



UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Escuela Profesional de Ecología

TESIS

**ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA FITOQUELATINA SINTASA
EN RAÍCES Y HOJAS DE PLÁNTULAS DE *Myrciaria dubia*
(KUNTH) MC VAUGH “camu camu” EXPUESTOS A METALES
PESADOS.**

Presentado por:

Bach. Adela Victoria Sunción Arce

Tesis para optar Título Profesional de:

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

LORETO – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Adela y Víctor Hugo

Mis padres, por su inmenso amor que me regalan cada día; por ser la base fundamental para seguir adelante en la forja de un destino mejor y ser mi mayor soporte en mis tiempos difíciles.

A Laura Emma

Mi querida hermana, por su comprensión y apoyo desinteresado durante mis estudios universitarios, por abrigarme sin medida y hacer el papel de mamá cuando más lo necesitaba.

A Ernesto Jesús

Mi ángel protector, que se puso sus alitas y alzó vuelo sin siquiera haber podido abrir sus ojitos para ver el mundo; es mi entrañable consuelo y fortaleza para seguir luchando en esta vida y a través de él pude sentir todo el amor que puede albergar el corazón de una madre.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Blgo. Jorge Angulo Quintanilla, por la transmisión de sus conocimientos y su disposición a la orientación permanente, por su paciencia en el adiestramiento, por las sugerencias y acompañamiento durante los procesos de ejecución y redacción final de la tesis y su comprensión en mis momentos de ausencias.

A la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia - CIRNA, al Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila, por el acceso a las instalaciones e instrumentos y equipos para llevar a cabo la ejecución total de la tesis.

A mi familia fuente motivadora permanente de mi vida, acompañantes en los momentos de felicidad y fortaleza en los momentos difíciles, a mis profesores por sus conocimientos y experiencias brindadas durante mis años de estudios que ayudaron a mi formación profesional y personal, a mis compañeros por sus amistad y compañía.

A mis amigos tesistas, practicantes y voluntarios de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), por el apoyo brindado.

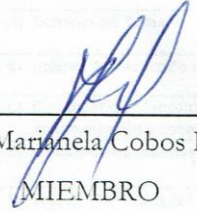
Mención especial a Jimmy Torres y Jhoao Fasabi, por su compañía y ayuda durante los procesos más complicados de la ejecución de la tesis.


JURADO CALIFICADOR

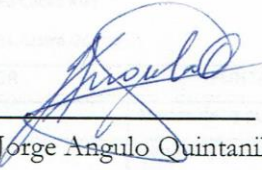
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS


Ing. Ulises Octavio Irigoín Cabrera MSc.
PRESIDENTE


Dra. Mariónela Cobos Ruíz
MIEMBRO


Dr. Juan Carlos Castro Gómez
MIEMBRO


Blgo. Jorge Angulo Quintanilla
ASESOR



FACULTAD
CIENCIAS E
INGENIERÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 10:00 horas del día lunes 13 de marzo del año 2017, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación de la bachiller en Ecología:

ADELA VICTORIA SUNCIÓN ARCE

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**
"Actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa en raíces y hojas de plántulas de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc. Vaugh "camu camu" expuestos a metales pesados."

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

Indicador	Examinador 1	Examinador 2	Examinador 3	Promedio
A) Dominio del Tema	18	18	18	18
B) Calidad de Redacción de la Tesis	18	16	16	17
C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia)	18	18	18	18
D) Calidad de Respuestas	18	17	17	17
E) Uso de Terminología Especializada	18	18	18	18
Calificación Final:				18

Aprobado Por: EXCELENCIA
Calificación Final (en letras): DIECIOCHO

Presidente: Ing. Ulises Octavio Irigoin Cabrera M.Sc.
Miembro: Dra. Marianela Cobos Ruiz
Miembro: Dr. Juan Carlos Castro Gómez

INDICADOR	PUNTAJE
Desaprobado	Menos de 13 puntos
Aprobado por Mayoría	De 14 a 15 puntos
Aprobado por Unanimidad	De 16 a 17 puntos
Aprobado por Excelencia	De 18 a más puntos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTO	3
JURADO CALIFICADOR	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
CAPÍTULO I	16
Introducción	16
CAPÍTULO II	18
OBJETIVOS	18
CAPÍTULO III	19
MARCO TEÓRICO CONCENTUAL	19
3.1. Marco teórico	19
3.1.1. Aspectos Generales de la Especie.	19
3.2. Metales pesados.	21
3.2.1. Efectos de la contaminación por metales pesados en las plantas.	22
3.3. Mecanismos de tolerancia a metales pesados.	23
3.4. Enzimas.	25
3.4.1. Unión de la enzima con el sustrato.	26
3.4.2. Actividad enzimática.	27
3.5. Fitoquelatinas (PCs).	29
3.5.1. Estructura.	30
3.5.2. Regulación de la biosíntesis de PC.	31
3.5.3. Fitoquelatina sintasa (PCS).	32
3.6. Términos básicos.	34
3.7. Antecedentes.	35
CAPÍTULO IV	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.	39

4.2. Recursos Utilizados.	39
4.2.1. Materiales de Laboratorio.	39
4.2.2. Reactivos.	40
4.2.3. Equipos.	40
4.2.4. Programas.	40
4.3. Diseño de investigación.	41
4.4. Población y muestra.	41
4.4.1. Población.	41
4.4.2. Muestra.	41
4.5. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos.	41
4.5.1. Técnicas y Procedimientos.	41
4.5.1.1. Obtención de plántulas a partir de semillas de frutos maduros.	41
4.5.1.2. Preparación de Metales pesados a emplearse.	42
4.5.1.3. Extracción de proteínas totales.	42
4.5.1.4. Cuantificación de proteínas - Método de Bradford.	42
4.5.1.5. Actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa.	43
4.6. Flujograma metodológico.	44
CAPÍTULO V	45
RESULTADOS	45
5.2. Cuantificación espectrofotométrica.	45
5.3. Actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa.	46
5.4. Velocidad promedio de actividad de la PC sintasa.	47
DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO VII	55
CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO VIII	56
RECOMENDACIONES	56
CAPÍTULO IX	57
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Título	Pág.
01	Familias de péptidos y-EC.	32
02	Concentraciones de las soluciones metálicas empleadas en las pruebas de resistencia a metales pesados por plántulas de <i>M dubia</i> ..	42
03	Concentración de proteína en hojas y raíces de <i>M. dubia</i> tratados con Mercurio	45
04	Concentración de proteína en hojas y raíces de <i>M. dubia</i> tratados con Plomo.	46
05	Coeficientes de dispersión de la actividad de la fitoquelatina en hojas de Mercurio.	61
06	Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de <i>M. dubia</i> tratadas con Mercurio.	61
07	Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de <i>M. dubia</i> tratadas con Mercurio.	61
08	Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de <i>M. dubia</i> tratadas con Plomo.	62
09	Velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa en hojas y raíces tratadas con Mercurio.	62
10	Velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa en hojas y raíces tratadas con Plomo.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
01	Unión enzima – sustrato.	27
02	Actividad enzimática.	28
03	Estructura de una fitoquelatina.	30
04	Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en hojas tratadas con Mercurio.	48
05	Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en raíces tratadas con Mercurio.	49
06	Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en hojas tratadas con Plomo.	50
07	Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en raíces tratadas con Plomo.	51
08	Curva de la desviación estándar del BSA.	63
09	Prueba de resistencia al stress con metales pesados.	64
10	Prueba de resistencia con Plata y Cobre a 03 y 24 horas de exposición.	64
11	Efectos sobre las plantas sometidas a stress con Plata.	64
12	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0,0001 mg/L).	65
13	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0,0008 mg/L).	65
14	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0,0016 mg/L).	65
15	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0,0001 mg/L).	65
16	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0,0008 mg/L).	65

Nº	Título	Pág.
17	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0,0016 mg/L).	65
18	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0,0001 mg/L).	66
19	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0,0008 mg/L).	66
20	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0,0016 mg/L).	66
21	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0,0001 mg/L).	66
22	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0,0008 mg/L).	66
23	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0,0016 mg/L).	66
24	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0,0001 mg/L).	67
25	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0,0008 mg/L).	67
26	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0,0016 mg/L).	67
27	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0,0001 mg/L).	67
28	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0,0008 mg/L).	67
29	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0,0016 mg/L).	67
30	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de H1 (0,001 mg/L).	68
31	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de H2 (0,008 mg/L).	68

Nº	Título	Pág.
32	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de H3 (0,016 mg/L).	68
33	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de R1 (0,001 mg/L).	68
34	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de R2 (0,008 mg/L).	68
35	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 06 horas con Plomo a una concentración de R3 (0,016 mg/L).	68
36	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H1 (0,001 mg/L).	69
37	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H2 (0,008 mg/L).	69
38	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H3 (0,016 mg/L).	69
39	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R1 (0,001 mg/L).	69
40	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R2 (0,008 mg/L).	69
41	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R3 (0,016 mg/L).	69
42	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H1 (0,001 mg/L).	70
43	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H2 (0,008 mg/L).	70
44	Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H3 (0,016 mg/L).	70
45	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R1 (0,001 mg/L).	70
46	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R2 (0,008 mg/L).	70

N°	Título	Pág.
47	Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R3 (0,016 mg/L).	70

ABREVIATURAS

AtPCS1: Gen *Arabidopsis thaliana* Fitoquelatina sintasa 1

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CAD1: Cadmio sensible 1

Cys: Cisteína

Glu: Glutamato

Gly: Glycina

GSH: Glutación

MTs: Metalotioneínas

PCs: Fitoquelatinas

PCS: Fitoquelatina sintasa

RESUMEN

Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh “camu-camu” es un frutal silvestre de la Amazonía. Los vertimientos de aguas saladas en los lagos y ríos han ocasionado un perjuicio, pues *M. dubia* debe adaptarse y para ello desarrollar mecanismos que le ayuden a sobrevivir. En esta especie se desconoce la existencia de genes de fitoquelatina sintasa y actividad catalítica de la misma por lo que se considera: Determinar la actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa en raíces y hojas de plántulas expuestas a metales pesados, como el MERCURIO y PLOMO a concentraciones de 0,0001; 0,0008; 0,0016 mg/L y 0,001; 0,008; 0,016 mg/L respectivamente y tiempos de exposición de 06, 12, 24 horas. Se Cultivó plántulas de *M. dubia*, y se realizó la extracción de proteínas totales cuantificándolas por espectrofotometría, con Albumina Sérica Bovina como estándar. Las concentraciones promedio de proteínas encontradas son de 0,96 mg/gr de muestra y 1,11 mg/gr de muestra en hojas y raíces respectivamente de las plántulas sometidas a stress con MERCURIO y concentraciones promedio de proteínas de 0,94 mg/gr de muestra y 0,98 mg/gr de muestra en hojas y raíces respectivamente de las plántulas sometidas a stress con PLOMO. La actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa. Para MERCURIO, la mayor actividad lo presenta la raíz con R^2 de 0,9739, 0,9935 y 0,9941 a 06 horas en las tres concentraciones empleadas. Con PLOMO, la raíz presenta una actividad con R^2 de 1,0 a las 06 horas de exposición a una concentración de 0,008mg/L. La velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa más sobresaliente, fue detectada en las hojas tratadas con MERCURIO 2.61×10^{-6} mM/s D.S $\pm 1.10 \times 10^{-7}$ a 06 horas de exposición a una concentración de 0,0016mg/L.

Palabras claves: *Myrciaria dubia*, contaminación, metales pesados, fitoquelatina sintasa, actividad catalítica.

ABSTRACT

Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh “camu-camu” is a wild fruit from the Amazon. The spills of salt water in lakes and rivers, causing a damage *M. dubia* must adapt and to this end develop mechanisms to help them survive. In this species the existence of phytochelatin synthase genes and their catalytic activity are unknown. To determine the catalytic activity of phytochelatin synthase in roots and leaves of seedlings exposed to heavy metals. As MERCURY and LEAD at concentrations of 0,0001; 0,0008; 0,0016 mg/L and 0,001; 0,008; 0,016 mg/L respectively and exposure times of 06, 12, 24 hours. Cultivated seedlings of *M. dubia*, and carried out the extraction of total proteins quantifying them by spectrophotometry, with Bovine Serum Albumin as standard. The average concentrations of proteins found are 0,96 mg/gr of sample and 1,11 mg/g of sample in leaves and roots respectively of the seedlings under stress with MERCURIO and average concentrations of proteins of 0,94 mg/gr of sample and 0,98 mg/gr of sample in leaves and roots respectively of the seedlings under stress with LEAD. The catalytic activity of phytochelatin synthase. To Mercury, the highest activity of the enzyme is presented by the root with R2 of 0,9739, 0,9935 and 0,9941 to 06 hours in the three concentrations used. With LEAD, the root presents an activity with R2 of 1,0 at 06 hours of exposure at a concentration of 0,008 mg/L. The average activity rate of the most prominent phytochelatin synthase was detected in the leaves treated with mercury $2,61 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 1,10 \times 10^{-7}$ a 06 hours exposure at a concentration of 0,0016 mg/L.

Key words: *Myrciaria dubia*, pollution, heavy metals, phytochelatin synthase, catalytic activity.

CAPÍTULO I

Introducción

Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh “camu-camu”, es un frutal silvestre de la Amazonía que crece en las riberas inundables de los ríos y cochas de aguas oscuras y puede permanecer completamente sumergido por cuatro a cinco meses (1). Se distribuye en las cuencas de los ríos Amazonas y Ucayali, lugar en donde ha desarrollado gran adaptación a las inundaciones (2).

La contaminación de la biósfera con metales pesados (Plomo, Cadmio, Arsénico, Uranio, etc.), se ha acelerado drásticamente desde el comienzo de la revolución industrial, la contaminación de suelos y aguas por residuos industriales y en particular por residuos de metales pesados(3).

Los vertimientos de aguas saladas en las cochas y ríos, ocasionan un perjuicio a los lechos de varios cuerpos de aguas, que se han visto dañados por los derrames o fugas de petróleo y otras operaciones, lo que ocasiona la contaminación de cochas y ríos de la amazonia por la actividad petrolera y aurífera. Las cochas de la amazonia presentan una mayor sensibilidad a la contaminación petrolera debido a la falta de movilidad del agua (4), por tal motivo *M. dubia* debe adaptarse y para tal efecto debe desarrollar mecanismos que le ayuden a sobrevivir en dichos lugares. En algunas plantas, se han identificado dos tipos de péptidos capaces de quelar metales pesados y ambos son péptidos ricos en cisteína: metalotioneínas y fitoquelatinas (5).

En *M. dubia* se desconoce la existencia de estos genes de fitoquelatina sintasa y la actividad catalítica de esta molécula, motivo por el cual se desarrolló la presente investigación ya que es de vital importancia conocer experimentalmente la presencia de dichas moléculas lo que contribuiría en el conocimiento de la especie.

Los resultados de esta investigación potencialmente proporcionarán múltiples impactos positivos en el ámbito científico, medioambiental y socioeconómico. En lo científico generaría un amplio conocimiento sobre este aspecto y se podrán identificar los genes y moléculas implicadas en los procesos de adaptación. Contribuirá a las ciencias medioambientales los conocimientos de los mecanismos de adaptación a ambientes con metales pesados. Y en el ámbito socioeconómico generará información de vital importancia para un manejo más adecuado y sostenible del recurso estudiado para poder garantizar la calidad del producto para su comercialización en el mercado internacional.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. General:

- Determinar si existe inducción de la actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa en raíces y hojas de plántulas de *M. dubia* expuestos a metales pesados.

