

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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE EN LAS PARTES
(HOJAS, SEMILLAS Y VAINAS) DE EXTRACTOS ACUOSOS
PREPARADOS A PARTIR DE *Machaerium robiniiifolium*.**

www.bdigital.ula.ve

Autores: Briceño S. Geraldine del C.

Cañizalez C. Mariángel L.

Tutor: Prof. Dávila M. Juan E.

Cotutores: Prof. Medina Gerardo

Prof. Meléndez Pablo.

Mérida, Julio de 2014

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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE EN LAS PARTES
(HOJAS, SEMILLAS Y VAINAS) DE EXTRACTOS ACUOSOS
PREPARADOS A PARTIR DE *Machaerium robiniiifolium*.**

www.bdigital.ula.ve

Autores: Briceño S. Geraldine del C.

Cañizalez C. Mariángel L.

Tutor: Prof. Dávila M. Juan E.

Cotutores: Prof. Medina Gerardo

Prof. Meléndez Pablo.

Mérida, Julio de 2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Resumen	
	Pag.
I.- Introducción	
✓ Las lectinas.....	1
✓ Las leguminosas.....	2
✓ El género <i>Machaerium</i>	4
✓ La Inmunología.....	7
✓ Antígenos y anticuerpos.....	8
✓ La hemoaglutinación.....	9
✓ Grupos Sanguíneos.....	9
✓ Proteínas.....	11
✓ La electroforesis.....	12
II.- Hipótesis.....	16
III.- Objetivos	
✓ Objetivo general.....	17
✓ Objetivo específico.....	17
IV.- Materiales y métodos	
✓ Separación de Las partes de la planta.....	20
✓ Preparación de los extractos.....	21
✓ Preparación de la solución de Glóbulos rojos.....	21
✓ Dilución de los extractos.....	23
✓ Pruebas de hemoaglutinación.....	23

✓ Criterios.....	24
✓ Evaluación de los extractos con mayor actividad.....	25
✓ Barrido espectrofotométrico.....	26
✓ Evaluación del perfil protéico.....	27
✓ Electroforesis.....	30
 V.- Resultados y Discusión.....	 33
 VI.- Conclusión.....	 55
 VII.- Referencias bibliohemerográficas.....	 58

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

✓ Tabla 1. Determinación del peso en fresco y obtención del extracto de las muestras procesadas una semana luego de la recolección.....	Pag. 33
✓ Tabla 2. Determinación del peso en fresco y obtención del extracto de las muestras procesadas inmediatamente luego de la recolección.....	33
✓ Tabla 3. Ensayos de hemoaglutinación en hojas dilución 1:10.....	34
✓ Tabla 4. Ensayos de hemoaglutinación en semillas dilución 1:10.....	35
✓ Tabla 5. Ensayos de hemoaglutinación en vainas dilución 1:10.....	35
✓ Tabla 6. Ensayos de hemoaglutinación en hojas dilución 1:10.....	36
✓ Tabla 7. Ensayos de hemoaglutinación en semillas dilución 1:10.....	36
✓ Tabla 8. Ensayos de hemoaglutinación en vainas dilución 1:10.....	36
✓ Tabla 9. Ensayos de hemoaglutinación en hojas dilución 1:10.....	37
✓ Tabla 10. Ensayos de hemoaglutinación en semillas dilución 1:10.....	37
✓ Tabla 11. Ensayos de hemoaglutinación en vainas dilución 1:10.....	38
✓ Tabla 12. Títulos de los extractos con mayor actividad hemoaglutinante (Semillas).....	39
✓ Tabla 13. Títulos de los extractos con mayor actividad	

hemoaglutinante (Semillas).....	39
✓ Tabla 14. Hemoaglutinación del extracto de hojas hasta la dilución 1:10.....	40
✓ Tabla 15. Hemoaglutinación del extracto de semillas hasta la dilución 1:10.....	40
✓ Tabla 16. Hemoaglutinación del extracto de vainas hasta la dilución 1:10.....	41
✓ Tabla 17. Títulos de actividad de los extractos de Semillas.....	42
✓ Tabla 18. Comparación de la actividad hemoaglutinante en extractos de semillas, obtenidos en diferentes tiempos de procesamiento.....	43
✓ Tabla 19. Comparación de la actividad hemoaglutinante en extractos de semillas, obtenidos en diferentes tiempos de procesamiento.....	44
✓ Tabla 20. Determinación cuantitativa de proteínas mediante el método de Warburg-Christian.....	46
✓ Tabla 21. . Determinación cuantitativa de proteínas mediante el método de Warburg-Christian.....	47
✓ Tabla 22. Cálculo de los Rf con sus respectivos pesos moleculares para cada muestra evaluada.....	54

INDICE DE FIGURAS

	Pág
✓ Figura 1. <i>Machaerium robiniifolium</i>	6
✓ Figura 2. <i>Machaerium robiniifolium</i>	18
✓ Figura 3. Frutos de <i>M. robiniifolium</i>	20
✓ Figura 4. Semillas de <i>M. robiniifolium</i>	20
✓ Figura 5. Solución de glóbulos rojos al 5%.....	22
✓ Figura 6. Diluciones 1:5 y 1:10 de los extractos.....	23
✓ Figura 7. Ensayos de hemoaglutinación, criterios 1 y 2.....	23
✓ Figura 8. Ensayos de hemoaglutinación, criterio 3.....	25
✓ Figuras 9 y 10. Diluciones seriadas en tubo y microplaca.....	26
✓ Figura 11. Corrida electroforética.....	31
✓ Figura 12. Espectro de barrido (200-300 nm).....	48
✓ Figura 13. Espectro de barrido (200-300 nm).....	48
✓ Figura 14. Determinación cuantitativa de proteínas en <i>M. robiniifolium</i> (Procesada una semana luego de su recolección).....	49
✓ Figura 15. Determinación cuantitativa de proteínas en <i>M. robiniifolium</i> (Procesada instantáneamente luego de su recolección).....	49
✓ Figura 16. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (concentración de 10%). Usando extractos obtenidos una semana luego de la recolección de la planta.....	51

✓ Figura 17. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (concentración de 10%). Usando extractos obtenidos el mismo día de la recolección de la planta.....	52
✓ Figura 18 y 19. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (concentración de 12,5% y 10%, respectivamente). Usando extractos obtenidos el mismo día de la recolección de la planta.....	53
✓ Figura 20. Curva de Calibración para estimar el peso molecular de las proteínas problema.....	54

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

A Dios principalmente por permitirnos vivir, brindarnos la oportunidad de formarnos en esta ilustre Universidad y con esta hermosa profesión, por darnos su ayuda infinita y la fuerza para seguir adelante, superando todos los momentos difíciles que nos ha tocado enfrentar, colocando en nuestro camino a personas maravillosas.

A nuestros padres, por darnos la vida, apoyarnos en los momentos de más incertidumbre, con sus palabras de motivación, por creer en nosotras y ser el principal soporte que nos permitió lograr esta meta.

A nuestros hermanos y hermanas, así como amigos que en este hermoso transcurrir han sido hermanos también.

A todos nuestros profesores que con tanta calidad humana y excelencia nos han enseñado.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

Al Profesor Gerardo Medina, por brindarnos su apoyo teórico y experimental en el momento que más necesitábamos su ayuda, con su conocimiento y excelente disposición.

Al Profesor Juan Dávila, por aceptarnos como sus tesisistas en un principio y al Profesor Pablo Meléndez por su valiosa cotutoría y apoyo con el material vegetal requerido.

A la ilustre Universidad de Los Andes, por abrirnos las puertas para formarnos como profesionales.

Al instituto de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, al excelente equipo que lo conforma, en especial a los Profesores: Cristina, Efren y Manuel, que nos prestaron toda la colaboración para que fuese posible culminar esta investigación.

A todas las personas que de una u otra forma nos apoyaron en la realización de este trabajo, a todas mil gracias...

RESUMEN

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que se unen a hidratos de carbono, produciendo aglutinación de células o precipitación de polisacáridos o glicoconjugados, y poseen al menos dos sitios de unión con los azúcares. Son de gran importancia, en la aglutinación de eritrocitos, linfocitos, plaquetas, así como en la inducción de mitosis y efectos citotóxicos y aglutinación de virus. Se encuentran en diversos organismos: bacterias, hongos, peces, moluscos, crustáceos, mamíferos y plantas. Basados en diferentes reportes sobre la presencia de lectinas en leguminosas, se planteó la hipótesis de encontrar actividad hemoaglutinante en extractos acuosos de las hojas, semillas y vainas de *Machaerium robiniifolium* (DC.), así como también se buscó establecer variaciones de dicha actividad en esta planta con distintos tiempos de procesamiento y evaluando tres criterios para elegir el más adecuado para el reporte de aglutinación. Preparación de extractos, actividad hemoaglutinante en glóbulos rojos humanos, posteriormente a los extractos se realizó una electroforesis y espectrofotometría. Planta procesada tardíamente: En las hojas se detectó hemoaglutinación en las muestras sin diluir; en cuanto a las semillas se determinó actividad en todos los grupos sanguíneos con los extractos sin diluir y al diluir hay un incremento de la hemaglutinación. Planta procesada inmediatamente: En las hojas se ve actividad en la muestra sin diluir y mantiene una baja aglutinación en las diluciones. En las semillas se observó poca actividad hemoaglutinante en las muestras sin diluir y aumentan su aglutinación cuando se diluye. El extracto de las vainas no presentó actividad hemoaglutinante. Se demostró que la planta procesada más tardíamente sufrió modificación en las proteínas debido al tiempo que estuvo en almacenamiento. Se realizó una corrida electroforética, en la cual se evidenció la presencia de una única banda en el extracto de hojas (61.957 D). En las semillas se observaron tres bandas (68.590 D, 39.113 D y 32.218 D). La vaina no presentó proteínas. En el extracto de hojas se observan bandas invertidas, tanto para la planta procesada tardíamente, así como también en la que se procesó de inmediato, lo cual indica la presencia de una proteína que no se pudo definir.

