L.” Aldana y Páez (2014), En este trabajo se prepararon extractos etanólicos a partir de hojas frescas, epitelio y frutos verdes de la planta *Annona muricata*. Los extractos se exploraron por espectrofotometría, cromatografía de capa fina, microbiología, comprobando fotoprotección /

fotoactivación. En los extractos del epitelio se observó toxicidad mientras que la hoja no. Asimismo se observó el crecimiento de microorganismos en la hoja, evidenciando fotoprotección. En la cromatografía se muestra la clorofila presente tanto en hojas como en epitelio con un RF de 0,97. La espectrofotometría evidencia la presencia de ácidos nucleicos y proteínas en longitud de onda 260 y 280 respectivamente. Se determinaron dos bandas de fotosensibilidad: una en el extracto de los epitelios del fruto a 210nm y otra en el extracto de las hojas a 675nm. (ob. Cit.)

“Estudio de Fotosensibilidad, fotoprotección y Actividad Biológica de los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad.” López Ramos (2014). En este estudio se evidencia la presencia de una molécula fotosensible que absorbe a 190 nm y otra a 201nm. La absorción directa en la región UV tanto ascendente como descendente pone en evidencia varios picos y valles entre 220-280 nm que además presentan en los efectos diferenciales un corrimiento hipsocrómico que puede estar reflejado en el resultado del bandeado cromatográfico, revelado por onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm).

“Fotosensibilidad y Fotoactividad del Grupo Hemo y de las Porfirinas de *Lupinus s.l meridanus* Moritz.” Duque-Duque, R.C. (2015). Los resultados de la cromatografía muestran una banda de Rf 0,18 (220nm), en el caso del nódulo se observa otra banda de Rf 0,60-0,65 (342nm de absorción), asociadas a fotoprotección. La espectrofotometría del extracto del pimpollo muestra una escalera en la resta y la división de 290 a 334nm, indicando que posiblemente estemos en presencia de un sistema de varias moléculas fotosensibles. Igualmente en el nódulo se observó una “Absorción bimodal” en la resta del espectro ascendente y descendente de 290-390nm. La electroforesis, revela presencia del dímero de la leghemoglobina, las dos subunidades principales de la nitrogenasa en el nódulo y una banda de proteína en la flor blanca, que posiblemente se trate de la Hemo Oxigenasa, en onda corta (190-290nm).

## 2.2 Antecedentes Históricos

En 1996, Hoult y Paya registran propiedades farmacológicas y bioquímicas de gran interés de la cumarina (1,2-benzopyron), su nombre viene de “Coumarou” nombre común de la habla indígena tonca, dicha sustancia fue extraída por primera vez en 1820 a partir de las semillas de *Dipteryx odorata* Willd. un árbol de la familia Fabaceae, tribu Dipteryxaceae originaria de los trópicos de América del Sur, conocido como (Coumarouna odorata). Se han aislado unas 1000 cumarinas naturales en unas 150 especies distribuidas en aproximadamente 30 familias, principalmente en Umbeliferae/Apiaceae, Rutaceae, Leguminosae/Fabaceae, Papilionaceae, Rubiaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Gramineae etc. (Lock de Ugaz, 1988; Murray *et al.* 1982). Las propiedades farmacológicas y bioquímicas y aplicaciones terapéuticas de cumarinas simples, dependen del patrón de sustitución; Compuestos más complejos basados en el núcleo cumarina incluyendo los anticoagulantes dicumarol / warfarina, aflatoxinas y los psoralenos (agentes fotosensibilizantes) (Hoult y Paya, 1996).

En el estudio de los Aspectos ecotoxicológicos de las maderas tropicales Martí, (1998) da una breve reseña de determinadas sustancias activas que contienen ciertos arboles pertenecientes a las leguminosas, las cuales afectan de manera importante a los trabajadores, dado que al manipular esta madera entran en contacto con finas partículas en forma de polvo que se ponen en contacto con la piel y las mucosas de los operarios, estas son inhaladas solubilizándose así sus principios activos. De las cesalpináceas el mayor representante es la *Cassia siamesa* Lam. (djohar) contiene un principio activo identificado como crisofanhidroantona responsable de dermatosis, trastornos oculares como conjuntivitis y queratitis, al ser administrada en los animales de experimentación produce vómitos, diarrea y albuminuria; *Apuleia leiocarpa* Vogel. es una madera de Brasil que contiene cytina C<sub>11</sub> H<sub>14</sub> N<sub>2</sub> O éter, aceites colorantes y saponina. (ob. cit.)

Las leguminosas papilionáceas del que forman parte las siguientes especies susceptibles de originar patología: *Dalbergia* L.f *Macherium* Pers. Y *Pterocarpus*

Jacq. *Dalbergia retusa* Hensl. es una madera de América Central tropical, especialmente empleada en la fabricación de instrumentos de viento, como flautas y clarinetes, no sólo producen dermatosis alérgicas producidas por el polvo, sino que también muchos músicos, especialmente flautistas, presentan manifestaciones de sensibilización muy intensa en los labios. Igualmente *Dalbergia nigra* Vell. y *Dalbergia melanoxydon* Guil. producen dermatosis alérgica. Todo este grupo de maderas tóxicas contiene diversos principios activos, especialmente flavonas, asociadas al tanino, denominadas dalbergionas, que son las responsables de toda su patología. (Martí, 1998).

*Machaerium violaceum* Vogel. esta madera origina intensas irritaciones cutáneas y algunas veces úlceras. *Brya ebenus* L. (Granadillo americano), es importada de Cuba, y muy apreciada para la fabricación de instrumentos de viento, puede producir sensibilización en los músicos que los tocan. *Pterocarpus angolensis* DC. (Muninga) Se han descrito casos de asma bronquial alérgica por inhalación de polvo de esta madera. (Martí, 1998).

## 2.3 Bases teóricas

### 2.3.1 Fotosensibilizadores.

Son sustancias que al absorber luz UV o visible forman reacciones fotoquímicas sobre otras moléculas sustrato, produciendo una respuesta exagerada a la luz solar; de acuerdo al tipo y nivel de acumulación, estas pueden ocasionar daño celular. Entre estas se encuentran diversos colorantes como el azul de metileno, el rosa bengala, porfirinas y ftalocianinas. (Pujol *et al.* 2011)

Según Ferrándiz (2009) estas pueden ser:

**2.3.1.1 Agentes endógenos:** moléculas del organismo, habituales en la piel, o bien que se acumulen en ella como consecuencia de una alteración metabólica, como ocurre en el caso de las porfirinas, trastornos que cursan con un cúmulo de porfirinas, agentes endógenos fototóxicos. (ob. Cit.)

**2.3.1.2 Agentes exógenos:** medicamentos y otros productos químicos los cuales pueden acceder a la piel por vía tópica o sistémica. (Ferrándiz, 2009)

Plastino y Mansilla (2004). Detallan los siguientes pigmentos que corresponden a sustancias fotosensibles.

#### 2.3.1.3 Las Clorofilas

Son compuestos tetrapirrólicos cíclicos con un átomo de magnesio en el centro del sistema de anillos. La clorofila *a* es considerada el pigmento esencial en el proceso de fotosíntesis. Exhibe picos de absorción en el azul (440 nm) y en el rojo (675 nm). Además de la clorofila *a*, en grupos taxonómicos específicos se presentan las clorofilas *b*, esta difiere de la clorofila *a* por una pequeña variación química en su



estructura básica, la que le confiere un espectro de absorción ligeramente distinto, con picos de absorción de 470 y 650 nm. (Plastino y Mansilla, 2004)

La clorofila *e* posee picos de absorción de aproximadamente 447, 590 y 634 nm y difiere en la estructura química de las anteriores especialmente por no presentar el grupo fitol. La clorofila *d* es descrita para algunas Rhodophyta, sin embargo, no parece tener función en la fotosíntesis. (ob. Cit.)

#### **2.3.1.4 Los Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos químicamente muy distintos de las clorofilas, compuestos por cadenas de 40 átomos de carbono construidas a partir de subunidades de isoprenos. Son divididos en dos grupos, los carotenos (hidrocarbonetos puros) y las xantofilas o carotenoides (hidrocarbonetos oxigenados) absorben longitudes de onda corta del espectro visible, en la región entre 400 y 560 nm, presentando coloración amarilla, naranja o roja. Además de actuar en la absorción de luz para la fotosíntesis, los carotenoides desempeñan un importante papel como protectores de moléculas de clorofila contra la foto-oxidación en presencia de luz excesiva. (Plastino y Mansilla, 2004)

#### **2.3.1.5 Las Ficobiliproteínas.**

Son proteínas que presentan cromóforos en su estructura, pueden ser de coloración roja (ficoeritrinas y ficoeritrocianinas) o azul (ficocianinas y aloficocianinas) y presentan picos de absorción en la franja de 490-670nm. Los cromóforos son compuestos tetrapirrólicos acíclicos denominados ficobilinas, encontrándose tres tipos principales: ficocianobilina, ficoeritrobilina y ficourobilina. (Plastino y Mansilla, 2004)

### **2.3.2 Fotosensibilización en animales de pastoreo.**

Estudios realizados por Ropana, (2009) describen la fotosensibilización que se produce en los animales de pastoreo, esta puede ser de tipo primaria, hepatógena y de etiología incierta.

#### **2.3.2.1 Fotosensibilización primaria.**

Ésta se produce por ingestión de agentes fotosensibilizantes provenientes de vegetales que se encuentran en fase verde activa de rápido crecimiento, los animales se afectan después de 3 a 5 días de estar pastoreando e ingerir las plantas con estas sustancias que pueden estar preformadas, las cuales llegan a la piel despigmentada ó poco pigmentada del dorso, de mucosas y de la córnea en concentraciones suficientes que al exponerse a la luz solar provocan la dermatitis, en muchos casos se requiere de ingerir grandes cantidades de vegetales fotodinámicos. Dejan de aparecer nuevos casos después de retirar a los animales de las plantas responsables. Ropana, (2009)

Los agentes fotodinámicos no identificados están presentes en algunas plantas como *Medicago denticulada* Willd. y los áfides que le infestan, así como en especies de *Trifolium* L. pertenecientes a la gran familia Fabaceae que pueden provocar fotosensibilización. (House *et al.* 1996).

#### **2.3.2.2 Fotosensibilización hepatógena.**

El agente fotosensibilizante que lo causa es la filioeritrina que proviene de la clorofila de algunas plantas, la cual, al ser ingerida en grandes cantidades se degrada anaeróbicamente por la microflora del sector gástrico anterior formando las filioeritrinas, que son excretadas en la bilis (Cano Celada, 2008). La falta de excreción de filioeritrinas puede ocurrir cuando la secreción biliar está obstruida por hepatitis o debido a obstrucción de conductos biliares por cálculos, lo que provoca el

aumento de filoeitricinas en circulación, las mismas se acumulan en la piel despigmentada absorbiendo la luz solar y liberan energía lumínica, iniciando así una reacción fototóxica, puede presentarse hepatomegalia con daño hepático e ictericia. (Ropana, 2009)

La alimentación de animales con piensos o henos almacenados puede afectarlos ya que pudiera existir suficiente clorofila o productos de su degradación para producir niveles tisulares tóxicos de filoeitricinas.

Algunas plantas y sustancias que causan fotosensibilización hepatógena son: plantas que contienen hepatotoxinas como en el hongo *Phitomyces chartarum*, así como las hierbas de *Lantana cámara* L. *Holocalyx glaziovii* Taub. *Myoporium laetum* G. Forst. *Crotalia retusa* L. *Senecio jacobaea* L. y *Sphenosciadium* A.Gray. (Cano Celada, 2008)

### **2.3.2.3 Fotosensibilidad de etiología incierta.**

Suelen ocurrir cuadros de fotosensibilidad cuya etiología es un conjetural, dado que en la alimentación con ciertas plantas, no es posible asegurar si la fotosensibilización es primaria o hepatógena. Entre ellas se citan *Brassica rapa* L.(corza), *Medicago sativa* L. (alfalfa), *Medicago denticulada* Willd. *Medicago minima* L. *Trifolium hybridum* L. (trébol sueco), *Erodium cicutarium* L. y *E. Moschatum* L. (lengua de cordero). La alfalfa contaminada con mohos o la alfalfa fermentada provocan brotes masivos sin signos de fotosensibilización hepatógena (Ropana, 2009).

### **2.3.3 La Radiación solar**

El Sol es el astro eje y productor de energía de nuestro planeta, La radiación lumínica no es emitida de manera continua, sino en forma de unidades, quantas o fotones, que contienen diferentes cantidades de energía. Estas comprenden una gama de radiaciones que incluyen rayos infrarrojos, luz visible, rayos ultravioleta,

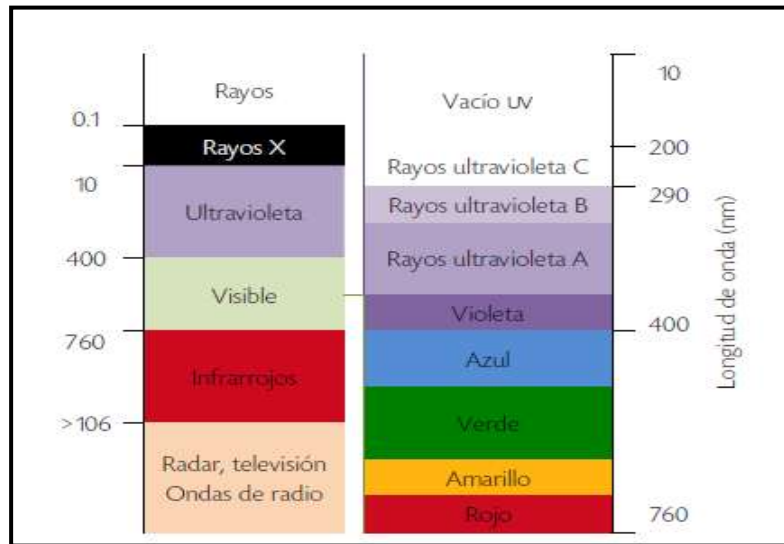
electricidad, ondas de radio, rayos gamma y rayos cósmicos. La radiación se describe cualitativamente en longitudes de onda y cuantitativamente por su frecuencia. En la fotobiología las longitudes de onda se expresan en unidades llamadas nanómetros (nm). (Alonso Octavio, 2000). Según Arellano Mendoza *et al.* (2014) “Existe una relación directamente proporcional entre la longitud de onda y los niveles de energía, a mayor longitud de onda menor el nivel de energía.”

### **2. 3.3.1 La radiación infrarroja:**

Tiene mayor longitud de onda de (760 – 1060 nm) y menor energía, esta presenta menor energía y representa el 40% de la energía radiante que alcanza la superficie terrestre, contribuye a la temperatura que mantiene la vida en el planeta, actualmente se ha demostrado que interviene en el proceso de fotoenvejecimiento. (Mendoza *et al.* 2014)

### **2. 3.3.2 Las radiaciones ultravioleta:**

Son una pequeña parte del espectro solar, causa la mayor parte de los efectos biológicos positivos y negativos de la luz solar en la piel humana. La longitud de onda de los RUV es menor que la luz visible que va desde (400 – 700 nm), pero mayor que la de los rayos X. El sol emite Rayos UV en un rango de longitud de onda de 100-400nm, que se clasifica en UVC (270-290 nm), UVB (290-315 nm), UVA (315-400nm). Esta última se divide en UVA I o cortos (320-340 nm) y UVA II o largos (340-400nm). (Trujillo *et al.* 2015).



**Figura 1. Espectro electromagnético.** Tomado de “Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México”. Por Mendoza *et al.* (2014) *Dermatología CMQ*, 12(4), 246.

### 2. 3.3.2.1 Efecto De La Radiación Ultravioleta

La respuesta inicial y crónica de la piel a la luz ultravioleta causa efectos agudos y crónicos, entre los efectos agudos de las radiaciones solares se tiene: eritema, hiperpigmentación inmediata y persistente, Bronceado tardío, hiperplasia epidérmica, formación de radicales libres y síntesis de vitamina C. (Mendoza *et al.* 2014)

Vallejo *et al.* (2013). Mencionan entre los efectos Crónicos el fotoenvejecimiento causado por los UVA, la inmunosupresión que se origina por estas radiaciones, al suprimir la inmunidad inmediata por células, produciendo linfocitos T supresores y alterando el perfil de citocinas cutáneas. Así como fotocarcinogenesis, donde las RUV inducen mutaciones del ADN y neoplasias malignas, entre ellas se mencionan el melanoma, carcinoma basocelular y epidermoide. Por último se menciona la fotodermatosis causada tanto por RUV como por la luz visible (ob.Cit.)

## **2. 3.3.2.2 Factores ambientales que influyen en la Intensidad De Radiación Ultravioleta.**

Entre los principales factores Mendoza *et al.* (2014) mencionan y describen los siguientes:

### **2. 3.3.2.2.1 La posición del sol.**

“Se dice que cuanto más alta sea la posición de nuestra estrella, mayor será la RUV, por otra parte la incidencia de la radiación solar varía con las estaciones del año, así que la intensidad de los rayos ultravioletas dependen no solo de la hora del día, sino del mes del año”. (Mendoza, *et al.* 2014, p.244).

### **2. 3.3.2.2.2 Latitud**

“A mayor proximidad con el ecuador terrestre, mayor radiación”. (Mendoza, *et al.* 2014, p.244)

### **2. 3.3.2.2.3 Altitud**

“Al aumentar la altitud la atmosfera se vuelve más ligera y absorbe menos RUV. La radiación ultravioleta aumenta entre 10 a 12% por cada mil metros de altitud”. (Mendoza, *et a.* 2014, p.244)

### **2. 3.3.2.2.4 Capa de ozono**

“Esta absorbe parte de la radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre. La concentración de ozono varía a lo largo del año e incluso en el mismo día” (Mendoza *et al.* 2014, p.244)

### **2. 3.3.2.2.5 Reflexión del suelo**

“Las diferentes superficies reflejan y dispersan las radiaciones ultravioletas de distintas maneras. La nieve reciente puede reflejar hasta el 80%, mientras que la arena

seca de una playa refleja hasta un 15% y la espuma del agua de mar, alrededor del 25%” (Mendoza *et al.* 2014, p.244)

#### **2. 3.3.2.2.6 Nubosidad**

“Aunque la radiación solar es máxima cuando el cielo está despejado, puede incrementar en los días nublados debido a la reflexión de las partículas finas del agua” (Mendoza *et al.* 2014, p.244)

#### **2.3.4 Terapia fotodinámica**

Es una terapia que se basa en la administración tópica o sistémica de agentes fotosensibilizadores, los cuales son activados por la aplicación de luz a una determinada longitud de onda, preferiblemente aquellos que tienen la capacidad de absorber luz a una longitud de onda mayor de 600 nm (Orellana, *et al.* (2005), dichos agentes interactúan con oxígeno molecular dando lugar a la formación de radicales de oxígeno tóxicos que conducen a la muerte celular. (Espinoza y Ubaldo, 2011)

Actualmente es una terapia emergente en el tratamiento del cáncer, esta ha sido aprobada para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas, vejiga y esófago, (Espinoza y Ubaldo, 2011). También se utiliza en la inactivación de microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras y virus (incluyendo el VIH), también pueden ser inactivados por luz visible después del tratamiento con un fotosensibilizador apropiado, es un tratamiento de bajo costo alternativo para infecciones localizadas y lesiones cutáneas fúngicas (ob.cit.). Además, puede ser útil para la esterilización de la sangre y sus subproductos para uso clínico, en el tratamiento de agua potable, así como en la desintoxicación antimicrobiana de los alimentos. (Perussi Rodrigues, 2007)

### **2.3.5 Quimioprevención.**

Se conoce como quimioprevención a la utilización de sustancias o moléculas químicas para prevenir la aparición de una enfermedad. En el caso del cáncer nos conduce a la utilización de sustancias o moléculas químicas para impedir la carcinogénesis. Entre estas sustancias mencionaremos medicamentos, vitaminas u otros fármacos capaces de disminuir los riesgos de cáncer, retardarlo o impedir que retorne interfiriendo con factores que participan en su inicio, promoción o progresión. Las características básicas que proporcionan fundamento teórico para la elección de sustancias químicas para su estudio, son sus actividades antioxidantes, antimutagénica y antiproliferativa. (Jang *et al.* 2003).

Entre las sustancias estudiadas como quimiopreventivos resaltan:

Alfa tocoferol, Antiinflamatorios no esteroideos. Inhibidores de la enzima COX – 2 ( $\alpha$  lecoxib – cáncer colorrectal), Betacaroteno, Calcio, Retinoides, Selenio, Vitamina E. (Jang *et al.* 2003).

### **2.3.6 Cromatografía**

La cromatografía es una antigua técnica instrumental que ha evolucionado enormemente en los últimos años, con lo que, inicialmente concebida como método de separación, ha llegado a convertirse en una fuente inagotable de métodos de análisis. Pocos métodos de análisis químico son tan específicos para un analito en particular, ya que tanto las fases previas de extracción como los procedimientos cromatográfico son llevados a cabo en función del tipo de molécula, puede ser utilizada como técnica preparativa y analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. (Pérez Hernández, 2005).