2.2. Específicos:

- Evaluar si existe inducción diferencial de la actividad catalítica de fitoquelatina sintasa en raíces y hojas de plántulas de *M. dubia* expuestos a metales pesados
- Determinar los parámetros cinéticos de la fitoquelatina sintasa en hojas y raíces de plántulas de *M. dubia*.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO CONCENTUAL

3.1. Marco teórico

3.1.1. Aspectos Generales de la Especie.

3.1.1.1. Clasificación Taxonómica.

Los estudios taxonómicos actuales del APG III (Angiosperm Phylogeny Group 2009) clasifican a la especie estudiada de la siguiente manera (6):

- **Tipo** : Fanerógamas
- **Subtipo** : Angiospermas
- **Clase** : Magnoliopsida
- **Sub clase** : Rosiidae
- **Orden** : Myrtales
- **Familia** : Myrtaceae
- **Sub familia** : Mytoideae; Tribu Myrteae;
- **Género** : Myrciaria
- **Especie** : *M. dubia*
- **Nombre científico**: *M. dubia* (Kunth) McVaugh
- **Nombre común**: “camu-camu”.

3.1.1.2. Distribución Geográfica.

Myrciaria dubia (Myrtáceae) es un frutal arbustivo silvestre de la Amazonía. Crece en las riberas inundables de los ríos, lagos, cochas de aguas oscuras formando poblaciones naturales densas y puede permanecer completamente sumergido en agua durante 4 ó 5 meses (7). El hábitat principal son las zonas naturales inundables, aunque se da en suelos de altura en forma de sembríos manejados. En el departamento de Loreto, las poblaciones naturales se encuentran en los ríos Putumayo, Napo, Curaray, Tigre, Marañón, Yavarí, Ucayali y muchos otros ríos como el Itaya y Nanay (8).

Esta especie se encuentra en las riberas de los ríos Solimoes (Amazonas), Negro, Trombetas, Xingu, Tocantines, Madeira, Tapajos, Acre, Yavarí, Macangana y Urupé, en el Brasil; Amazonas, Ucayali, Marañón, Napo, Tigre, Curaray, Yavarí y Tahuayo, en el Perú; Putumayo e Inírida, en Colombia; así como también en la cuenca superior del Orinoco, en Venezuela. La mayor concentración y diversidad de las poblaciones se encuentra en la Amazonía peruana (1).

En la quebrada “Iricahua” afluente del río Ucayali, existe el camu-camu tipo árbol en poblaciones relativamente medianas y cuya época de recolección se efectúa entre los meses de enero y marzo. Cabe indicar que el camu-camu tipo árbol no se encuentra en poblaciones compactas como el tipo arbustivo, sino en asociación con otras especies forestales como capirona, quinilla, shimbillo, entre otras, a una densidad que oscila entre 20 a 50 individuos por hectárea (9).

3.1.1.3. Descripción Botánica.

M. dubia es una planta arbustiva, perenne de crecimiento indeterminado. Se distinguen tres tipos de plantas: tipo columnar, que se caracteriza por tener poca o nula ramificación; tipo intermedio, cuya ramificación está a una altura de 50 a 70 cm del suelo; y el tipo copa abierta o cónica, que es la planta ideal, tiene muchas ramificaciones desde el suelo, con muchas ramas fructíferas (10).

Los arbustos de *M. dubia* miden de 4 a 8 m de altura, con una ramificación que se inicia desde la base. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricas, lisos de color marrón claro a rojizo, con una corteza que se desprende cumplido su ciclo. Las hojas son simples, de borde liso, opuestas, ovaladas, elípticas, lanceoladas y algo asimétricas. La raíz principal es de forma cónica, y muchos pelos absorbentes. Los frutos son globosos, de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro hasta negro púrpura al madurar, miden de 2 a 4 cm de diámetro, con 1 a 4 semillas por fruto, siendo la más común de 2 a 3 semillas.

Las semillas son reniformes, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud (11).

La especie, inicia la floración, cuando alcanzan un diámetro basal de 2,0 cm, que corresponde a los arbustos que tienen entre dos y tres años de edad aproximadamente. La floración de un individuo ocurre en forma continua. Las yemas florales emergen desde las ramas superiores, hacia las ramas inferiores. Por lo tanto, un individuo puede presentar yemas florales, flores y frutos en varios estados de desarrollo al mismo tiempo (7) .

La Región Loreto, presenta las condiciones medioambientales ideales para el crecimiento y desarrollo de este frutal, es así que las mayores poblaciones naturales de camu-camu encontradas, se ubican en esta región formando rodales naturales en las orillas de las cuencas del río Amazonas (12).

Considerando características morfológicas el camu-camu se agrupa en cinco ecotipos: arbusto con hoja ancha (ecotipo 1), arbusto con hoja chica (ecotipo 2), árbol Supay (ecotipo 3), árbol Iricahua (ecotipo 4) y camucamillo (ecotipo 5)(13).

Por los estados de maduración del fruto se clasifican de acuerdo a la coloración rojiza presente en la cáscara: verdes para aquellos que tienen menos del 25% de coloración rojiza, verde-pintón 25-50%; pintón 50-75% y maduros mayor del 75% de coloración rojiza (14).

3.2. Metales pesados.

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas (15).

Se consideran metales pesados aquellos elementos de transición de la Tabla Periódica con densidad $> 5\text{g/cm}^3$. Pueden ser esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni o Mo) o no esenciales (Cd, Pb, Hg, Cr), y

también se incluyen en el grupo algunos metaloides (As, Se) con efectos contaminantes. La mayoría de los metales pesados tienden a presentarse como cationes asociados a diversos ligandos orgánicos e inorgánicos (16) , están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse (17).

Los metales pesados pueden incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, los que posteriormente se depositan en lagos, ríos y distintos sistemas acuíferos. La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimentaria (15).

Las plantas son organismos autotróficos capaces de utilizar la luz y el dióxido de carbono como fuente de energía. Al mismo tiempo que son capaces de tomar agua y nutrientes por medio de sus raíces, son también capaces de absorber compuestos tóxicos pero (18), han desarrollado mecanismos muy específicos para absorber, translocar y acumular nutrientes (19); sin embargo no tienen un mecanismo de transporte específico para los metales no esenciales por lo que utilizan sistemas de transporte de moléculas similares.

Según la capacidad de distribución del metal pesado se habla de plantas acumuladoras, que almacenan activamente el elemento tóxico en sus tejidos y disponen de un sistema eficaz de transporte desde la raíz a la parte aérea, y de plantas exclusoras, que tienen restringidos tanto la absorción del metal como su transporte a la parte aérea (20).

3.2.1. Efectos de la contaminación por metales pesados en las plantas.

La toxicidad ocasionada por las altas concentraciones de metales pesados da como resultado clorosis, crecimiento débil de las plantas y puede incluso ocasionar reducción en la captación de los nutrientes así como desórdenes en el metabolismo (19), también se inactivan algunas enzimas del ciclo de Calvin

(Rubisco, fosfoenolpiruvato carboxilasa), dañan la membrana plasmática e inducen (16) al estrés oxidante en las plantas. Además se ha reportado que el estrés por metales afecta a la fotosíntesis, a la fluorescencia de la clorofila y a la resistencia estomatal. Por ejemplo, el Cobre inhibe la fotosíntesis y los procesos reproductores, el Plomo reduce la producción de clorofila mientras que el Arsénico interfiere con el proceso metabólico y disminuye la germinación de las semillas (19).

Ernst (1996) y Hall (2002) mencionan la existencia de dos tipos de mecanismos que pueden explicar la resistencia en las plantas a la toxicidad de iones metálicos, como son: la anulación, que involucra varias maneras de prevenir el acceso de los iones tóxicos a los sitios designados, y la tolerancia, mediante la resistencia a la entrada de los iones metálicos al simplasma. Como mecanismo de resistencia al exceso de metales en el sustrato se reportan estrategias de adaptación como: exudación y excreción de ácidos orgánicos, transporte y almacenamiento en vacuolas, interferencia y restricción de paredes celulares, complejos en el simplasma (21).

3.3. Mecanismos de tolerancia a metales pesados.

Para el caso de las plantas, su tolerancia a elementos potencialmente tóxicos (metales esenciales y no esenciales) puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies de plantas la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos tóxicos. Dicho proceso se ha dado gracias al desarrollo de una serie de mecanismos eficientes y específicos (procesos adaptativos) que permiten mantener la toma de elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles, así como proporcionar la capacidad de inactivar metabólicamente lo elementos esenciales y no esenciales cuando representan un riesgo para la integridad celular (22).

De acuerdo al conjunto de mecanismos moleculares o bioquímicos, se clasificó a la tolerancia en dos tipos:

- Co-tolerancias: que puede ser un resultado de un mecanismo específico que confiere una tolerancia a diversos metales.
- Tolerancia múltiple: la tolerancia es generada por una serie de mecanismos independientes que interactúan de manera conjunta para cada metal o metales y así evitar el daño de la planta

La presencia de tolerancia múltiple ha permitido que las plantas desarrollen tres estrategias básicas para establecerse en suelos con niveles tóxicos de metales: estrategia de exclusión, indicadora e hiperacumulación. 1.- La estrategia de exclusión consiste en una limitada acumulación preferente en el sistema radical. 2.- En la estrategia indicadora las plantas acumulan metales en sus tejidos que generalmente reflejan los niveles de metales presentes en el suelo. 3.- La hiperacumulación se caracteriza por la capacidad de la planta de bioacumular altas concentraciones de metales en su tejidos, se consideran los posibles mecanismos de tolerancias en las siguientes formas: 1.- Mecanismos externos: hongos micorrizógenos; 2.- Mecanismo internos: (a) enlace a la pared celular y exudados radicales, (b) quelación de los metales por diversos ligandos en el citosol (fitoquelatinas, metalotioneínas y aminoácidos), (c) presencia de proteínas de estrés térmico, y (d) acumulación en la vacuola.

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro. Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados son las siguientes (23).

Fase I. Implica el transporte de los metales pesados al interior de la planta y, después, al interior de la célula. La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en

el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica (17).

Fase II. Una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos. Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metaloteínas.

Las metalotioneínas son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo. Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de Zn, Cd, Hg y Cu.

Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que tienen como sustrato al glutatión. Están constituidas básicamente por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, unidos por enlaces peptídicos.

Fase III. Involucra la compartimentalización y detoxificación, proceso por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola.

3.4. Enzimas (24).

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por

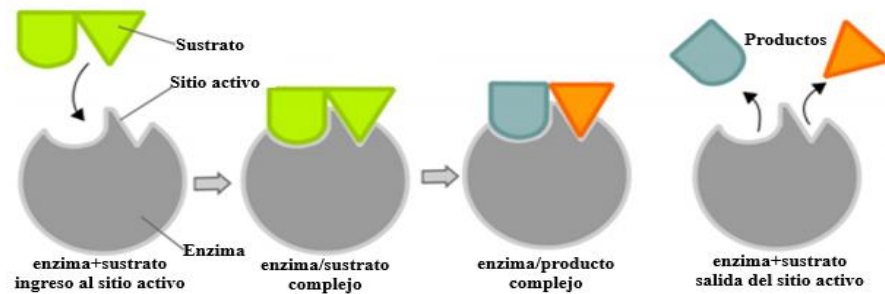
las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato, que hacen que la conversión de éste en un producto se vea favorecida. Como cualquier catalizador, al finalizar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima regresa a su estado original y puede involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis.

Las enzimas tienen una enorme variedad de funciones dentro de la célula: degradan azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, copian fielmente la información genética, participan en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior y se encargan de degradar subproductos tóxicos para la célula, entre muchas otras funciones vitales. La identidad y el estado fisiológico de un ser vivo está determinado por la colección de enzimas que estén funcionando con precisión de cirujano y con la velocidad de un rayo en un momento dado dentro de las células. Así, a lo largo de millones de años de evolución, la naturaleza ha desarrollado una gran diversidad de enzimas para mantener el complejo fenómeno de la vida.

3.4.1. Unión de la enzima con el sustrato.

La molécula o moléculas a modificar se sitúan en una región concreta de la enzima denominada centro o sitio activo. Esta zona de la enzima es responsable de las dos propiedades básicas de la molécula: la especificidad y la acción catalizadora de la proteína. Dentro de todo el conjunto de enzimas hay quienes presentan una alta especificidad, aceptando tan sólo un tipo de moléculas sobre las que realizar la catalización, siendo capaces de discriminar incluso entre moléculas isoméricas; por otro lado, otras enzimas con un menor nivel de especificidad cataliza reacciones utilizando como sustratos moléculas que presenten una cierta similitud. La interacción entre enzima y sustrato se realiza a través de enlaces de naturaleza débil entre la molécula de sustrato y el centro activo. Cuanto mayor sea el número de

estos enlaces, mayor será la especificidad de la enzima, y mayor también su capacidad de discriminar entre dos sustratos estructuralmente próximos.



Dos sustratos (@Meowbot y Jerry Crimson Mann)

Figura 01. Unión enzima – sustrato

3.4.2. Actividad enzimática (25).

La acción de las enzimas es absolutamente necesaria para los sistemas vivos, ya que las reacciones sin catalizar tienden a ser lentas y las posibilidades que tiene una molécula de cambiar en un ambiente estable como es el medio biológico, son muy bajas, de ahí que las enzimas proporcionen el medio adecuado para contrarrestar la lentitud en la realización del cambio. Las reacciones sean catalizadas o no, dependen para su desarrollo de las leyes termodinámicas. El principal parámetro que desde el punto de vista termodinámico, permite deducir si una reacción se desarrolla o no de forma espontánea, es el cambio en la energía libre de Gibbs, (ΔG) deducido de la segunda ley de la termodinámica (una reacción es espontánea si la entropía global del universo aumenta), que mide la capacidad de un sistema para desarrollar trabajo.

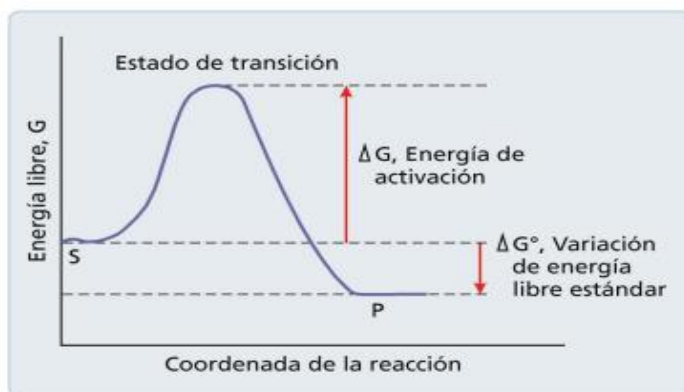


Figura 02: Actividad enzimática.

Para que se realice la transformación de una molécula, que denominamos sustrato (S), en otra que denominamos producto (P), el cambio de energía libre de Gibbs ha de ser negativo, lo que implica que la energía libre del producto ha de ser menor que la del sustrato. Esquemáticamente, el desarrollo de una reacción enzimática sencilla consistiría en:



En una reacción química la conversión de sustrato en producto requiere una situación energética intermedia que se denomina estado de transición, donde el nivel de energía es superior al del sustrato o del producto. La diferencia entre el nivel de energía basal y la correspondiente al estado de transición se denomina energía de activación y cuanto más alta sea menor será la velocidad de reacción. La presencia del catalizador provoca una disminución en la energía de activación requerida, y de esta forma aumenta la velocidad con que se desarrolla la misma. Un detalle importante a la hora de analizar la actividad enzimática, es que en las reacciones catalizadas enzimáticamente, se incrementa la velocidad de la reacción; pero lo que no se modifica es el equilibrio de la misma, que sigue las leyes termodinámicas independientemente de la presencia o ausencia del catalizador. La forma que tiene la

enzima de realizar su actividad catalítica será en primer lugar unirse con el sustrato, y en segundo lugar facilitar la modificación del mismo para su cambio a producto.