INTRODUCCIÓN

Las Lectinas:

Renkonnen, 1.948; Boyd y Reguera, 1.949 dieron un gran paso en la historia de las lectinas, encontrando que algunas aglutinaban células sanguíneas. Boyd descubrió que las lectinas aglutinaban algunos grupos individuales, dentro del sistema sanguíneo ABO, sin afectar las células de otro grupo, de hecho este descubrimiento del grupo sanguíneo específicamente llevó a al término común de lectina, para denotar este aspecto de selección.

Según Pusztay (1.991), las lectinas son proteínas de origen no inmune que se unen a hidratos de carbono, produciendo aglutinación de células o precipitación de polisacáridos o glicoconjugados, y poseen en su estructura al menos dos sitios de unión con los azúcares.

Hace más de cien años fue descrita la primera planta que poseía lectinas, por Stillmark (Stillmark, 1.888, 1.889). trabajando con extractos de *Ricinus communis* (Linneo), a partir del cual obtuvo una preparación que aglutinaba las células sanguíneas, a medida que más se estudiaba, tales sustancias fueron descubiertas después en otras plantas y el término hemoaglutinina como un nombre común, fue descrito por Elfstrand (1.898). La toxicidad de algunas hemoaglutininas, tales como la ricina y la abrina, ha hecho que los efectos de estas sustancias sean de gran interés en la producción de medicamentos. (Pusztay, 1.991).

Goldstein y col. En 1.980, señalan que las lectinas son proteínas o glicoproteínas que pueden unirse a azúcares, aglutinando células o precipitando glicoconjugados. Estas se encuentran en diversos organismos: bacterias, hongos, peces, moluscos, crustáceos, mamíferos y plantas; capaces de aglutinar células animales o vegetales y/o precipitar polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos. Anteriormente se creía que la hemoaglutinación era debida a propiedades tóxicas de los extractos únicamente, pero luego se evidencio que también las poseen los granos comestibles (Djabayan, 1.998).

Las lectinas están presentes en la mayoría de los seres vivos, tanto en el reino animal, vegetal y en microorganismos como bacterias, protozoarios y virus. Las lectinas han sido estudiadas ampliamente y se ha llegado a la conclusión de que sus propiedades biológicas son de gran importancia, en la aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, plaquetas, así como en la inducción de mitosis y efectos citotóxicos sobre los linfocitos y aglutinación de virus. (www.monografias.com)

Las Leguminosas

La palabra leguminosa deriva del latín legumen, que significa cualquier planta leguminosa. Constituyen una familia extensa que comprende más de 13.000 especies. Varían en tamaño desde la diminuta arveja silvestre a los grandes árboles. El ser humano consume como alimento aproximadamente 20 especies que ya han sido estudiadas por nutricionistas. (Keller, 1.996).

Las leguminosas han sido una de las primeras plantas cultivadas por el hombre. Su historia como planta cultivada se remota a los tiempos neolíticos, en la época en la que el hombre pasaba de la fase de la caza y la recolección de frutos espontáneos a la producción de alimentos mediante el trabajo humano y adoptaba un nuevo modo de vida basado en comunidades agrícolas aldeanas, que a su vez condujo, paso a paso a la civilización urbana. En Halicar, Turquía, se han encontrado restos de trigo, guisantes y lentejas, con molinillos de mano, morteros y hoces, procedentes de una capa que, utilizando el carbono 14, pudo determinarse databa de 5.500 años antes de Cristo, aproximadamente. (Keller, 1.996).

Las leguminosas son una familia botánica que incluye plantas caracterizadas por producir frutos en forma de vainas dentro de las cuales se encuentran las semillas. Tienen la propiedad de tomar el nitrógeno de la atmósfera a través de bacterias en sus raíces (*Rhizobium*), incorporándolo al suelo. En agricultura se incluye un grupo de plantas cultivadas pertenecientes a la familia leguminosa, que se usan preferentemente para alimentación de los animales y del hombre. (www.manualdelombricultura.com).

Las leguminosas se presentan en la naturaleza como arbustos o árboles y pueden ser leñosas, trepadoras, postradas o enredaderas y herbáceas, también pueden tener ganchos o espinas. Pueden ser de crecimiento continuo o no, con hojas que varían en forma y tamaño. Las hojas pueden ser simples o compuestas, pinnadas o bipinnadas, poseen folíolos que pueden ser alternos u opuestos, también cuentan con una laminilla que se halla en la base de los segmentos foliares en las hojas compuestas, llamadas estípelas. (Keller, 1.996).

En algunas leguminosas se encuentran diversas sustancias (como por ejemplo) el inhibidor de la tripsina, glucósidos cianogenéticos, las saponinas, los alcaloides, las hemoaglutininas y el desconocido factor tóxico causante del latirismo. (Keller, 1.996)

El género *Machaerium*

El género *Machaerium* fue descrito por Persoon en 1807, quien lo separó a partir de los géneros *Nissolia* y *Quinata* publicados por Medikus en 1787. Meyer en 1818 crea el género *Depranocarpus*, el cual es muy afín a *Machaerium* pero se diferenciaban en la morfología del fruto. Ducke (1922) refiere a este género como un subgénero de *Machaerium* y, posteriormente lo trata como un sinónimo del mismo. En 1975, quedó aprobado por el XII Congreso Internacional de Botánica la conservación válida del nombre *Machaerium*, frente a *Nissolia* y *Quinata*. (Meléndez, 2.009).

El género *Machaerium* fue revisado por Bentham (1860) quien agrupó 56 especies en cinco series: *Lineata*, *Oblonga*, *Acutifolia*, *Reticulata* y *Penninervia*, basado en las características de los folíolos y en la espinescencia o no de las estípulas; el género *Drepanocarpus* fue considerado junto a *Machaerium* en dichas series y en una misma clave de identificación por Bentham (1862). Taubert (1894) le otorga a estas series el estatus de secciones. Hoehne (1941) publicó la revisión más amplia y reconoció 121 especies. (Meléndez, 2.009).

Las especies de *Machaerium* se pueden encontrar en la mayor parte del territorio venezolano, desde bosques, llanos, selvas de la Guayana, cuencas

de la Orinoquia y Amazonia, región insular caribeña (Isla de Margarita), hasta los bosques submontañosos de la cordillera andina y cordillera de la costa, no llegando a alcanzar los 2.000 m de altitud (Meléndez, 2.009).

En Venezuela se realizó un completo estudio sobre la taxonomía de las especies pertenecientes al género *Machaerium* encontradas en el país. Observando su morfología, se determinaron 39 especies y 11 variedades distribuidas en todo el territorio en altitudes que van de 0-1.800 msnm. La clasificación tiene como base la morfología de las hojas y descripción; afirmando de esta manera que se encuentran presentes las siguientes especies: *M. capote* (Persoon), *M. isadelphum* (E. Mey), *M. milleflorum* y *M. seemannii* (Pittier). Se reafirma el endemismo de: *M. dubium* (Kunth), *M. grandifolium* (Pittier), *M. guaremalense* (Pittier), *M. orthocarpum* (Pittier), *M. striatum* (J.R.), *M. towarensense* (Pittier) y *M. truxillense*. Se propone una combinación nueva: *Machaerium arboreum* (Jacq.) Benth. var. *cultratum* (Pittier) (Meléndez, 2.009).

Meléndez en su estudio realizado en el año 2009, señaló que la especie *Machaerium robiniifolium* (DC.) son árboles o arbustos de 3 a 8 m de alto, armados. Hojas compuestas generalmente de 21 a 31 folíolos; láminas oblongas, 2,5 a 5,5 cm de largo, 1 a 2 cm de ancho, membranáceas, con envés pilósulo a pubescente; ápice redondeado a subretuso; base subredondeada o subcuneada; peciólulos de 1 a 3 mm de largo; venas foliares secundarias impresas por ambas caras, no arcuadas, distantes entre sí 0,5 a 1 mm, llegan hasta el margen sin anastomosarse, se erigen en ángulo de 40°-45° respecto al nervio medio; reticulación terciaria difusa. Inflorescencias paniculiformes axilares y terminales, de 10 a 25 cm de largo.

M. robinifolium, presenta flores 8-15 mm de largo, pubescentes, con corolas blancas en la yema y violeta claro en antesis; alas hasta 7 mm de largo, 3 mm de ancho con ápice redondo; bractéolas 2, orbiculares, hasta 2,5 mm de largo, 3 mm de ancho; pedicelos 1,5 a 2 mm de largo; cáliz alrededor de 4,5 cm con dientes obtusos poco evidentes, uno de éstos más pronunciado que el resto. Estambres monadelfos con incisión central de la base estaminal que divide parcialmente en 2 fascículos. Frutos de legumbres samaroides, pilósulas hasta glabrescentes, alrededor de 6 cm de largo, cuando maduran marrón-rojizas; base geniculada; ala de 1,5 cm de ancho; estípites 3 a 5 mm de largo (Meléndez, 2.009).



Figura 1. *Machaerium robiniifolium*.

La Inmunología

El término inmunidad, del latín *immunis* (que significa libre de), se aplicó en un principio a la resistencia de los organismos a infecciones microbianas. Por tanto, la inmunología era el estudio de la inmunidad ante las bacterias. Hoy en día esta definición se ha extendido, por analogía, a las reacciones específicas o inespecíficas, que tienden a eliminar sustancias extrañas. Sin embargo, las reacciones inmunitarias no siempre desempeñan una reacción favorable, puesto que pueden provocar reacciones de hipersensibilidad (Boyd y cols, 1.954).

La inmunología es un área fascinante, variada y extensa de la biología y los sistemas inmunes influyen profundamente en la supervivencia de las especies multicelulares. Los avances en inmunología han conducido a un mayor conocimiento de los procesos de la enfermedad, tanto en hombres como en animales, y a un incremento en la apreciación del papel del sistema inmune de los mamíferos en el mantenimiento de la homeostasis. (Sharon, 1.989).