Esta técnica contempla la separación de mezclas moleculares, que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles. Una de las



fases es un lecho fijo de gran área superficial, mientras que la otra es un líquido el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. Los componentes de la mezcla deben tener dimensiones moleculares, lo que requiere que estén en soluciones o en el estado de vapor, la afinidad relativa de los solutos por cada fase debe ser reversible para asegurarse que ocurra transferencia de masa durante la separación cromatográfica. La fase fija se denomina fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada, sobre un material de soporte inerte. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil o estacionaria. (Alfonso, 2003).

Si la fase estacionaria es un sólido se denomina: cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido se denomina cromatografía de partición. Si la fase móvil es un líquido el proceso se denomina cromatografía líquido-sólido, cuando la fase móvil es un gas el proceso se denomina cromatografía gas-sólido. Si la fase fija es un líquido y la fase móvil también, se denomina cromatografía líquido- líquido, si es un gas: cromatografía gas-líquido. (Alfonso, 2003).

### **2.3.7 Espectrofotometría**

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, este es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa

por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. (Díaz *et al.* 2005).

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. (Díaz *et al.* 2005).

### **2.3.8 Los extractos**

Para lograr una concentración adecuada de los principios activos contenidos en las plantas y que su acción sea más efectiva es necesario realizar diversos procedimientos mediante los cuales sean extraídos aquellos con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias beneficiosas. (HM Stationery Office, 1980). Los extractos Pueden ser de consistencia líquida (extractos fluidos y tinturas) o semisólida (extractos blandos o densos), o sólida (extractos secos). (ob. Cit.)

#### **2.3.8.1 Métodos de extracción.**

Los métodos de extracción permiten obtener los productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende. (HM Stationery Office, 1980). Los principales métodos de extracción son: Maceración, Percolación, Digestión.

#### **2.3.8.1.1 Maceración.**

Para lograr el proceso de maceración se coloca el material vegetal en forma de trozos, según sea la conveniencia, luego se tritura con un mortero o con piedra y luego se mezcla con el alcohol, también se puede colocar un recipiente lleno del menstruo y se deja reposar por tres o más días, con agitación frecuente hasta completar la extracción del material vegetal. (Sharapin, 2000)

Al final de este período se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente. El líquido así obtenido se clarifica por decantación o filtración. Este proceso se realiza a temperatura ambiente y los líquidos que con más frecuencia se utilizan son el agua y el alcohol o combinación de ambos, aunque también pueden emplearse vinos tintos o blancos. El tiempo total de maceración está en dependencia del tipo de planta, parte de la misma o del principio activo a extraer, la proporción más usada es de 1:20 vegetal/líquido. (Sharapin, 2000).

#### **2.3.8.1.2 Percolación.**

Es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas y extractos fluidos. Consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. Se utiliza un percolador, recipiente cónico con una abertura superior en la cual se puede colocar una tapa circular horadada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Por la parte inferior posee un cierre regulable para permitir el paso del líquido a una velocidad conveniente. (HM Stationery Office, 1980)

#### **2.3.8.1.3 Digestión.**

Es una forma de maceración con ligero calentamiento durante el proceso de extracción, siempre que esta temperatura no altere los principios activos del material vegetal y así se logra una mayor eficiencia en la utilización del menstruo. Las temperaturas más utilizadas es entre 35° y 40° C., aunque puede elevarse a no más de

50° C. Se utiliza este proceso con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles (HM Stationery Office, 1980)

Para ello se introducen las partes a extraer en un recipiente con el líquido previamente calentado a las temperaturas indicadas; se mantiene durante un periodo que puede oscilar entre media hora y 24 horas, agitando el envase regularmente. (HM Stationery Office, 1980)

#### **2.3.8.1.4 Variables en el proceso de extracción.**

Las variables que intervienen en el proceso de extracción independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final, son: El estado de división de la sustancia, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción. (Sharapin, 2000)

#### **2.3.9 Familia Fabaceae Lindley. Características comunes**

El Fabaceae también llamado frijol y leguminosas o familia de los guisantes, es la tercera más grande de la familia de angiospermas después de *Orchidaceae* Juss. (Orquídeas) y *Asteraceae* Bercht. y J.Presl (margaritas, girasoles) (Wojciechowski, *et al.* 2006)

Esta familia reúne árboles, arbustos y hierbas perennes, fácilmente reconocibles por su fruto, principal característica unificadora de la familia conocido como una legumbre que se define como un lugar seco (Polhill, 1994). Son una de las más variables y de gran distribución en el mundo (Lewis *et al.* 2005). Se ha apreciado que alrededor del 16% de todas las especies arbóreas en los bosques lluviosos neotropicales de america, son miembros de esta familia. (Meléndez, 2009a; ver también Burnham, y Johnson, 2004) Constituye uno de los grupos naturales más dominantes de plantas en Venezuela (Ubierno *et al.* 2007). Son particularmente diversas en los bosques tropicales y matorrales templados con un clima estacionalmente seco o árido, esta preferencia por semi-árido a hábitats áridos se

relaciona con un metabolismo del nitrógeno exigente, muchas especies tienen la capacidad de colonizar las tierras áridas y marginales debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico a través de una asociación simbiótica con los rizobios (bacterias del suelo). (McKey, 1994; Sprent, 2001)

### **2.3.9.1 Importancia económica de la familia.**

En términos de importancia agrícola y económica, las legumbres incluyen un gran número de especies domesticadas como cultivos cosechados para el consumo humano y animal, así como los aceites, fibras, combustible, fertilizantes, madera, plantas medicinales, productos químicos, y las variedades hortícolas (Lewis *et al.* 2005)

Se ha demostrado la importancia agrícola durante miles de años, en Irán data de 9.500 a 8.000 años atrás, su uso como fuente de alimento durante la prehistoria del Norte y América del Sur, entre ellos se destacan los frijoles, con más de 3.000 años de uso por el Imperio Romano, como fuente de alimento y para mejorar la calidad del suelo (Graham y Vance, 2003). Hoy son una fuente de alimento cada vez más valiosa, representa el 27% de la producción mundial de cultivos primarios y también para los animales de granja (ob. Cit.)

Leguminosas como la soja (*Glycine max* L.) y maní (*Arachis hypogaeae* L.) proporcionan más del 35% del petróleo del mundo vegetal procesada y una rica fuente de proteínas en la dieta de las aves de corral (Graham y Vance, 2003). También son utilizados como herramientas en la agricultura y la silvicultura, sus productos vegetales como hojas y vainas, son utilizados como fuente de nitrógeno para mejorar el suelo. Estas técnicas permiten a los agricultores ahorrar miles de millones de dólares en el costo de los fertilizantes nitrogenados, industrialmente las legumbres tienen muchos usos en la fabricación de plásticos biodegradables, aceites, tintes, y el combustible biodiesel. (ob. Cit.)

### 2.3.9.2 El género *Machaerium* Pers.

El género *Machaerium* fue descrito por Persoon (1807) quien lo deriva a partir del género *Nissolia* Jacq., creando tres especies y siendo su Tipo *M. ferrugineum* (Willd.) Pers. Está subordinado a la subfamilia Papilionoideae Juss. dentro de la tribu Dalbergieae; dicha tribu consiste de 19 géneros y aproximadamente 300 especies (Polhill, 1981). Los recientes estudios filogenéticos moleculares incluyen 49 géneros y alrededor de 1300 especies en esta tribu (Klitgaard y Lavin, 2005). *Machaerium* está ampliamente distribuido desde el sur de México hasta Argentina, con especies que se extiende por las Antillas y otras por la costa occidental de África (Rudd 1977, 1987; Lozano y Klitgaard 2006; Klitgaard y Lavin, 2005).

En Venezuela, Pittier (1944) describe brevemente 28 especies de *Machaerium*. De acuerdo a Rudd (1999), existen cerca de 130 especies en el mundo, unas 35 en Venezuela con 22 en la flora de la Guayana. Meléndez (2000) presenta nueve especies dentro de la flora del estado Mérida. En la actualidad, Winfield y Aymard, (2007) registran 16 especies para la flora de los Llanos venezolanos, Meléndez, (2008) confirma 35 especies en el Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. Habitan prácticamente todas las regiones político-geográficas de Venezuela, desde el cordón externo de los bosques no intervenidos o en aquellos que están en fase de regeneración del bosque secundario, por los bosques deciduos de los Llanos, las selvas de la Guayana y cuencas de la Orinoquia y Amazonia, región insular caribeña (Isla de Margarita), hasta los bosques subsiempreverdes-ombrófilos submontanos de la cordillera andina y cordillera de la Costa, no llegando a alcanzar los 1800 m de altitud. (Meléndez, 2009)

### 2.3.9.2.1 Aspectos Químicos- Bioactivos.

En una recopilación realizada por Meléndez (2000), se proporciona información sobre las investigaciones fitoquímicas indagadas en forma generalizada a través de la revisión bibliográfica mundial de los últimos 30 años. (Ver (Tabla 1).

La caracterización química en algunas especies de *Machaerium* ha determinado neoflavonoides, isoflavonas y pterocarpanos (Oliveira *et al.* 1971); triterpenos, isoflavinas, fenilcumarinas y quinoides (Ogiyama y Yasue, 1973); Kurosawa *et al.* 1978a); isoflavonoides (Kurosawa *et al.* 1978b); N-Metilprolinas (Adrián-Romero *et al.* 2007).

Entre estos productos provenientes del metabolismo secundario se han encontrado compuestos o moléculas bioactivas. *M. aculeatum* Raddi, *M. latialatum* Pittier, *M. robiniaefolium* (DC. Vogel), *M. tovarense* Pittier, presentan lectinas en sus semillas, las cuales se aislaron preparando suspensiones al 10% (p/v) en NaCl al 0,85% para luego extraerse (Casotto, *et al.* 1984); se ha aislado una procianidina inhibitoria de *Pseudomona maltofilía* a partir de los extractos alcohólicos de tallos y corteza de *M. floribundum* Benth. (Waage *et al.* 1984); Se aislaron lectinas partir de *M. biovulatum* Michel y *M. lunatum* (L.f.) Ducke., manosa-especifico enlazantes, inhibitorias del HIV, que a una concentración de 0.4µg ml<sup>-1</sup> previenen el efecto citopatico del virus a (Animashaum *et al.* 1993); isoflavonoides antiinflamatorios (Da Silva *et al.*, 1994); isoflavonas antiardiales en *M. aristulatum* (Spruce ex Bentham) Ducke, a partir de los extractos etanólicos de la corteza (El-Sohly, Joshi y Nimrod, 1999); cinnamifenoles (macharistol) con actividad citotóxica en líneas células de tipo KB: carcinoma epidermoide oral humano, Col-2: cáncer de colon, LNCaP: cáncer de próstata, HUVEC: célula endotelial de la vena umbilical humana y hTERT-RPE1: célula epitelial pigmental-retinal- transcriptasa reversa telomerasa humana, formononetina con efectos antiardial a partir del tallo de *M. aristulatum* (Seo *et al.* 2001); benzopiranos con actividad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*, actividad antifungica contra la *Candida albicans*, actividad antiparasitaria

contra el *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donavani* a partir del extracto etanólico de *Machaerium multiflorum* (Muhammad *et al.*, 2003). A partir del extracto bencénico de la corteza de *Machaerium acutifolium* Vogel. se han aislado cinamilfenoles como el Petrostyrene (Ollis *et al.*, 1978a, 1978b), flavonas, saponarina, Isovitexin, Isoorientina y Swertisina en las hojas de *Machaerium hirtum* Vell. Stellfe (Tangerina, 2012). También, se ha realizado un perfil bromatológico del follaje utilizado para el silvopastoreo de vacunos (Korbut *et al.* 2009)

El estudio realizado por Giraldo (2011) evidencia los avances fitoquímicos de este género en Venezuela. En los extractos de *M. humboldtianum* Vogel, *M. biovulatum* Micheli. y *M. seemannii* Benth. ex Seem, los compuestos químicos predominantes que fueron detectados son: compuestos nitrogenados (aminas, índoles), terpenos y fenoles. Dicha investigación muestra que el extracto de las hojas de *M. humboldtianum* es rico en compuestos terpénicos, así mismo en el extracto de los frutos de *M. seemanniipo* se obtuvieron terpenos tanto polares como apolares, Predominando la mayor abundancia de los compuestos analizados en el extrato foliar de *M. biovulatum*. Además todos los extractos de las especies estudiadas presentaron compuestos con actividad antioxidante y carencia de alcaloides.

#### **2.3.9.2.2 Etnobotánica-medicinal**

Las plantas de este género han sido utilizadas por indígenas en América para fitoterapia en el tratamiento de diarreas estomacales (Heinrich *et al.* 1992); cólicos de la menstruación (Ginzburg, 1977); tos y úlceras bucales (Joly *et al.* 1987). Klitgaard y Lavin, (2005) Menciona que la savia rojiza de algunas especies es usada por tribus nativas para el tratamiento contra la mordedura de serpientes, y las hojas son un sustituto de la cocaína; además se ha registrado dermatitis por el contacto con la corteza o madera.



En la siguiente tabla se mencionan plantas del género *Machaerium* de acuerdo a su taxonomía y su relación con diferentes compuestos encontrados.

**Tabla 1.**  
**Reporte Fitoquímicos.**

<b>Taxa</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Acción/ Aplicación</b>
<i>M. aristulatum</i> Spruce ex Bentham Duke.	Isoflavonas	Antigiardiales
<i>M. biovulatum</i>	Lectinas	inhibición en infectividad por HIV
<i>M. floribundum</i> Benth.	Procyanidina	Inhibe desarrollo de <i>Pseudomonas maitophilia</i>
<i>M. villosum</i>	Isoflavonoides	Antiinflamatorios en células de ratones
<i>M. acuelatum</i>	Lectinas	
<i>M. acutifolium</i>	Cinnamylfenol (Petrostyreno)	
<i>M. kuhlmannii</i>	Cinnamelfenoles (Kuhlmanistyreno)	
<i>M. mucrunulatum</i>	Cinnamylfenoles (Mucronustyreno Mucronulastyreno)	
<i>M. nictitians</i>	Neoflavonoides	
<i>M. pedicellastrum</i>	Triterpenos Fenilcumarinas Dalbergiquinol	
<i>M. scleroxylum</i>	Hidroxiilos fenólicos	
<i>M. spp</i>	Neoflavonas Isoflavonoides	correlación quimiotaxonómica

Nota: Tomado de “Estudio taxonómico del género *Machaerium* en el estado Mérida”. Por Meléndez, 2000 Trabajo de Ascenso no publicado, (p. ) Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida.

**Tabla 2****Especies de *Machaerium* y clases de metabolitos encontradas.**

<b>Especie</b>	<b>Clases de Metabolitos</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Ref.</b>
<i>M. aristulatum</i>	Cinnamylfenol pterocarpanos; Flavonoides	macharistol; (+)- medicarpina; (+)- maackiaina; formononetina	Seo <i>et al.</i> 2001
<i>M. kuhlmannii</i>	neoflavonoides; Cinnamylfenol		Ollis <i>et al.</i> 1968 a
<i>M. mucronulatum</i>	chalconas; Cinnamylfenol isoflavonas	buteina; isoliquiritigenina; mucronustireno; mucronulastireno; (- )-mucronulato; (-)- duartina; (-)- mucroquinona; (±)- mucronulato	Kurosawa <i>et al.</i> 1977c
<i>M. multiflorum</i>	Benzopiranos	machaeriol A, B, C e D; machaeridiol A, B e C	Muhammad <i>et al.</i> 2001
<i>M. opacum</i>	soflavonas (-)-	imucronulato; (-)- duartina	Kurosawa <i>et al.</i> 1977b
<i>M. vestitum</i>	Isoflavonoides	vestitol; vesticarpano	Kurosawa <i>et al.</i> 1977 a
<i>M. villosum</i>	isoflavonas; Cinnamylfenol	(-)-mucronulato; (-)- duartina; Vilostireno	Oliveira <i>et al.</i> 1968

Nota: Tomado de “Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Machaerium hirtium*. (Vell) Stellfe” por Tangerina, 2012. Trabajo de grado no publicado, (p. 22) Instituto de Química, Universidad Estatal Paulista. Campus Araraquara

### 2.3.9.3 *Machaerium acuminatum* Kunth.

#### 2.3.9.3.1 Clasificación Taxonómica

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Leguminosae / Fabaceae
<b>subfamilia</b>	Papilionoideae
<b>Tribu</b>	tribu Dalbergieae
<b>Género</b>	Machaerium
<b>Epíteto específico</b>	Acuminatum
<b>Nombre Científico</b>	<i>Machaerium acuminatum</i> Kunth



**Figura 2. Planta *Machaerium acuminatum* Kunth.**

### 2.3.9.3.2 Botánica:

*Árboles* de 6-8 m de altura, inermes. *Hojas* compuestas generalmente de 5-7 folíolos; láminas ovaladas o elíptico-lanceoladas a oblongas, 5-8 cm de largo, 2-4 cm de ancho, cartáceas, glabras, con tricomas laxos por nervadura central en el envés; base redondeada a subaguda; ápice gradual acuminado algo curvado con remate obtuso; peciólulos de 5 mm de largo; venas foliares secundarias prominulas por la haz e impresas por el envés, distantes entre sí unos 3-4 mm, arcuadas, anastomosándose antes del margen, se erigen en ángulo de 45° respecto al nervio medio; vénulas terciarias indistintamente reticuladas. (Meléndez, 2009 a).

*Inflorescencias* en racimos paniculiformes, 4-6 cm de largo, pedúnculo pubescente. *Flores* sésiles de 0,6 cm de largo; corola blanca; estandarte orbicular no escotado, de 3,5 mm de alto, 4 mm de ancho; alas 4,5 mm de largo; cáliz pubescente con dientes brevísimo-obtusos, 2 mm de largo. Estambres monadelfos. Ovario hirsuto, derecho. (ob. Cit.)

*Frutos* de legumbres samaroides de unos 6 cm de largo, pubérulos a glabrescentes cuando maduros; ala de 4,3 cm de largo, 2 cm de ancho; base seminal geniculada; estípites de hasta 1 cm de largo. (ob. Cit.)

### 2.3.9.3.3 Holótipo e Isótipo.

*Nissolia acuminata* (Kunth) DC., Prodr. 2: 258. 1825.

*Machaerium stenophyllum* Pittier, Bol. Soc.Venez. Ci. Nat. 7: 149. 1941.

### 2.3.9.3.4 Habita:

Según los estudios realizados por Meléndez (2009 b) y las observaciones directas *Machaerium acuminatum* Kunth. Crece en talud en los cerros o barrancos del pie de monte andino y las selvas de Los Llanos Centrales y Occidentales

principalmente, lo que corresponde a los pisos bioclimáticos *Infratropical Subhúmedo* y *Termotropical Húmedo*.

#### **2.3.9.3.5 Distribución:**

Aragua, Barinas, Distrito Federal, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Portuguesa, Táchira, Trujillo, Yaracuy. Otros países: Colombia, Costa Rica, México. (Meléndez, 2009 a).

#### **2.3.9.3.6 Fenología y Ecología**

El material examinado por Melendez (2009 b) en Venezuela muestra que muchas especies del genero *Machaerium* tienen heterogeneidad para los meses de floración y entre los taxones, en algunos casos incluso para una misma especie en distintas localidades, lo que supone probablemente que factores edáficos y microclimáticos de cada formación o región boscosa condicionan esa inherente plasticidad fenológica del taxón. Es así en cuanto a la fenología y ecología que *Machaerium acuminatum* Kunth. crece en taludes, al borde del bosque secundario a una altitud de 200-800 m.s.n.m por lo común la floración ocurre en mayo - Agosto y la fructificación sucede en Diciembre- Abril.

Registros del Herbario MERF de la Facultad de farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

**Tabla 3**

**Datos de recolección de *Machaerium acuminatum* Kunth. en Venezuela.**

<b>Colección</b>	<b>Pablo Meléndez -Herbario MERF</b>
<b>Departamento</b>	Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos.
<b>Responsable de la colección</b>	Dr. Pablo Meléndez Gonzales
<b>Determinador</b>	Pablo Meléndez
<b>Fecha de colecta:</b>	2014-07-20
<b>N° de registro</b>	634
<b>Estado</b>	Barinas
<b>Municipio</b>	Barinitas –Bolívar
<b>Localidad</b>	Sector Barragán. Carretera desde Barinitas a unos 4 km subiendo hacia Mérida, a orilla del camino.

Nota. Datos tomados de *colección del Pablo Meléndez, Herbario MERF*, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA, Mérida.

## 2. 4 Hipótesis

A continuación se exhiben las hipótesis planteadas en el problema de investigación.

Los extractos etanólicos de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth, pueden presentar niveles de fotosensibilidad en luz UV y luz blanca.

Es posible que los extractos etanólicos de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth, presenten fotoactivación.

www.bdigital.ula.ve

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1 Enfoque de la investigación**

Dicha investigación posee un enfoque tipo mixto ya que comprende enfoque cualitativo y cuantitativo.