3.5. Fitoquelatinas (PCs).

Las fitoquelatinas constituyen uno de los principales mecanismos de defensa frente a metales pesados (26), son polipéptidos que enlazan metales, de PM entre 10 y 14 Kda, y han sido descritas en todos los organismos autótrofos. Estos péptidos actúan como agentes quelatantes, formando complejos con metales pesados en las plantas (27).

El nombre de fitoquelatinas se atribuye a su presencia específica en las plantas. El término “fito – que significa plantas” y las propiedades quelantes de metales “Chelatin”. A partir de entonces, muchas evidencias que han sido presentadas sugieren la importancia de los péptidos de las fitoquelatinas en el secuestro de los iones tóxicos de los metales en las plantas (28).

Desde principios de la década de los 80 se conocía que levaduras y plantas inducían la síntesis de moléculas ricas en grupos sulfhídrico al ser cultivadas en medios con una elevada concentración de Cadmio, pero no es hasta 1985 que determinan su estructura y las denominan fitoquelatinas. En investigaciones posteriores se asienta la idea de que las fitoquelatinas son polipéptidos sintetizados en el citosol para desactivar el efecto fitotóxico de los metales no esenciales. Esta desactivación se produce mediante la formación vía tiolatos de complejos metal-fitoquelatina de extraordinaria estabilidad, y su posterior secuestro en orgánulos de bajo metabolismo (principalmente vacuolas) donde quedan aislados (29).

Las PCs han sido detectadas en tejidos y cultivos celulares de plantas expuestas a concentraciones fisiológicas de metales esenciales, como el Cu y el Zn, sugiriendo que juegan un papel fundamental en su homeostasis. Además, existen evidencias que muestran que las PCs juegan un importante papel en

la detoxificación de metales, puesto que concentraciones elevadas de metales estimulan su síntesis. No obstante, su importancia en la tolerancia a metales pesados puede variar entre especies vegetales y el tipo de metal (30).

3.5.1. Estructura.

Las fitoquelatinas (PCs) están compuestas básicamente por tres aminoácidos: ácido glutámico (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly). La secuencia de aminoácidos que define su estructura primaria corresponde a un ácido glutámico –que ocupa la posición amino terminal- unido a una cisteína a través de un enlace γ -carboxilamida; esta unidad γ -Glu- Cys se repite n veces hasta finalizar con un residuo de glicina, que ocupa así el extremo carboxilo terminal (Figura 03). La fórmula general de estos péptidos se expresa, pues, como $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n puede llegar a 11 pero suele variar entre 2 y 5, y donde el aminoácido C-terminal puede cambiar dando lugar a cinco variaciones estructurales de fitoquelatinas. La manera simplificada de nombrar estos ligandos es PC2, PC3, PC4, según n sea 2, 3, 4 y así sucesivamente (29).

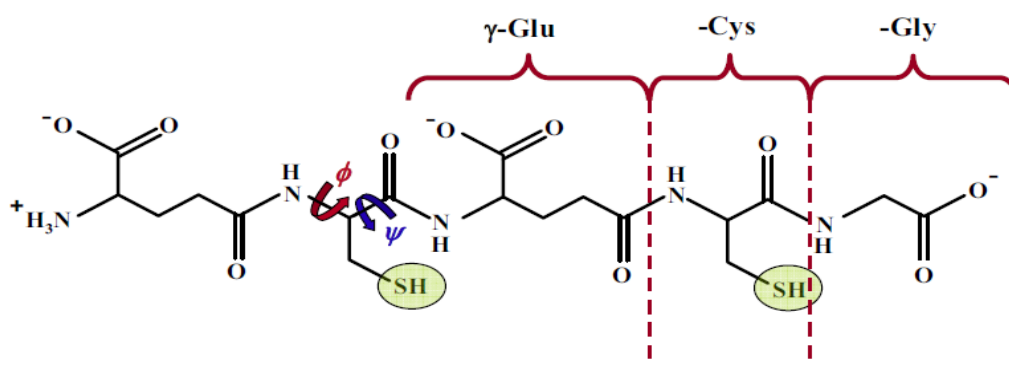


Figura 03: Estructura de una fitoquelatina $n = 2$. Se indican los ángulos que conforman un plano peptídico y los grupos sulfhídrico.

Están estructuralmente relacionados con el glutatión (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) y se supone que son productos de una vía biosintética; numerosos factores fisiológicos, estudios bioquímicos y genéticos han confirmado que el GSH es el sustrato para la biosíntesis de la fitoquelatina (31).

El glutatión (GSH), un tripéptido natural de fórmula γ -Glu-Cys-Gly. La presencia de grupos sulfhidrilo confiere al GSH y a las PC la propiedad de enlazar fuertemente diferentes iones metálicos. Aunque esta parece ser su principal función, no es la única; los grupos tiol son nucleófilos y reductores por lo que también reaccionan dentro de las células con otras especies tóxicas como radicales libres, especies oxidantes y xenobióticos orgánicos electrófilos (29).

3.5.2. Regulación de la biosíntesis de PC.

El mecanismo por el cual se activa PC sintasa parece ser relativamente no específica con respecto a la activación de iones de metal, aunque algunos metales son más eficaces que otros. Un modelo para la función de PC sintasa es que el dominio amino-terminal confiere la actividad catalítica de esta enzima.

La activación probablemente surge de una interacción entre los residuos en este dominio y los iones o complejos de metal-metal libre de GSH. Se ha sugerido que el dominio carboxi-terminal actúa como un sensor local por iones de metales pesados de unión (presumiblemente a través de las múltiples residuos de Cys) y traerlos en contacto con el sitio de activación en el amino-terminal dominio catalítico(31).

Se conoce estructuras primarias de cinco familias de péptidos γ -EC (Fitoquelatinas) (32).

Tabla 01: Familias de péptidos γ -EC.

Familias de péptidos γ -EC	Estructura básica	Tripéptido relacionado	Material de Referencia
1	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n - \text{Gly}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ (glutación)	Levaduras , Algas, Monocotiledóneas y Dicotiledóneas
2	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n - \beta\text{-Ala}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-}\beta\text{-Ala}$ (homoglutación)	Legumbre
3	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	$\gamma\text{-Glu-Cys}$	Levaduras Maíz
4	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n - \text{Ser}$	$\gamma\text{-Glu-Cys- Ser}$ (hidroximetilglutación)	Gramíneas Poaceae
5	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n - \text{Glu}$	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n - \text{Glu}$	Maíz

3.5.3. Fitoquelatina sintasa (PCS).

Para la síntesis de las fitoquelatinas es necesario en primer lugar, que ocurra la síntesis de la cisteína necesaria para la formación de glutación (GSH), proceso donde intervienen las enzimas γ -glutamyl-cys sintetasa y la glutación sintetasa. Una vez que el metal pesado entra en contacto con la enzima esta se activa y cataliza la conversión del glutación a la molécula de fitoquelatina (27) .

Se inducen rápidamente in vivo por una amplia gama de iones de metales pesados; la enzima fitoquelatina sintasa se identificó primero por Grill et al. La enzima se describió como un tetrámero de Mr 95.000 con un Km para GSH de 6,7 mM; tiene una vida media a 35 °C de 6 horas, a 220 °C de 34 horas, a 4 °C de 140 horas. No es un requisito absoluto la presencia de iones de metales pesados para la actividad enzimática (33).

Es una Glu – Cys dipeptidyl transpeptidasa (CE 2.3.2.15) que cataliza la transpeptidación del resto Glu – Cys de GSH ya sea sobre una segunda molécula de GSH para formar PC ($n = 2$) o en una molécula para producir PC ($n + 1$) oligómero (31).

Estudios cinéticos utilizando cultivos celulares de plantas demostraron que la biosíntesis de PC ocurre a minutos de exposición a Cd y es independiente de la síntesis de proteínas. La Enzima parece expresarse independientemente de la exposición a metales pesados ha sido detectado en extractos de cultivos celulares de plantas o tejidos cultivados en presencia de mínimos niveles de metales pesados esenciales. En conjunto, la PC sintasa se regula principalmente por la activación de la enzima en la presencia de metales pesados. Ha reaccionado en presencia de una gama de iones metálicos. El mejor activador probado fue Cd, seguido de cationes Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg y Au (34).

3.6. Términos básicos.

3.6.1. Contaminación por Metales pesados.

La contaminación por metales pesados es considerada como una de las problemáticas ambientales más serias a nivel global; debido a la toxicidad, persistencia y continua demanda de estos elementos.

3.6.2. Enzimas.

Proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos. Están compuestas principalmente por proteínas.

3.6.3. Cofactores

Es una molécula pequeña necesaria para la actividad de muchas enzimas. Son iones metálicos o moléculas orgánicas que participan con las enzimas en la realización de una actividad enzimática. A los cofactores de naturaleza orgánica se le conocen como coenzimas

3.6.4. Actividad catalítica

Conversión de una cantidad de sustrato por unidad de tiempo con la cual se induce a la reacción a seguir hacia el equilibrio químico.

3.6.5. Quelantes.

Se denominan quelantes a las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular.

3.6.6. La quelación.

Es un fenómeno fisicoquímico por el cual ciertos iones metálicos son secuestrados de los complejos de que forman parte sin constituir una unión química con la sustancia quelante aunque sí una combinación.

3.6.7. Fitoquelatinas.

Uno de los mecanismos de tolerancia a metales pesados en las plantas, está relacionado con la síntesis de péptidos tiólicos.

3.7. Antecedentes.

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más graves que enfrenta hoy en día la humanidad. Con el término de metales pesados se pretende indicar a aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Esta es la acepción común de los metales perjudiciales para la naturaleza ya que la toxicidad de un elemento o compuesto químico es la capacidad que tiene ese material de afectar adversamente alguna función biológica.

Muchos metales pesados son oligoelementos o micronutrientes necesarios en pequeñas cantidades para los organismos y sólo son tóxicos una vez pasado cierto umbral de concentración. Dentro de los distintos componentes de un ecosistema, el suelo constituye el principal sumidero de metales donde pueden acumularse en concentraciones anómalas debido a factores naturales o por acción humana. La explotación y extracción de metales produce anualmente millones de toneladas de residuos, la mayoría, cuya oxidación libera grandes cantidades de metales pesados al ambiente, y en particular a los suelos. Las plantas están muy expuestas a distintas adversidades del ambiente. Muchos agentes externos pueden causarles efectos altamente nocivos y como ellas son un importante eslabón de la cadena trófica, estos agentes externos pueden causar luego problemas a los animales y seres humanos (35).

Tres clases de péptidos, glutatión (GSH), metalotioneínas y las fitoquelatinas (PCs), han sido implicados en la desintoxicación de metales pesados y homeostasis en plantas(36).

Bruns et al. Propusieron el uso de las fitoquelatinas como un marcador fisiológico de contaminación por metales pesados, en especial del Cd, ya que encontraron una correlación positiva entre las concentraciones de fitoquelatinas y las del metal en plantas. Este resultado coincide con el reseñado por Ranieri et al. (2005) quienes encontraron que la concentración de fitoquelatinas aumento proporcionalmente con el tiempo de exposición al Cd, incrementándose 4,7 veces en un periodo (27).

La enzima denominada “ γ -glutamilcisteína dipeptidil transpeptidasa” o fitoquelatina sintasa en una preparación pura de la enzima de *S. cucubalus* fue activada mejor por Cd que por Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg y Au (inductores de fitoquelatinas en *R. setperltii*). Cuando se genera la cantidad de (γ -Glu-Cys4-Gly necesaria para secuestrar el Cd disponible con una relación tiol-cadmio de 2:1, cesa la catálisis enzimática. La fitoquelatina sintasa aparenta ser una enzima auto regulada, en donde el producto de la reacción se asocia al metal activador, dando como resultado el cese de su actividad. La enzima es constitutiva y su concentración no es notablemente alterada por exposición de las células al Cd (37).

En el 2012 indica que los reportes sobre la concentración del cobre son ligeramente superiores a las requeridas por las plantas (30mg/kg-1 de tejido en peso seco), mencionan que produce efectos tóxicos tales como la inhibición del crecimiento en raíces y brotes y que en las raíces, la inhibición del crecimiento por el cobre puede ser resultado de una reducción en el proceso de división celular y del daño estructural o muerte de las células del meristemo apical (38).

La expresión genética y el perfil de proteínas que muestran ante el estrés por cobre, muchos procesos fisiológicos y bioquímicos son alterados y que la respuesta de las plantas es un proceso complejo. En hojas de plantas de *Oryza sativa* hay un incremento en la expresión de 146 genes en respuesta al Cobre.

La mayoría son genes de defensa, respuesta a estrés, transducción de la señal y metabolismo. Dentro de los genes relacionados con la defensa están los que codifican para proteínas tipo Metalotioneínas (MTs) y peroxidasa. La expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de flavonoides, fitoalexinas y lignina también aumenta por la exposición a exceso de cobre (39).

Estudios de las metalotioneínas de *Tetrahymena* concluyen que se pueden dividir en dos subfamilias, 7^a (Cd-MTs) y 7b (Cu-MTs), distinguibles principalmente por las características estructurales de sus secuencias aminoacídicas y el grado de inducción de los genes que las codifican por Cd o Cu. Así mismo análisis filogenético reportan once MTs descritas en *Tetrahymena* y comparten una marcada estructura modular que podría contribuir al inusual tamaño de estas MTs, superior respecto a las MTs del resto de organismos. También indican que la expresión de los genes MT de *T. thermophila* y *T. rostrata* son inducibles en presencia de metales como de otros agentes estresantes (pH ácido, alta temperatura, estrés oxidativo e inanición), y confirma el carácter multiestrés de las MTs de *Tetrahymena*, como sucede también en otros organismos, y que las tres isoformas génicas de Cd-MTs de *T. thermophila* (MTT1, MTT3 y MTT5) presentan patrones de inducción y niveles de expresión diferentes (40).

Resultados obtenidos en estudios sobre elementos potencialmente tóxicos en las plantas de manglar sugieren que la exposición de plantas de *Avicennia germinans* y *A. marina* a diferentes dosis subletales de Cd y Cu son capaces de inducir la expresión diferencial de los genes de metalotioneína y fitoquelatina sintasa. En este contexto, la inducción de transcritos de los genes de las MT en diferentes tejidos de estas plantas de manglar coincide con las observaciones de Roosens et al. (2003) en las plantas acuáticas *Typha latifolia* y *Thlaspi caerulescens* cuando eran sometidas a bajas concentraciones de Cu y Cd. Lo mismo reportan Zhang et al. (2005) con respecto a la expresión del gen de la fitoquelatina sintasa en plantas de *Triticum spp.* Y *Allium sativum*, expuestas a metales. Esto indica que ambos genes en las plantas de manglar podrían tener una función en la desintoxicación de metales esenciales y no esenciales (41).

En el análisis comparativo de raíces y hojas sugiere que la raíz, a pesar de acumular Cd en mayor concentración que las hojas, presenta menos daños oxidativos. Este hecho, podría deberse a la capacidad de la raíz para acumular el metal de forma no activa, en la pared celular, vacuola o formando complejos con fitoquelatina(42).

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia Peruana (CIRNA – UNAP). Ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,0 distrito de San Juan Bautista, pasaje Los Paujiles s/n. AA.HH Nuevo San Lorenzo.