Las células del sistema inmunitario son principalmente los glóbulos blancos o leucocitos y las células tisulares relacionadas con ellos. Estas células tienen origen en un célula progenitora común, llamada célula troncal (célula madre) hematopoyética pluripotente, de la que también derivan los eritrocitos, o sea los glóbulos rojos de la sangre, y las células llamadas megacariocitos. Todos estos tipos celulares se denominan en conjunto células hematopoyéticas. (Parham, P. 2.006).

Los glóbulos blancos también llamados leucocitos (*leukos*, blanco), cumplen una función importante en la respuesta inmunitaria, defendiendo al organismo contra los invasores extraños, como los parásitos, bacterias y los virus, dicha inmunidad viene dada en especial por la capacidad que tienen estas células para producir anticuerpos. Aunque la mayoría de los glóbulos blancos llegan a todo el cuerpo gracias a la sangre, su trabajo se suele llevar a cabo en los tejidos en lugar del aparato circulatorio. Existen cinco tipos de glóbulos blancos maduros: linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, estos se pueden agrupar de acuerdo con las características morfológicas o funcionales compartidas. (Silverthorn, D y cols, 2.008).

Antígenos y Anticuerpos

Un antígeno es una sustancia que presenta una reacción específica ante los anticuerpos o los receptores celulares y tiene la capacidad de estimular la producción de anticuerpos o una reacción celular. Las sustancias que reaccionan con los anticuerpos, pero que no pueden por sí mismas estimular la producción de estos se conoce como haptenos. La capacidad de los antígenos para que se produzca una reacción inmunitaria es lo que se conoce como inmunogenicidad. Los antígenos también son capaces de generar otras respuestas, principalmente la hipersensibilidad retardada y la tolerancia. (Boyd y cols, 1.954).

En la membrana del hematíe se encuentran antígenos del grupo sanguíneo. Su especificidad inmunológica proviene de pequeñas diferencias en los monosacáridos terminales o ramificados de las numerosas cadenas cortas de hidratos de carbono fijadas a las proteínas y lípidos de la membrana. Por

ejemplo, el antígeno de la sangre del grupo A difiere del antígeno de la sangre del grupo B solo en que la cadena de hidratos de carbono del antígeno del grupo A termina en N-acetilgalactosamina, en tanto que la cadena de hidrato de carbono del antígeno del grupo B finaliza con galactosa (Boyd y cols, 1.954).

Para la determinación del grupo sanguíneo la aglutinación se produce por la actuación de los anticuerpos (Acs) del suero o aglutininas sobre los antígenos (Ags) de los glóbulos rojos o aglutinógenos. De acuerdo a la existencia de los diversos aglutinógenos y aglutininas los individuos pueden clasificarse dentro de 4 grupos sanguíneos básicos. (www.medicinapreventiva.com)

La aglutinación directa es una técnica que se utiliza para identificar los grupos ABO y para detectar anticuerpos antibacterias. En ambas pruebas, el antígeno es una molécula relativamente estable y de un tamaño suficientemente grande para que la aglutinación pueda verse directamente, teniendo tales antígenos, un número óptimo de determinantes en su membrana. (Sharon, 1.989).

Los anticuerpos se definen como la sustancia cuya producción se puede provocar mediante la administración de antígenos o de haptenos unidos a un portador y capaces de unirse específicamente a este antígeno o a este hapteno. Estos son inmunoglobulinas, proteínas de elevado peso molecular que constan de cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas). Son la base fluida de los productos terminales de ciertas

células linfoides inmunocompetentes; pueden también actuar como receptores de superficie en las membranas celulares. (Sharon, 1.989).

La mayoría de los anticuerpos se hallan en disolución, donde actúan como el brazo funcional de la respuesta inmune. Hay un gran número de anticuerpos diferentes en el suero del adulto humano, la mayoría de los cuales están presentes en tan pequeñas cantidades que sus especificidades no pueden ser identificadas. (Sharon, 1.989). Estos anticuerpos llamados naturales se producen como respuesta de exposición del sistema inmune a los microbios y posiblemente a las células tumorales, y un cierto número de anticuerpo a anticuerpos existentes en el sistema como un medio de control. El niño nace virtualmente sin anticuerpos propios, y solamente después de unos cuantos años de exposición del sistema inmune al desafío antigénico es cuando se consigue la concentración de anticuerpos de un adulto normal. (Sharon, 1.989).

Los eritrocitos o glóbulos rojos, son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina una proteína que contiene hierro lo que le da el color rojo a la sangre. Los glóbulos rojos son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo. Tienen una forma bicóncava para adaptarse a una mayor superficie de intercambio de oxígeno por dióxido de carbono en los tejidos. Además su membrana es flexible lo que permite a los glóbulos rojos atravesar los más estrechos capilares. (www.tuotromedico.com).

Cuando se mezclan suero y glóbulos de distintas personas puede ocurrir que tales mezclas permanezcan homogéneas o bien que aparezca aglutinación.

Este fenómeno observado primero por Landsteiner permitió asentar el concepto de compatibilidad sanguínea, tan importante en la práctica de las transfusiones.(www.medicinapreventiva.com)

En los hematíes humanos existe un aglutinógeno denominado factor Rh; su existencia se puso de manifiesto por la aglutinación producida en presencia de aglutininas obtenidas al inyectar a conejos o cobayos con hematíes de una variedad de mono Rhesus. La aglutinación se produce en el 85 % de los hematíes humanos que constituye el grupo del denominado Rh positivo. El 15% restante, que no posee ese aglutinógeno, no produce aglutinación y conforma el grupo del Rh negativo. (www.medicinapreventiva.com)

Las Proteínas

Las proteínas están constituidas por aminoácidos, los cuales pueden ser esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo y que necesariamente deben ser aportados con la dieta, todos ellos se encuentran en las proteínas de las semillas vegetales y algunas leguminosas; en este grupo se encuentran: cisteína, histidina, tirosina, arginina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina. Mientras que, los aminoácidos no esenciales son aquellos que si pueden ser sintetizados por el organismo con la ayuda de una buena fuente de carbono, y estos son: glicina, alanina, serina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, glutamina y prolina. (Montgomery, 1.998).

EL Término proteína proviene del griego protos, el cual significa primero y principal. Desde el punto de vista estructural, se definen como

macromoléculas constituidas por aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos, las cuales cumplen una gran variedad de funciones en los organismos. Los aminoácidos son moléculas que están constituidas por un grupo amino y uno carboxilo, poseen una estructura de la α -L aminoácido. Conteniendo dentro de su estructura un carbono denominado α con cuatro enlaces covalentes unidos a los grupos amino (NH_2), carboxilo (COOH), hidrógeno (H) y a uno de estructura variable (R). los α -L aminoácidos proteicos se diferencian unos de otros por su grupo R, lo cual le confiere un nombre particular a cada uno (Hicks, 2002).

Una característica de las proteínas es que poseen estructuras tridimensionales bien definidas. Esta organización en el espacio, denominada conformación de la proteína, permite que cumpla una función biológica en el organismo. (Hicks, 2002).

www.bdigital.ula.ve

La Electroforesis

La electroforesis es una metodología en la que se hacen migrar los solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, estos solutos migran hacia el cátodo o ánodo (electrodo positivo y negativo), dependiendo de la combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Existen numerosos métodos electroforéticos que se utilizan para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Sin embargo, uno de los más utilizados en el laboratorio es el método electroforético en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE). (Campell, 1.995).

Los métodos electroforéticos en procedimientos analíticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como métodos de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, aportando un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de cargas. (Campell, 1.995).

Existen numerosas técnicas para la evaluación de las proteínas. Sin embargo, las técnicas electroforéticas se han convertido en herramientas principales para la caracterización de macromoléculas y para determinar su pureza. El método electroforético se basa en el hecho de que las moléculas como ADN, ARN y las proteínas, poseen una carga y por lo tanto son capaces de moverse cuando se colocan en un campo eléctrico. (Cooper, 1.984).

La relación de frente (R_f), es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ión líder. (Campell, 1.995).

Estudios de actividades biológicas en las plantas

En el año 1993, Díaz L llevó a cabo el aislamiento de lectinas en algas marinas (*Halimeda opuntia*), recolectada en la Costa de San Juan de los Cayos, Municipio Tucacas, Estado Falcón, Venezuela. Los objetivos

perseguidos en la investigación fueron: extracción por métodos no convencionales, aislamiento-purificación y caracterización de lectinas a partir de algas marinas, utilizando procesos de elusión y destrucción mecánica del alga. Aislamiento y purificación preliminar por diálisis inversa, precipitación de proteínas con sulfato de amonio, purificación a escala preparativa y analítica por cromatografía en geles de filtración molecular, análisis de proteínas, actividades y perfiles electroforéticos. Se encontró que la elusión resultó ser el mejor método de extracción de proteínas tanto cualitativa como cuantitativamente.

Dávila, en el año 2.002, obtuvo muy buenos resultados en ensayos de aglutinación en extractos de raíces de plantas de la familia *Musaceae*, así como también en el fruto del cambur manzano; por el contrario los extractos acuosos del plátano Hartón; fruto del cambur Quinientos; corno y fruto del cambur Topocho no presentaron actividad hemoaglutinante.

Gélvez, en el año 2.004, evaluó la actividad biológica de *Hyptis suaveolens*; observando que los extractos acuosos no presentaron actividad sobre *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y otros microorganismos utilizados.

Sala y col, en el 2.006 realizaron un estudio para determinar la presencia de moléculas hemoaglutinantes en 7 especies de leguminosas, realizando pruebas de hemoaglutinación con eritrocitos humanos de los grupos A, B, AB, y O, de factor Rh positivo y ensayos de electroforesis desnaturizante, para la determinación de pesos moleculares de diferentes proteínas encontradas; observando hemoaglutinación en la mayoría de las especies estudiadas, así como también lisis de glóbulos rojos.