Según Gómez, (2006) es constituido por medio de la fusión del enfoque cualitativo y cuantitativo:

En el enfoque cuantitativo se aplica la secuencia de pasos en forma estructurada. Utiliza la medición numérica, el conteo y frecuentemente el uso de la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento en una población. Por el contrario el enfoque cualitativo se basa en métodos de recolección de datos, utilizando las descripciones y observaciones. (p.60)

#### **3.2 Tipo y Diseño de investigación**

En la actual investigación el diseño es de tipo experimental y de campo. Ya que según León y Toro, 2007 “la investigación experimental es aquel proceso donde el investigador introduce una o varias variables independientes para observar los efectos que ocasionan en las variables dependientes”. (p.104)

De esta manera, se someterán los extractos etanólicos de las semillas y hojas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth, a diferentes longitudes de ondas de luz UV y visible, para así evaluar las consecuencias de estos estímulos a los cuales son sometidos.



La investigación de campo radica en la obtención de datos directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar variable alguna.

### **3.3 Población y muestra**

En esta investigación, la población se encontrará representada por 3 Ramas de *Machaerium acuminatum* Kunth. siendo una leguminosa de múltiples regiones del país, que crece a 200 - 800 m.s.n.m., luego de la selección de esta planta se extraerán distintas muestras como son las hojas y los frutos.

En dicha investigación el muestreo será No probabilístico. Según Baptista, (2007) es un procedimiento donde la selección no depende estrictamente de probabilidad, sino de los criterios utilizados en la investigación. (p. 78)

El muestreo no probabilístico se efectuara por cuotas el cual se fundamenta en elegir los elementos del universo en estudio hasta obtener las cuotas preestablecidas

### **3.4 Materiales y Métodos**

#### **3.4.1 Materiales**

En los procedimientos para la recolección de muestras vegetales se emplearon los siguientes materiales y equipos:

Tijeras corta ramas con tubos de aluminio.

Tijeras podadoras manuales.

Altímetro, brochas, paños, bolsas negras, rótulos adhesivos, balanza de precisión.

Para la obtención de los extractos vegetales y determinación de la fotosensibilidad y fotoactivación se utilizaran los siguientes materiales y equipos:

Mortero, Frascos ámbar, Tul, Tirro, Cinta pegante, Papel óptico, Micropipetas, Puntillas azules blancas y amarillas, Piseta, Cubetas de cuarzo, Tubos eppendorf, Tubos de ensayo, Gradillas, Frascos de desecho.



**Figura 3. Materiales utilizados en la parte experimental.**



**Figura 4. Cubetas de cuarzo**

www.bdigital.ula.ve

#### **3.4.1.1 Compuestos químicos.**

Solventes orgánicos: Alcohol etílico y

Agua destilada.



**Figura 5. Solventes utilizados**

### 3.4.1.2 Equipos Utilizados:

Espectrofotómetro GENESYS 10 BIO.

Estufa.

Cámara cromatográfica.



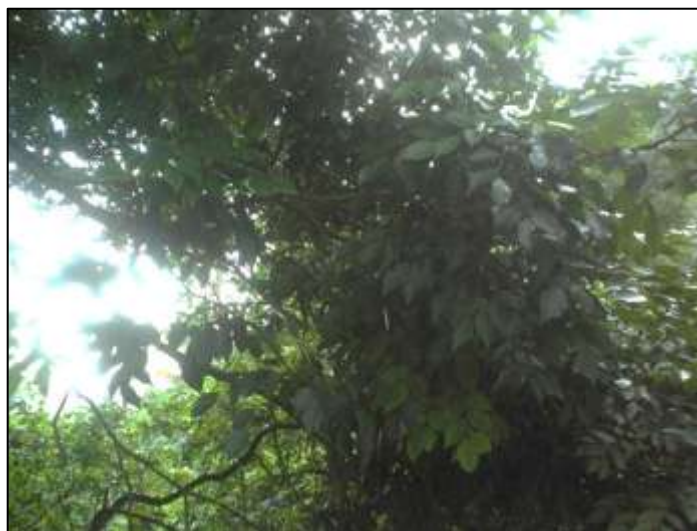
**Figura 6.** Espectrofotómetro GENESYS 10 BIO



**Figura 7.** Cámara cromatográfica.

### 3.4.1.3 Material biológico:

- Hojas de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth
- Semillas de *Machaerium acuminatum* Kunth



**Figura 8.** Planta *M. acuminatum* Kunth. entre sector Barragán y La Yuca, Barinas

### 3.4.2 Métodos

#### 3.4.2.1 Estrategias para la recolección de las muestras

Los especímenes de la planta *M. acuminatum* Kunth. (Semillas y hojas) se tomaron de los alrededores de la vía Barinitas-Mérida, entre el sector Barragán y La Yuca, Barinas – Venezuela, que se encuentra a una altura de 545 m.s.n.m. una temperatura de 28°C con una longitud Este 70° 19' 54 y 70° 45' 18 Y latitud Norte 8° 34' 36 y 9° 03' 12.

El proceso de recolección se llevó a cabo en el mes de Julio del año 2014; Se seleccionó el material en las mejores condiciones físicas y sanitarias. Con ayuda del programa google Earth se pudo obtener la ubicación del lugar de recolección.



**Figura 9. Vista satelital de la Vegetación - entre sector Barragán y La Yuca, Barinitas.**

Su determinación se realizó con la orientación de Profesor Pablo Meléndez, experto en el análisis botánico de la especie y genero antes mencionada, en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida- Venezuela). Esta especie fue procesada y depositada como testigo en el herbario MERF bajo el número (635) de colección de Pablo Meléndez.

Las muestras se conservaron en refrigeración y posteriormente fueron trasladadas en bolsas negras hasta los laboratorios de la seccional de Biotecnología del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis para la preparación de los extractos etanólicos. Finalmente a las plantas recolectadas se les eliminó el exceso de tierra, fueron conservadas y luego pesadas en el siguiente orden:

- Peso de la rama completa
- Peso de las hojas clasificadas por grado de inmadurez : (hoja Verde, hoja Verde- morada, hoja Morada (Tierna))
- Peso del fruto
- Peso de la base seminal del fruto (ubicación de la semilla).



**Figura 10. Especímenes de la planta *M. acuminatum* Kunth. hoja verde (madura)**



**Figura 11. Especímenes de la planta *M. acuminatum* Kunth. hoja verde -morada**



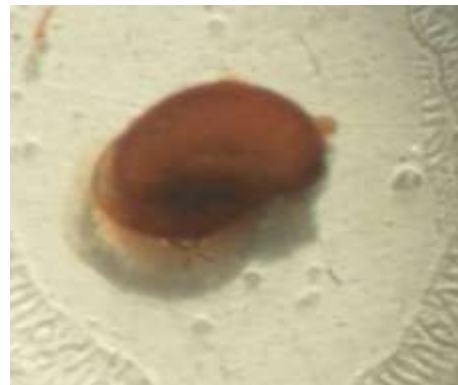
**Figura 12.** Especímenes de la planta *M. acuminatum* Kunth. hoja morada (inmadura)



**Figura 13.** Fruto de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth.

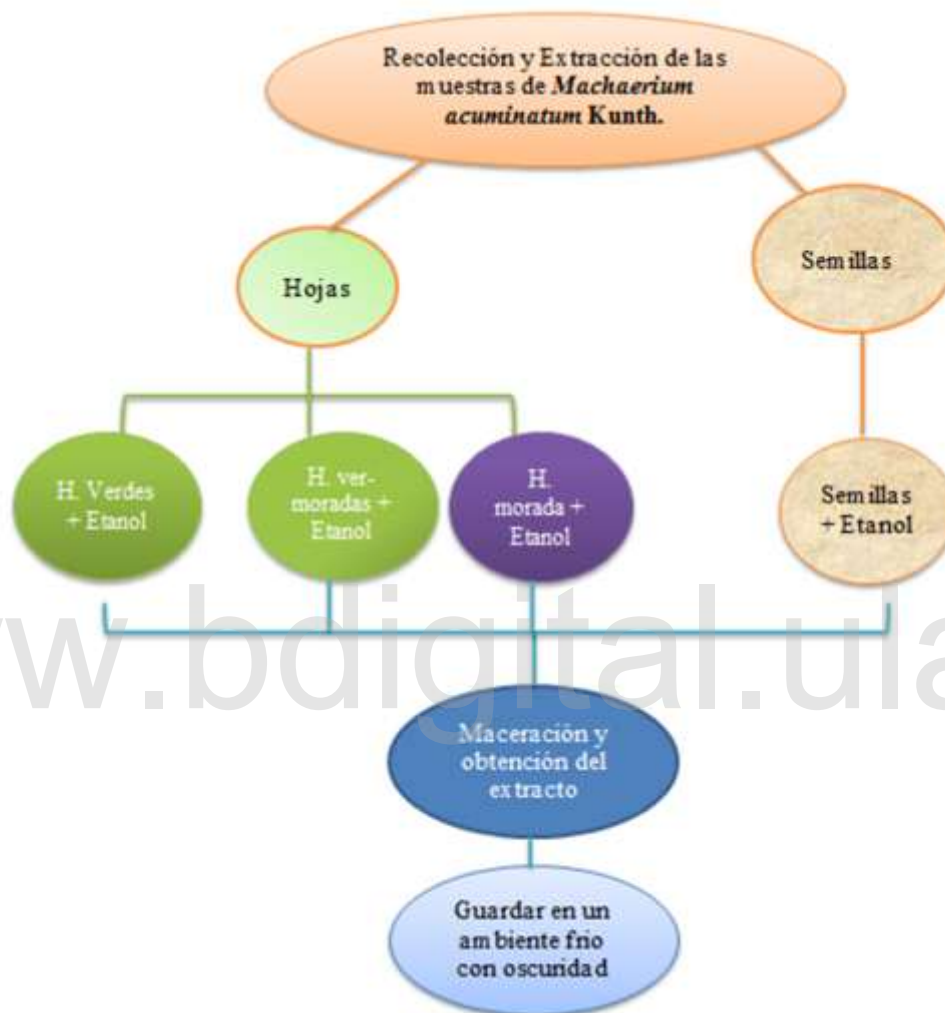


**Figura 14.** Base seminal Fruto de *M. acuminatum* Kunth.



**Figura 15.** Semilla de *M. acuminatum* Kunth.

### 3.4.2.2 Metodología para la obtención de los extractos etanólicos



Extracción de las muestras en la oscuridad, se procedió de la siguiente manera: Se mezclan las hojas verdes (maduras), verde-moradas y moradas individualmente, asimismo las semillas con el etanol y se macera, al obtener el extracto se guarda en frío y oscuridad. Para realizar los extractos etanólicos, se usó el método de extracción rápida usado en la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB).

### 3.4.2.3 Preparación de los extractos

Una vez pesadas la rama completa, frutos y hojas se prepararon los extractos etanólicos en la oscuridad.

Este método permite obtener un extracto crudo rápidamente, usando solventes biopermisivos y bioamables, lo cual evita la Biotransformación, Bioconversión y Biodegradación del material. Asimismo, permite que algunas macromoléculas sean extraídas junto con metabolitos, moléculas orgánicas e inorgánicas.

- En un mortero se colocaron las hojas verdes y se les agregó el etanol para su maceraron, posteriormente se decantó, recuperando determinada cantidad del extracto, este fue envasado en un frasco ámbar envuelto con teipe, con el rótulo HOJA VERDE MYS 2014.

De igual forma se obtuvieron los extractos de las hojas verde-moradas y hojas moradas, estas se conservaron con el siguiente rotulo HOJA VERDE-MORADA MYS 2014 y HOJA MORADA MYS 2014.

- Para preparar el extracto de la semilla, se seleccionó la base seminal de la vaina, de igual forma fueron colocadas en un mortero determinados gr de la base seminal y se les agregó etanol, se maceraron, posteriormente se filtró la cantidad obteniéndose fue envasado en un frasco ámbar envuelto con teipe con el rotulo SEMILA MYS 2014.

Los respectivos extractos fueron conservados en la nevera a 5 grados centígrados.



#### **3.4.2.4 Calculo de P/V y concentraciones**

Concentración en g/mL: g material vegetal/ mL disolución. Los cálculos se realizaron para la hojas verde, hojas verde- morada y hojas moradas así como para las semilla

Las alícuotas se destinaron para ensayos de fotosensibilidad, fotoactivación y cromatografía.

Además se agregó 1 mL del extracto de cada hoja concentrado en un tubo eppendorf pre pesado así como del extracto de la semilla la cantidad restante se refrigeró. Los tubos se cubrieron para protegerlos de la luz y se pesaron antes de proceder al secado.

Posteriormente se colocaron en la estufa en un periodo de 1 hora de secado a una temperatura de 60 grados centígrados, los mismos fueron pesados después secado obteniéndose un peso 2 (P2). Luego se calculó el peso seco de cada extracto.

#### **3.4.2.5 Espectrofotometría: Ensayo de fotosensibilidad y fotoactivación.**

La sección de Biotecnología utiliza un sistema diseñado para determinar la existe de alguna fotosensibilidad o fotoactivación donde se usa la irradiación del monocromador del espectrofotómetro para sensibilizar/activar los extractos y de igual forma detectar los cambios de absorción en las diferentes longitudes de onda. Para ello se hace un espectro ascendente en una dilución determinada y un espectro descendente conservando la dirección. Ambas muestras son alícuotas distintas de la misma dilución.

Para el extracto etanólicos de la semilla se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente en la región ultravioleta, desde 190nm a 290nm y de 290 a 390nm luego un barrido descendente desde 390 nm a 290 nm y de 290nm a 190nm, con un

intervalo de longitud de onda de 2 en 2, a velocidad de barrido lenta utilizando la dilución de 1/10.

Adicionalmente a los extracto de las hojas verdes, verde-moradas y moradas también se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente analizado en la región visible desde 400nm a 500nm luego de 500nm a 600nm y por ultimo de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 2 en 2, a una velocidad de barrido turbo. La dilución empleada para las hojas fue de 1/20, 1/20 y 1/40 respectivamente.

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

#### **3.4.2.6 Cromatografía en capa fina**

Se realizó una cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas adecuadas, ajustada a cm requeridos por cada lado, así como su respectiva activación

Posteriormente se dibujó la línea de siembra y la línea frente del disolvente a un centímetro del borde inferior y superior, además se calculó el sitio de siembra aproximado. Con ayuda de micropipetas se colocó la cantidad establecida para la corrida de cada extracto de las hojas y de los extractos de la semilla.

Se empleó como fase móvil un solvente compuesto por: Acetato de etilo, metanol y agua destilada.

La corrida se realizó hasta que el solvente alcanzó la línea de frente. Después de la corrida, la placa se colocó en una estufa á 37° C para su secado. Se observó en luz blanca, luz UV onda corta 254 nm y luz UV onda larga 365 nm, fotografiando la placa para cada tipo de radiación **Figuras 26, 27 y 28** y luego se guardó en una estufa á 37° C envuelta en papel marrón.

**CAPITULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**4.1 Material biológico utilizado:**

**Tabla 4**

**Peso de las partes de la planta *Machaerium acuminatum* Kunth.**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (g)</b>
Rama completa de la planta	33,00
Hojas verdes	20,00
Hojas verde- morada	15,00
Hojas Moradas	1,00
Fruto	12,70
Base seminal con semilla	5,50

**Tabla 5**

**Cantidades utilizadas para preparación de extractos etanólicos y relación P/V**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (g.)</b>	<b>Vol. De etanol (ml)</b>	<b>Relación P/V (g./mL)</b>
Hoja verde	20,0	40	0,5
Hoja verde-morada	15,0	50,0	0,30
Hoja morada	1,0	6,0	0,167
Base seminal con semilla	5,50	8,0	0,68

#### **4.1.2 Peso del tubo con bagazo de las hojas.**

Tubo 1 hoja (verde P1): 1,4663 g

Tubo 2 hoja (verde-morada P1): 1,4112 g

Tubo 3 hoja (morada P1): 1,4188 g

#### **4.1.3 Peso del tubo con bagazo de las hojas lavado y secado.**

Tubo 1 hoja (verde P2): 1,4273 g

Tubo 2 hoja (verde-morada P2): 1,3464 g

Tubo 3 hoja (morada P2): 1,3665 g

#### **4.1.4 Peso seco (p.s) de los extractos de las hojas.**

Hoja verde P1 (1,4663 g) - P2 (1,4273 g) = 0,039 g = 39,0 mg p.s

Hoja verde-morada P1 (1,4112 g) - P2 (1,3464 g) = 0,0648 g = 64,8 mg p.s

Hoja morada P1 (1,4188 g) - P2 (1,3665 g) = 0,0523 g = 52,3 mg p.s

#### **4.1.5 Peso del tubo para trasvasar (extracto concentrado y diluido de la semilla).**

Concentrado: 1,4443 g

Diluido: 1,4537 g

#### **4.1.6 Peso del tubo con bagazo de la semilla.**

Concentrado: 1,4942 g

Diluido: 1,4335 g

#### **4.1.7 Peso del tubo con bagazo lavado y secado**

Concentrado: 0,0405 g

Diluido: 0,0108 g

La semilla produce un gel que se observa en el residuo del extracto.



**Figura 16. Bagazo de hoja verde**



**Figura 17. Bagazo de hoja ver - morada.**



**Figura 18. Bagazo de hoja morada**



**Figura 19. Bagazo de la Semilla.**



**Figura 20. Tubo con Bagazo de la hoja morada y verde-morada.**



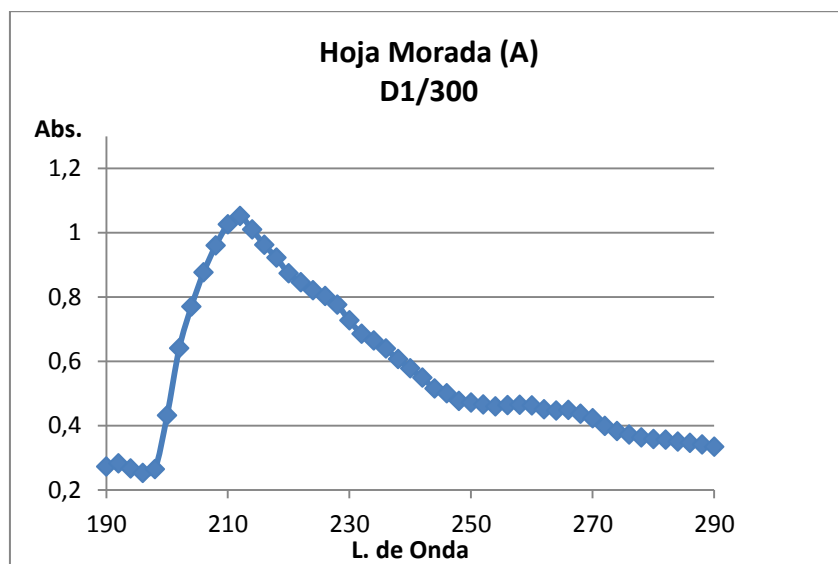
**Figura 21. Tubo Bagazo de la hoja verde.**

#### **4.2 Resultados de la fotosensibilidad y fotoactivación evaluados por espectrofotometría.**

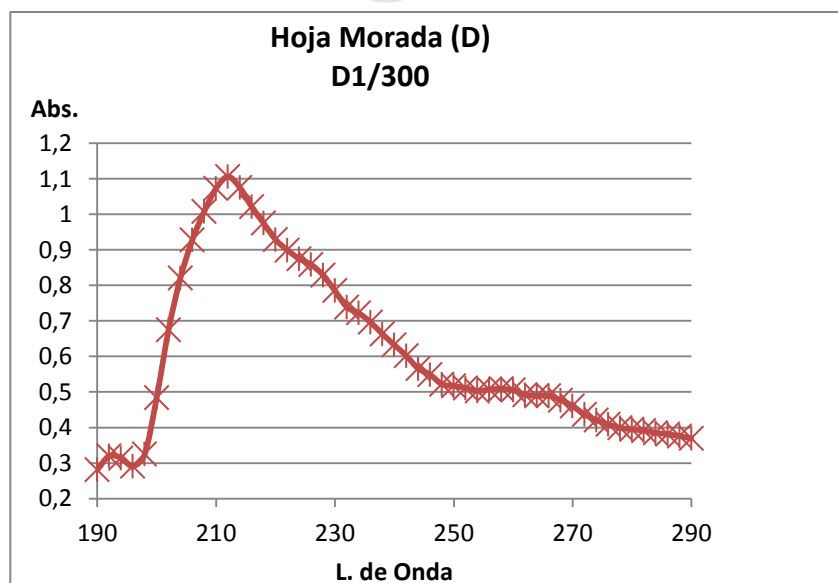
Se realizó un espectro ascendente (A) (190- 290nm) de (290- 390nm) y descendente (D) (390- 290nm) (290- 190nm) para el extracto etanólico de las hojas moradas (dilución: 1/300) (1500 uL de Etanol + 5uL del extracto), verdes (dilución: 1/200), (1400 uL de Etanol + 7uL del extracto) y semilla (dilución: 1/100), (1500 uL de Etanol + 15uL del extracto) de *Machaerium acuminatum* Kunth. Sin exposición a la luz blanca. En este experimento se incluyen los espectros originales y los espectros diferenciales (resta y división) para obtener los valores y las tendencias comparativas.

Además, el extracto de la hojas verde, verde-morada y morada así como de la semilla fue trabajado en luz visible entre 400-700nm ascendente, La dilución empleada para las hojas Verdes fue de 1/20, para las hojas verde-morada 1/20, y para las hojas moradas 1/40, así como para semilla 1/10.