4.2. Recursos Utilizados.

4.2.1. Materiales de Laboratorio.

- ✓ Cubeta de cuarzo.
- ✓ Frascos tapa rosca de 50, 100, 500 y 1000 ml
- ✓ gorro
- ✓ guantes
- ✓ mandil
- ✓ marcadores
- ✓ mascarilla
- ✓ Micropipetas 0.2 – 2.0; 0.5 a 10; 20 – 200; 100 – 1000 μ l
- ✓ Microtubos de 250 – 500 μ l y 1.5 ml
- ✓ Mortero y pilones
- ✓ Parafina
- ✓ papel aluminio
- ✓ Pipetas de vidrio graduadas de 10 ml
- ✓ Probetas de 10 , 500 y 1000 ml
- ✓ Separador de tubos raps
- ✓ Tips 1-10 μ l, 20 – 200 μ l, 100 -1000 μ l
- ✓ Tubos falcon de 15 y 50 ml

4.2.2. Reactivos.

- ✓ Acetado de Plomo – Pb (C₂H₃O₂)₂
- ✓ Albúmina Sérica Bovina – BSA
- ✓ Bradford (Azul de coomassie G-250, etanol absoluto 5% y ácido ortofosfórico 10 %)
- ✓ Buffer Fosfato pH 7.2 – K₂HPO₄ – KH₂PO₄
- ✓ Cisteína
- ✓ Cloruro de Mercurio – HgCl₂
- ✓ Desoxiadenosina trifosfato – dATP
- ✓ Glicina
- ✓ Glutamato
- ✓ Glutación reducido – GSH
- ✓ Hidróxido de sodio – NaOH

4.2.3. Equipos.

- ✓ Autoclave – Yamato SM510
- ✓ Balanza analítica – Sartorius ED1245
- ✓ Baño María – Thermo Scientific 18007-1CE
- ✓ Centrifuga – Hettich EBBA 20
- ✓ Destilador de agua – Thermo Scientific A-56210-857
- ✓ Espectrofotómetro - ROCHESTER Genesys 6
- ✓ Deshionizador de agua – Thermo Scientific 013321
- ✓ Potenciómetro – Comming, PR 15
- ✓ Vórtex – Scientific Industries

4.2.4. Programas.

- ✓ Excel de Microsoft Office
- ✓ GraphPad Prism 5

4.3. Diseño de investigación.

El estudio se realizó con muestras de hojas y raíces de plántulas crecidas bajo condiciones de: muestras control, sin contaminación aparente.

Baterías con plantas sometidas a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos 06, 12 y 24 horas con cloruro de Mercurio y acetato de Plomo, todas han sido procesadas por triplicado con la finalidad de obtener resultados estadísticamente representativos y significativos. De las cuales se procedió a la extracción de PROTEÍNAS TOTALES y la verificación de la actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa bajo condiciones experimentales de laboratorio.

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población.

Se contó con una población de 550 plántulas y luego sometidas soluciones con metales pesados y bajo condiciones normales (control) en el laboratorio de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de los Recursos Naturales (CIRNA – UNAP).

4.4.2. Muestra.

Se trabajó con tres plántulas por condición de cada grupo de las que se extrajeron las proteínas totales y se procedió de acuerdo a lo planteado en la metodología.

4.5. Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos.

4.5.1. Técnicas y Procedimientos

4.5.1.1. Obtención de plántulas a partir de semillas de frutos maduros.

Se retiró totalmente la pulpa de las semillas de los frutos maduros, luego cuando estén ligeramente secas se retirara la cascarilla de la zona embrionaria y se colocaron en bandejas conteniendo gasa

embebidas en agua, cantidad suficiente para cubrir las semillas, las que se dejaron hasta el crecimiento de las plántulas para luego someterlas a contaminación bajo las diferentes concentraciones de metales.

4.5.1.2. Preparación de Metales pesados a emplearse.

Las concentraciones experimentales que se aplicaron se consideró los valores de Estándares de Calidad Ambiental (ECA)(43).

Tabla 02: Concentraciones de las soluciones metálicas empleadas en las pruebas de resistencia a metales pesados por plántulas de *M dubia*.

	Valor ECA mg/L	Control	1ra Concent.	2da Concent.	3ra Concent.
MERCURIO	0,0001	0,0	0,0001	0,0008	0,0016
PLOMO	0,001	0,0	0,001	0,008	0,016

4.5.1.3. Extracción de proteínas totales. (Según Holloway y Arundel. 1988)(44).

200 mg del tejido vegetal de *M. dubia* (hoja y raicillas), se trituró en un mortero sumergido en un envase conteniendo hielo adicionando 2000 µL de Buffer fosfato, el homogenizado se transfirió a viales de 1.5 mL y se agitó con vórtex por 5 minutos luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a nuevos viales y se guardó en refrigeración hasta la realización de actividad catalítica previa cuantificación de proteínas.

4.5.1.4. Cuantificación de proteínas - Método de Bradford (45).

Se preparó soluciones estándares de albúmina sérica bovina (BSA) entre 0,156 a 25 mg/mL, en un espectrofotómetro ROCHESTER Genesys 6 UV/Vis a 595 nm, se realizaron las lecturas del estándar a diferentes concentraciones de la cual se ha obtenido una recta con una ecuación ($Y=0,3197x+0,4729$) cuyo $R^2 = 0,9615$, la reacción consistió en adicionar 930 µL del reactivo de

El cálculo de la concentración glutatión se realizó empleando la siguiente ecuación: Que considera la ley empírica de Lambert y Beer

$$\text{Abs} = K \times C \times L$$

Dónde:
Abs: absorbancia.
K: coeficiente de extinción molar (GSH 17400 M⁻¹ cm⁻¹)
C: concentración
L: distancia que viaja la luz a través de la muestra. (Normalmente es de 1 cm).

Ecuación de la ley empírica de Lambert

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon * C * l$$

Dónde:
A : absorbancia.
I₀ : intensidad del haz incidente.
I : intensidad del haz transmitido.
C : concentración de la especie responsable de la absorción (M) ; **l :** distancia óptica a través de la muestra(cm).
ε (λ) es el coeficiente de extinción molar de la especie dada.

4.6. Flujograma metodológico.

Obtención de plántulas a partir de semillas de frutos maduros.

Contaminación y exposición con metales pesados en diferentes concentraciones a 06, 12 y 24 horas.

Extracción de proteínas totales

Cuantificación de proteínas y actividad enzimática de la Fitoquelatina sintasa.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.2. Cuantificación espectrofotométrica.

La cuantificación espectrofotométrica de proteínas empleando para la curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA), proporciono mejores concentraciones promedio de proteínas con 0,96 mg/gr de muestra con D.S. $\pm 0,01$ y 1,11 mg/gr de muestra con D.S $\pm 0,08$ en hojas y raíces respectivamente de las plántulas sometidas a stress con MERCURIO. Y concentraciones promedio de proteínas de 0,94 mg/gr de muestra con D.S. $\pm 0,05$ y 0,98 mg/gr de muestra con DS $\pm 0,01$ en hojas y raíces respectivamente de las plántulas sometidas a stress con PLOMO. (Tablas siguientes).

Tabla 03: Concentración de proteína en hojas y raíces de *M. dubia* tratados con Mercurio.

Concentración de proteínas				
T.Exp	Muestra	[mg/gr m]	\bar{X} [mg/gr m]	D.S.
06 horas	hoja	0,86	0,92	$\pm 0,04$
		0,94		
		0,94		
12 horas	hoja	0,94	0,88	$\pm 0,07$
		0,79		
		0,89		
24 horas	hoja	0,97	0,96	$\pm 0,01$
		0,97		
		0,94		
06 horas	raíz	1,18	1,11	$\pm 0,08$
		1,02		
		1,14		
12 horas	raíz	0,90	0,94	$\pm 0,06$
		1,02		
		0,90		
24 horas	raíz	0,79	0,84	$\pm 0,05$
		0,89		
		0,83		

*mg/gr m: miligramos /gramos muestra

Tabla 04: Concentración de proteína en hojas y raíces de *M. dubia* tratados con Plomo.

Concentración de proteínas				
T.Exp	Muestra	[mg/gr m]	\bar{X} [mg/gr m]	D.S.
6 horas	hoja	0,88	0,94	±0,05
		0,96		
		0,98		
12 horas	hoja	0,48	0,62	± 0,27
		0,43		
		0,94		
24 horas	hoja	0,55	0,51	± 0,04
		0,51		
		0,46		
6 horas	raíz	1,00	0,98	± 0,01
		0,97		
		0,97		
12 horas	raíz	0,93	0,89	± 0,07
		0,80		
		0,93		
24 horas	raíz	0,50	0,47	± 0,06
		0,53		
		0,39		

*mg/gr m: miligramos/gramos muestra

5.3. Actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa.

En esta etapa se tiene que las curvas de actividad catalítica de la **Fitoquelatina sintasa** presentan valores variables de Coeficiente de dispersión (R^2), así tenemos a tiempo de exposición de **6 horas** a una concentración de 0,0001 mg/L de la plántula sometidas al stress con solución de **Mercurio**; en **las hojas** la actividad de la **Fitoquelatina sintasa** presenta un R^2 de 0,9755 y a 12 horas a la misma concentración la actividad de la enzima presenta un R^2 de 0,9874, mientras que en las raíces expuesta a 6 horas al stress con mercurio la actividad de esta enzima presenta R^2 de 0,9739, 0,9935 y 0,9941 para las tres concentraciones empleadas, también se tiene que el coeficiente de dispersión de la actividad de la enzima de R^2 de 0,9568 a las 12 horas bajo la concentración de 0,0008 mg/L. Respecto a las

plántulas sometidas a stress con solución de **Plomo**, la actividad de la enzima en las hojas presenta un R^2 de 0,9050 y 0,9890 a 6 horas y 24 horas de stress respectivamente a concentración de 0,008mg/L, mientras que en la raíz la actividad de la enzima presenta un R^2 de 1,0 a una concentración de 0,008mg/L y 06 horas de exposición, y un R^2 de 0,9568 a una concentración de 0,001 mg/L a 12 horas de exposición a stress. El coeficiente de dispersión de la actividad de la Fitoquelatina sintasa de las plántulas expuestas a stress por 12 horas son más notables como se puede observar en las tablas (anexo 05, 06, 07, 08) a concentraciones de 0,0001 mg/L y 0,001 mg/L tanto en hoja y en raíces de *M. dubia*.

5.4. Velocidad promedio de actividad de la PC sintasa.

Respecto a la velocidades promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa; en las HOJAS de plántulas sometidas a solución de MERCURIO concentración de 0,0001 mg/L a 06 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $2,05 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,35 \times 10^{-7}$ disminuyendo esta velocidad a 12 horas de exposición con $1,72 \times 10^{-6}$ mM/s D.S. $\pm 1,95 \times 10^{-7}$, a 24 horas una disminución de la velocidad de actividad a $5,38 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,51 \times 10^{-8}$, mientras que a concentración de 0,0008 mg/L a 6 horas de exposición, presenta velocidad promedio de actividad de $1,75 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,05 \times 10^{-7}$ disminuyendo esta velocidad a 12 horas de exposición a $6,04 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 2,49 \times 10^{-8}$ para luego a 24 horas de exposición incrementar la velocidad a $2,1 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 1,53 \times 10^{-8}$. Así mismo a la concentración de 0,0016 mg/L a las 6 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $2,61 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 1,10 \times 10^{-7}$ disminuyendo esta velocidad a 12 horas de exposición a $3,6 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,56 \times 10^{-8}$ para luego a 24 horas de exposición incrementar la velocidad a $1,38 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,78 \times 10^{-8}$. (Figura 04 y anexo 09)

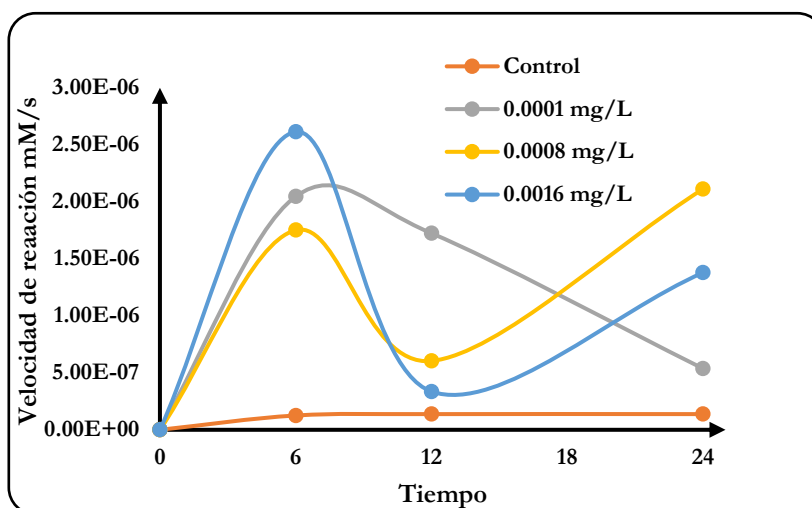


Figura 04: Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en hojas tratadas con Mercurio.

En las RAÍCES de plántulas sometidas a solución de MERCURIO concentración de 0,0001 mg/L a 06 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $5,59 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 2,05 \times 10^{-8}$ incrementando la velocidad a las 12 y 24 horas de exposición a $8,34 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 2,52 \times 10^{-8}$ y $1,27 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,0 \times 10^{-7}$ respectivamente, mientras que a concentración de 0,0008 mg/L a 6 horas de exposición, presenta velocidad promedio de actividad de $5,8 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,75 \times 10^{-8}$ disminuyendo esta velocidad a 12 horas de exposición a $2,8 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,5 \times 10^{-8}$ para luego a 24 horas de exposición incrementar la velocidad a $1,15 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 1,47 \times 10^{-7}$, Así también a la concentración de 0,0016 mg/L a las 06 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $5,72 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,97 \times 10^{-8}$ disminuyendo esta velocidad a 12 horas de exposición a $2,41 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,0 \times 10^{-8}$ para luego a 24 horas de exposición incrementar la velocidad a $8,13 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,47 \times 10^{-8}$. (Figura 05 y anexo 09)

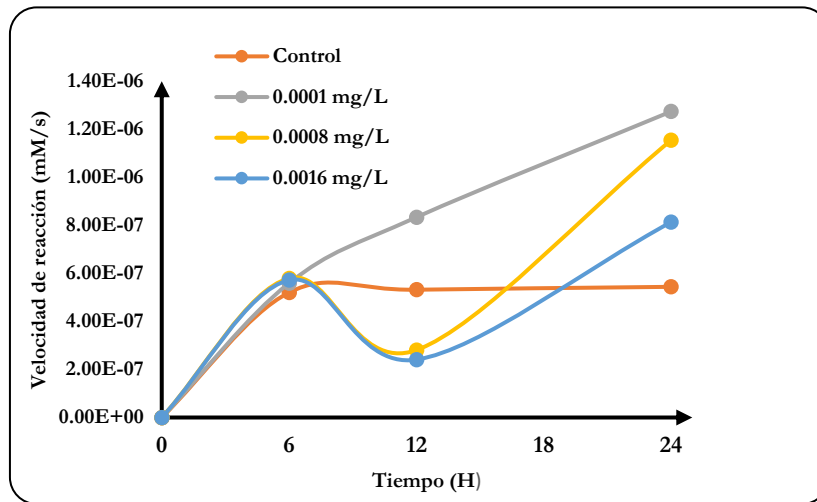


Figura 05: Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en raíces tratadas con Mercurio.

Respecto a la velocidades promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa; en las HOJAS de plántulas sometidas a solución de PLOMO concentración de 0,001 mg/L a 06 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $2,2 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,02 \times 10^{-8}$ aumentando esta velocidad a 12 horas de exposición a $4,89 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 1,8 \times 10^{-8}$, luego una disminución a de la velocidad de actividad a 24 horas con $2,68 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,0 \times 10^{-8}$, mientras que a concentración de 0,008 mg/L a 06 horas de exposición, presenta velocidad promedio de actividad de $6,72 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,0 \times 10^{-8}$ incrementándose ligeramente esta velocidad a 12 horas de exposición a $6,91 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,06 \times 10^{-8}$ para luego continuar el incremento de la velocidad a 24 horas de exposición a $1,26 \times 10^{-6}$ mM/s D.S. $\pm 2,1 \times 10^{-7}$, así mismo a la concentración de 0,016 mg/L a las 06 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $2,2 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,04 \times 10^{-8}$ incrementándose muy significativamente esta velocidad a 12 horas de exposición a $2,18 \times 10^{-6}$ mM/s D.S. $\pm 1,07 \times 10^{-7}$ para luego a 24 horas de exposición decrecer vertiginosamente la velocidad a $2,72 \times 10^{-7}$ mM/s D.S. $\pm 2,01 \times 10^{-8}$ (Figura 06 y anexo 10).