En el 2.008, Kubarev et al., determinaron la actividad hemoaglutinante de las lectinas de semillas de algunos cereales y leguminosas (soja, altramuz azul, el trigo blando, cebada de primavera y el frijol blanco) en eritrocitos de ganado. Los experimentos mostraron que los más potentes aglutinadores de los eritrocitos fueron las semillas de soja.

Investigaciones realizadas en el año 2.009, por Cavalheiro *et al*, señalan que las actividades biológicas y enzimáticas del extracto acuoso de semillas de *Caesalpinia ferrea Mart*, son utilizadas en la medicina popular, por sus propiedades curativas, como lo son: anti-inflamatorios, analgésicos, antibióticos y antitérmicos, siendo de gran importancia en la industria farmacéutica.

Investigaciones sobre actividad biológica de extractos preparados a partir de la planta *Couroupita guianensis* efectuadas en el año 2.010 por Dávila, señalaron que no existía actividad hemoaglutinante significativa en dichos extractos para ningún grupo sanguíneo, sin embargo, los extractos de hojas, pulpa de fruto maduro y semilla de fruto verde mostraron actividad larvicida importante.

HIPÓTESIS

Basados en diferentes reportes sobre la presencia de lectinas en leguminosas, es viable encontrar actividad hemoaglutinante en extractos acuosos obtenidos a partir de las partes (hojas, semillas y vainas) de *Machaerium robiniifolium*.

www.bdigital.ula.ve

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad hemoaglutinante presente en los extractos acuosos obtenidos a partir de las partes (hojas, semillas y vainas) de *Machaerium robiniifolium*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar e identificar el material vegetal *Machaerium robiniifolium* y elaborar una muestra botánica para almacenarla en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

- Preparar extractos acuosos a partir de semillas y hojas.
- Evaluar la actividad hemoaglutinante sobre glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos del sistema ABO, en presencia de los extractos acuosos a diferentes diluciones.
- Determinar la presencia de las proteínas utilizando la técnica de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.
- Cuantificar las proteínas presentes en los diferentes extractos mediante espectrofotometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS.

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en su hábitat natural, entre el Vigía y Mérida, alcabala la Victoria entre Estanquez y la estación de servicio el Portachuelo.

Una vez realizada la recolección se procedió a la identificación taxonómica. Se clasificaron con la ayuda y orientación del personal experto que labora en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y a través de consultas bibliográficas. Depositando una muestra en el jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (MERF), bajo el número de voucher 631, colección de Pablo Meléndez y Geraldine Briceño.

MATERIAL VEGETAL: *Machaerium robiniifolium*.

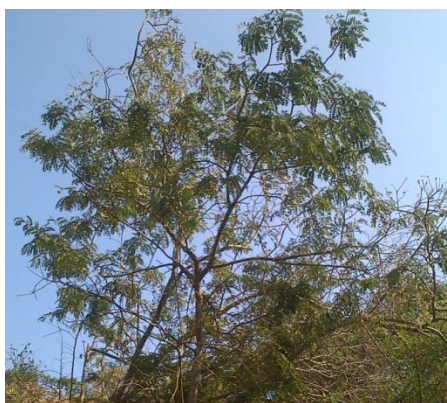


Figura 2. *Machaerium robiniifolium*.

METODOLOGÍA



SEPARACIÓN DE LAS PARTES DE LA PLANTA

Una vez colectada la planta, se procedió a separar sus partes (Hojas, semillas y Vainas. Figuras 3 y 4) y se determinó su peso fresco; posteriormente fue lavado con agua destilada para eliminar cualquier residuo que pueda interferir en las mediciones



figura 3. Frutos de *M. robiniifolium*



figura 4. Semillas de *M. robiniifolium*

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la Preparación de los extractos se utilizaron, dos muestras de plantas con diferentes tiempos de recolección: Una procesada el mismo día de su recolección y otra procesada a la semana siguiente de recolectada. (Sala y cols, 2.006)

Los extractos se prepararon a partir de las hojas, semillas y vainas, según la siguiente metodología:

Se utilizó un mortero para homogeneizar, en el caso de la planta recolectada y procesada el mismo día, y una licuadora para la planta procesada luego de una semana de recolectada (se preservó en una caja a temperatura ambiente), las muestras fueron homogenizadas con solución salina fisiológica, filtradas a través de un tul, midiéndola en un cilindro graduado la cantidad obtenida de extractos, se trasvasaron en tubos el cual fue centrifugado por 30 minutos a 3.000 rpm guardando el sobrenadante en tubos eppendorf y refrigeradas hasta su posterior utilización.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS AL 5%. (Sala y cols, 2.006)

- Se obtuvieron 3ml de sangre venosa con anticoagulante, de tipo “A”, “B”, “AB” y “O” todos de factor Rh positivo.
- Se realizó un lavado, colocando la sangre en un tubo seco y limpio que contenía 7mL de solución salina fisiológica (SSF).

- Se agito suavemente para homogenizar.
- Se centrifugó la preparación a una velocidad de 1.000 a 1.500 RPM en un tiempo de 3-5 min.
- El sobrenadante o fase acuosa se descartó, volviendo agregar asi SSF y repitiendo los ultimos dos pasos (3 veces).
- Una vez realizados los 3 lavados, se midio el pellet de globulos rojos y se resuspendió hasta 5% en SSF.
- Esta suspensión fue guardada en la nevera hasta su utilización.



Figura 5. Solución de glóbulos rojos al 5%.

DILUCIÓN DE LOS EXTRACTOS. (Sala y cols, 2.006)



Figura 6. Diluciones 1:5 y 1:10 de los extractos.

PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN. (Sala y cols, 2.006)

En tubos de ensayo se agrego de cada extracto 100 μ l concentrado o con su respectiva dilucion 1:5 y 1:10 con 100 μ l de la suspensión de globulos rojos al 5% de los grupos sanguineos ("A", "B" "AB" Y "O") de factor Rh "+". Se agito suavemente y se dejo a temperatura ambiente por una (1) hora para observar los resultados. Como control se utilizo 100 μ l de SSF + 100 μ l de suspensión de glubulos rojos al 5% de cada grupo sanguineo.



Figura 7. Ensayos de hemoaglutinación, criterios 1 y 2

Para mejorar la sensibilidad del método, luego de observar los resultados al cabo de (1) hora, se procedió a centrifugar los tubos con la mezcla (globulos rojos + extractos) por un tiempo de 30 segundos y se registraron dichos resultados, siguiendo el criterio escrito a continuación.

Se utilizaron los siguientes criterios:

1er criterio: observación de la actividad luego de una (1) hora.

- 0: botón pequeño y bien sedimentado.
- 1(+): hemoaglutinación muy leve.
- 2(+): hemoaglutinación leve.
- 3(+): hemoaglutinación moderada.
- 4(+): hemoaglutinación máxima.

2do Criterio: Observación de la actividad moviendo los tubos.

- (0): sin grumos.
- 1(+): grumos finos (arenilla).
- 2(+): grumos medianos.
- 3(+): grumos grandes.

3er Criterio: Observación de la actividad luego de ser centrifugado.

- (0): no hay grumos. Aglutinación negativa.

- 1(+): grumos pequeños.
- 2(+): grumos grandes.
- 3(+): el botón se fragmenta en 2 o 3 partes.
- 4(+): el botón se desprende totalmente del tubo. Aglutinación máxima.

El empleo de los diferentes criterios de hemoaglutinación, tienen la finalidad de comparar los mismos y de esta forma determinar cual es el más confiable al momento de reportar los resultados.



Figura 8. Ensayos de hemoaglutinación, criterio 3

EVALUACIÓN DE HEMOAGLUTINACIÓN EN LOS EXTRACTOS. (Sala y cols, 2.006)

Este ensayo se realizó sobre aquellos extractos que presentaron mayor actividad hemoaglutinante sobre algunos grupos sanguíneos, con la finalidad de hallar el título hasta donde se mantenía dicha actividad. Se realizaron diluciones seriadas, utilizando microplacas y tubos de vidrio de 13 x 75 mm,

las diluciones fueron: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, empleando como volumen de dilución para cada tubo 100 μ l de SSF.

Se tomaron 100 μ L del extracto correspondiente y se agregaron al primer tubo (1/2), a partir de allí se hicieron diluciones seriadas hasta 1/1024 (ultimo pozo), descartando 100 μ l de esta ultima dilución. Sobre cada tubo o dilución se agrego 100 μ l de la suspensión de eritrocitos. Se dejo en reposo durante una (1) hora, y al cabo de ese tiempo se centrifugaron los tubos con la mezcla con el fin de mejorar la sensibilidad del método y se observaron los resultados, siguiendo el mismo criterio referido anteriormente.

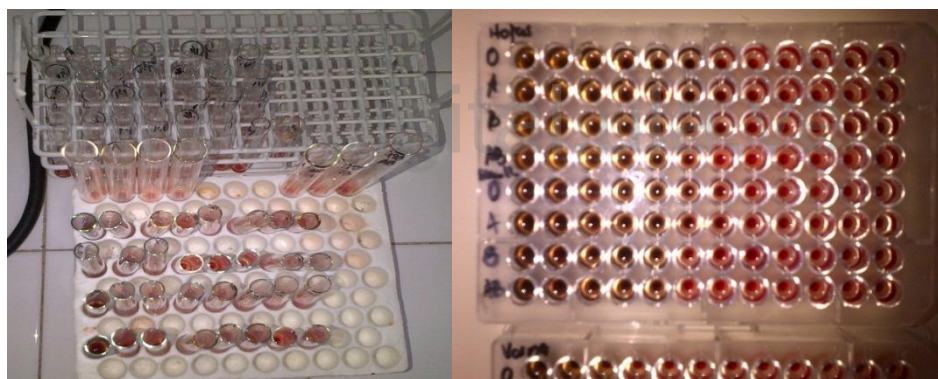


Figura 9 y 10. Diluciones seriadas en tubo y microplaca.

EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LOS EXTRACTOS EN LA REGIÓN UV.

Barrido espectrofotométrico a diferentes longitudes de onda. (Bollag y cols, 1.996)

Se diluyeron los extractos hasta 1:100, y sobre ellos se realizó un barrido espectrofotométrico entre 200 y 300 nm. Luego se calculó el % de ácidos nucleicos y la concentración de las proteínas presentes, utilizando el método estandarizado de Warburg-Christian. Utilizando la fórmula:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = (\text{A280}) (\text{factor de corrección}) / Fc = \text{A280/A260}$$

EVALUACIÓN DEL PERFIL PROTÉICO DE LOS EXTRACTOS (Utilizando electroforesis SDS-PAGE). (Bollag y cols, 1.996)

Preparación de las soluciones de trabajo.

Solución A. (Solución Stock de acrilamida) para 100ml.

Acrilamida. 29,2 g.

Bis-Acrilamida. 0,8 g.

Agua destilada. 100 ml.

Disolver y luego refrigerar.

Solución B. (Tampón para preparar el gel de concentración) para 100ml.

75 mL 2M Tris-HCL (pH 8,8) 1,5 M.

4 mL SDS 10% 0,4%

Agua destilada 21 ml.

Refrigerar.

Solución C. (Tampón para preparar el gel de separación) para 100ml.

50 mL 2M Tris-HCL (pH 6,8)	0,5 M.
----------------------------	--------

4 mL SDS 10%	0,4%
--------------	------

Agua destilada	46 ml.
----------------	--------

Refrigerar.

Persulfato de Amonio al 10%

Persulfato de amonio	0,5 g.
----------------------	--------

Agua destilada	10 ml.
----------------	--------

Buffer de electroforesis.

Tris	3 g.
------	------

Glicina	14,4 g.
---------	---------

SDS	1 g.
-----	------

Agua destilada	1 L.
----------------	------

Disolver y refrigerar.

Buffer de carga.

Tris-HCL1M (pH 6,8)	3,1 ml.
---------------------	---------

Glicerol 50%	5 ml.
--------------	-------

SDS 10%	2 ml.
2-Mercaptoetanol	0,25 ml.
Azul de Bromofenol 1%	0,5 ml.
Agua destilada	1,4 ml.
Refrigerar.	

Preparación del gel al 10% (gel de resolución).

Solución A	3,3 ml.
Solución B	2,5 ml.
Agua destilada	4,17 ml.
Persulfato de amonio	50 µl.
Temed	5 µl.

Preparación del gel de 12,5% de acrilamida (gel de resolución).

Solución A	4,16 ml.
Solución B	2,5 ml.
Agua destilada	3,34 ml.
Temed	5 µl.
Persulfato de amonio	50 ml.

El gel líquido debe ser agregado lentamente en las placas de vidrio para evitar que se presenten burbujas de aire que puedan afectar los resultados. Luego de polimerizado el gel aproximadamente 60 minutos, se agregara el gel de concentración que se preparara de la siguiente manera.

Gel de concentración (Stacking gel al 5%).

Agua destilada	2,3 ml.
Solución A	0,67 ml.
Solución C	1 ml.
Persulfato de amonio	30 µl.
Temed	5 µl.

www.bdigital.ula.ve

Una vez agregado el gel de concentración, se coloca un peine para lograr la formación de los pozos, donde se colocaran las muestras, se espera para que complete su polimerización y posteriormente se le agregan los extractos.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se preparan en una porción 4:1 con respecto al buffer de carga, se llevan a baño de maría con una temperatura de 100°C, durante 2 minutos para luego agregarlas en cada pozo del gel, luego se coloca el buffer de electroforesis hasta cubrir el gel, y se inicia el proceso cumpliendo las siguientes condiciones: un voltaje de 70 voltios hasta que las muestras

recorran el gel de concentración, luego se elevara el voltaje a 100 voltios y se espera hasta que las muestras recorran todo el gel.



Figura 11. Corrida electroforética.

Coloración y decoloración de los geles.

Los geles fueron separados, colocados en un recipiente limpio de plástico con solución de azul de Cromassie para colorearlos, permanecieron 1 hora, al cabo de este tiempo se procedió a su decoloración con una solución de destañido de Cromassie dejándose durante varias horas hasta que se puedan visualizar claramente las bandas que deseamos.

Solución teñido de Cromassie.

Azul de Coomassie-R250	1 g.
Metanol	450 ml.
Agua destilada	450 ml.
Ácido acético glacial	100 ml.

Preparar 1litro de solución.

Solución de destemido de Cromassie.

Metanol 100 ml.

Agua destilada 800 ml.

Ácido acético glacial 100 ml.

Volumen final 1 litro.

CALCULO DEL MARCADOR DE MIGRACIÓN

Se midió el frente de migración (distancia recorrida por el gel) para cada uno de los geles. Se calculó el Rf para cada una de las proteínas encontradas en las diferentes bandas de los geles a través de la siguiente fórmula.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por cada proteína (cm)}}{\text{Frente de migración del gel (cm)}}$$

Luego por comparación con proteínas patrón de peso molecular conocido, se calculó el peso molecular de las proteínas presentes en los diferentes extractos de los geles evaluados.

Para esta evaluación se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular:

MUESTRA	PESO MOLECULAR
Albumina	68.000 D.
Ovoalbumina	43.000 D.
Lisozima	14.300 D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización del estudio se recolectaron plantas de la familia de las leguminosas (*Machaerium robiniifolium*), se separaron las partes a estudiar (hojas, semillas y vainas), se determinó el peso en fresco, se realizó un lavado con agua destilada y posteriormente se prepararon los extractos.

Tabla 1. Determinación del peso fresco y obtención del extracto de las muestras procesadas una semana luego de la recolección.

Extracto	Peso (g)	SSF (mL)	Volumen obtenido (mL)
Hojas	28	250	212
Semillas	19	50	78
Vainas	40	200	123

Tabla 2. Determinación del peso fresco y obtención del extracto de las muestras procesadas el mismo día de la recolección.

Extracto	Peso (g)	SSF (mL)	Volumen obtenido (mL)
Hojas	10	45	41
Semillas	4,7	2,5	4,5
Vainas	13,2	15	9,5

En las tablas 1 y 2 se puede apreciar el peso en gramos de cada parte de la planta, con el solvente agregado y el volumen final obtenido de cada extracto. Evidenciándose en la tabla 2 que en la semilla se obtuvo mayor volumen final que la cantidad de solvente agregado, esto debido a la humedad presente en esta. Mientras que para la tabla 1 se observa que se utilizó mayor volumen de solvente en la preparación de todos los extractos.

Ensayos de hemoaglutinación de los extractos de (Hojas, semillas y vainas) *Machaerium robiniifolium*. Procesada una (1) semana luego de su recolección.

1er criterio:

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Ensayos de hemoaglutinación en hojas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO HOJAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	2(+)	3(+)	3(+)	2(+)
Dilución 1:5	2(+)	1(+)	2(+)	1(+)
Dilución 1:10	1(+)	2(+)	3(+)	1(+)

Tabla 4. Ensayos de hemoaglutinación en semillas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO SEMILLAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	3(+)	3(+)	3(+)	3(+)
Dilución 1:5	1(+)	2(+)	2(+)	1(+)
Dilución 1:10	1(+)	2(+)	2(+)	1(+)

Tabla 5. Ensayos de hemoaglutinación en vainas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO VAINAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	1(+)	2(+)	2(+)	1(+)
Dilución 1:5	1(+)	2(+)	2(+)	2(+)
Dilución 1:10	1(+)	2(+)	2(+)	2(+)

Siguiendo el 1er criterio, se pudo observar que la mayor actividad hemoaglutinante se encuentra en los extractos sin diluir, sin tener mucha variación en los diferentes grupos sanguíneos a excepción de las semillas para el grupo “O” y “AB” y las hojas en “AB” que disminuyen su actividad a medida que se diluye.

2do Criterio:

Tabla 6. Ensayos de hemoaglutinación en hojas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO HOJAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	1(+)	1(+)	1(+)	1(+)
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Tabla 7. Ensayos de hemoaglutinación en semillas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO SEMILLAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	1(+)	2(+)	3(+)	3(+)
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Tabla 8. Ensayos de hemoaglutinación en vainas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO VAINAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	0	0	0	0
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Luego de agitar los tubos que se encontraban 1 hora en reposo se detectó actividad hemoaglutinante solo en los extractos sin diluir; en las semillas aumento la aglutinación en los grupos “B” y “AB”, mientras que en las vainas no se encontró actividad. Demostrando en el referido criterio, que el primer criterio genera falsos positivos.

3er Criterio:

Tabla 9. Ensayos de hemoaglutinación en hojas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO HOJAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	0	1(+)	0	1(+)
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Tabla 10. Ensayos de hemoaglutinación en semillas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO SEMILLAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	1(+)	2(+)	3(+)	4(+)
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Tabla 11. Ensayos de hemoaglutinación en vainas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO VAINAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “AB”
Control	0	0	0	0
Sin diluir	0	0	0	0
Dilución 1:5	0	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0	0

Para mejorar la sensibilidad del método se sometieron la muestra a centrifugación y se obtuvo que las vainas no poseen actividad hemoaglutinante, las semillas poseen mayor hemaglutinación en las muestras sin diluir, con mas fuerza en los grupos sanguíneos “B” y “AB”, mientras que las hojas poseen poca actividad solo en los grupos sanguíneos “A” y “AB”. La evaluación de los extractos utilizando este criterio reafirma lo encontrado en el segundo criterio.

Luego de evaluar la hemoaglutinación en los ensayos anteriores, empleando los tres criterios propuestos en un principio, así como la técnica de dilución en microplaca, se determinó que el criterio de mayor confianza era el número tres, debido al descarte de falsos positivos observados en los demás métodos, por lo cual el resto de las pruebas fueron reportadas usando dicho criterio.