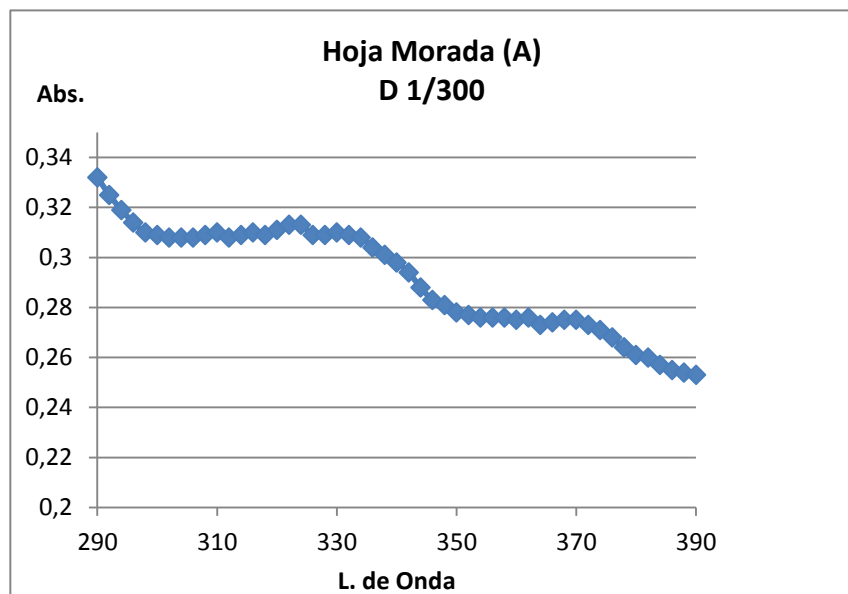
En los experimentos se trató de poner en evidencia la fotosensibilidad de las muestras ascendente y descendente, y la relación diferencial comparativa de ambos espectros. Los espectros se midieron en cubetas de cuarzo, el ascendente desde ultravioleta hasta el rojo lejano y el descendente a la inversa.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



**GRÁFICA 1.** Espectro ascendente, de los extractos etanolicos de hoja morada a (190-290 nm.)

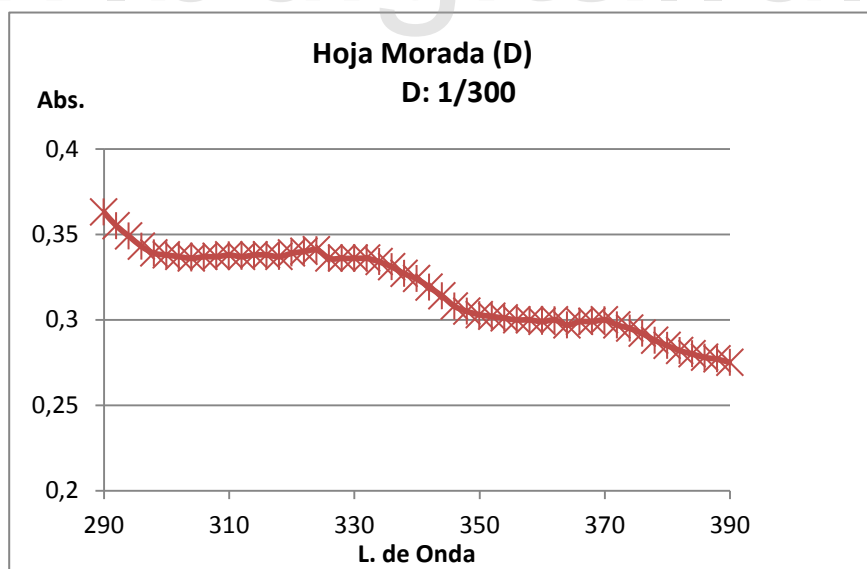


**GRÁFICA 2.** Espectro descendentes, de los extractos etanolicos de hoja morada a (190-290 nm)



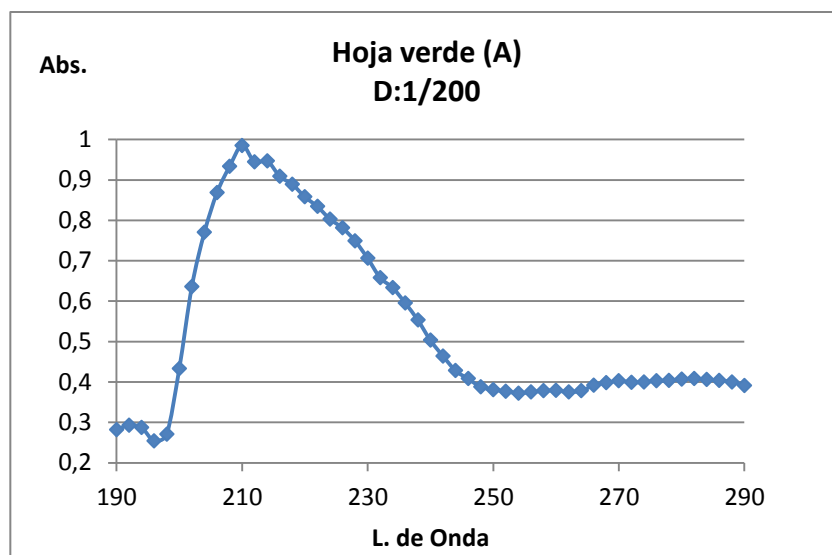
**GRÁFICA 3.** Extractos etanólicos de hoja morada ascendente de (290-390)

www.bdigital.ula.ve

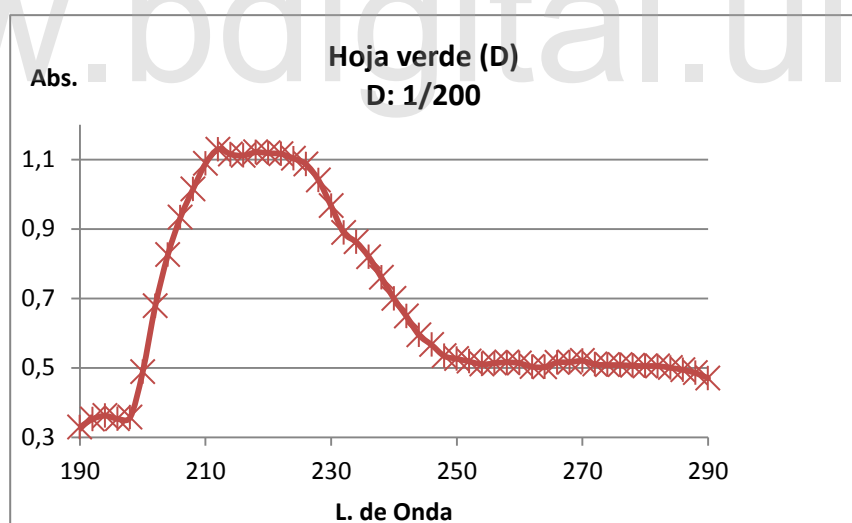


**GRÁFICA 4.** Extractos etanólicos hoja morada descendentes de (290-390)



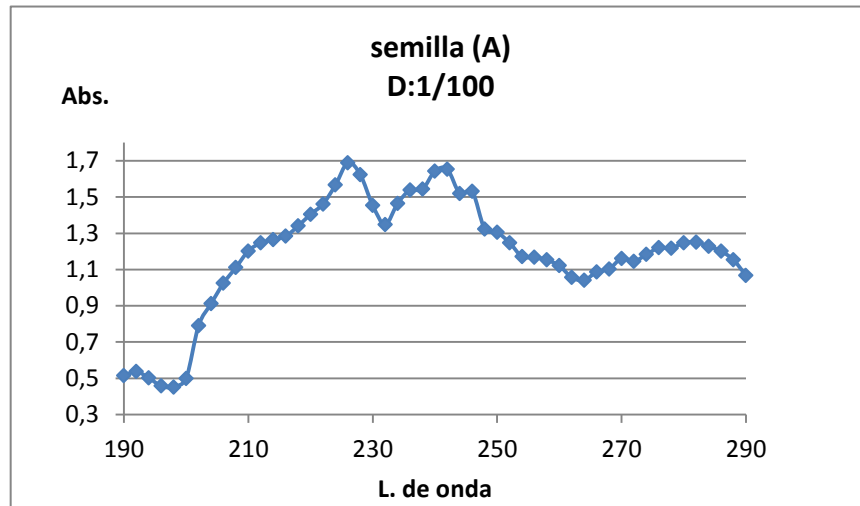


**GRÁFICA 5. Extracto etanólico de hoja verde (Ascendente de 190-290)**

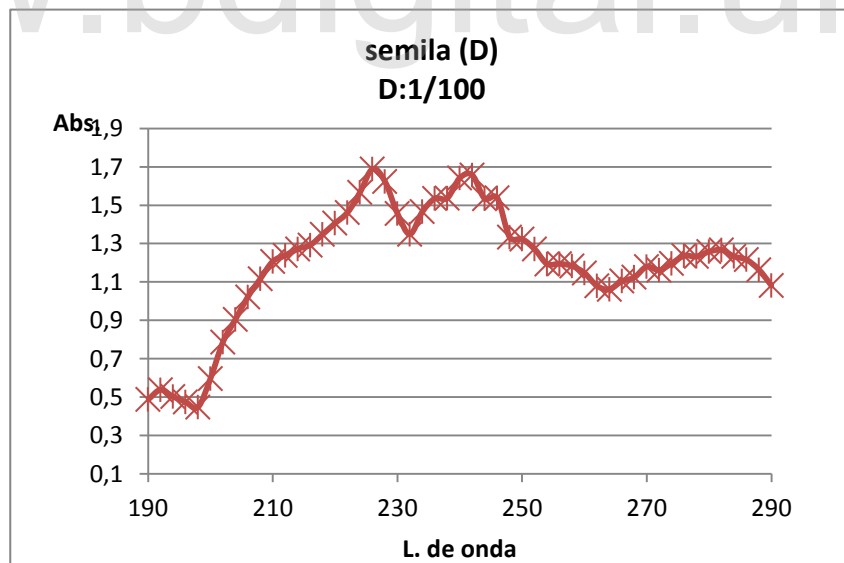


**GRÁFICA 6. Extracto etanólico de hoja verde descendente de (190-290)**

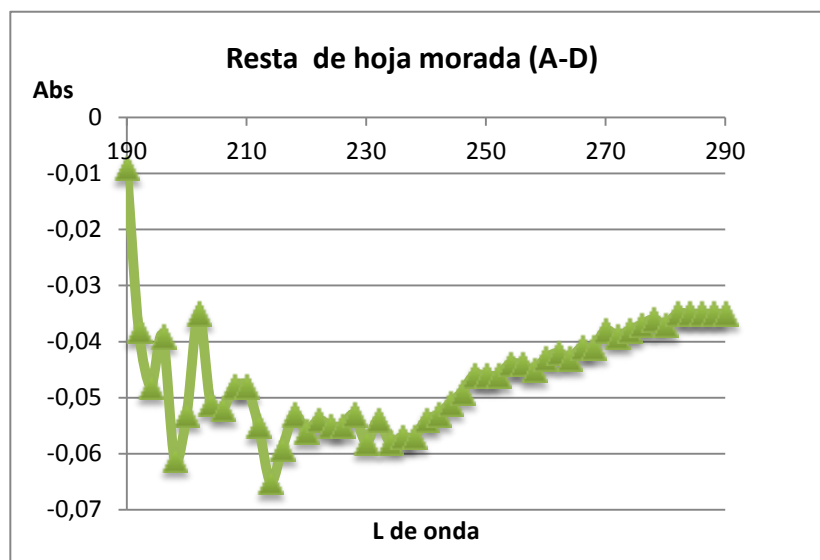
Hay una variación en el gráfico descendente con el ascendente a 210 nm, donde ella tiene un pico la descendente arroja una meseta lo que muestra fotosensibilidad expresada con variación molecular.



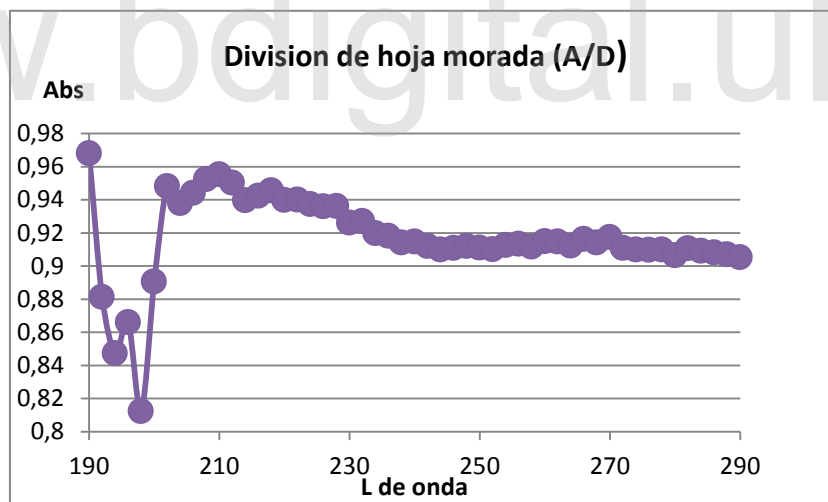
**GRÁFICA 7. Extracto etanólico de semilla ascendente de (190-290)**



**GRÁFICA 8. Extracto etanólico de semilla descendente de (190-290)**

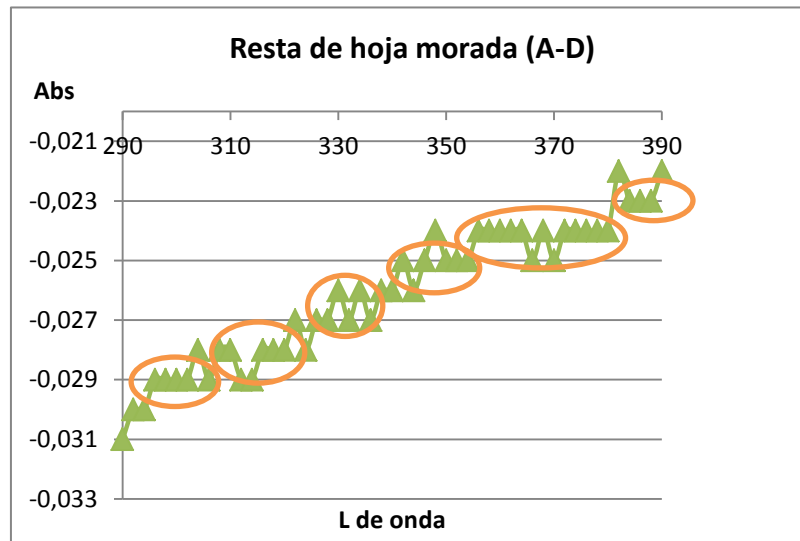


**GRÁFICA 9.** Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de hoja Morada (190- 290).



**GRÁFICA 10.** División de los espectros Ascendentes-Descendentes de la hoja Morada 190- 290).

Se puede observar un valle en 198 nm.



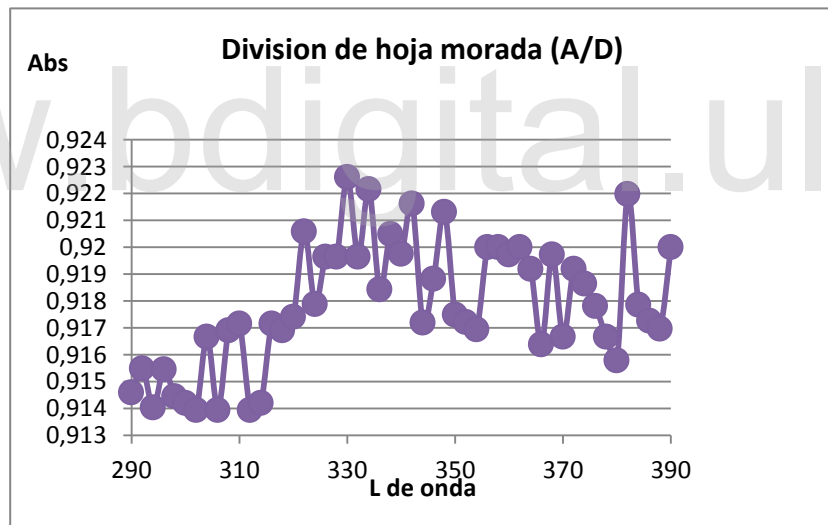
**GRÁFICA 11. Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de hoja Morada (290- 390).**

En el espectro diferencial de la hoja morada (tierna), para el rango de 290 a 390 nm se presenta una diferencia en la resta, observándose una especie de “escalera” (ver grafica 15) para la cual se han analizado otro caso similar en el estudio de Duque (2015) en los espectros diferenciales de resta y división del extracto etanólico del pimpollo en la planta *Lupinus s.l meridanus* Moritz. (leguminosa) en la cual se obtuvo una escalera bien definida que va desde 290 a 335 nm, cabe destacar que esta autora realizó el barrido con intervalos de longitud de onda de 5 en 5, a velocidad de “barrido turbo”. Ambos resultados se han interpretado que pueden estar asociados a celdas fotovoltaicas naturales presentes en las formas inmaduras del tejido vegetal (pimpollo en el caso de Duque 2015 y hoja tierna en nuestro caso). Se ha observado un modelo similar en los estudios de Boudaoud *et al.* (2015).

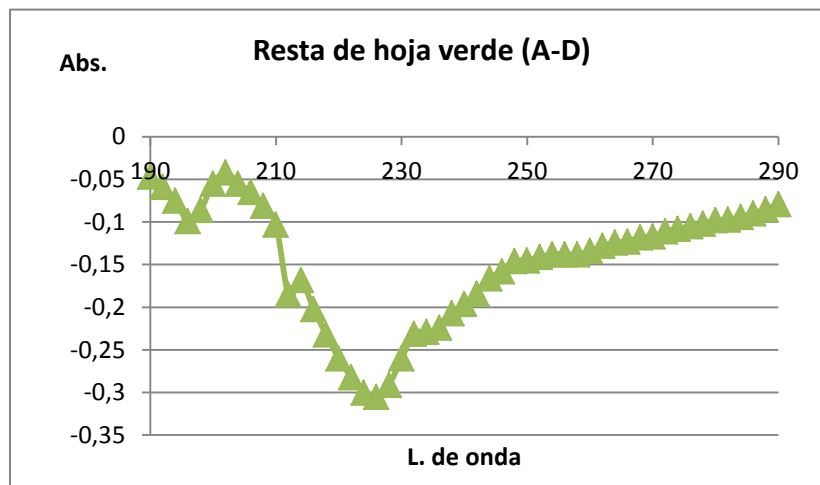
En este caso se evidencian 6 celdas representadas por cada escalón en la gráfica, estableciendo un sistema de varias moléculas fotosensibles acopladas por las reacciones de fotoactivación y posiblemente con transmisión electroquímica.

Comparando nuestros resultados con los de Duque (2015), la escalera generada en nuestro trabajo se observa con poca definición y mucha perturbación.

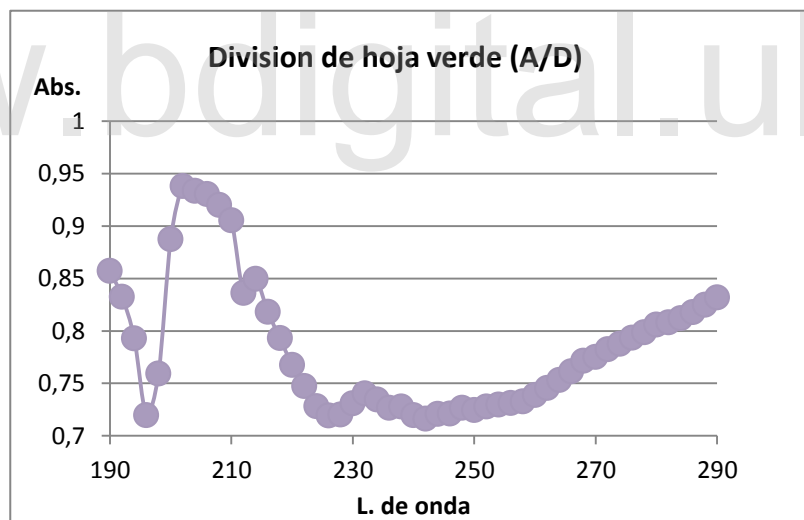
En el caso de esa autora, la perturbación ocasionada por el doble barrido espectrofotométrico debe ser menor porque los saltos de longitud de onda son de 5 en 5 con lo cual hay 4 longitudes de ondas que no afectan la muestra, además al ser un “barrido turbo” el calentamiento es menor y finalmente en nuestro caso, se realizó un barrido con intervalos de longitud de onda de 2 en 2, a velocidad de barrido lenta, el número de datos es 2,5 veces mayor, con lo cual el riesgo de error en el sistema operativo por lo menos se duplica (esto se denomina error instrumental).