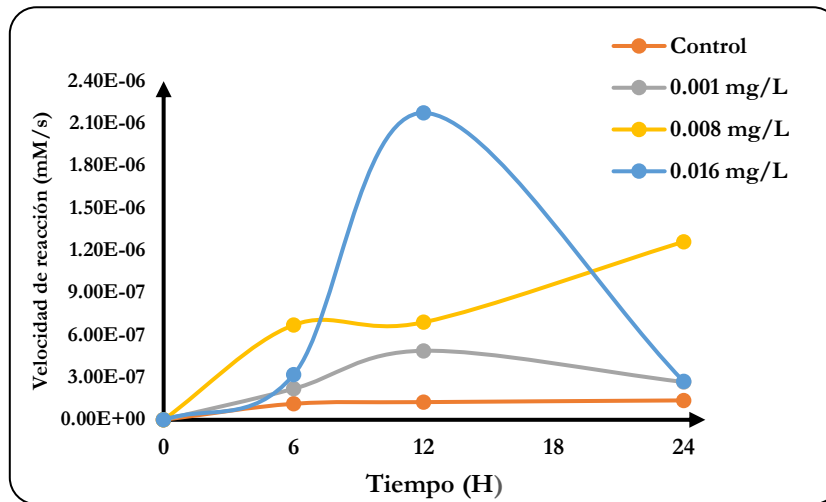


Figura 06: Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en hojas tratadas con Plomo.

En las RAÍCES de plántulas sometidas a solución de PLOMO a concentración de 0,001 mg/L a 6 horas de exposición presenta velocidad promedio de actividad de $1,99 \times 10^{-8}$ mM/s D.S $\pm 1,44 \times 10^{-9}$, incrementándose significativamente a las 12 horas de exposición a una velocidad de $1,31 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,0 \times 10^{-7}$ para luego decrecer a las 24 horas de exposición a una velocidad de $1,62 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 2,0 \times 10^{-8}$, a concentración de 0,008 mg/L a 6 horas de exposición $5,72 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,95 \times 10^{-8}$, incrementándose la velocidad a $1,29 \times 10^{-6}$ mM/s D.S $\pm 2,00 \times 10^{-7}$ para luego decrecer hasta $6,23 \times 10^{-7}$ D.S $\pm 2,0 \times 10^{-8}$ a las 24 horas de exposición a la concentración 0,016 mg/L la actividad fue de $2,24 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 3,05 \times 10^{-8}$ el cual se incrementa a las 12 horas de exposición a $9,83 \times 10^{-7}$ mM/s D.S $\pm 1,15 \times 10^{-8}$, decreciendo esta velocidad a las 24 horas de exposición a $1,78 \times 10^{-7}$ D.S $\pm 2,0 \times 10^{-8}$. (Figura 07 y tabla del anexo 10)

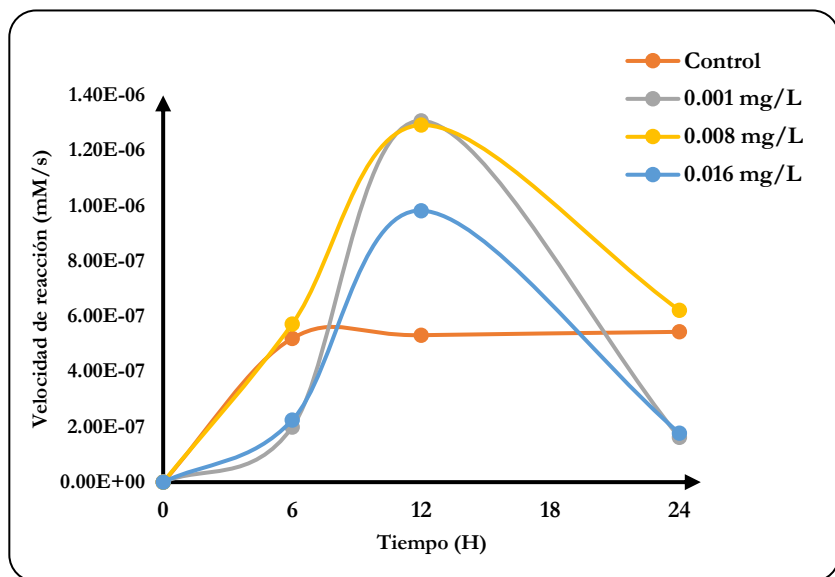


Figura 07: Velocidad promedio de la actividad enzimática de la PCS en raíces tratadas con Plomo.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Los metales pesados considerados tóxicos son solamente unos cuantos que podrían contaminar los ambientes terrestres y acuáticos amazónicos. Muchos metales pesados son oligoelementos o micronutrientes necesarios en pequeñas cantidades para los organismos y sólo son tóxicos una vez pasado cierto umbral de concentración. Aquí se incluyen Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Sólo un grupo pequeño de metales no tiene función biológica conocida y son altamente tóxicos, incluso a dosis bajas. Entre ellos se encuentran el As, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi (3,46).

Los metales pesados empleados en este trabajo, tanto en la prueba de selección y el desarrollo definitivo de las pruebas de toxicidad fueron el Mercurio (Hg), El Plomo (Pb), La Plata (Ag), y Cobre (Cu). El Mercurio y el Plomo fueron los metales que pasaron la prueba de selección. Ensayos realizados en *Medicago sativa* “alfalfa” en un sistema hidropónico a microescala con distintas dosis de metal (0, 3, 10 y 30 μM) y tiempos de exposición de (3, 6 y 24 horas) fueron empleados para determinar el umbral de toxicidad y analizar respuestas específicas y tempranas del estrés por Hg o Cd (35). Concentraciones y tiempo de exposición diferente a lo empleado en el presente trabajo. En otro estudio realizado en *Salvinia minima* hiperacumulador de plomo, el contenido de proteína se midió según el método de Bradford (1976) con BSA como estándar (47), procedimiento similar a lo realizado en este estudio, ya que las plántulas de *M Dubia* “camu camu”, crecidas en baterías de vasos descartables y sometidas a stress con metales pesados, experimentaron cambios externos notándose el deterioro gradual de las hojas en el tiempo y funcionalmente como se puede notar con la presencia de proteínas con concentraciones muy aceptables y suficientes para las pruebas de actividad tanto para hojas y raíces de este vegetal.

La actividad de la **fitoquelatina sintasa** (PCS) presenta coeficientes de dispersión que permite entender la actividad creciente de esta enzima en muchas de las muestras analizadas, lo que nos indica una actividad creciente respecto de la síntesis de fitoquelatina (PC), donde se detecta diferentes características de actividad habiendo sido sometidas a stress a diferentes tiempos de exposición.

La actividad de la enzima es notable en las raíces de las plántulas sometidas a MERCURIO donde se nota el incremento de velocidad en el tiempo, hecho similar a lo que se encontró en el estudio en *Salvinia minima* hiperacumulador de plomo donde la actividad de la **fitoquelatina sintasa** en hojas y raíces tratadas con Pb^{2+} y siguiendo de cerca el patrón de acumulación, la actividad en las raíces aumentó rápidamente en las plantas expuestas 3 horas después de la exposición y permaneciendo constante durante un corto tiempo y luego exhibiendo un segundo ascenso en el periodo de 6 a 12 horas, alcanzando valores tres veces más altas que las plantas control (47). En el presente trabajo la conducta de la actividad de la fitoquelatina sintasa en raíces de *M. dubia* respecto al Mercurio se puede asumir que es un inductor de la expresión y actividad de la enzima. Ranieri et al. (2005) quienes encontraron que la concentración de fitoquelatina aumento proporcionalmente con el tiempo de exposición al Cd, incrementándose 4,7 veces en un periodo corto de 10 horas, comportándose como inductor (27). Por otro lado en nuestro trabajo podemos asumir que el Mercurio presente mecanismos de inducción y represión a nivel genético que estén afectando la expresión de los genes y la velocidad de actividad la enzima, ya que la inducción de la expresión del gen PCS es poco probable que desempeñe un papel significativo en la regulación de la biosíntesis de la PC. Es respaldado por el estudio de análisis de la expresión de AtPCS1/CAD1 que muestra que los niveles de expresión de ARNm no fueron influenciados por la exposición de plantas a Cd y otros metales, lo que sugiere una ausencia de regulación en el nivel de transcripción. En contraste, el análisis de AtPCS1 la expresión en las raíces indicó mayores niveles de ARNm en la exposición a Cd. Esto sugiere que, en algunas especies,

la actividad de PC sintasa puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como Postraduccionales. Poco se sabe sobre la especificidad de tejido de PCS, la expresión y / o biosíntesis de PC. En un estudio en tomate, la actividad se detectó en las raíces y tallos de las plantas, pero no en hojas o frutos (27).

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- Existe inducción de la actividad catalítica de la enzima fitoquelatina sintasa en hojas y raíces de *Myrciaria dubia* expuestas a metales pesados.
- Se encontraron proteínas en concentraciones muy aceptables tanto en hojas y raíces de las plántulas sometidas a stress con MERCURIO y PLOMO.
- En la actividad catalítica de la fitoquelatina sintasa se confirma con los valores de coeficiente de dispersión R^2 por encima de 0,9.
- La mejor velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa se detectó en las hojas tratadas con plomo a 12 horas de exposición a stress.
- El mercurio se comporta como inductor de la actividad de la fitoquelatina sintasa en las raíces de M dubia.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos similares con la adición de mayor número de factores para la evaluación de la fitoquelatina sintasa.
- En los cultivos de plántulas considerar tiempos de exposición en mayor número y más próximos entre sí para una mejor evaluación.
- Evaluar la actividad de la fitoquelatina sintasa con repeticiones de las mismas condiciones buscando que sea reproducible.
- Considerar estudios de la actividad enzimática de la fitoquelatina sintasa en diferentes tejidos de plantas adultas de *M. dubia* de poblaciones naturales.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Herminio Inga, Mario Pinedo, César Delgado, Carlos Linares, Kember Mejía. Fenología reproductiva de *Myrciaria dubia* Mc Vaugh (HBK) Camu camu. *folia Amazónica*. 2001;12(1-2):99-106.
2. Rodney Vega Vizcarra. Liofilización de pulpa de *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, camu camu. *Folia Amazónica*. 2005;14(2):51-83.
3. Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, et al. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nat Biotechnol*. 1995 May;13(5):468-74.
4. Observatorio petrolero de Amazonia norte. Contaminación petrolera en la cocha Atiliano. SOLSTICIO;
5. Domínguez Solís, José Ramón, Gotor Martínez, Romeo Gonzalez. Planta resistente a medios con metales pesados. Madrid; ES 2 176 117 A1.
6. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc*. 2009 Oct 1;161(2):105-21.
7. C.M. Peters, A. Vasquez. Estudios Ecológicos de camu-camu *Myrciaria dubia*. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. *Acta Amazon*. 1986;
8. Ricardo Bardales, Mario Pinedo, José Ramos, Sonia Farro. Evaluación y Selección en Colecciones Básicas de Camu- camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en Loreto, Perú. *PROBOSQUES*. 2002;
9. Programa de ecosistemas terrestres (PET). Desarrollo de tecnologías de valor agregado para Camu camu en Ucayali. 202AD.
10. Veronica Irene Torres Flores. Determinación del potencial nutritivo y funcional de Guayaba (*Psidium guajava*L.), Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) y camu camu (*Myrciaria dubia* Vaugh). [Quito]: Escucnica Politécnica Nacional - ESP; 2010.
11. Cesar Delgado, Guy Coutrier. Manejo de insectos plagas en la Amazonía : Su aplicacion en camu - camu. *Promamazonía*; 2004.
12. Sixto Imán Correa. Caracterización y evaluación morfoagronomica de Germoplasma de camu camu - *Myrciaria dubia* (Mc vaugh). *Promamazonía*; 2009.

13. Estrategias para el Mejoramiento Genético del Camu Camu (*Myrciaria dubia* HBK) en la Amazonia Peruana - EcoPortal.net [Internet]. [cited 2014 Nov 7]. Available from: http://www.ecoport.net/Temas_Especiales/Biodiversidad/Estrategias_para_el_Mejoramiento_Genetico_del_Camu_Camu_Myrciaria_dubia_HBK_en_la_Amazonia_Peruana_-_EcoPortal.net
14. Correa SI, Zamudio LB, Solís VS, Cruz CO. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci Agropecu.* 2011 Sep 5;2(3):123–30.
15. Prieto Méndez J, González Ramírez CA, Román Gutiérrez AD, Prieto García F. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Trop Subtrop Agroecosystems* [Internet]. 2009 [cited 2017 Feb 9];10(1). Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=93911243003>
16. Loreto Naya Aquilué. Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular de las Leguminosas a Estreses Abióticos [Internet]. [Zaragoza]; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10261/2927>
17. Aviñó JPN, Alonso IA, López-Moya JR. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas [Internet]. *Ecosistemas.* 2007 [cited 2017 Feb 9]. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54016203>
18. José Luis Couselo, Elena Corredoira, Ana M. Vieitez, Antonio Ballester. Aplicación del cultivo in vitro en tejidos vegetales en estudios de fitorremediación. *Revista Real Academia Galega de Ciencias.* 2010;XXIX:77–87.
19. Huerta R, Aurora E, Hernández A, Aurora M. Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev Int Contam Ambient.* 2012 May;28(2):103–17.
20. Loreto Naya Aquilué. Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular de las Leguminosas a Estreses Abióticos [Internet]. [Zaragoza]; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10261/2927>
21. Casierra-Posada F, Poveda J. Manganese and zinc toxicity reduce dry matter production, leaf pigment and fruit quality in strawberries (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). *Agron Colomb.* 2005 Jul;23(2):283–9.
22. Tania Ivonne Gómez Calderón. Análisis de Producción De tioles de bajo peso molecular en respuesta un Varias concentrations de absorción de Cr (VI) en *H annuus* Como Mecanismos de defensa para conser la consentracion Máxima de tolerancia. [Silao, Guanajato]: Instituto Politécnico Nacional; 2015.
23. Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Trop Subtrop Agroecosystems.* 2011 Aug;14(2):597–612.