Determinación de títulos de los extractos con mayor actividad hemoaglutinante. (Semillas y hojas) mediante tubos 13x75

Para esta evaluación se realizaron diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1/128, se utilizó el método de hemoaglutinación centrifugado con la mezcla de los extractos con los glóbulos rojos al 5% (Ver materiales y métodos). Obteniéndose los siguientes resultados:

3er Criterio:

Tabla 12. Determinación de la actividad hemoaglutinante en Semillas hasta la dilución 1:128.

EXTRACTO SEMILLAS	GRUPO "O"	GRUPO "A"	GRUPO "B"	GRUPO "AB"
SIN DILUIR	3(+)	3(+)	3(+)	4(+)
DILUCIÓN 1:2	4(+)	4(+)	4(+)	2(+)
DILUCIÓN 1:4	1(+)	1(+)	1(+)	1(+)

Tabla 13. Determinación de la actividad hemoaglutinante en Hojas hasta la dilución 1:128.

EXTRACTO de Hojas	GRUPO "O"	GRUPO "A"	GRUPO "B"	GRUPO "AB"
SIN DILUIR	0	1(+)	0	1(+)

En este ensayo se empleó el tercer criterio, mejorando la sensibilidad del método mediante la centrifugación, se determinó más actividad en todos los grupos sanguíneos con los extractos sin diluir. En los grupos "O", "A" y "B" se observa que en la dilución 1/2 hay un incremento de la hemaglutinación,

disminuyendo en las sucesivas diluciones; mientras que para el grupo “AB” comienza a disminuir a medida que aumenta la dilución. El extracto de hojas no presentó hemoaglutinación significativa, se observó únicamente 1+ en el extracto sin diluir, para los grupos sanguíneos “A” y “AB”.

Ensayos de hemoaglutinación de los extractos de (Hojas, semillas y vainas) *Machaerium robiniifolium*. Procesada el mismo día de su recolección (3er Criterio):

Tabla 14. Hemoaglutinación del extracto de hojas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO HOJAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”
Control	0	0	0
Sin diluir	1(+)	1(+)	1(+)
Dilución 1:5	1(+)	1(+)	1(+)
Dilución 1:10	1(+)	1(+)	1(+)

Tabla 15. Hemoaglutinación del extracto de semillas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO SEMILLAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”
Control	0	0	0
Sin diluir	2(+)	1(+)	2(+)
Dilución 1:5	2(+)	3(+)	2(+)
Dilución 1:10	2(+)	3(+)	2(+)

Tabla 16. Hemoaglutinación del extracto de vainas hasta la dilución 1:10.

EXTRACTO VAINAS	GRUPO “O”	GRUPO “A”	GRUPO “B”
Control	0	0	0
Sin diluir	0	0	0
Dilución 1:5	0	0	0
Dilución 1:10	0	0	0

En las tablas 14, 15 y 16, mejorando la sensibilidad del método, se manifiesta una actividad negativa en el extracto de vainas, ligera y uniforme con el extracto de hojas y de moderada a abundante en las semillas, donde la hemaglutinación de los grupos “O” y “B” se mantiene constante; mientras que el grupo “A” aumenta la aglutinación al diluir el extracto.

Determinación de títulos de los extractos de Semillas mediante tubos.
(Dávila, 2.002).

Para esta evaluación se realizaron diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1/1024, se utilizó el método de hemoaglutinación sin centrifugar y centrifugado con la mezcla de los extractos con los glóbulos rojos al 5% (Ver materiales y métodos). Obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 17. Títulos de actividad de los extractos de Semillas.

DILUCIONES	GRUPO “A”	GRUPO “B”	GRUPO “O”
SIN DILUIR	0	1(+)	1(+)
DILUCIÓN 1:2	1(+)	1(+)	2(+)
DILUCIÓN 1:4	2(+)	2(+)	2(+)
DILUCIÓN 1:8	3(+)	2(+)	2(+)
DILUCIÓN 1:16	2(+)	1(+)	1(+)
DILUCIÓN 1:32	2(+)	1(+)	1(+)
DILUCIÓN 1:64	1(+)	0	0
Dilución 1:128	1(+)	0	0
Dilución 1:256	1(+)	0	0
Dilución 1:512	1(+)	0	0
Dilución 1:1024	0	0	0

En la tabla 17, el método dio como resultado, que los grupos sanguíneos “B” y “O” muestran poca actividad hemoaglutinante en las muestras sin diluir, con un título máximo de 32. El grupo “A” no presenta actividad con el extracto sin diluir, observándose variaciones en las diluciones, siendo este el de mayor actividad con un título de 512.

Probablemente en el extracto coexistan factores aglutinantes e inhibidores de la aglutinación y a medida que se diluye el efecto en los inhibidores es mayor, por lo que se observa incremento en la aglutinación.

Comparación de la actividad hemoaglutinante en extractos de semillas y hojas de *M. robiniiifolium* obtenidos en diferentes tiempos de procesamiento. Utilizando el tercer criterio.

Tabla 18. Comparación de la actividad hemoaglutinante en extractos de semillas, obtenidos en diferentes tiempos de procesamiento.

EXTRACTO DE SEMILLAS	GRUPO “O”		GRUPO “A”		GRUPO “B”		GRUPO “AB”
	P.S	P.D	P.S	P.D	P.S	P.D	P.S
Sin diluir	3(+)	1(+)	3(+)	0	3(+)	1(+)	4(+)
Dilución 1:2	4(+)	2(+)	4(+)	1(+)	4(+)	1(+)	2(+)
Dilución 1:4	1(+)	2(+)	1(+)	2(+)	1(+)	2(+)	1(+)
Dilución 1:8	0	2(+)	0	3(+)	0	2(+)	0
Dilución 1:16		1(+)		2(+)		1(+)	
Dilución 1:32		1(+)		2(+)		1(+)	
Dilución 1:64		0		1(+)		0	
Dilución 1:128				1(+)			
Dilución 1:256				1(+)			
Dilución 1:512				1(+)			
Dilución 1:1024				0			

P.S: Procesada una semana luego de su recolección.

P.D: Procesada el mismo día de su recolección.

En la planta procesada una semana luego de su recolección se determinó más actividad en todos los grupos sanguíneos con los extractos sin diluir. En los grupos “O”, “A” y “B” se observa que en la dilución 1/2 hay un incremento

de la hemaglutinación, disminuyendo en las sucesivas diluciones; mientras que para el grupo “AB” comienza a disminuir a medida que aumenta la dilución. En todos los grupos sanguíneos el título fue de 4.

Mientras que en la planta procesada el mismo día de recolectada, dio como resultado, que los grupos sanguíneos “B” y “O” muestran poca actividad hemoaglutinante en las muestras sin diluir, “B” aumenta su aglutinación en las diluciones 1:4 y 1:8 a partir de la cual comienza a disminuir; el grupo “O” incrementa a partir de que se diluye, disminuye en 1:16, y al igual que “B” tiene su título es 32. El grupo “A” no presenta actividad con el extracto sin diluir, alcanzando su pico máximo en 8, observándose variaciones en las diluciones, siendo este el de mayor actividad con un título de 512.

Tabla 19. Comparación de la actividad hemoaglutinante en extractos de semillas, obtenidos en diferentes tiempos de procesamiento.

EXTRACTO DE SEMILLAS	GRUPO “O”		GRUPO “A”		GRUPO “B”	
	P.S	P.D	P.S	P.D	P.S	P.D
Sin diluir	2(+)	1(+)	1(+)	1(+)	2(+)	1(+)
Dilución 1:2	0		0		0	
Dilución 1:4	0		0		0	
Dilución 1:5	ND	1(+)	ND	1(+)	ND	1(+)
Dilución 1:8	0		0		0	
Dilución 1:10	ND	1(+)	ND	1(+)	ND	1(+)

Ver leyenda pág 46

P.S: Procesada una semana luego de su recolección.

P.D: Procesada el mismo día de su recolección.

ND: No se determinó.

En la planta procesada una semana luego de su recolección, se detectó hemoaglutinación solo en las muestras sin diluir, para los grupos sanguíneos “O”, “B” y “A”, a excepción de “A” que también presenta un título de 8. Mientras que en “AB” no hubo actividad. En la planta procesada el mismo día de su recolección se ve una ligera actividad que mantiene su proporción en las diluciones realizadas y sin diluir, con título 10.

Determinación cuantitativa de proteínas y ácidos nucleicos presentes en los extractos de *Machaerium robiniiifolium*. (Hojas, semillas y vainas), con distintos tiempos de procesamiento.

Se realizó la determinación de concentración de proteínas presentes en los extractos mediante el método de Warburg-Christian y se obtuvieron los siguientes resultados:

Planta procesada una semana luego de su recolección.

Tabla 20. Determinación cuantitativa de proteínas mediante el método de Warburg-Christian.

	Extracto de hojas	Extracto de semillas	Extracto de vainas
Absorbancia a 260 nm	1,2	1,4	1,3
Absorbancia a 280 nm	1,3	1,5	1,3
A280/A260	1,0	1,1	1,0
Factor de corrección	0,8	0,9	0,8
Concentración de proteínas mg/ml	1,7	4,5	1,9
mg totales de Proteínas	360,4	351	380
mg proteínas/gr material vegetal	12,9	18,5	9,5

Planta procesada el mismo día de su recolección.

Tabla 21. Determinación cuantitativa de proteínas mediante el método de Warburg-Christian.

	Extracto de hojas	Extracto de semillas	Extracto de vainas
Absorbancia a 260 nm	0,2	0,3	0,2
Absorbancia a 280 nm	0,2	0,4	0,3
A280/A260	1,0	1,5	1,2
Factor de corrección	0,9	1,0	0,9
Concentración de proteínas mg/ml)	15,8	44,8	24,1
mg totales de Proteínas	647,8	201,6	228,95
mg proteínas/gr material vegetal	64,8	42,8	17,3

Los valores de proteínas estimados espectrofotométricamente, indican que el proceso de extracción realizado el mismo día de la recolección produjo mayor cantidad de proteínas

Espectro de barrido (200-300 nm) de extractos obtenidos de *Machaerium robiniifolium*. (Hojas, semillas y vainas). Procesada una semana luego de su recolección.