**GRÁFICA 12.** División de los espectros Ascendentes-Descendentes de la hoja Morada 290- 390).

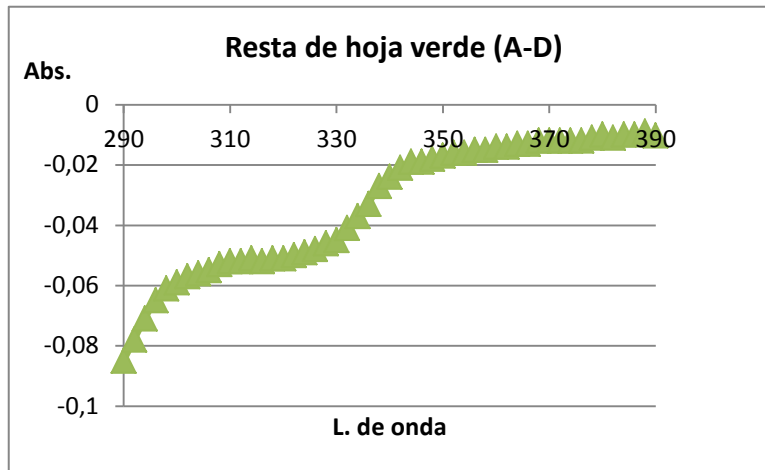


**GRÁFICA 13.** Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanólicos de hoja Verde a (190 – 290 nm)

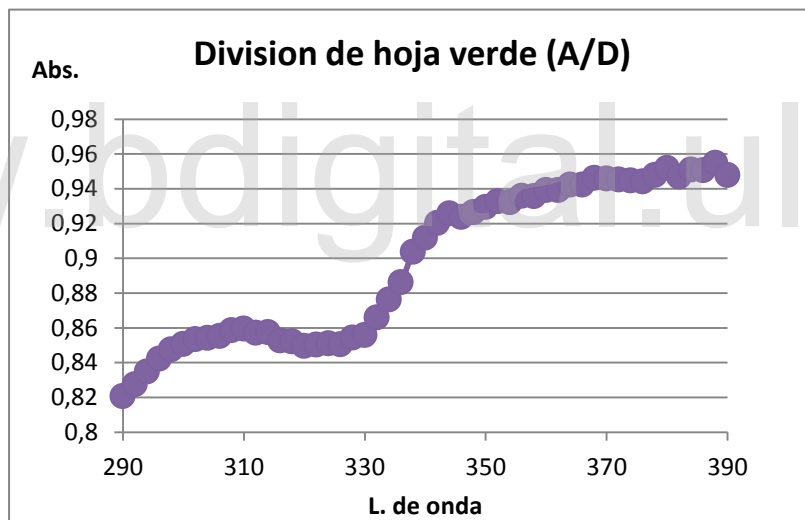


**GRÁFICA 14.** División de los espectros Ascendentes / Descendentes de los extractos etanólicos de hoja Verde a (190 – 290 nm)

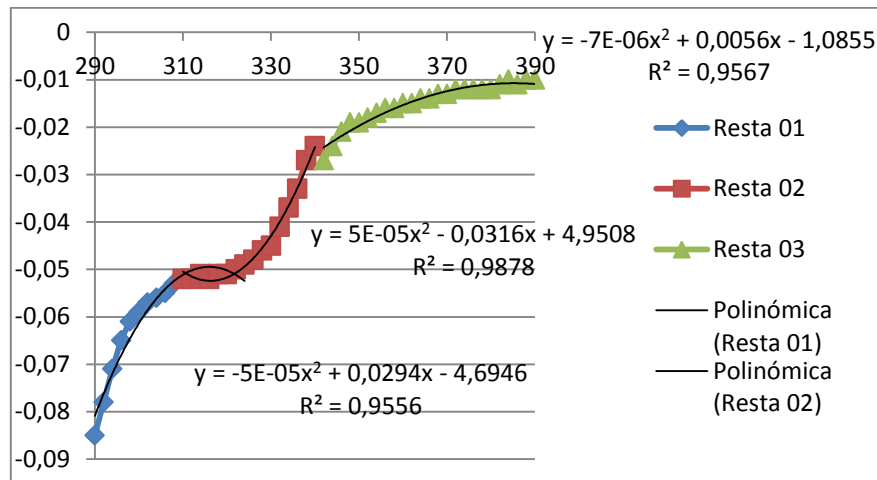
En la resta y división de la hoja verde presenta dos valles; uno a 196 y otro a 224 y en medio hay un pico a 202. Las dos hojas tienen similitud en 196 nm y se diferencian en que, la hoja verde tiene otro valle a 224 nm y un pico a 202 nm.



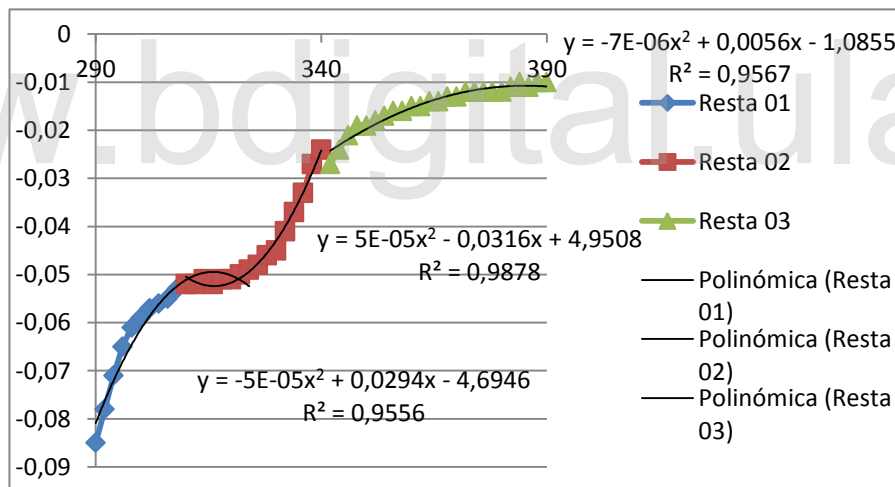
**GRÁFICA 15.** Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde a (290 – 390 nm)



**GRÁFICA 16.** Division de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde a (290 – 390 nm)

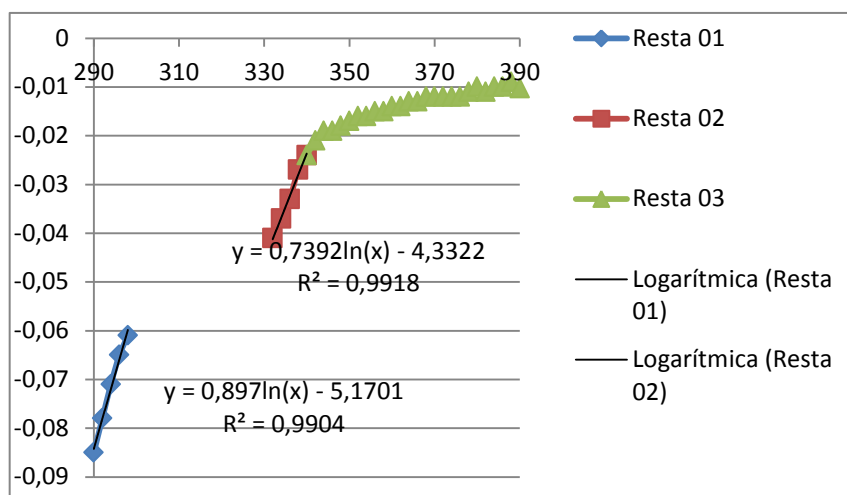


**GRÁFICA 17.** Resta 2 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390).



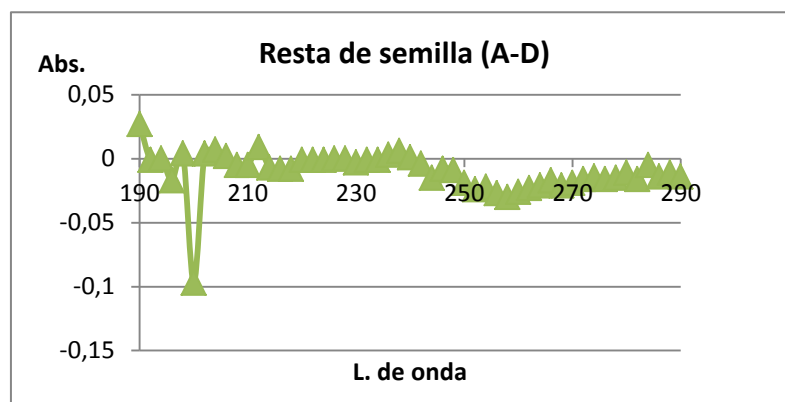
**GRÁFICA 18.** Resta 3 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390)



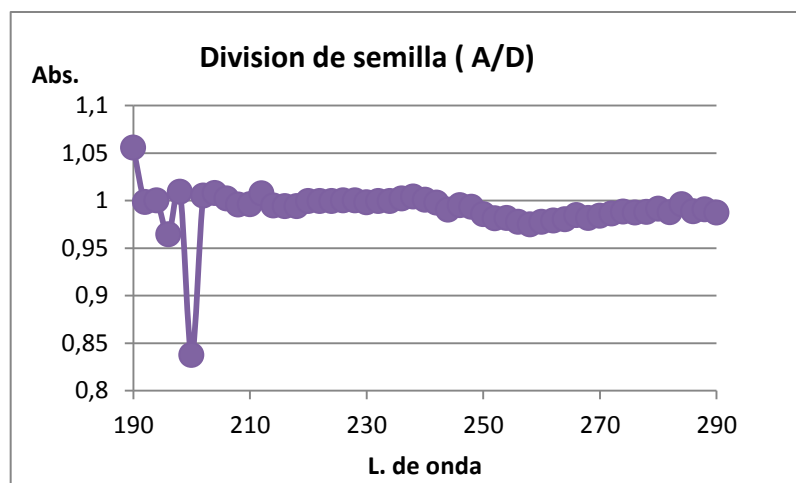


**GRÁFICA 19. Resto 4 de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de hoja Verde (290- 390).**

Hemos conseguido en el espectro de hoja verde de 290 a 390 nm dos curvas cooperativas. Aparece una primera curva con un incremento lineal con centro en 298 nm y una segunda con centro en 335, y el punto intermedio entre las dos es 319,5 (ver graficas 18, 19, 20, 21, 22 y 23) la hoja morada no tiene este fenómeno. Este resultado es semejante al obtenido por Duque (2015) en la resta del espectro ascendente y descendente en onda larga (290-390nm) del extracto del nódulo en la planta *L. meridanus* M. Esta absorción Bimodal muestra una estabilidad entre varias moléculas.

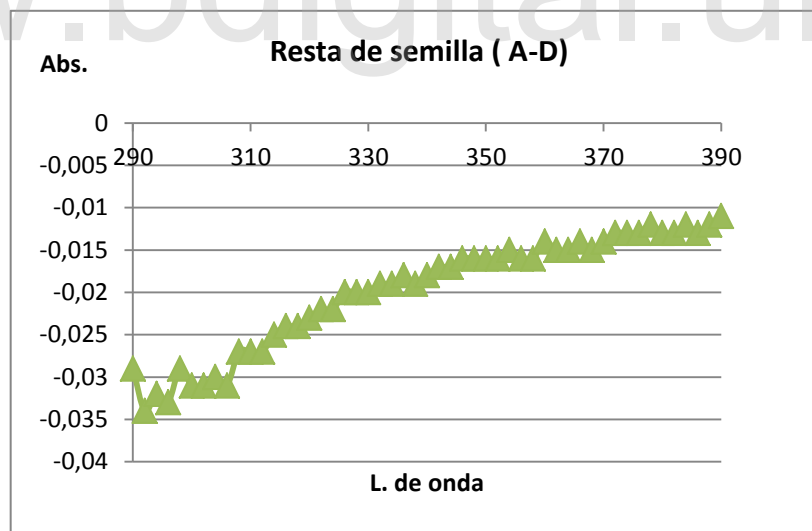


**GRÁFICA 20. Resto de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (190 - 290 nm)**

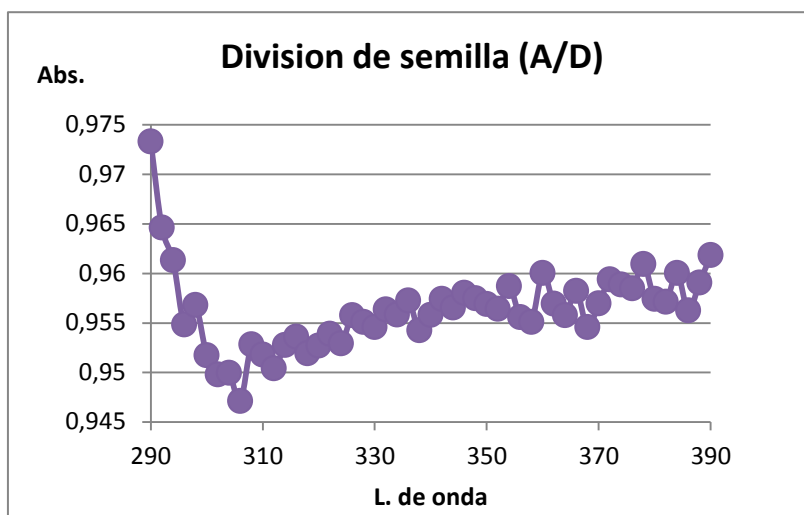


**GRÁFICA 21.** División de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (190- 290nm).

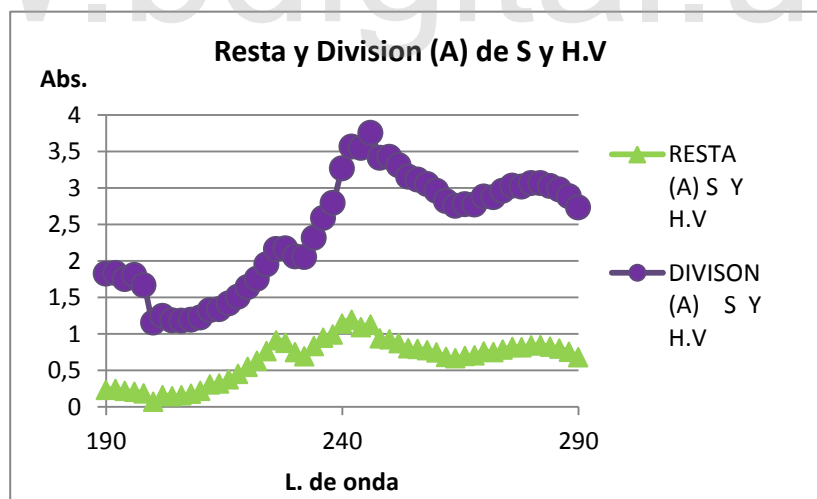
Presenta un valle a 200 nm en resta y división.



**GRÁFICA 22.** Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (290 – 390 nm)

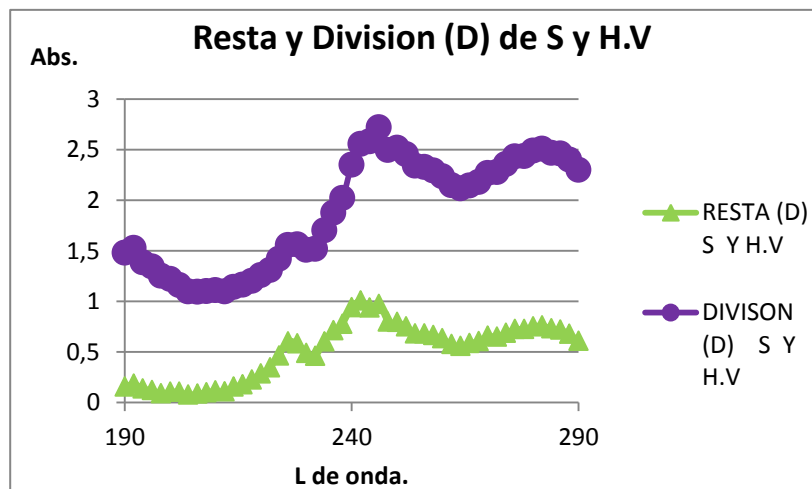


**GRÁFICA 23.** División de los espectros Ascendentes-Descendentes de los extractos etanolicos de la semilla a (290- 390nm).



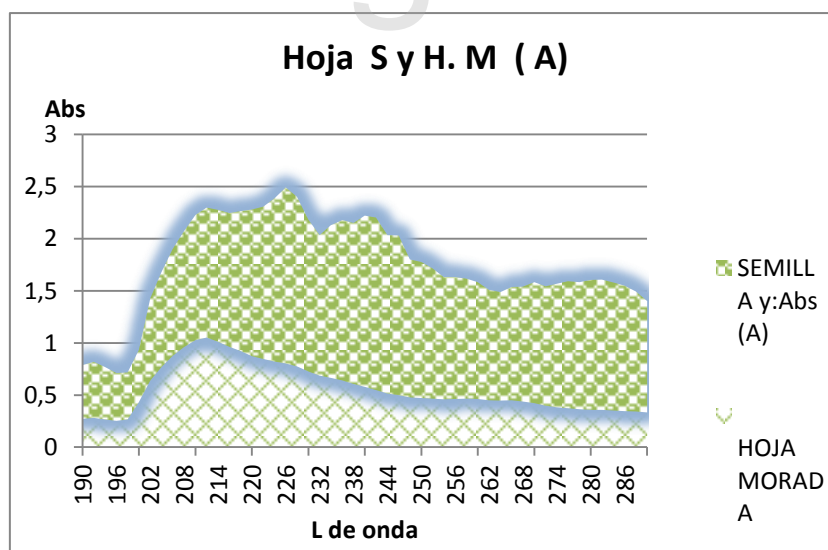
**GRÁFICA 24.** Espectros diferenciales Ascendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja verde a (190- 290nm).

Hay una diferencia entre la semilla y la hoja verde, donde ella tiene un pico la semilla tiene un valle.



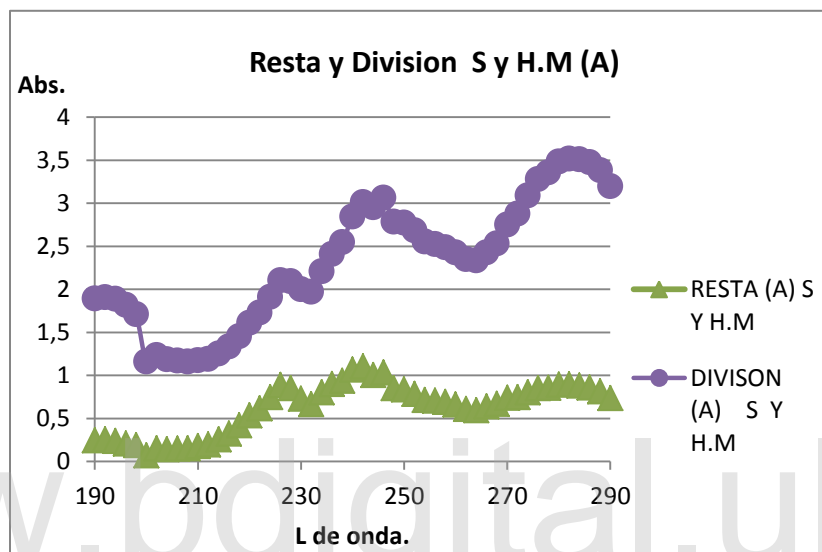
**GRÁFICA 25.** Espectros diferenciales descendentes de los extractos etanólicos de la semilla y hoja verde a (190- 290nm).

Los picos se ponen en evidencia con el extracto de la hoja verde.



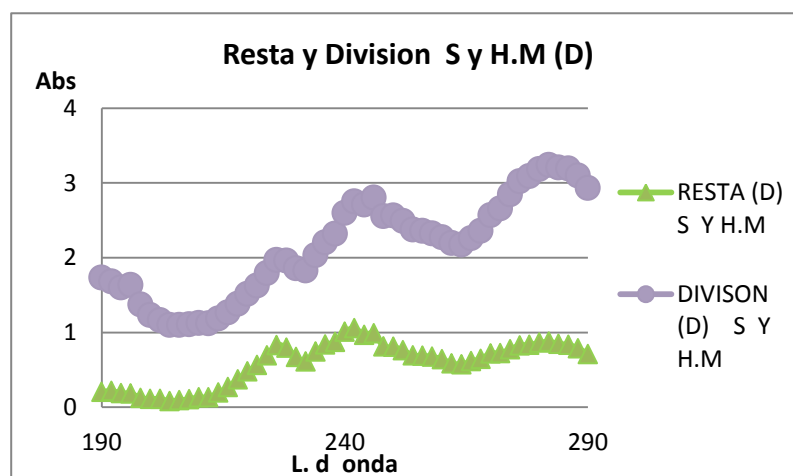
**GRÁFICA 26.** Extracto etanólico de la semilla y hoja morada Ascendente de (190-290)

En este espectro podemos descubrir compuestos principales de la parte interna de la semilla (Hay un tegumento verde de la semilla) y cuál de las dos hojas verde o morada es más parecida a la semilla.