24. Joaquín Ramírez Ramírez, Marcela Ayala Aceves. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? Revista digital universitaria [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2017 Feb 9];15(12). Available from: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/>
25. Jesús Merino Pérez, María José Noriega Borge. Tema 2B-Bloque I-Enzimas. In: FISIOLÓGIA GENERAL [Internet]. 2017 [cited 2017 Feb 9]. Available from: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/tema-1.-introduccion-al-estudio-de-la-fisiologia/Tema%20B-Bloque%20I-Enzimas.pdf>
26. Rodríguez-Serrano M, Martínez-de la Casa N, Romero-Puertas MC, Río LA del, Sandalio LM. Toxicidad del Cadmio en Plantas. Ecosistemas [Internet]. 2008 [cited 2017 Feb 9];17(3). Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=54017106014>
27. Pernía B, De Sousa A, Reyes R, Castrillo M. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. Interciencia. 2008 Feb;33(2):112–9.
28. Inouhe M. Phytochelatin. Braz J Plant Physiol. 2005 Mar;17(1):65–78.
29. Alberich Herranz A. Nuevas estrategias electroanalíticas y quimiométricas aplicadas a sistemas de difícil resolución. Complejación de fitoquelatinas con plomo. TDX Tesis Dr En Xarxa [Internet]. 2011 Feb 21 [cited 2017 Feb 7]; Available from: <http://www.tdx.cat/handle/10803/84152>
30. González-Mendoza D, Zapata-Pérez O. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. Bol Soc Botánica México. 2008 Jun;(82):53–61.
31. Cobbett CS. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. Curr Opin Plant Biol. 2000;3(3):211–6.
32. Ramírez S, Porta AA, Caffini NO. Fitoquelatinas y péptidos relacionados. Acta Farm Bonaer [Internet]. 1999 [cited 2017 Feb 16];18, no. 1. Available from: <http://hdl.handle.net/10915/7023>
33. Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(2):439–43.
34. Rauser WE. Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. Plant Physiol. 1995 Dec;109(4):1141–9.
35. María Laura Flores Cáceres. Caracterización de los mecanismos de respuesta antioxidante de *Medicago sativa* a metales pesados. [España]: UAM; 2009.
36. Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu Rev Plant Biol. 2002;53:159–82.
37. Silvia Ramirez, Andrés Porta, Néstor Caffini. Fitoquelatinas y Péptidos Relacionados. Estructura, Rol Metabólico y Aplicaciones Ambientales. Acta Farm Bonaer. 1999;18(1):53–63.

38. Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol*. 2001 Feb 5;160(3):543–50.
39. Janet Maria Morales, Gabriela Sepulveda Jimenes. El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta Antioxidante de las plantas. *Interciencia*. 2012 Nov;37:11.
40. Francisco Amaro Torres. La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados. [Madrid]: UCM; 2010.
41. González-Mendoza D, Zapata-Pérez O. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Bol Soc Botánica México*. 2008 Jun;(82):53–61.
42. Rodriguez Serrano M. Mecanismos Moleculares de Respuestas al Cadmio de *Pisium sativum* L.: Funcion de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo. [Granada - España]: Universidad de Granada; 2007.
43. José Álvare, Víctor Sotero, Antonio Brack Egg, César A. Ipenza Pera. Minería aurífera en Madre de Dios y contaminación con Mercurio: Una bomba de tiempo. Lima - Perú: IIAP - MINAN; 2011.
44. Universidad Nacional Federico Villarreal - Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Manual práctico: Técnicas aplicadas al estudio de la biodiversidad.
45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.
46. Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, et al. Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiol*. 2001 Nov;127(3):887–98.
47. Estrella-Gómez N, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R, González-Mendoza D, Zapata-Pérez O, Martínez-Hernández A, et al. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb(2+) by increasing phytochelatin via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2009 Mar 9;91(4):320–8.

ANEXOS

Tabla 05: Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en hojas de *M. dubia* tratadas con Mercurio.

Coeficiente de dispersión R² - Hojas		
Concentración mg/L	Tiempo de exposición	R ²
0,0001	06	0,0538
0,0008	06	0,9050
0,0016	06	0,0739
0,0001	12	0,1261
0,0008	12	0,6171
0,0016	12	0,7102
0,0001	24	0,3818
0,0008	24	0,989
0,0016	24	0,6171

Tabla 06: Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de *M. dubia* tratadas con Mercurio.

Coeficiente de dispersión R² - Raíces		
Concentración mg/L	Tiempo de exposición	R ²
0,0001	06	0,3857
0,0008	06	1
0,0016	06	0,3572
0,0001	12	0,9568
0,0008	12	0,2225
0,0016	12	0,7441
0,0001	24	0,7547
0,0008	24	0,8409
0,0016	24	0,0043

Tabla 07: Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de *M. dubia* tratadas con Plomo.

Coeficiente de dispersión R² - Hojas		
Concentración mg/L	Tiempo de exposición	R ²
0,001	06	0,0538
0,008	06	0,9050
0,016	06	0,0739
0,001	12	0,1261
0,008	12	0,6171
0,016	12	0,7102
0,001	24	0,3818
0,008	24	0,989
0,016	24	0,6171

Tabla 08: Coeficiente de dispersión de la actividad de la PCS en raíces de *M. dubia* tratadas con Plomo.

Coeficiente de dispersión R² Raíces			
Concentración mg/L	Tiempo de exposición		R ²
0,001	06		0,3857
0,008	06		1
0,016	06		0,3572
0,001	12		0,9568
0,008	12		0,2225
0,016	12		0,7441
0,001	24		0,7547
0,008	24		0,8409
0,016	24		0,0043

Tabla 09: Velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa en hojas y raíces tratadas con Mercurio.

Hojas						
Tiempo de expo.	06		12		24	
Concentración	\bar{X} mg/ml	D.S.	\bar{X} mg/ml	D.S.	\bar{X} mg/ml	D.S.
Control	1.33x10 ⁻⁷	± 2.00x10 ⁻⁸	1.75x10 ⁻⁷	± 1.80x10 ⁻⁸	2.68x10 ⁻⁷	± 1.95 x10 ⁻⁸
0.0001	2.05x10 ⁻⁶	± 2.35x10 ⁻⁷	1.72x10 ⁻⁶	± 1.95x10 ⁻⁸	5.38x10 ⁻⁷	± 2.51x10 ⁻⁸
0,0008	1.75x10 ⁻⁶	± 2.05x10 ⁻⁷	6.04x10 ⁻⁷	± 2.49x10 ⁻⁸	2.11x10 ⁻⁷	± 1.53x10 ⁻⁸
0,0016	2.61x10 ⁻⁶	± 1.10x10 ⁻⁷	3.36x10 ⁻⁷	± 2.56x10 ⁻⁸	1.38x10 ⁻⁶	± 2.78x10 ⁻⁸
Raíces						
Control	5.20x10 ⁻⁷	± 2.00x10 ⁻⁸	5.32x10 ⁻⁷	± 2.57x10 ⁻⁸	5.44 x10 ⁻⁷	± 2.05x10 ⁻⁸
0.0001	5.59x10 ⁻⁷	±2.05x10 ⁻⁸	8.34x10 ⁻⁷	±2.52x10 ⁻⁸	1.27x10 ⁻⁶	± 2.00x10 ⁻⁷
0,0008	5.80x10 ⁻⁷	±1.75x10 ⁻⁸	2.81x10 ⁻⁷	±1.52x10 ⁻⁸	1.15 x10 ⁻⁶	± 1.47x10 ⁻⁷
0,0016	5.72x10 ⁻⁷	±1.97x10 ⁻⁸	2.41x10 ⁻⁷	±2.00 x10 ⁻⁸	8.13 x10 ⁻⁷	± 1.47x10 ⁻⁸

Tabla 10: Velocidad promedio de actividad de la Fitoquelatina sintasa en hojas y raíces tratadas con Mercurio.

Hojas						
Tiempo de expo.	06		12		24	
Concentración	\bar{X} mg/ml	D.S.	\bar{X} mg/ml	D.S.	\bar{X} mg/ml	D.S.
Control	1.33×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$	1.75×10^{-7}	$\pm 1.80 \times 10^{-8}$	2.68×10^{-7}	$\pm 1.95 \times 10^{-8}$
0.0001	2.20×10^{-7}	$\pm 2.02 \times 10^{-8}$	4.89×10^{-7}	$\pm 1.80 \times 10^{-8}$	2.68×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$
0,0008	6.72×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$	6.91×10^{-7}	$\pm 2.06 \times 10^{-8}$	1.26×10^{-6}	$\pm 2.10 \times 10^{-7}$
0,0016	2.20×10^{-7}	$\pm 2.04 \times 10^{-8}$	2.18×10^{-7}	$\pm 1.07 \times 10^{-8}$	2.72×10^{-7}	$\pm 2.01 \times 10^{-8}$
Raíces						
Control	5.20×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$	5.32×10^{-7}	$\pm 2.57 \times 10^{-8}$	5.44×10^{-7}	$\pm 2.05 \times 10^{-8}$
0.0001	9.99×10^{-8}	$\pm 1.44 \times 10^{-9}$	1.31×10^{-6}	$\pm 2.00 \times 10^{-7}$	1.62×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$
0,0008	5.72×10^{-7}	$\pm 1.95 \times 10^{-8}$	1.29×10^{-6}	$\pm 2.00 \times 10^{-7}$	6.23×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$
0,0016	2.24×10^{-7}	$\pm 3.05 \times 10^{-8}$	9.83×10^{-7}	$\pm 1.15 \times 10^{-8}$	1.78×10^{-7}	$\pm 2.00 \times 10^{-8}$

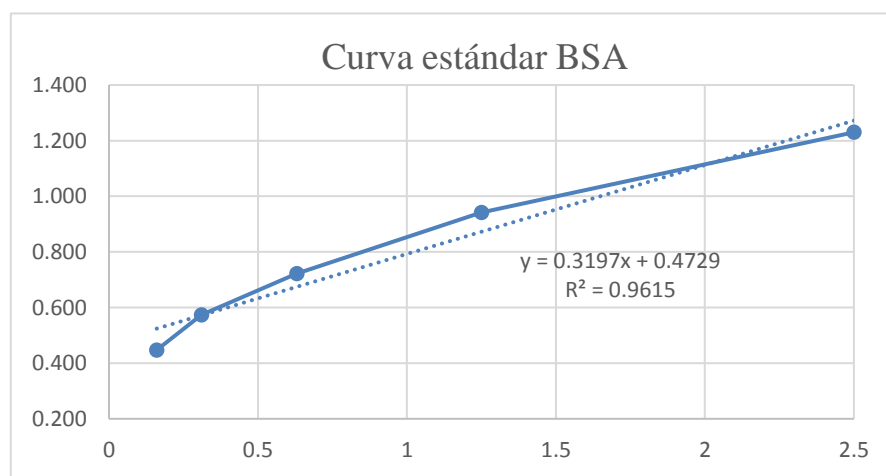


Figura 08: Curva de la desviación estándar del BSA.

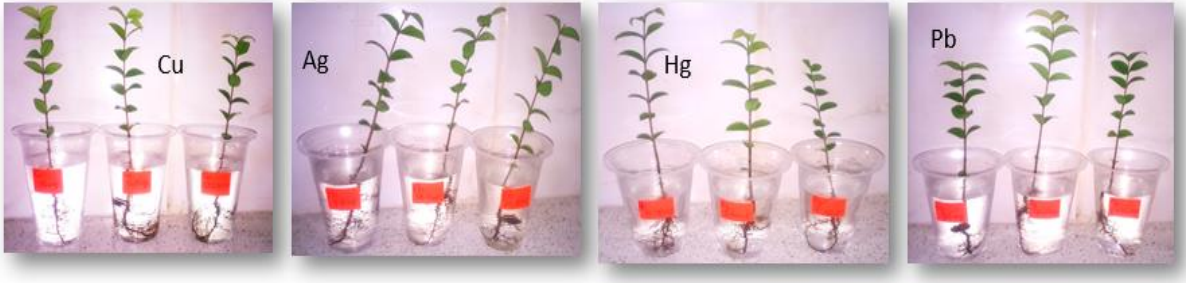


Figura 09: Prueba de resistencia al stress con metales pesados.

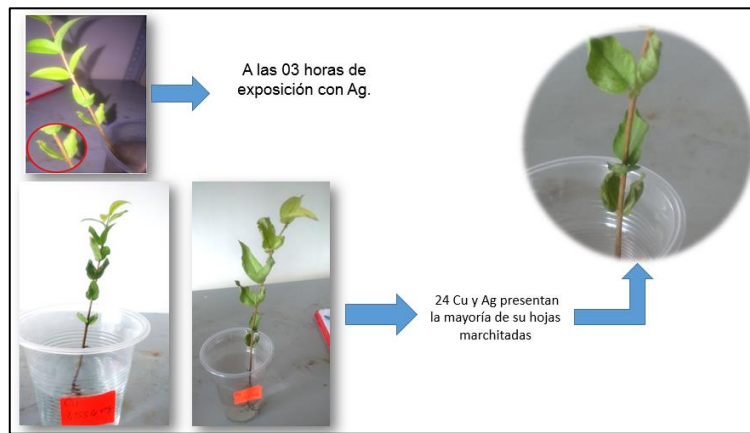


Figura 10: Prueba de resistencia con Plata y Cobre a 03 y 24 horas de exposición.

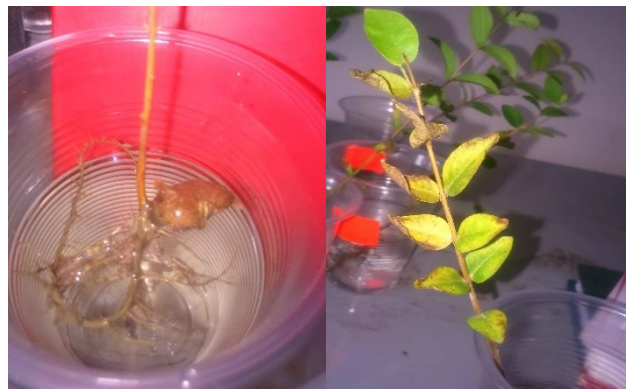


Figura 11: Efectos sobre las plantas sometidas a stress con Plata.

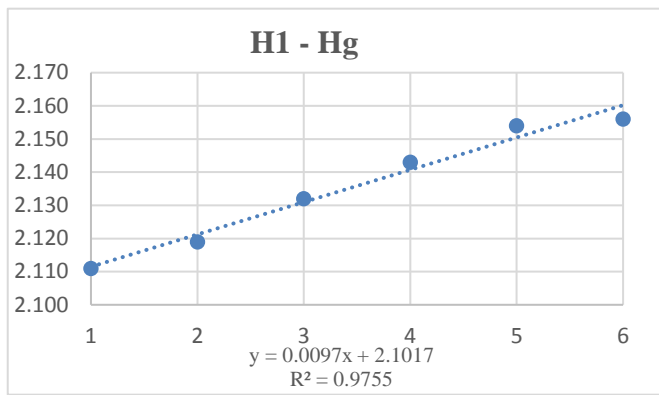


Figura 12: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0.0001 mg/L).

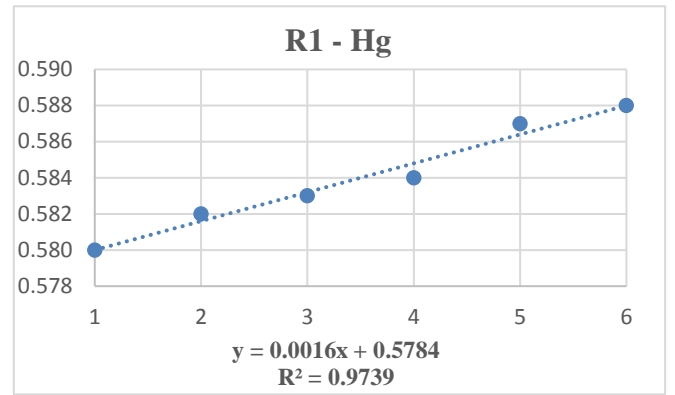


Figura 15: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0.0001 mg/L).

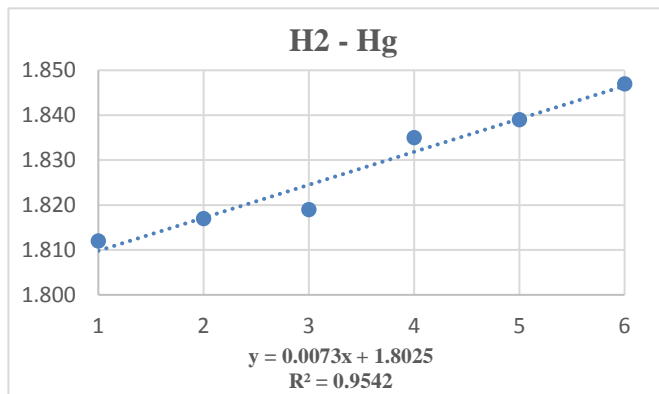


Figura 13: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0.0008 mg/L).