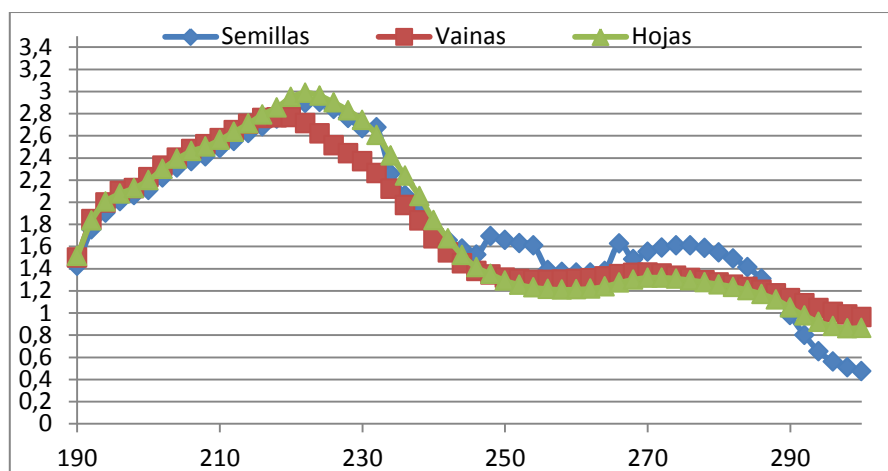


Figura 12. Espectro de barrido (200-300 nm).

www.bdigital.ula.ve

Espectro de barrido (200-300 nm) de extractos obtenidos de *Machaerium robiniifolium*. (Hojas, semillas y vainas). Procesada el mismo día de su recolección.

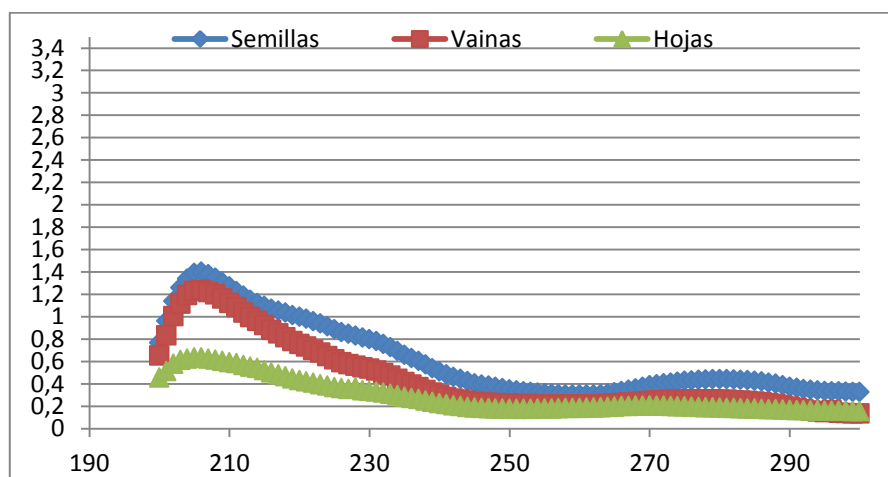
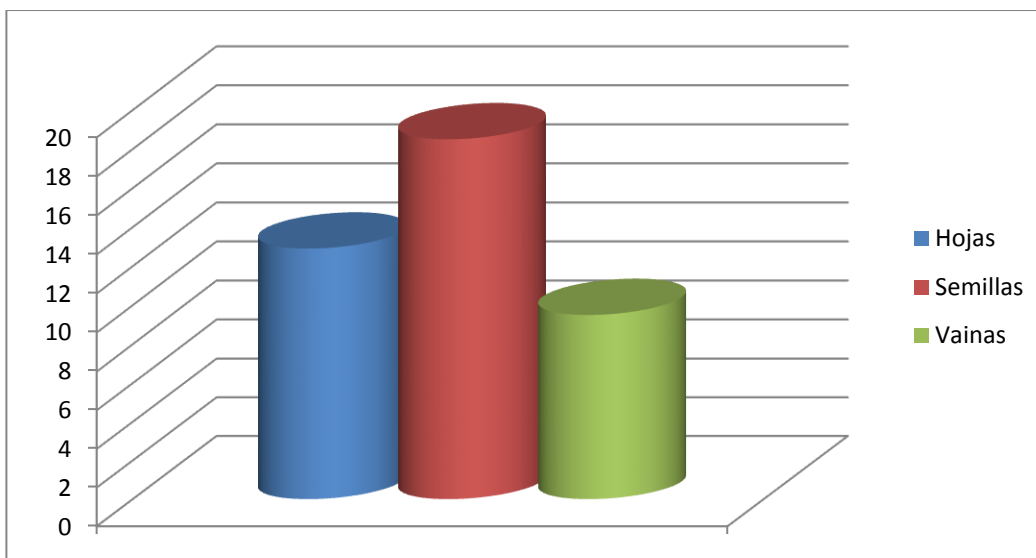


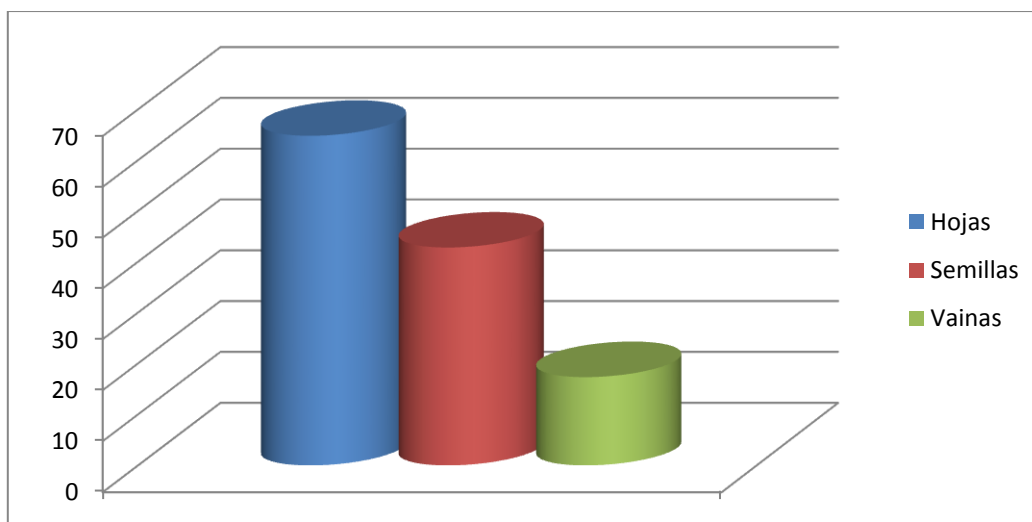
Figura 13. Espectro de barrido (200-300 nm).

Figura 14. Determinación del contenido de proteínas en los extractos de *Machaerium robiniifolium*. (Procesada una semana luego de su recolección).



www.bdigital.ula.ve

Figura 15. Determinación del contenido de proteínas en los extractos de *Machaerium robiniifolium*. (Procesada el mismo día de su recolección).



En las figuras 12 y 13, se observa que la evaluación espectrofotométrica muestra diferencias en los valores máximos de absorción entre los dos tratamientos, suponemos que dicha variabilidad es generada por el tratamiento de secado por una semana a temperatura ambiente, lo cual puede insidir negativamente en la calidad de las proteínas presentes en los extractos.

En las figuras 14 y 15, se evidencia la diferencia cuantitativa de proteínas presentes de los extractos en diferentes tiempos de procesamiento (una procesada el mismo día de su recolección y otra una semana después), demostrando que la planta procesada más tardíamente sufrió deterioro en las proteína, esto puede deberse a la desnaturalización que ocurre en las mismas al extraer la planta de su hábitat natural.

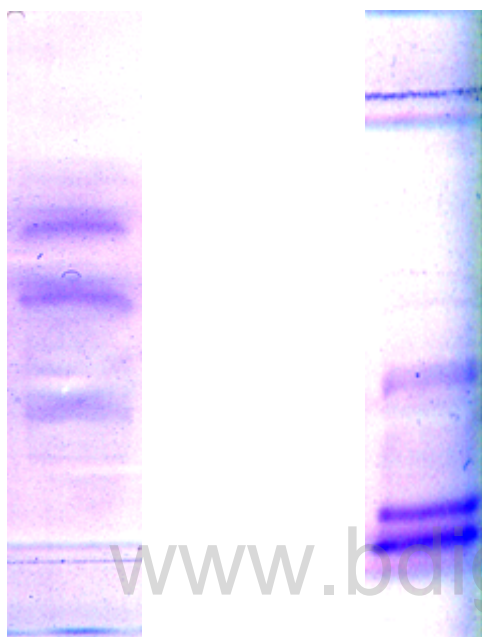
www.bdigital.ula.ve

Basándonos en el método de Warburg-Christian se obtuvo como resultado: en el primer extracto, la semilla presenta la mayor cantidad proteica, lo cual concuerda con la actividad hemoaglutinante que posee; seguido por el extracto de hojas; mientras que en el segundo extracto hay mayor cantidad de proteínas en las hojas que en las semillas, sin embargo la semilla sigue presentando mayor capacidad aglutinante, pudiendo ser que las que se encuentran presentes en las hojas no son afines a los hidratos de carbono que están en la membrana de los glóbulos rojos; en ambos extractos, las vainas tienen la menor concentración proteica y no presentaron aglutinación.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

Figuras 18 y 19. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (concentración de 12,5% y 10%, respectivamente). Usando extractos obtenidos el mismo día de la recolección de la planta.



Ext. De semillas 10 μ l.