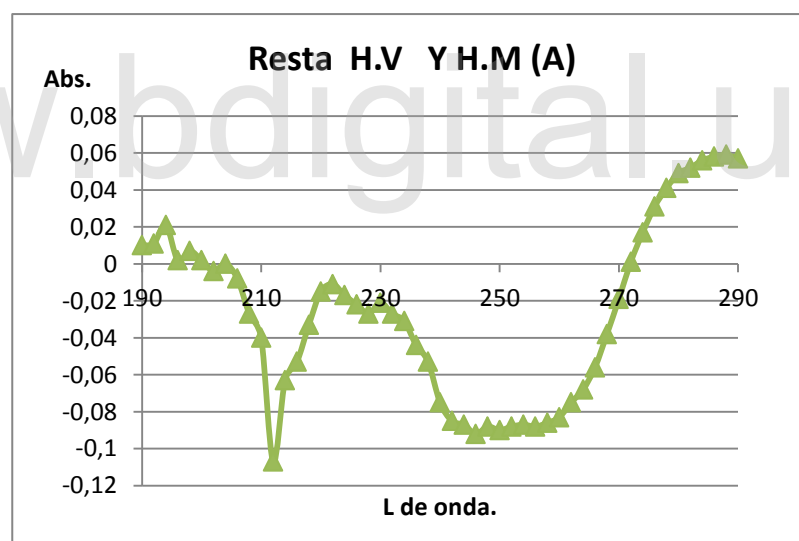


**GRÁFICA 27. Espectros diferenciales Ascendentes de los extractos etanólicos de la semilla y hoja Morada a (190- 290nm).**

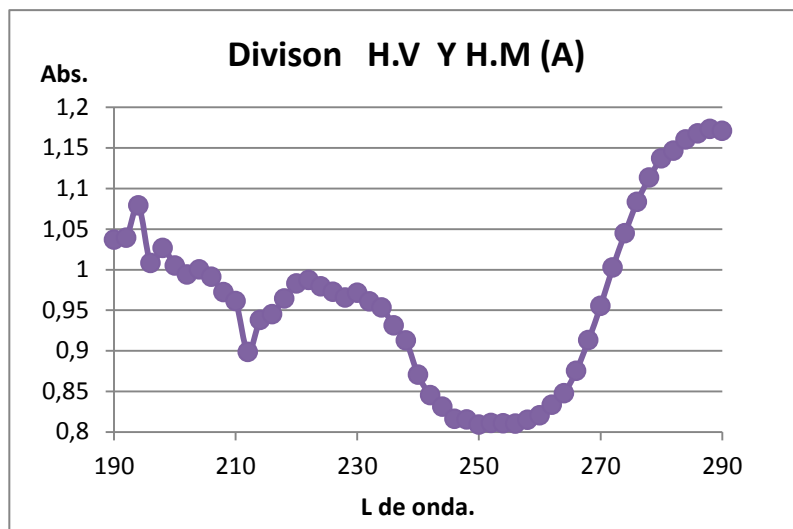
Comparando la semilla con la hoja morada se pone en evidencia clarísima que hay tres picos; uno a 226 nm, otro a 240 nm y otro a 280 nm y hay un valle importante a 260 nm. Esto se interpreta como un diferencial de ácidos nucleicos (260nm) y proteínas (280nm), el primero a favor de la hoja morada y el segundo a favor de semilla.



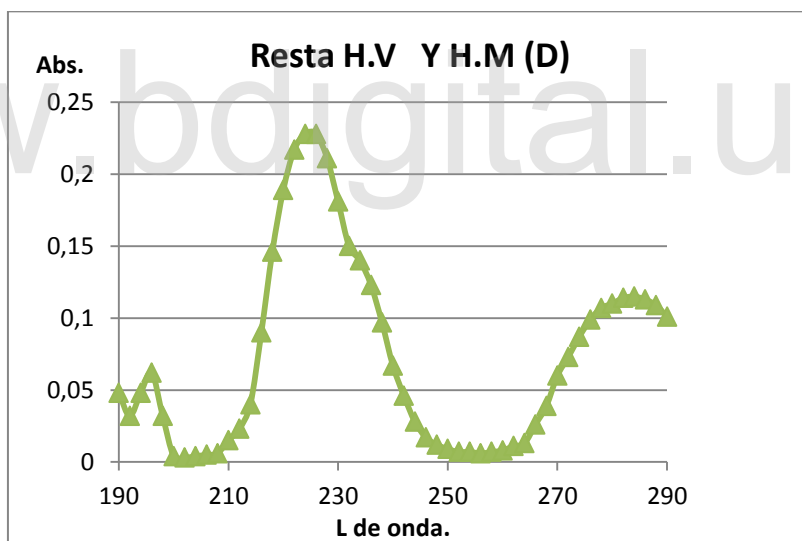
**GRÁFICA 28.** Espectros diferenciales descendentes de los extractos etanolicos de la semilla y hoja Morada a (190- 290nm).



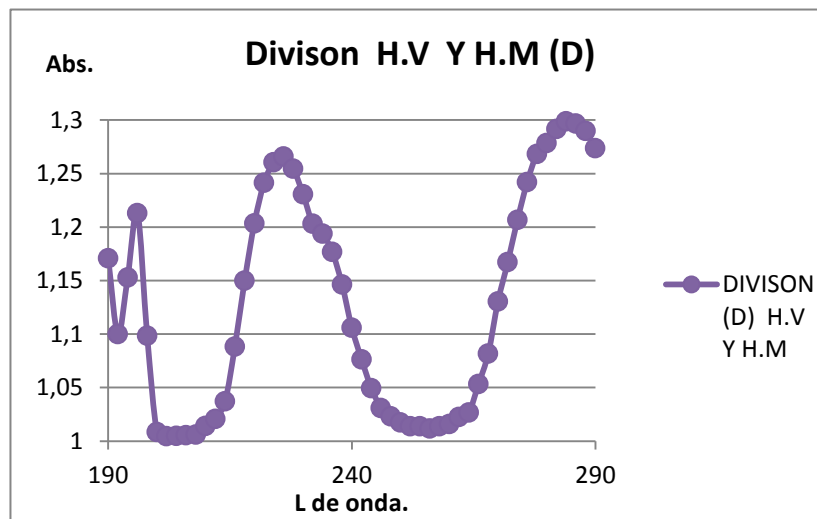
**GRÁFICA 29.** Resta de los espectros Ascendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm)



**GRÁFICA 30.** División de los espectros Ascendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm)



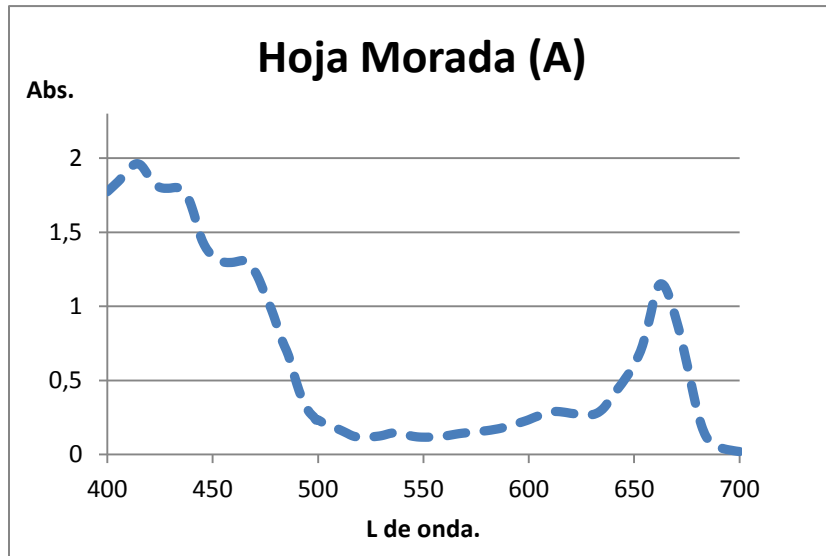
**GRÁFICA 31.** Resta de los espectros Descendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm)



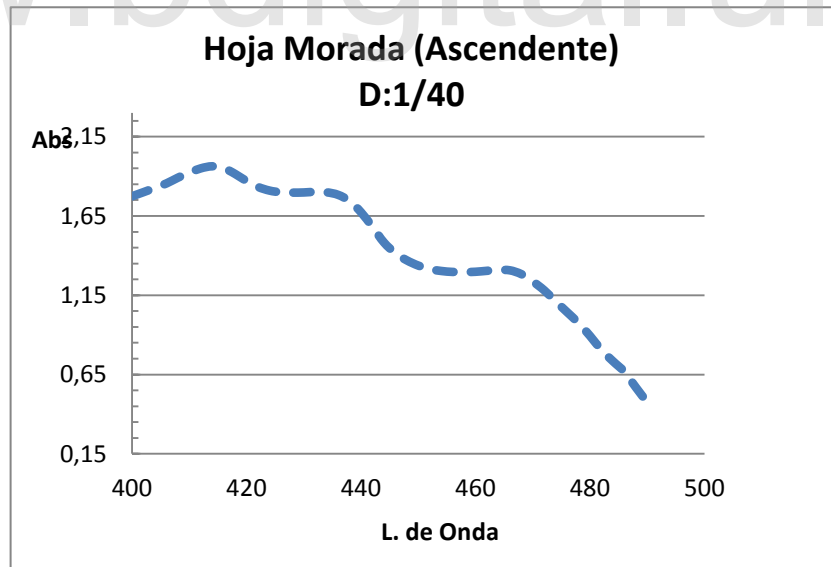
**GRÁFICA 32. División de los espectros Descendentes de los extractos etanolicos de la hoja Verde y Morada a (190 – 290 nm)**

En estos espectros diferenciales tenemos un valle producido por la hoja morada a 254 asociados a (Ácidos Nucleicos) y dos picos uno en 224 nm y otro a 282 nm producidos por la hoja verde asociados a (proteína) y otro valle en 204 nm. (Ver gráficos 39 y 40)



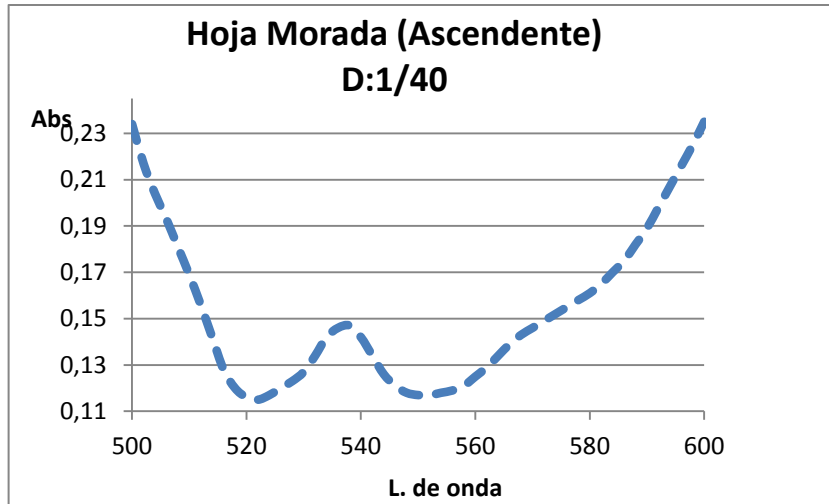


**GRÁFICA 33.** Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (400-700 nm)



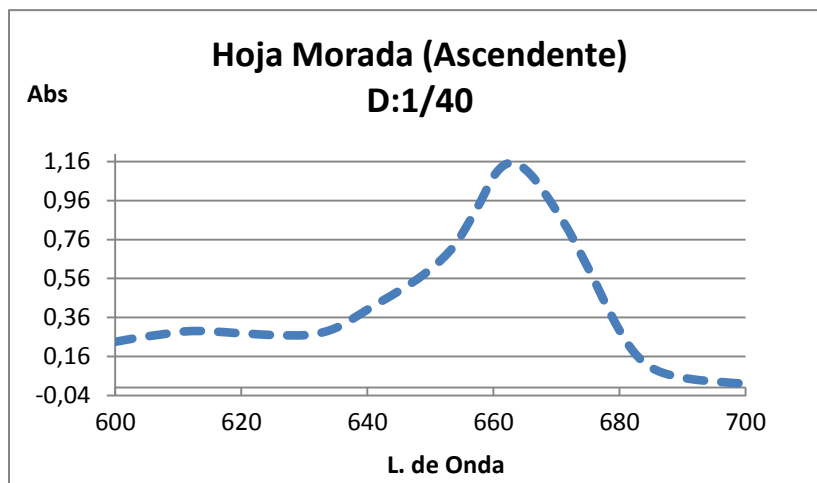
**GRÁFICA 34.** Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (400-500 nm)

En los espectros de hoja morada onda corta tres picos a 412, 434 y 466 nm que revelan la presencia de clorofila (A) y (B) respectivamente con dos valles a 422 y 448 nm.



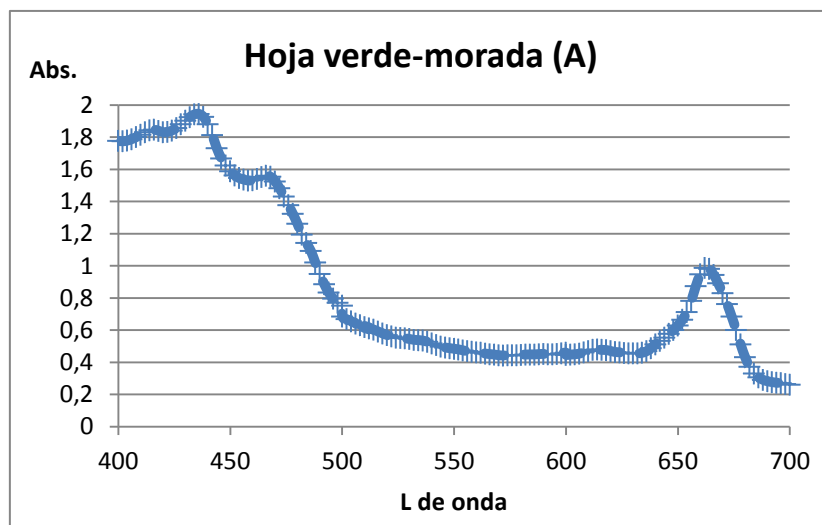
**GRÁFICA 35. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (500-600 nm)**

En este espectro se observan dos valles a 520 y 550 con un pico máximo a 536 nm los cuales se asocian a la presencia de b-xantina y ficocianina.

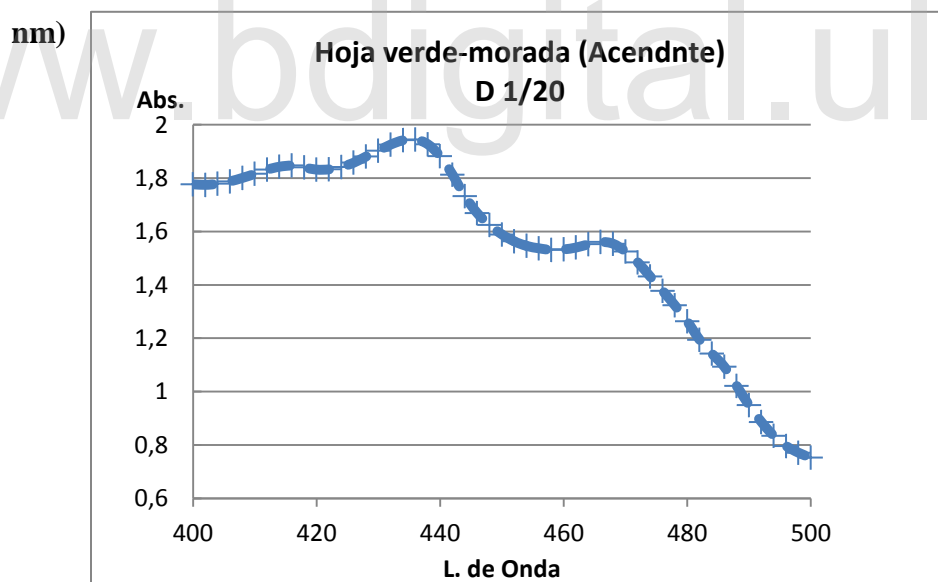


**GRÁFICA 36. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Morada (600-700 nm)**

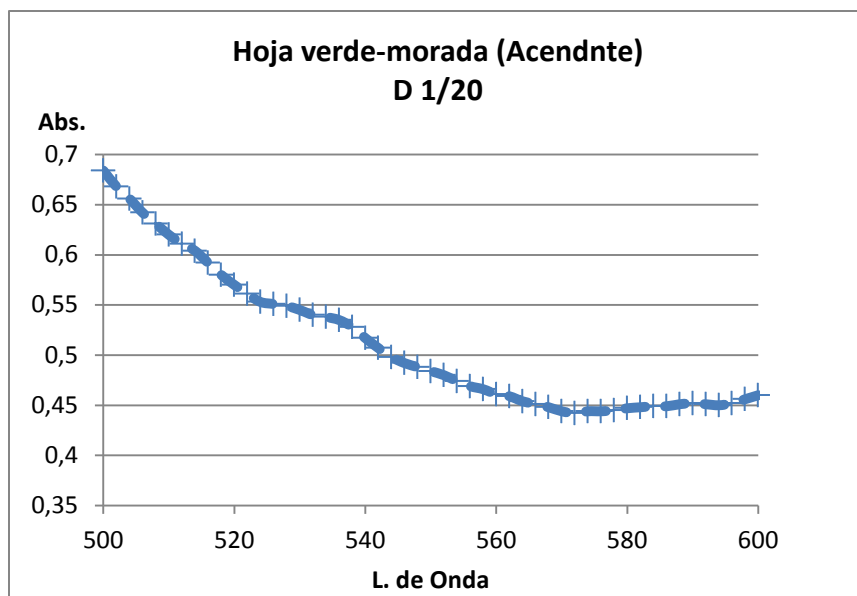
Hay un pico máximo a 664 asociados a clorofila (A)



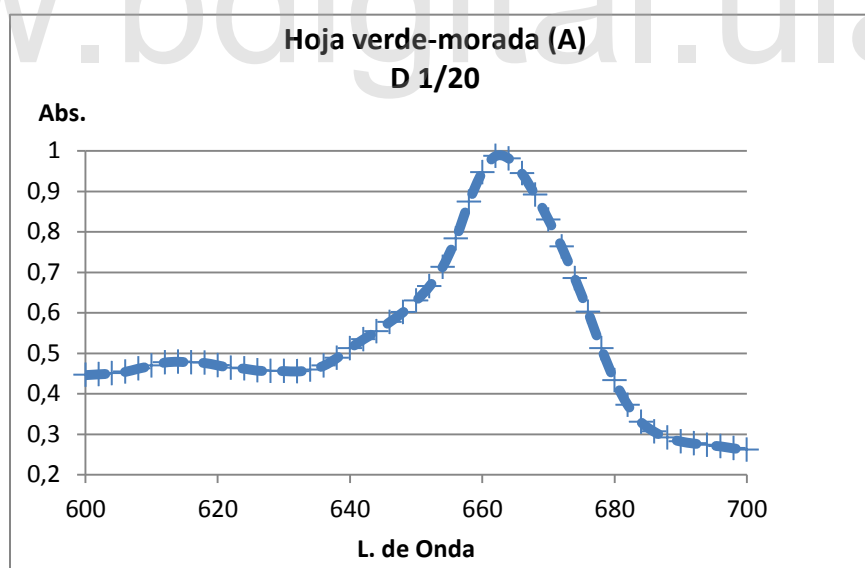
**GRÁFICA 37. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde -morada (400-700**



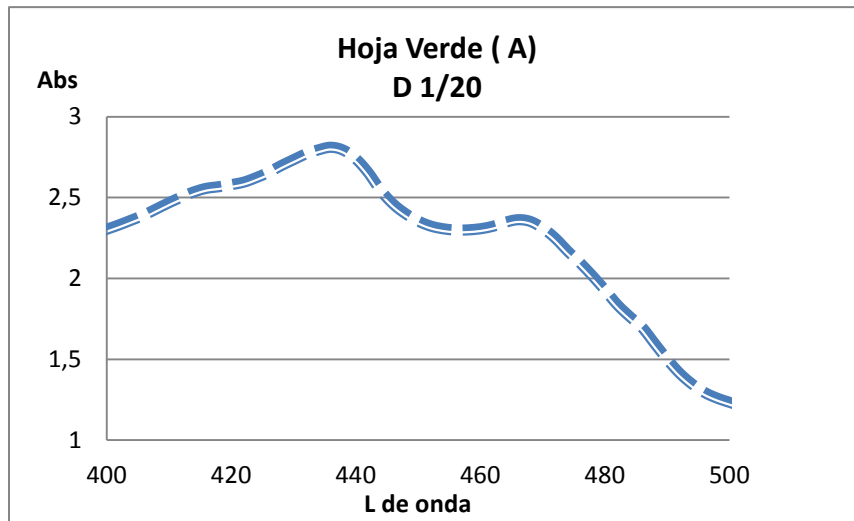
**GRÁFICA 38. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (400-500 nm)**



**GRÁFICA 39.** Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (500-600 nm)



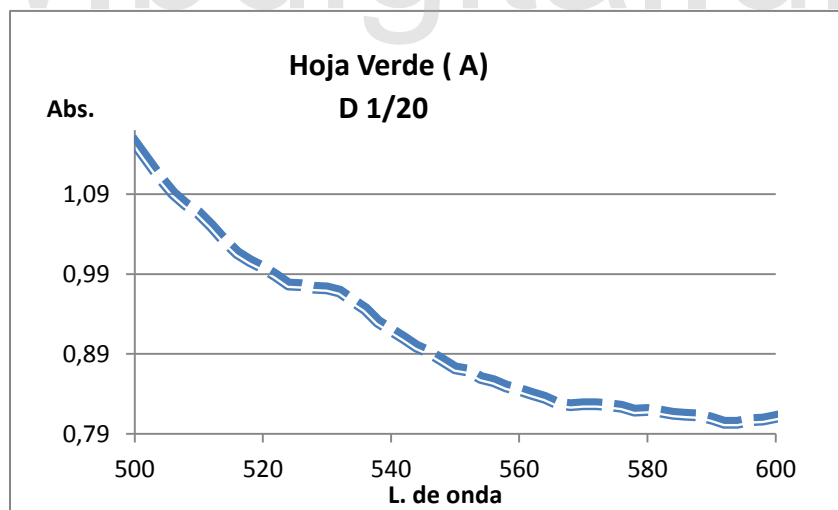
**GRÁFICA 40.** Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde-morada (600-700 nm)



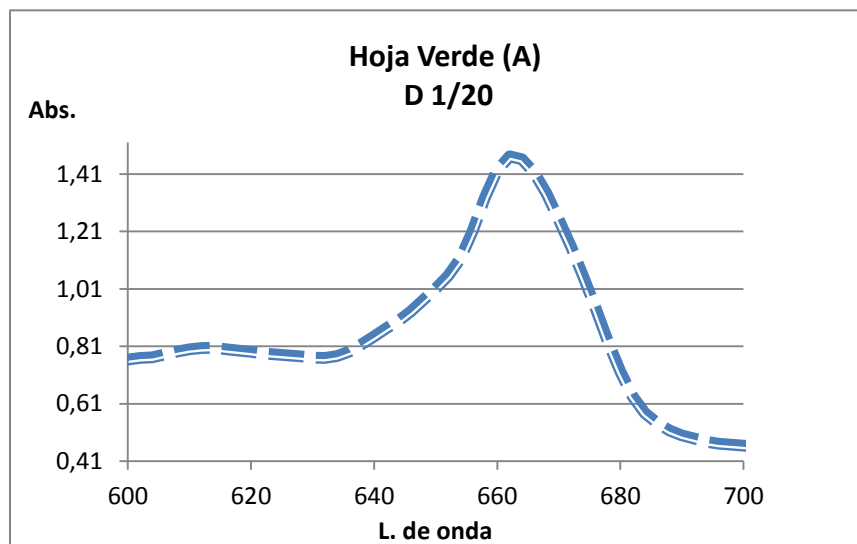
**GRÁFICA 41. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (400-500 nm)**

Se observan dos picos a 434 y 466 nm asociado a la clorofila (A) y (B).