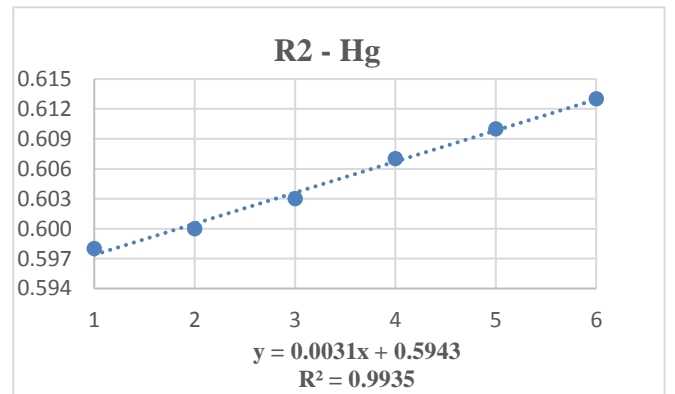


Figura 16: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0.0008 mg/L).

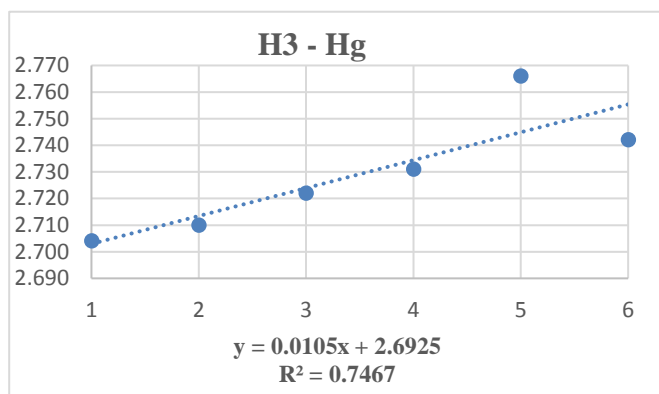


Figura 14: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0.0016 mg/L).

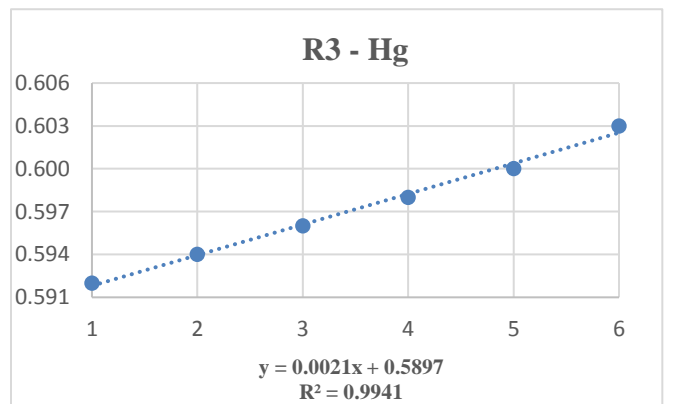


Figura 17: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0.0016 mg/L).

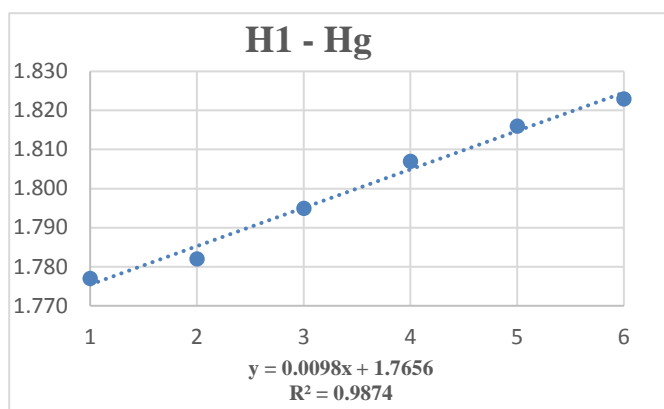


Figura 18: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0.0001 mg/L).

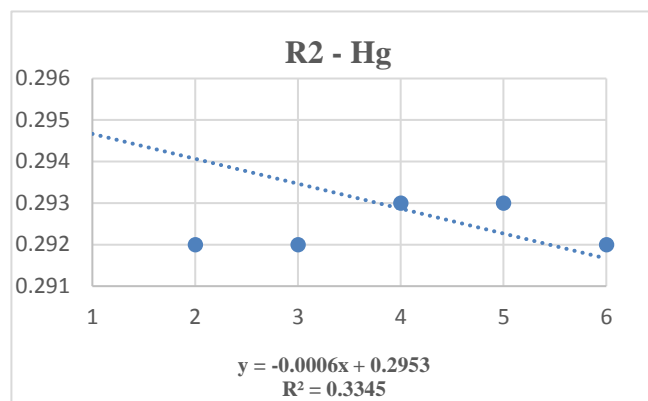


Figura 21: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0.0001 mg/L).

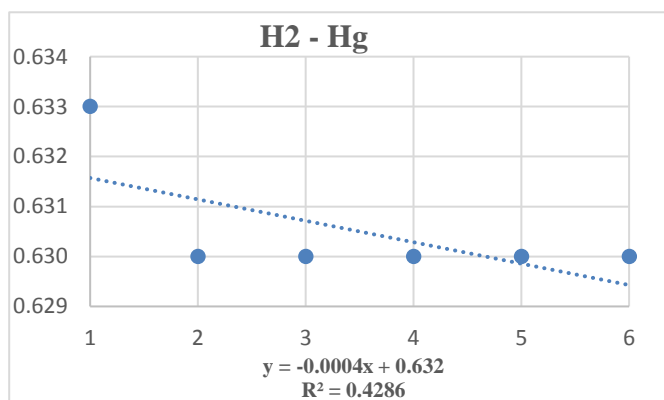


Figura 19: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0.0008 mg/L).

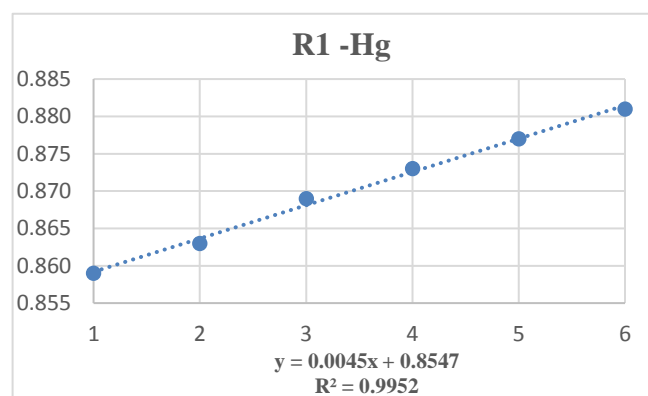


Figura 22: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0.0008 mg/L).

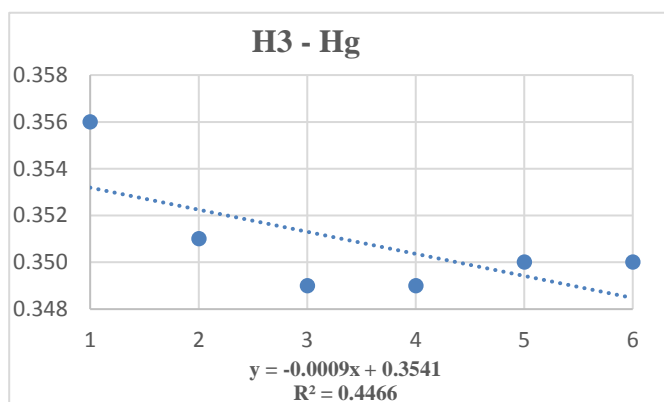


Figura 20: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0.0016 mg/L).

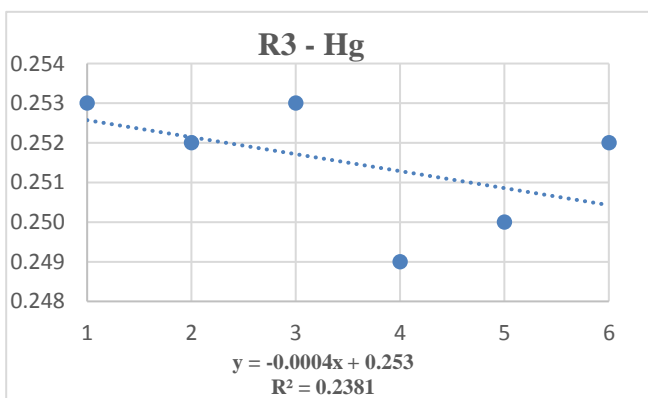


Figura 23: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0.0016 mg/L).

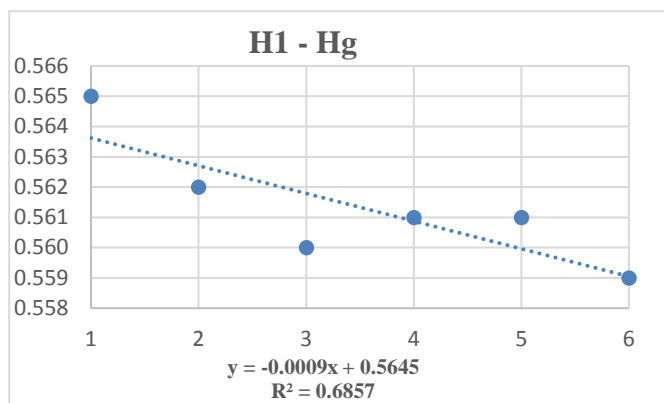


Figura 24: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H1 (0.0001 mg/L).

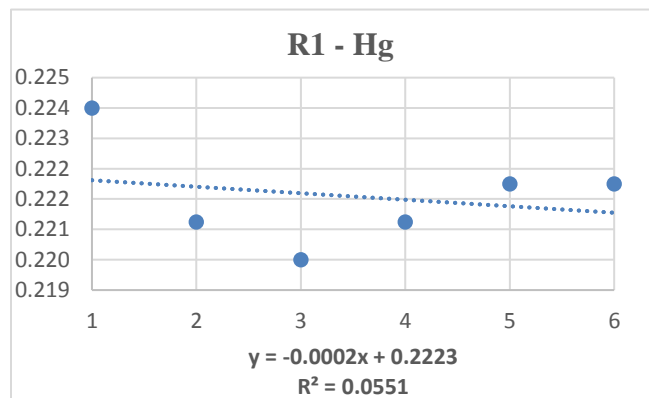


Figura 27: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R1 (0.0001 mg/L).

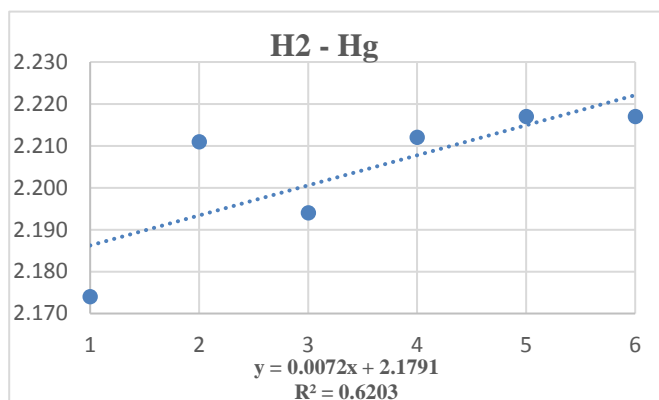


Figura 25: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H2 (0.0008 mg/L).

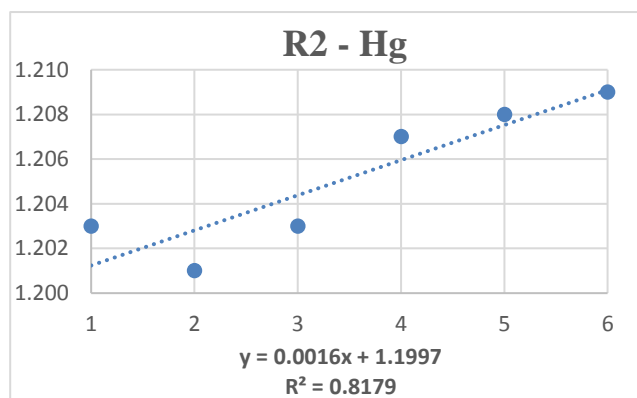


Figura 28: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R2 (0.0008 mg/L).

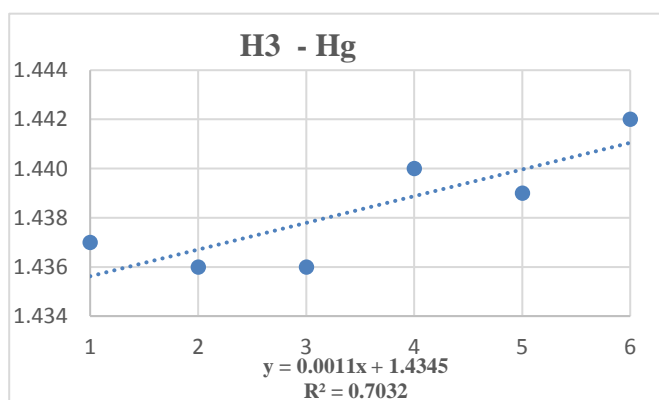


Figura 26: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de H3 (0.0016 mg/L).

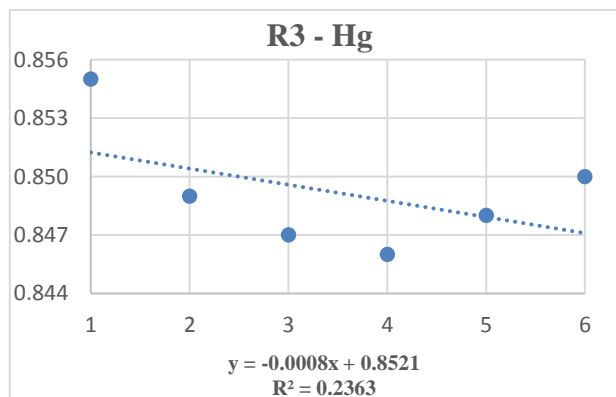


Figura 29: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Mercurio a una concentración de R3 (0.0016 mg/L).

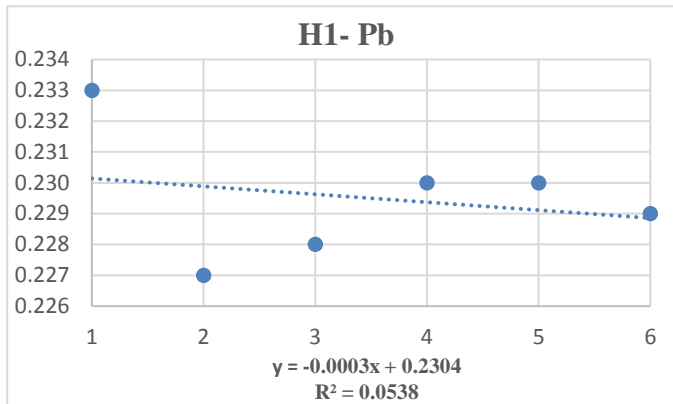


Figura 30: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de H1 (0.001 mg/L).