De los tres extractos a evaluar solo se evidencian las bandas propias de la semilla, pudo deberse a desnaturalización proteica, problemas con el gel o errores en la metodología. En la figura 19, se pudieron separar adecuadamente las bandas que conciernen a los marcadores de peso molecular; se observan claramente las bandas de proteínas presentes en la semilla mediante este método.

Figura 20. Curva de Calibración para estimar el peso molecular de las proteínas problema.

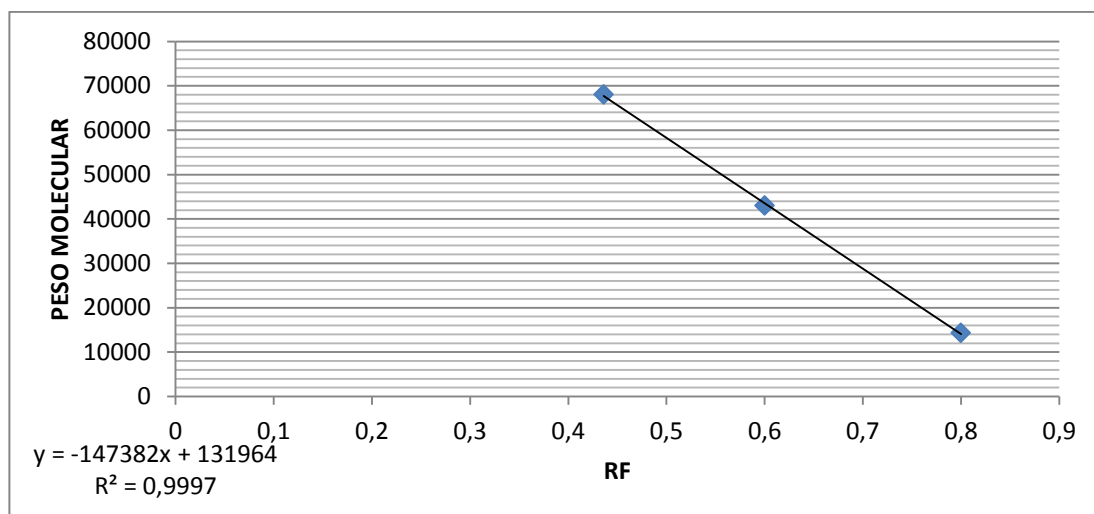


Tabla 22. Cálculo de los Rf con sus respectivos pesos moleculares para cada muestra evaluada.

MUESTRA	PESO MOLECULAR	RF
Hojas	61.957 D.	0,475
Semillas	68.590 D	0,43
	39.113 D	0,63
	32.218 D	0,67

En la figura 20, se graficaron los Rf de los extractos de hoja (Gel 1) y semillas (Gel 2), así como también patrones de peso molecular, realizando una curva, obteniendo los pesos moleculares de las proteínas presentes en cada una mediante la aplicación de la ecuación de la recta, los resultados se muestran en la tabla 22. Se observa la presencia de 3 proteínas en el extracto de hojas, al igual que en el extracto de semillas.

CONCLUSIONES

1.- *Machaerium robiniifolium* mostró capacidad hemoaglutinante, con variaciones en los títulos en diferentes grupos sanguíneos, así como también varió su actividad según diferentes tiempos de procesada para la obtención de extractos.

2.- En los extractos de hojas de la planta procesada una semana luego de su recolección, se detectó hemoaglutinación solo en las muestras sin diluir, para los grupos sanguíneos "O", "B" y "A". Mientras que en "AB" no hubo actividad. En la planta procesada el mismo día de su recolección se ve una ligera actividad que mantiene una baja aglutinación en las diluciones realizadas y en la muestra sin diluir.

3.- En cuanto a las semillas; en la planta procesada una semana luego de su recolección se determinó actividad en todos los grupos sanguíneos con los extractos sin diluir. En los grupos "O", "A" y "B" se observa que al diluir un poco hay un incremento de la hemaglutinación, con un título de 2, luego desapareció en las sucesivas diluciones; mientras que para el grupo "AB" comienza a disminuir a medida que aumenta la dilución.

En las semillas de la planta procesada el mismo día de recolectada, se observó, que los grupos sanguíneos "B" y "O" muestran poca actividad hemoaglutinante en las muestras sin diluir y aumentan su aglutinación cuando se diluye, presentando su título en 32. El grupo "A" no presenta actividad con el extracto sin diluir, pero si al diluirse alcanzando su pico

máximo en 1:8, observándose variaciones en las diluciones, siendo este grupo el de mayor actividad, con título 512.

4.- El extracto de las vainas no presento actividad hemoaglutinante.

5.- En cuanto al estudio espectrofotométrico de los extractos de hojas, semillas y vainas de la leguminosa *Machaerium robiniifolium*, se evidencia una diferencia cuantitativa en la concentración de proteínas presentes de los extractos en diferentes tiempos de procesamiento (una procesada el mismo día de su recolección y otra una semana después).

Se demostró que la planta procesada más tardíamente sufrió modificación en las proteínas debido al tiempo que estuvo en almacenamiento. En ambos extractos, a pesar de su variación proteica en cantidad, se aprecia que la mayor cantidad de proteínas se encuentra en las semillas, aunque con gran diferencia en concentración, puesto que en la que se proceso el mismo día hay mayor cantidad.

6.- Para conocer el perfil proteico de los extractos, se realizó una corrida electroforética, en la cual se evidenció la presencia de una única banda en el extracto de hojas, con peso molecular de: 61.957 D. En el caso del extracto obtenido de las semillas se observaron tres bandas, cuyos pesos moleculares son: 68.590 D, 39.113 D y 32.218 D. Mientras que en el caso de la vaina no hubo presencia de proteínas.

8.- En el extracto de hojas se observa la presencia de bandas invertidas, tanto para la planta procesada tardíamente, así como también en la que se procesó de inmediato, lo cual indica la presencia de una proteína que no se pudo definir. Se realizó una búsqueda con respecto al nuevo fenómeno y no se encontró ningún reporte que hiciera referencia a este tipo de banda, por lo cual es de gran importancia realizar investigaciones futuras con respecto a esta posible novedad.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Boyd, W. y cols. (1.954). Antigenic relations of blood group antigen and suggested by test with lectins; p. 73.
- Campell, M. (1.995). Biochemistry. Second eition. Saunder College Publishing; p. 34-36.
- Cavaleiro, M.G., et al; (2.009). Actividades biológicas en enzimáticas do extratoacuoso de sementes de *Caesalpiniaferrea* Mart., leguminosae. Brazilianjournal of pharmacognosy, 19(2B); p. 586-591.
- Cooper, T. (1.984). Instrumentos y técnicas de Bioquímica; p. 201-202.
- Bollag, D; Rozicky, M; Edelstein, S. (1.996). Protein Methods (segunda Edición); p. 107-169.
- Dávila, J. (2.002). Evaluación de la actividad hemoaglutinante de extractos de la familia Musáceae. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida- Venezuela; p. 6,10,68.

www.bdigital.ula.ve

- Dávila, J. (2.010). Actividad biológica de extractos preparados a partir de la planta *Couroupita guianensis Aubl.* Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela; p. 2.
- Díaz, L. (1.993). Lorena Díaz de Torres. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Mérida-Venezuel; p.4-5.
- Djabayan, P. (1.998). Cuantificación de la actividad de unión de las lectinas con su carbohidrato específico, presente en la membrana de los eritrocitos humanos: Una metodología en el proceso de caracterización de las lectinas. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela, p. 1,3.
- Gélvez L. (2.004). Evaluación de la actividad biológica de *Hyptis suaveolens*(L) Poit. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela, p. 26,55.
- Gómez R. (2.011). Hemograma. Cómo hacer e interpretar. Sao Paulo. Brasil; p. 18
- Hicks, J. (2.002). Bioquímica interamericana Mc Graw Hill. 2da edic, p.49-60.

- <http://www.tuotromedico.com/temas/eritrocitos.htm>. (04.02.2-013)
- <http://www.manualdelombricultura.com/glosario/pal/163.html>.
(02.05.2013)
- <http://www.monografias.com/trabajos11/lecti/lecti.shtml#intro>.
(13.11.2013)
- <http://www.medicinapreventiva.com.ve/laboratorio/grupos.htm>.
(27.01.2014)
- Keller, (1.996). identificación de las tribus de leguminosas leñosas en América tropical, mediante el uso de caracteres vegetativos. Acta botánica Venezolana. (19): 1-24.
- Kubarev, S.V., et al., (2.008). Interaction of seedlectins of cereal and leguminouscrops witherythrocytes of cattle. AGRIS, 44(1), 129-132.
- Meléndez, P.A. (2.009). Sinopsis del género machaeriumpers. (leguminosae–papilionoideae–dalbergieae) en Venezuela. Acta botánica Venezuéllica. 32 (2).

- Millán, A. (2.010). Evaluación de la actividad en extractos preparados de plantas como cactáceas y leguminosas. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela, p. 13.
- Montgomery, R.; Tomas, C. y Spector, A. (1.998). bioquímica. Edit. Mosby year-book; p. 31-67.
- Parham, P. (2.006). Inmunología. 2da edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; p. 13.
- Puszta, A. (1991). Plant Lectins. Cambridge Universitypress. New York. EE.UU; p. 3, 67-107.
- Sala, A., y Santiago, A. (2.006). Evaluación de la actividad hemoaglutinante en las partes (hojas, tallos, raíz y cotiledón) de plántulas de leguminosas. Tesina de grado, Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela, p. 26, 31-37, 40-44.
- Sharon, N. y cols. (1.989). Mitigenic stimulation of linphocytes. Lectins. Edit. Chapman and Hall; p. 27-31.
- Silverthorn, D. y cols. (2.008). Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 4ta edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; p. 538.

- Warburg, C. Protein Analysis-Determination of Protein Concentration, p.1-4.

www.bdigital.ula.ve