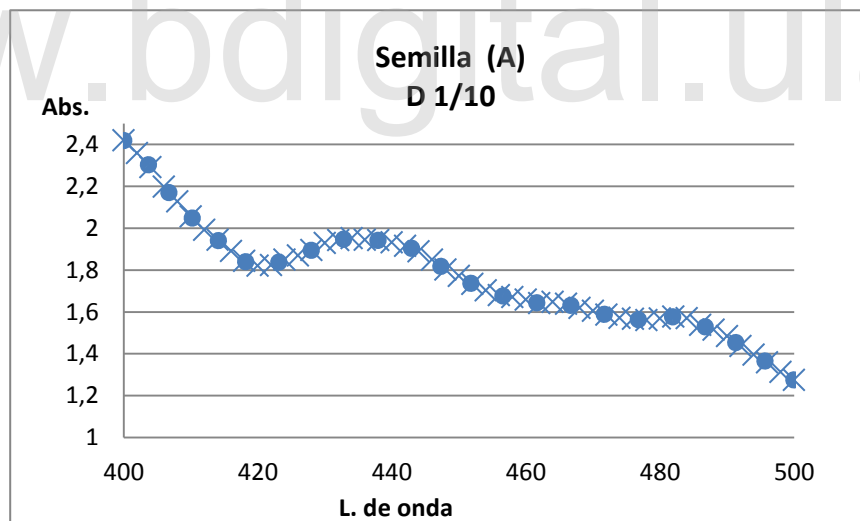
Y un valle a 450 nm.



**GRÁFICA 42. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (500-600 nm)**

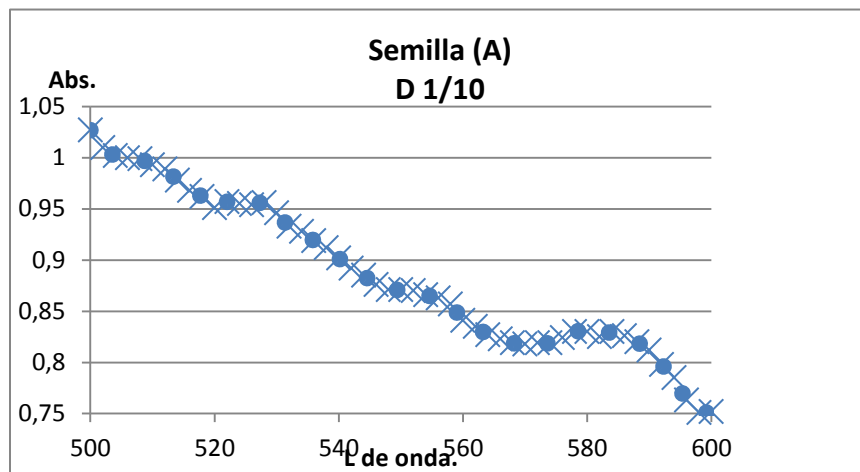


**GRÁFICA 43. Espectro ascendente de extracto etanólico de hoja Verde (600-700 nm)**



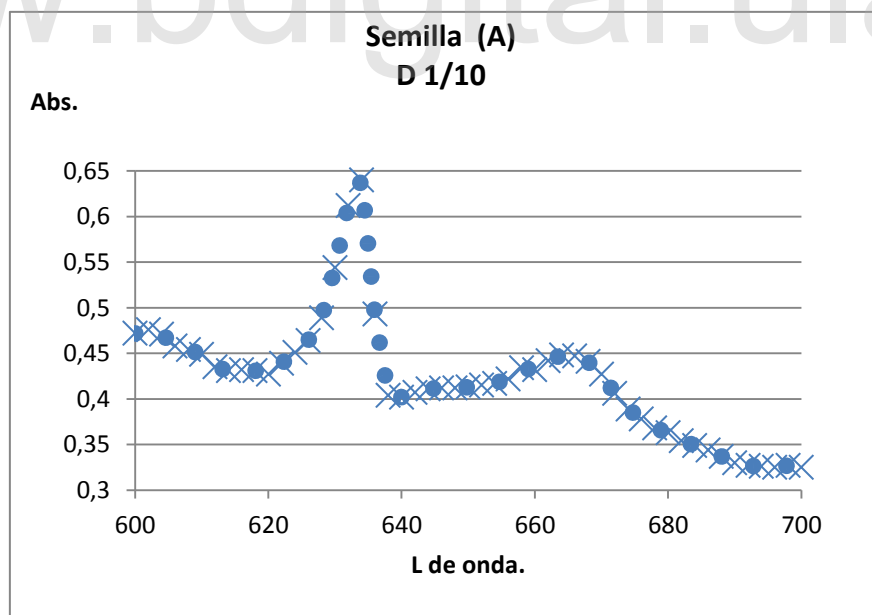
**GRÁFICA 44. Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (400-500 nm)**

En este espectro se observan 1 valle a 420 nm y 2 picos a 434 nm (clorofila (A) y 480 nm que podría tratarse de un pigmento llamado carotenoides, además hay una meseta en caída a 450 nm.



**GRÁFICA 45. Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (500-600 nm)**

Hay dos platos y una caída alrededor de 520 y 550 nm con un valle a 566 y un pico a 580 nm. Este se relaciona con la presencia de ficobiliproteínas.



**GRÁFICA 45. Espectro ascendente de extracto etanólico de la Semilla (600-700 nm)**

En este espectro vemos un pico muy bien definido que absorbe a 634 nm mostrando actividad específica y muy alta revelando la presencia de clorofila (C) y otro pico menos marcado a 664 nm (clorofila A)

### 4.3 Resultados de la cromatografía.

Para los estudios de cromatografía en capa fina, se emplearon placas Merck TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> N° 1.05554\_0001 20x20cm ajustada a 10 cm por cada lado, la misma se colocó durante 60 minutos en una estufa a 37° C para su respectiva activación.

**Tabla 6**

**Cantidades de extractos utilizados en la cromatografía.**

<b>Hoja Verde</b>	<b>Hoja Verde-morada</b>	<b>Hoja Morada</b>	<b>Semilla</b>
5ul y 10ul (D 1/20)	5ul y 10ul (D1/20)	5ul y 10ul (D 1/40)	5ul, 10ul y 15ul (D 1/10)

Se empleó como fase móvil un solvente compuesto por: 100mL de acetato de etilo, 17mL de metanol y 13mL de agua destilada. La corrida completa se realizó en 35 minutos en la oscuridad. La corrida se realizó hasta que el solvente alcanzó la línea de frente.

Después de la corrida, la placa se colocó en una estufa á 37° C por una hora. Se observó en luz blanca, luz UV onda corta 254 nm y luz UV onda larga 365 nm, en los casos se fotografió la placa **Figuras 25, 26 y 27** y luego se guardó en una estufa á



37° C envuelta en papel marrón. La lámpara utilizada es marca Mineralight Modelo UVL-25, 115 Volts, 60 Hz, 0,15 Amps / Ultra-Violet Products INC. San Gabriel California, U.S.A.

**En la tabla 8** se muestran los resultados de la cromatografía de las muestras 1 (hoja morada), 2 (Hoja verde-morada), 3 (hoja verde) y 4 (semilla) sembradas a diferentes concentraciones (5, 10 y 15µl) visualizadas bajo luz visible, UV onda corta (254nm) y UV onda larga (365). En la **tabla 7** se muestran los Rf correspondientes a las bandas visualizadas, a las cuales se les asignó un número en orden creciente de acuerdo a su aparición.

Además en la **tabla 8** se colocaron sólo los valores de Rf a la condición de luz en la que la banda es más evidente, mientras que el signo positivo (+) indica la presencia y el negativo (-) la ausencia de las mismas.

**Tabla 7**

**Referencia de las bandas cromatográfica**

<b>Número de bandas</b>	<b>Rf</b>
1	0,93
2	0,85
3	0,77
4	0,63
5	0,44
6	0,36
7	0,27
8	0,24
9	0,20
10	0,11

**Tabla 8**

**Cromatografía observada en luz visible, luz UV onda corta (254 nm) y luz UV onda larga (365nm).**

n de Banda	RF	H.M 5 ul			H.M 10 ul			H.V-M 5 ul			H.V-M 10 ul			H.V 5 ul			H.V 10 ul			S 5 ul			S 10 ul			S 15 ul		
		LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI	LV	Oc	OI
1	0,93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	0,85	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
3	0,77	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
4	0,63	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	0,44	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,36	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,27	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9	0,20	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

**Leyenda:**

Lv: Luz visible	Extracto de hoja morada (5 y 10 ul)	Extracto de hoja verde (5 y 10 ul)
Oc: onda corta	Extracto de hoja verde-morada (5 y 10 ul)	Extracto de semilla (5 y 10 ul y 15)
OI: onda larga		

En primer lugar es importante acotar que las bandas observadas pueden variar su intensidad lumínica debido a las diferentes concentraciones de los extractos utilizados, por lo que se utilizaran los mismos Rf de las bandas que estén al mismo nivel de expresión.

La banda 1 con un Rf de (0,93) observada en el extracto de las hojas moradas, verde- moradas y verdes así como en los de la semilla a luz visible, posiblemente corresponde a un pigmento denominado clorofila la cual puede variar en sus tipos (a, b y c) también se observa que varía la intensidad de la manchas en los extractos de las semilla posiblemente por la baja concentración de este pigmento. Estas manchas se relacionan directamente con los picos a 440 y 466 nm de los espectros.

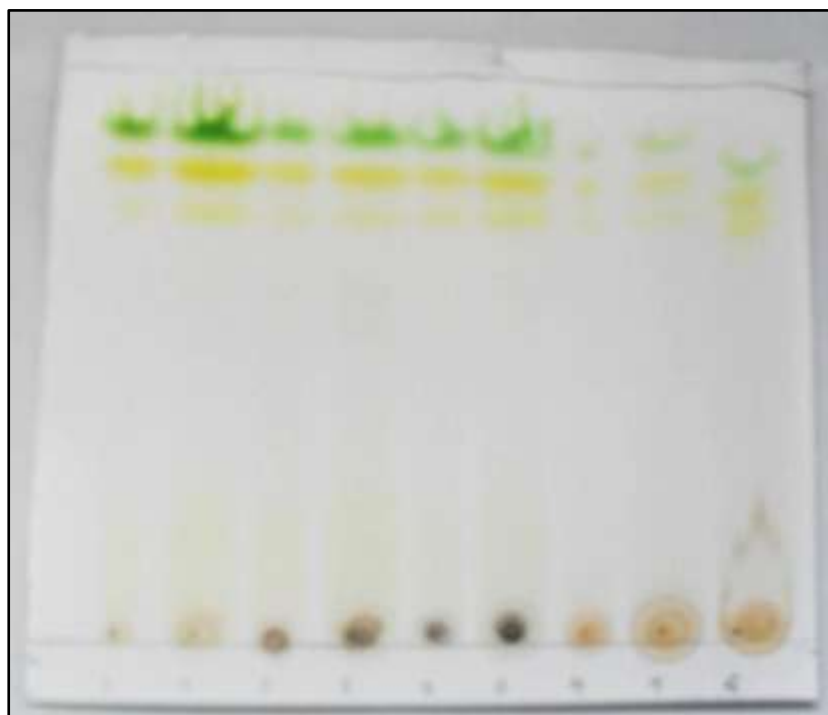
La banda 2 con un Rf (0,85) a luz visible se observa en el extracto de las hojas moradas, verde- moradas y verdes así como en los de la semilla y refleja levemente la luz UV onda corta en la hoja morada.

La banda 3 se observa a luz visible en todos los extractos y absorbe luz UV onda corta y onda larga con un Rf (0,77) en el extracto de la hoja verde-morada y verde.

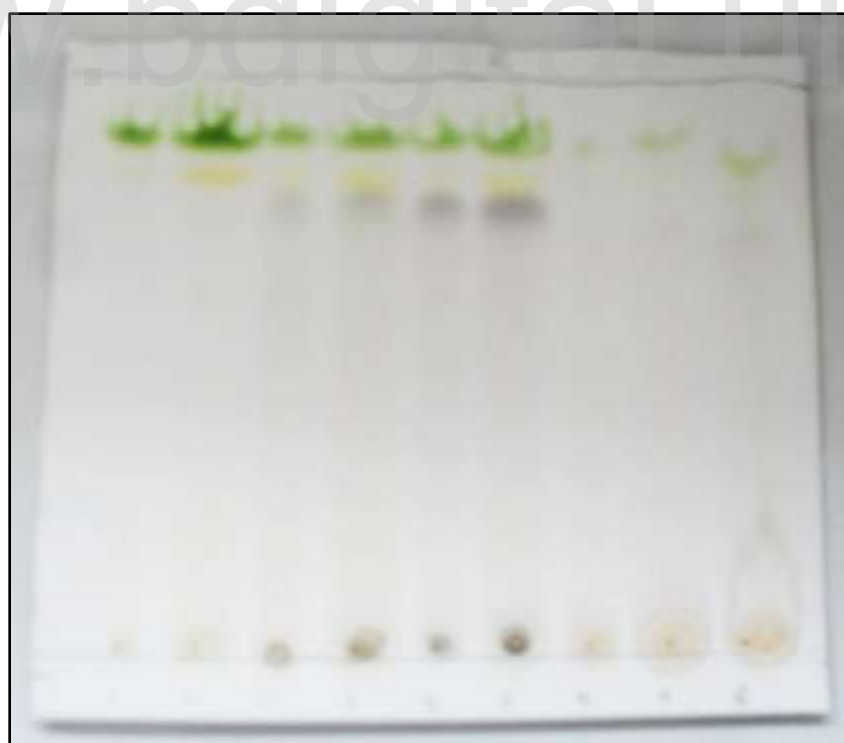
Existe una 4ta banda de color anaranjado en la hoja morada y verde-morada que indica foto conversión, esta posee un Rf (0,63) y se ven más o menos iguales en la parte de arriba al nivel de la mitad de la placa.

Otra banda que refleja la luz UV onda corta siendo su Rf (0,44) es la 5ta, esta se expresa con mayor intensidad en el extracto de la hoja verde-morada y verde con mayor concentración siendo muy leve al nivel de la hoja morada.

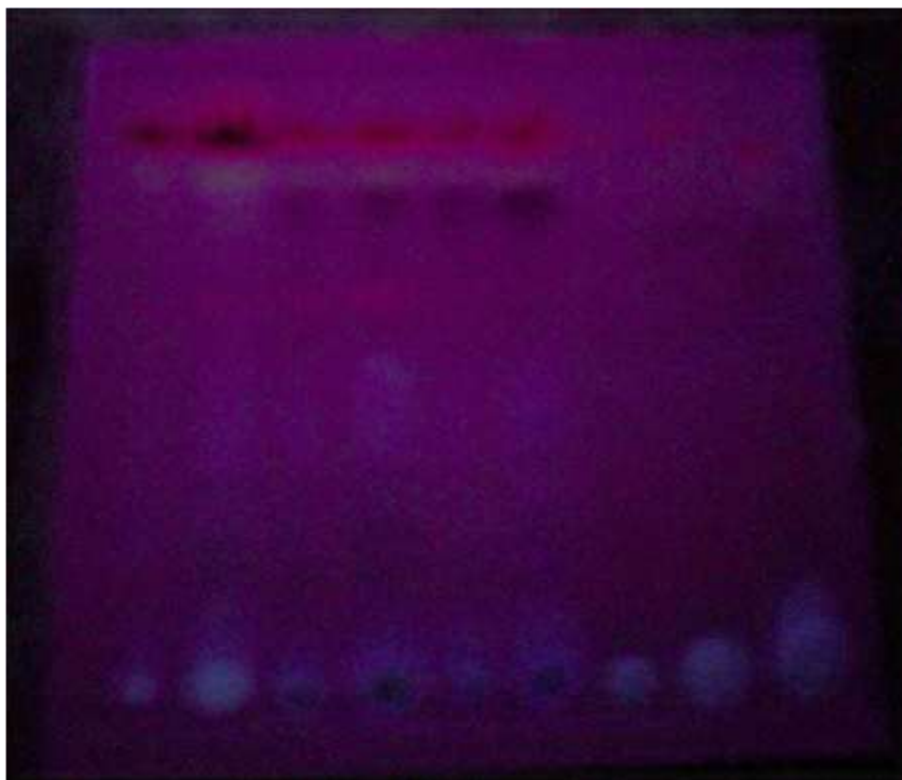
Las bandas 6, 7, y 9 absorben luz UV onda larga, sus Rf son (0,36) (0,27) (0,20) respectivamente, se expresan en los extractos con mayor concentración de las hojas moradas y verde-moradas siendo casi imperceptible en la hoja verde.



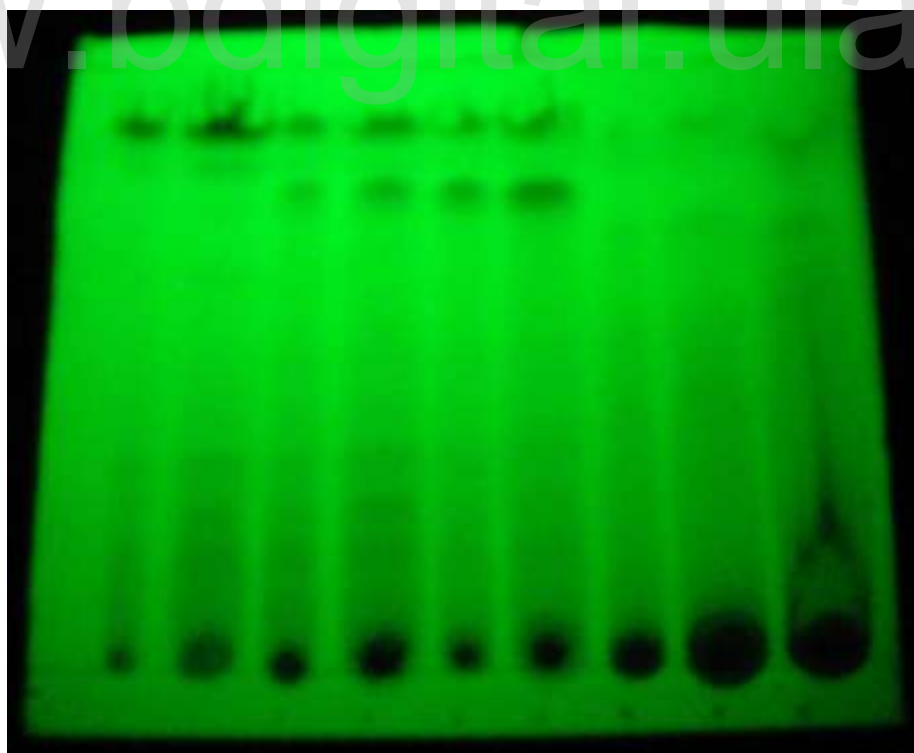
**Figura 22.** Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz visible.