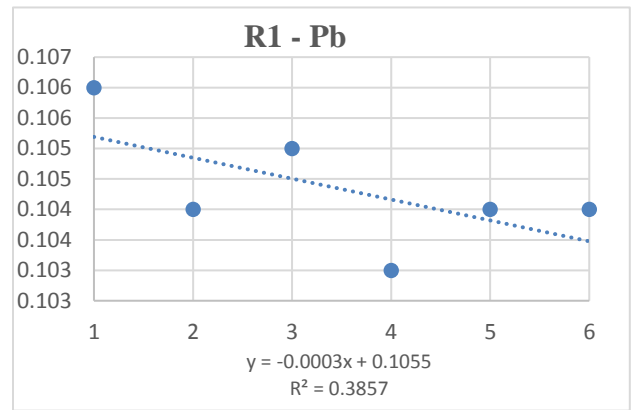


Figura 33: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de R1 (0.001 mg/L).

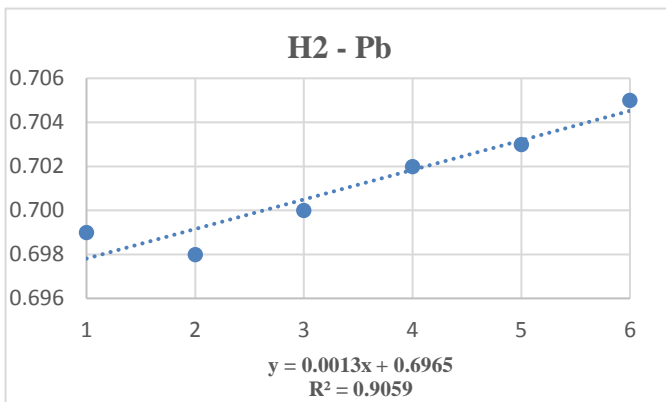


Figura 31: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de H2 (0.008 mg/L).

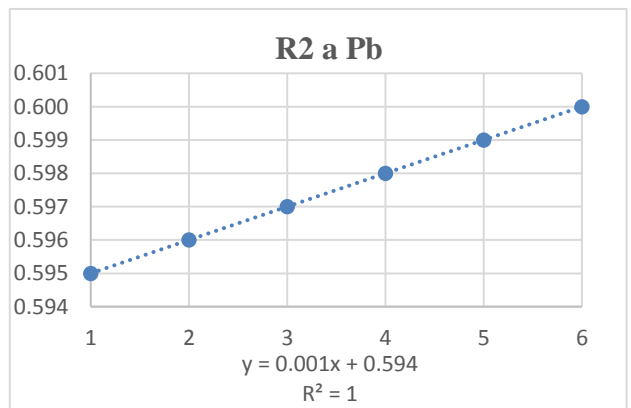


Figura 34: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de R2 (0.008 mg/L).

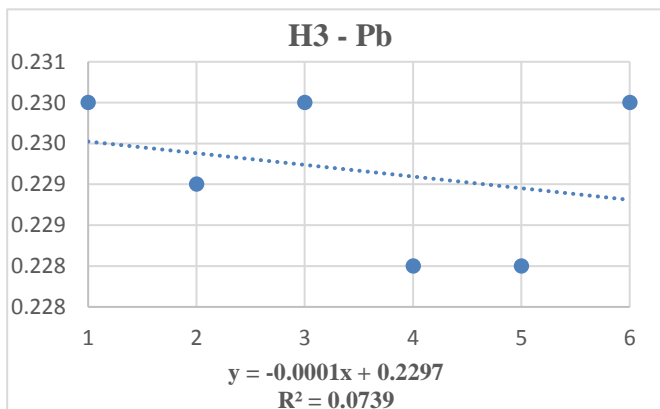


Figura 32: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de H3 (0.016 mg/L).

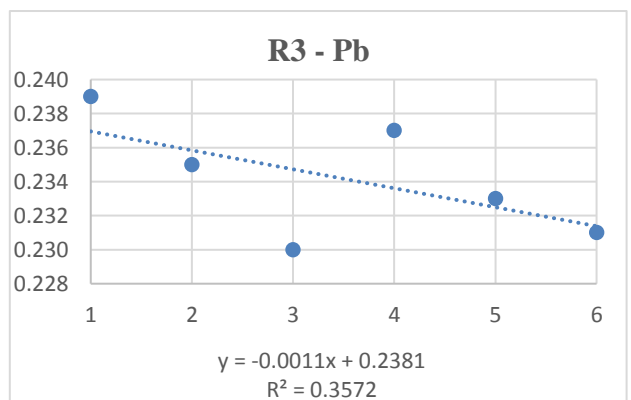


Figura 35: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 6 horas con Plomo a una concentración de R3 (0.016 mg/L).

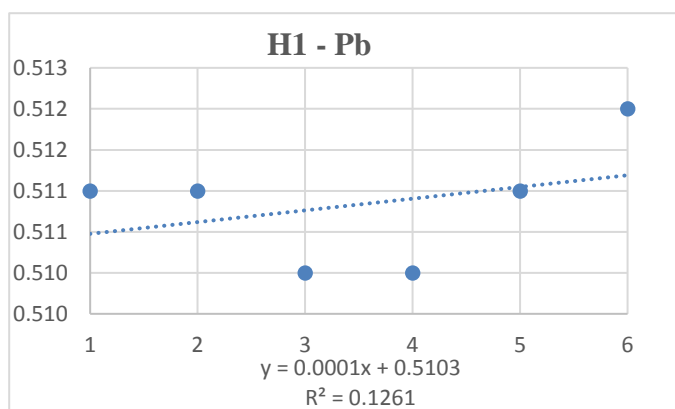


Figura 36: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H1 (0.001 mg/L).

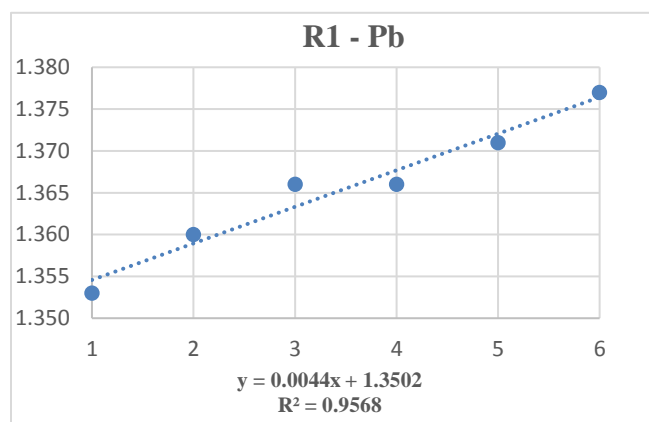


Figura 39: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R1 (0.001 mg/L).

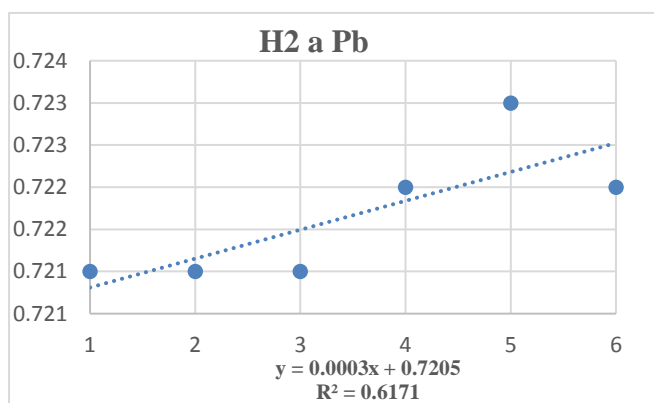


Figura 37: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H2 (0.008 mg/L).

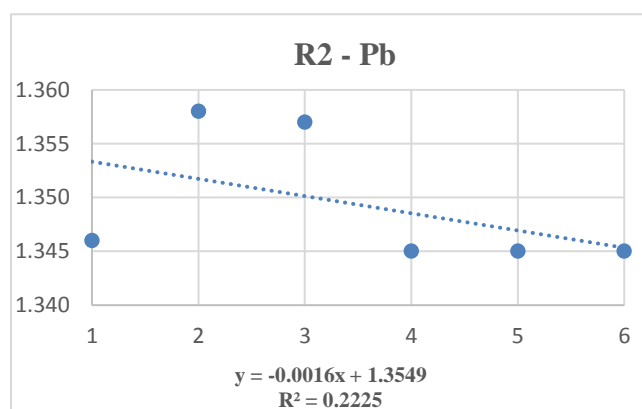


Figura 40: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R2 (0.008 mg/L).

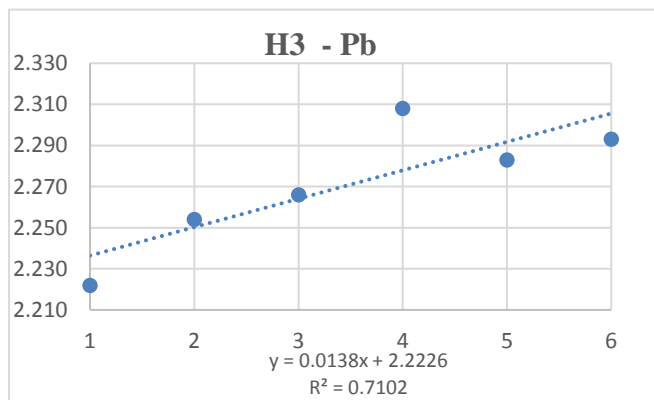


Figura 38: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de H3 (0.016 mg/L).

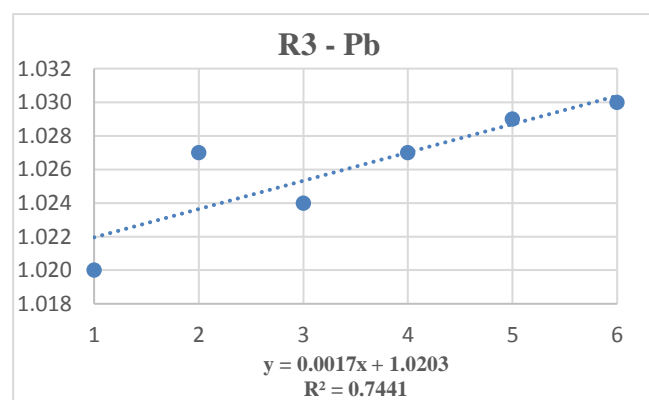


Figura 41: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 12 horas con Plomo a una concentración de R3 (0.016 mg/L).

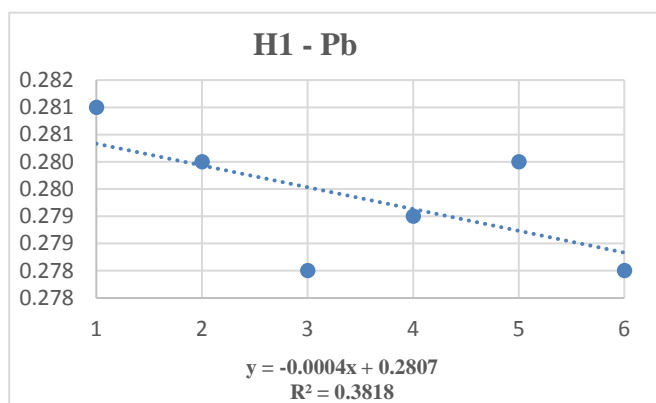


Figura 42: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H1 (0.001 mg/L).

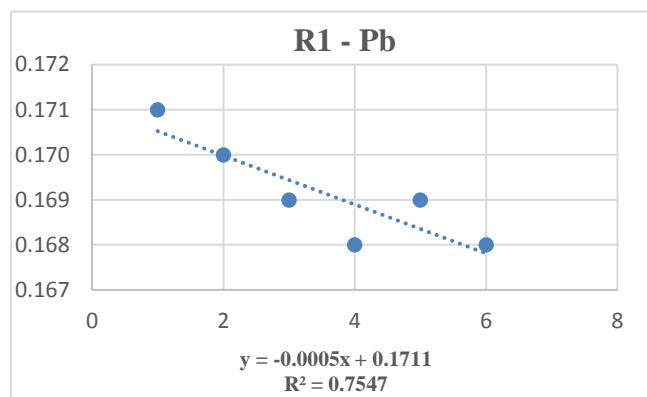


Figura 45: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R1 (0.001 mg/L).

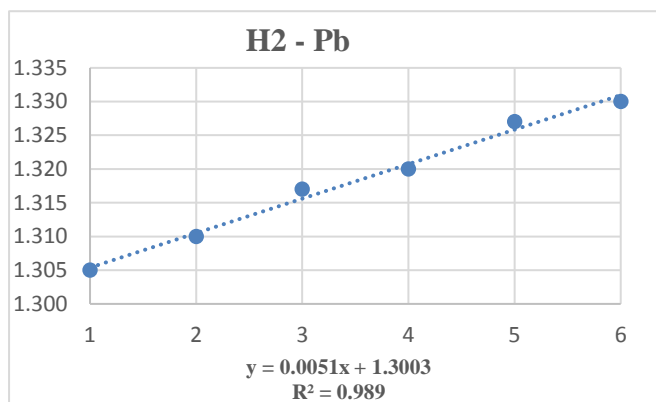


Figura 43: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H2 (0.008 mg/L).

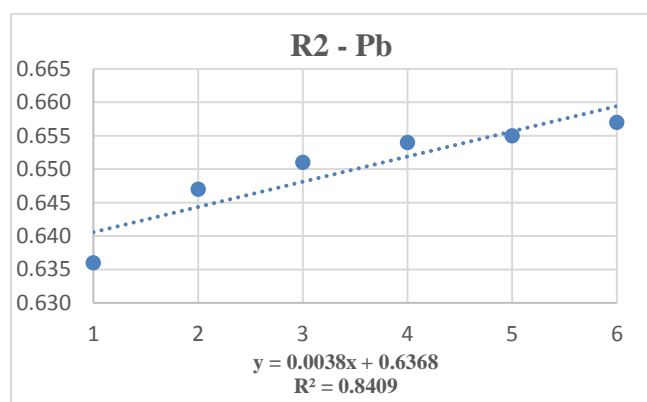


Figura 46: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R2 (0.008 mg/L).

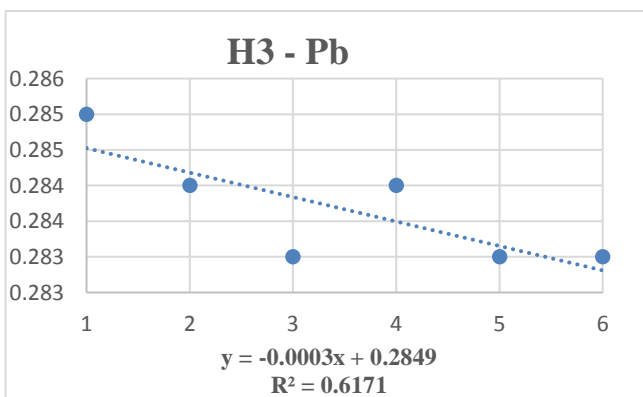


Figura 44: Velocidad de reacción de la PC sintasa en hojas sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de H3 (0.016 mg/L).

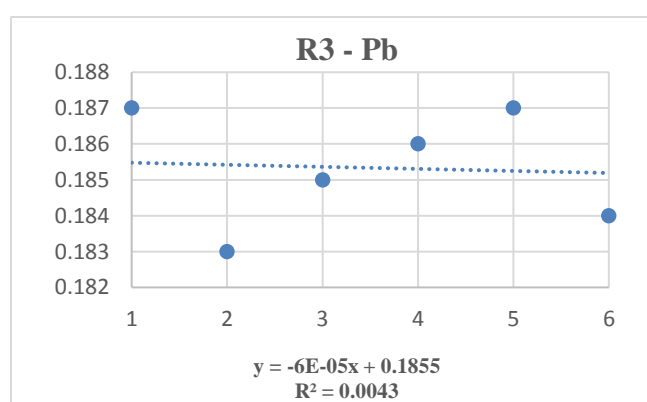


Figura 47: Velocidad de reacción de la PC sintasa en raíces sometidas a stress por 24 horas con Plomo a una concentración de R3 (0.016 mg/L).