**Figura 23.** Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz visible



*Figura 24. Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz UV onda corta.*



*Figura 25. Cromatografía de los extractos etanólicos de hojas y semillas a luz UV onda larga.*

## CONCLUSIONES

En los resultados de fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría, se demostró lo siguiente:

Existe di sincronía con el pico a 210 nm en la hoja verde ascendente con respecto a la descendente, lo que demuestra la existencia de una fotosensibilidad, expresada por una posible variación molecular.

Se ha detectado una especie de “escalera” con 6 escalones, similares a los encontrados por Duque (2015) en los espectros diferenciales de resta y división del extracto etanólico del pimpollo en la planta *Lupinus s.l meridanus* Moritz. Al igual que en ese caso se concluye que estamos en presencia de una dinámica molecular fotovoltaica, que genera una transmisión de energía en varios niveles o “celdas”.

Además en el caso del extracto de la hoja verde, estudiada en el rango de 290 – 390 nm, posee un diferencial Ascendente – descendente que se muestra como una doble sigmoideal con una “zona perfecta” desde 332 – 340 nm. También se observa que en el “plateau” a menor longitud de onda los coeficientes de extinción son aproximadamente a la mitad de los valores que en el “plateau” a mayor longitud de onda, lo que indica que hay un equilibrio entre formas moleculares que existen en esta región (el mínimo son dos formas moléculas).

Hay una serie de picos de absorción especiales, en los espectros diferenciales de la semilla y la hoja morada, el mayor pico a 280 nm son proteínas y el valle a 260 son ácidos nucleicos. Hemos concluido que la semilla tiene un mayor contenido de proteínas que la hoja morada y el resultado es a la inversa para los ácidos nucleicos.

En los espectros y la cromatografía de la semilla hay menor expresión de los tejidos fotosintéticos y más de los tejidos reproductivos, debido a que del fruto se separó el ala de la base seminal, siendo la parte más nutritiva por su contenido proteico, ácidos nucleicos y carbohidratos. Esto se aplica en los espectros visibles y ultravioleta.

En los espectros de luz visible se evidencia la presencia de diversos compuestos. En los espectros de las hojas se evidencia la presencia de las clorofilas (A) a 440 con otro pico menos marcado a 664 y (B) a 466.

La semilla tiene clorofila (A) y carece de clorofila (B), en su lugar contiene clorofila (C) con gran fotoactividad revelada en el pico a 634 nm. También se observa un pico a 480 nm que podría tratarse de un pigmento llamado carotenoides y un pico a 580 nm relacionado con la presencia de ficobiliproteínas.

En el análisis de resultados de la cromatografía la banda 2 con un Rf (0,85) a luz visible se observa en el extracto de las tres hojas, así como en los de la semilla, y refleja levemente la luz UV onda corta en la hoja morada, esta podría corresponder a un compuesto denominado Beta-xantina perteneciente a los flavonoides, este corresponde al pico observado a 536 nm del espectro de la hoja morada.

El método utilizado para el análisis e identificación de sustancias químicas ha demostrado ser una estrategia de gran invención, en primer lugar permite la identificación de sustancias fotosensibles por medio de la espectrofotometría y dependiendo de los hallazgos se precede a la purificación de las moléculas de interés.

## RECOMENDACIONES

Identificar las celdas fotovoltaicas naturales presentes en las formas inmaduras del tejido vegetal que tiene “forma de escalera” en el espectro UV onda larga del extracto de la hoja morada.

Un adecuado estudio de fotosensibilidad en la zona perfecta (332 – 340 nm) encontrada en los extractos de la hoja verde.

Realizar ensayos de las sustancias fotosensibles encontradas, como herramienta para la terapia fotodinámica.

Desarrollar un estudio preventivo en cuanto a leguminosas utilizadas como alimento en la ganadería venezolana.

www.bdigital.ula.ve



## REFERENCIAS

Adrián-Romero, M., Blunden, G., Patel, A., Arnstromg, N., Meléndez, P. & Carabot, A. 2007. Betaines and N-Methylprolines from Venezuelan Plants. *Natural Product Communications* (2) 863-868.

Aldana R., Páez D. (2014). *Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de extractos etanólicos de la hoja y epitelio de Anonna muricata*. Tesis de grado no publicada, Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de los Andes, Merida.

Alfonso, G. (2003). *Remington Farmacia*. Tomo I. 20 ed. Buenos Aires. Editorial Panamericana. 686.

Alonso, O. F. (2000). Educación médica continúa El Sol y la piel. Fotodermatosis. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 9(2) 126-135.

Animashaun, T., Mahmood, N., Hay, A. J., & Hughes, R. C. (1993). Inhibitory effects of novel mannose-binding lectins on HIV-infectivity and syncytium formation. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 4(3), 145-153.

Baptista Triconis, T. J. (2007). *Acreditación como médico especialista. Guías básicas para elaborar el proyecto de tesis*. Mérida, Venezuela: Universidad de Los Andes, vicerrectorado académico CODEPRE.

Boudaoud, L., Khelifi, S., Mostefaoui, M., Rouabhia, A. K., & Sahouane, N. (2015). Numerical study of InGaN based photovoltaic by SCAPs simulation [Estudio numérico de la fotovoltaica basada InGaN por SCAPS simulación]. *Energy Procedia*, 74, 745-751.

Burnham, R. J., & Johnson, K. R. (2004). South American palaeobotany and the origins of neotropical rain forests. [Paleo botánica de América del Sur y los orígenes de las selvas neotropicales.] *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* (359), 1595-1610.

Cano Celada, Pedro. (2008). *Fotosensibilización*. [Documento en Línea]. Disponible: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/.../FOTOSENSIBILIZACION.doc> [Consulta: 2015, Noviembre 04] utilizo en año de publicación en la web para citar o no.

Castro, J., Cabrera, H., Grassi, C., & Andrades, E. D. (2012). Tratamiento de carcinoma basocelular con terapia fotodinámica sistémica. *Revista Colombiana de Cancerología*, 16(3), 154-161.

Casotto, M. 1984. Study of the seed lectins of Venezuelan Papilionoideae (Leguminosae). *Acta Cient. Venez.* 35: 248-252.

Dávila, M.A., Sangronis, E., Granito, M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Rev. ALAN [Revista en línea]*, (53) Extraído el 29 de junio del 2011. Desde <http://www.scielo.org.ve>

Da silva, E. et al (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* (46), 118- 122

Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P. y Fiñana, I. T. (2005). 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Córdoba.*

Didier Walter, F. B. C. W., Brum da Silva, F. L. y Aerts de Castro, D. R. (2014). Hábitos de exposición al sol y el uso de protección solar entre los estudiantes universitarios en Teresina, Piauí. *Revista Epidemiología y Salud Servicios*, [Revista en Línea], 23 (3), 487-496. Disponible: <http://www.scielo.org.ar> [Consulta: 2015, Noviembre 04]

Díaz, L., De Montijo, S., Medina, A. L., Meléndez, P., Laurence, V., y Marti-Mestres, G. (2011). Actividad del extracto etanólico de las hojas de *Machaerium floribundum* contra bacterias que inducen el acné y su efecto citoprotector y antioxidante sobre fibroblastos. *Revista Peruana de Biología*, [Revista en Línea], 18(2), 153-158. Disponible: Web:<http://www.scielo.org.ve> [Consulta: 2011, Junio 01]

Duque-Duque, R.C. (2015) *Fotosensibilidad y Fotoactividad del Grupo Hemo y de las Porfirinas de Lupinus s.l meridanus* Moritz. Tesis de grado no publicada, Instituto de Investigaciones. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Espinoza, A., y Ubaldo, E. (2011). *Evaluación del efecto anticancerígeno y citotóxico in vitro de la porfirina no simétrica A3B NS1 en el compuesto HS01 de la planta hibiscus sabdariffa y la proteína quimérica E2-IL-18*. Tesis Doctoral no publicada, Universidad Autónoma de Nuevo León. Disponible: <http://eprints.uanl.mx/2305/1/1080221566.pdf> [Consulta: 2016, Enero 17]

ElSohly, H. N., Joshi, A. S., & Nimrod, A. C. (1999). Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*. [isoflavonas antiardiásica de *Machaerium aristulatum*] *Planta medica*. (65) 490

Flores M. (2014). *Evaluación preliminar de la fotoactivación y fototoxicidad del acíbar de plantas de Sábila*. Tesis de grado Tesis de grado no publicada,

Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes, Mérida.

Ferrándiz, C. (2009). *Dermatología clínica* (3ª. ed.). Barcelona: Elsevier

Ginzburg, S. (1977). Plantas medicinales de los indios bribris y cabécar. *América Indígena*, 37(2), 367-98.

Giraldo, D. (2011). *Aspectos Sistemáticos de las especies Machaerium biovulatum Micheli, M. humboldtianum Vogel, M. seemanii Benth ex Seem. (Leguminosae) de Venezuela y detección en sus extractos alcohólicos de la presencia de compuestos fenólicos, terpénicos, alcaloidales y con actividad antioxidante.* Informe de investigación de materia especial no publicado. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Farmacia Cátedras de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Universidad de Los Andes, Mérida.

Graham, P. H., y Vance C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* (131), 872 – 877.

Gómez, Marcelo. M. (2006). *Introducción a la metodología de la investigación científica.* Argentina: Brujas.

Heinrich, M., Rimpler, H., y Barrera, N. A. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(1), 63-80.

HM Stationery Office, (1980). *British Pharmacopoeia Volume III Monographs Formulated Preparations: General Monographs*

Hoult, J. R. S., y Paya, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. [Acciones farmacológicas y bioquímicas de las cumarinas simples: los productos naturales con potencial terapéutico.] *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 713-722

House, J. K., George, L. W., Oslund, K. L., Galey, F. D., Stannard, A. W., y Koch, L. M. (1996). Primary photosensitization related to ingestion of alfalfa silage by cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(9), 1604-1607.

Jang, D. S., Park, E. J., Kang, Y. H., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J. G., ... & Kinghorn, A. D. (2003). Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. *Journal of natural products*, 66(9), 1166-1170.

Joly, L. G., Guerra, S., Septimo, R., Solis, P. N., Correa, M., Gupta, M., ... & Sandberg, F. (1987). Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in Western Panama. Part I. *Journal of ethnopharmacology*, 20(2), 145-171.

Kim, A. y Chong, B. F. (2013). Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus. *Photodermatology, Photoimmunology y Photomedicin*, [Revista en Línea], 29(1), 4-11 Disponible: <http://onlinelibrary.wiley.com> [Consulta: 2015, Octubre 25]

Klitgaard, B. y Lavin, M. (2005). Tribe Dalbergieae. In: *Legumes of the world* The Royal Botanic Gardens, Kew. 307-335.

Korbut, N., Ojeda, A., & Muñoz, D. (2009). Evaluación del perfil bromatológico y de algunos parámetros físicos del follaje de plantas leñosas consumidas por

vacunos en silvopastoreo en un bosque seco tropical semideciduo. *Zootecnia Trop*, 27(1), 65-72.

Kurosawat, K., Ollist, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., & De Oliveira, A. B. (1978a). Mucronustyrene, mucronulastyrene and villostyrene, cinnamylphenols from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. *Phytochemistry*, 17(8), 1389-1394.

Kurosawa, K., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., & de Oliveira, A. B. (1978b). Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. *Phytochemistry*, 17(8), 1405-1411

Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B., and Lock, M. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.

León Hurtado, I. Y Torro Garrido, J. (2007). *Paradigmas y métodos de investigación en tiempos de cambio*. Caracas: Libros El Nacional CEC, SA.

Lock de Ugaz, O. (1988). Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima-Perú. *Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú*.

López Ramos, C.D (2014), *Estudio de Fotosensibilidad, fotoprotección y Actividad Biológica de los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta (Bidens pilosa L.) preparados en la oscuridad* Tesis de grado Tesis de grado no publicada, Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de los Andes, Mérida.

- Lozano, P. y B. Klitgaard. (2006). The genus *Machaerium* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergiae) in Ecuador. *Brittonia* (58), 124-150.
- Martí, M. Á. C. (1998). «Aspectos ecotoxicológicos de las maderas tropicales». *Observatorio medioambiental*, (1), 257.
- McKey, D. (1994). Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In *Advances in Legume Systematics, part 5, the nitrogen factor* (Sprent J. I. and McKey, D.). Royal Botanic Gardens, Kew, 211–228
- Meléndez, P. (2000). *Estudio taxonómico del género Machaerium en el estado Mérida*. Trabajo de Ascenso no publicado, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida.
- Melendez, P.A. (2009 a). Sinopsis del género *Machaerium* pers. (leguminosae-papilionoideae-dalbergiae) en Venezuela. *Acta Bot. Venezuela*, (32), 363-416.
- Meléndez P.A. (2009b). *Estudio sistemático del género Macherium Pers. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) en Venezuela: taxonomía, distribución y consideraciones filogenéticas*. Tesis Doctoral. SIBIO. Departamento de Ciencias Ambientales. Universidad de Alicante. San Vicente del Raspeig, España.
- Méndez J., Rosales, D. (2013). *Moléculas potencialmente fotosensibles, fotoactivables en el zumo de la pulpa madura, verde y hojas del noni, Morinda citrifolia*. Tesis de grado Tesis de grado no publicada, Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de los Andes, Mérida.
- Mendoza, I. A., Pérez, D. A., Gómez, J. F. B., Ortega, B. C., Cázares, J. P. C., de la Barreda Becerril, F., y Navarrete, L. J. (2014). Recomendaciones clínicas para la

fotoprotección en México. *Dermatología CMQ* [Revista en Línea], 12(4), 243-255. Disponible: [www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/](http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/) [Consultado: 2015, Noviembre 05]

Murray, R. D. H., Méndez, J., y Brown, S. A. (1982). *The natura, coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons.

Muhammad, I., Li, X. C., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Dunbar, D. C., & Ferreira, D. (2003). Antimicrobial and Antiparasitic (+)-trans-Hexahydrodibenzopyrans and Analogues from *Machaerium m. ultiflorum*. *Journal of natural products*, 66(6), 804-809.

Ochoa Ochoa, W. (2012). *Toxicología de la fotosensibilización en ganaderías de leche*. Trabajo de grado no publicado. Universidad de Cuenca Facultad de ciencias Agropecuarias, escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Disponible: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/432/1/TESIS>. [Consultado: 2015, Noviembre 07]

Ogiyama, K., y Yasue, M. (1973). Constituents of *Machaerium pedicellatum* heartwood. *Phytochemistry*, 12(10), 2544-2545. Olaya, J. M. y Mendez, J. (2003). Guía de plantas y productos medicinales. *Convenio Andres Bello*. 10-13.

Olinda, Roberio G., Medeiros, Rosane M.T., Dantas, Antônio F.M., Lemos, Ricardo A.A. de, y Riet-Correa, Franklin. (2015). Poisoning by *Enterolobium contortisiliquum* in cattle in Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(1), 44-48.

Oliveira, A. B., Gottlieb, O. R., Ollis, W. D., & Rizzini, C. T. (1971). A phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*. *Phytochemistry*, 10(8), 1863-1876.



Ollis, W. D., Redman, B. T., Sutherland, I. O., & Gottlieb, O. R. (1978a). Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. *Phytochemistry*, 17(8), 1379-1381.

Ollis, W. D., Redman, B. T., Roberts, R. J., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., & Magalhaães, M. T. (1978b). Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. Nictitans*. *Phytochemistry*, 17(8), 1383-1388.

Orellana, G., Villén, L., & Jiménez-Hernández, M. E. (2005). Desinfección mediante fotosensibilizadores: Principios básicos. *SolarSafeWater: Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*, ed. J. Blanco and MA Blesa, Unsam, San Martín, Argentina, 237-251.

PERSOON, C. 1807. *Machaerium*. In: Persoon, C. H. (ed.). *Synopsis plantarum seu enchiridium botanicum*. Part. 2. Pp. 276-277. Treuttel & Wurth, Paris.

Pérez Hernández, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficacia. *SEQC. Ed Cont Lab Clin* [Revista en Línea], 8.49-62 Disponible: [www.seqc.es/](http://www.seqc.es/) [Consulta: 2015, Noviembre 07]

Perussi Rodrigues, J. (2007). Inactivación fotodinámica de los microorganismos. *Revista Química Nova* [Revista en Línea], 30(4), 988-994. Disponible: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422007000400039&lng=en&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000400039&lng=en&tlng=pt). [Consulta: 2015, Noviembre 04]

Pittier, H. (1944). *Leguminosas de Venezuela. Papilionáceas*. Bol. Técn. N° 5. Ministerio de Agricultura y Cria. Servicio Botánico. Caracas.

- Plastino, E. M y Mansilla, A. (2004). *Luz y fotosíntesis. In: C. Werlinger. (Org.). Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos.* [Libro en Línea], Concepción: Consejo Nacional del Libro y la Lectura - Universidad de Concepción, [Libro en Línea], ed 1(1), 229-252. Disponible: <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/B> [Consulta: 2015, Septiembre 05]
- Polhill, R. M. (1994). *Classification of the Leguminosae.* Pages xxxv–xlviii in *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae* (Bisby, F. A., Buckingham, J., and Harborne, J. B.). Chapman and Hall, New York, NY
- Polhill, R. (1981). Papilionoideae. In: *Advances in legumes systematic.* Part 1. Royal Botanic Gardens
- Pujol –Lereis, M. L., Bochicchio, P., Rabossi, A. (2011). Xantenos y porfirinas, moléculas fotoactivables Empleadas en el control de insectos plaga. *Revista Química Viva.* [Revista en línea], (3). Disponible: <http://www.quimicaviva.qb>. [Consulta: 2015, Septiembre 28]
- Rodrigues P., J. (2007). Inactivación fotodinámica de los microorganismos. *Revista Química nova,* [Revista en línea], 30(4), 988-994. Disponible: <http://www.scielo.br/scielo.php> [Consulta: 2015, Noviembre 04]
- Ropana, R. (2009). *Fotosensibilización.* [Documento en línea] Disponible: [http://www.ropana.cl/plantas\\_toxicas/foto.htm](http://www.ropana.cl/plantas_toxicas/foto.htm)[Consulta: 2015, Noviembre 04]
- Rudd, V. (1977). The genus *Machaerium* (Leguminosae) in Mexico. *Bol. Soc. Bot.Mexico* (37) 119-146.
- Rudd, V. (1987). Studies in *Machaerium* (Leguminosae) VI. *Phytologia.* (62), 282-302.

- Rudd, V. (1999). Machaerium. In: Flora of the Venezuelan Guayana. Eriocaulaceae Lentibulariaceae. *Missouri Botanical Garden Press, St. Louis*, (5), 339-352.
- Seo, E. K., Kim, N. C., Mi, Q., Chai, H., Wall, M. E., Wani, M. C., ... & Tan, G. T. (2001). Macharistol, a New Cytotoxic Cinnamylphenol from the Stems of Machaerium aristulatum. *Journal of natural products*, 64(11), 1483-1485.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología fitoterapéuticos*. Editorial Convenio Andres bello.
- Soto D., y López F. (2012). *Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa madura y verde de los frutos de Couroupita guianensis Aubl.* Tesis de grado Tesis de grado no publicada, Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes, Mérida.
- Sprent, J. I. (2001). Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Tangerina, M. M. P. (2012). *Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: Machaerium hirtium Vell.* [Los extractos estandarizados para el tratamiento de enfermedades crónicas: hirtium Machaerium Vell.] Trabajo de grado no publicado, Universidad Estatal Paulista, Instituto de Quimica.
- Ubiergo, P. Y M. Lapp, M (2007). Caracterización morfológica de semillas de algunas especies de los géneros *Cassia* L. y *Senna* Mill. (Leguminosae Juss.) *Rev. Fac. Agron.* (24)
- Vallejo, E.O., Vargas, N., Martínez, L.M., Agudelo, C.A. y Ortiz, I.C. (2013). Perspectiva genética de los rayos UV y las nuevas alternativas de protección

solar. *Revista argentina de dermatología*. [Revista en Línea], 94(3), Disponible:  
Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo>. [Consulta: 2013, Noviembre 01]

Waage, S. K., Hedin, P. A., & Grimley, E. (1984). A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. *Phytochemistry*, 23(12), 2785-2787.

Virtuoso S.; Davet A., Dias J.F., Cunico, M. M., Miguel, M.D., Oliveira A.B., and Miguel, O.G. (2005). Estudio preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae) *Rev. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* (15). 137-142

Winfield, R. y G. Aymard. (2007). Fabaceae. In: *Catálogo ilustrado y anotado de las plantas vasculares de Los Llanos de Venezuela*. FUDENA, FUNDACIÓN POLAR, FIBV . 479-508.

Wojciehowski, M.F., Mahn, J. y Jenes, B. (2006). *Fabaceae.Legumes*. [Revista en Línea], (14), Disponible: <http://tolweb.org/Fabaceae/> [Consulta: 2014, Noviembre 15]

# ANEXOS

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



www.uniba.ve



Figura 2. *M. acuminatum* - A. Rama con  
flores. - B. Fruto