



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y FISICOQUIMICA DE
LECTINAS DE FRIJOL Y AMARANTO CULTIVADOS EN EL ESTADO DE
HIDALGO

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICA EN ALIMENTOS

Presenta:

Julia Dolores Salgado Telpalo

Asesora:

Dra. María del Carmen Valadez Vega

Pachuca, Hgo.

2006



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos II del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTA) ; ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en el Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría



CIQ



CICyTA



DEDICATORIA

"Al conocer lo que Dios nos ha dado, encontraremos muchísimas cosas por las que dar gracias continuamente". *San Bernardo*

*Esta tesis está dedicada a mis papas: **Ismael y Flor** por creer en mi y porque gracias a ellos llegue hasta donde estoy, y aunque no soy muy expresiva saben que los amo con toda el alma y que nunca dejaré de agradecer todo lo que han hecho por mi*

GRACIAS, por todos los hermosos recuerdos de mi infancia.

GRACIAS, por todos los regañones que me hicieron la persona que soy.

GRACIAS, por apoyar mis errores, y también todas las decisiones que he tomado en mi vida.

GRACIAS, por estar junto a mí en los buenos momentos, así como en mis tristezas.

GRACIAS A TI PAPA, porque con tu ejemplo, tus sacrificios, tu esfuerzo, tu carácter llegue a ser el gran ser humano que eres tú, pero sobre todo gracias por ser como eres, el mejor de los padres, sabes que te admiro mucho por todo lo que has logrado.

GRACIAS A TI MAMA, porque con todo tu amor, tu ternura, tu comprensión, tus sacrificios y a pesar de los momentos difíciles que pasaste siempre me apoyaste y tuviste palabras de aliento y consuelo, gracias por ser la mejor mamá del mundo.

GRACIAS, porque han estado junto a mí en mis triunfos disfrutando conmigo las grandes felicidades.

Estoy muy orgullosa de ser su hija... y que Dios los bendiga siempre...

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, GRACIAS a **Dios** por darme la paciencia necesaria para poder culminar mis estudios, porque en muchos momentos de mi vida la fe en ese ser Supremo y mi sueño de superación me dieron esperanzas para realizar una de las mayores metas de mi vida: terminar una carrera.

Le agradezco principalmente a la Dra. Carmen Valadez Vega, mi asesora de tesis porque gracias a su apoyo, sus conocimientos, su disposición para aclarar mis dudas y por sus sugerencias durante el desarrollo de este proyecto; pude sacar este trabajo adelante; en verdad no tengo como pagarle todo lo que ha hecho por mi, simplemente muchas gracias y especialmente le agradezco por brindarme su amistad que se que durará por muchos años.

A mi novio Abraham, porque sin su ayuda me hubiera tardado muchísimo en terminar la parte experimental de mi tesis, gracias por tenerme tanta paciencia y apoyarme cuando me sentía más sola y abrumada por el trabajo, en verdad mil gracias por tu amor y comprensión, sabes cuanto te quiero y que quisiera escribirte mas cosas pero no debo extenderme demasiado.

A Moy y a Claus por su apoyo, por su cariño y por creer en mi; y a los bebichitos (Mickey y Neyda) que desde que llegaron a este mundo han sido una de las alegrías más grandes de mi vida, a los cuatro los quiero mucho.

A mis abuelitos, mis tíos y especialmente a mi madrina, muchas gracias porque se que desde donde estén se que estarán celebrando conmigo todos los momentos alegres de mi vida. No quiero omitir a nadie por eso gracias a todos mis primos, tíos, sobrinos y a la familia Cruz Téllez, porque han sido la mejor familia que me pudo haber tocado en este mundo; especialmente a Memo y Raúl, porque al igual que mi Papá, desde pequeña fueron mi ejemplo a seguir.

A Aide y Liliana gracias por las sacadas de sangre y poncharme las venas... no en serio gracias mil por brindarme su amistad cuando llegue a clases como muppet y no conocía a nadie más y aunque no nos veamos seguido saben que siempre pueden contar conmigo y que las quiero mucho.

A Vane y Mary, gracias por su amistad, por ayudarme cuando tenía muchísimo trabajo y por hacerme mas llevadera la estancia en el laboratorio.

A todos los de la segunda generación de química en alimentos, así como a los compañeros que conocí cuando llegue a la carrera que por algunas circunstancias se fueron quedando en el camino, porque fue un grupo muy padre, agradezco mucho haber estado con ustedes y de todos me llevo gratos recuerdos.

A mis amiguitas de química Chuy y Flor porque el mejor recuerdo de estar en esa carrera fue que hicimos una gran amistad. Agradezco también al Dr. José Guadalupe Alvarado Rodríguez, la Dra. Noemí Andrade López y la M. en C. Araceli Sierra Zenteno por todos sus conocimientos y porque de ustedes me llevo un gran recuerdo.

Al Dr. Fikrat Abdullaev Jafarova y al Dr. Heriberto Caballero Ortega del Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, por haberme prestado sus instalaciones, material y reactivos para la elaboración de la matriz de estroma.

A la M. en C. Mayra Cuéllar Cruz, por el préstamo de reactivos y porque desde que me dio bioquímica, aunque sufrí mucho en esa materia, se volvió una persona que recordaré con mucho cariño.

Al Dr. Santiago Filardo Kerstupp, por haberme prestado su microcentrifuga y así avanzar en mi trabajo cuando se decompuso la centrifuga grande, además porque no podía faltar en esta hoja, gracias por sus consejos.

Al Dr. José Manuel Rodríguez Nogales, porque su clase siempre fue muy interesante y porque aunque esta muy lejos, siempre lo voy a recordar; al Dr. Joseantonio Godoy Reyes, por darme la analítica que mas me costo trabajo pero que también fue donde aprendí mucho; a la Dra. Judith Jaimez Ordaz por calificar nuestras faltas de ortografía y por sus enseñanzas; a la Dra. Elizabeth Contreras López, por sus conocimientos y la convivencia.

Al Dr. Javier Castro Rosas por prestarme su fuente de poder porque sin ella no hubiera terminado nunca mis geles. Al Dr. Norberto Chavarría Hernández y a la Dra. Rosa Blanca Rodríguez Pastrana, del Laboratorio de Biotecnología del ICAp, por su gran amabilidad al prestarme la liofilizadora. A la Quim. Yolanda, por soportarme horas eternas en el equipo UV y por no regañarme tanto al pintarle sus celdas de azul y a la Dra. Verónica, por ayudarme con la cuantificación de los metales.

A varios de los ex-alumnos de la Dra. Carmen por la valiosa donación de su sangre.

A todos los profesores, ingenieros, maestros y doctores, que me formaron durante toda mi vida académica muchas gracias por todos sus conocimientos.

A mis sinodales por todos sus consejos, correcciones y recomendaciones con lo cual pude obtener un trabajo de calidad. Especialmente a la Dra. Clara Zúñiga Pérez, por ser una gran persona y por su apoyo incondicional para la elaboración de esta tesis.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	IX
I.- RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ANTECEDENTES	4
A. Leguminosas	4
1. Frijol	4
a) Características del frijol negro	5
b) Compuestos antifisiológicos	6
B. Cereales	6
1. Amaranto	7
a) Características del amaranto	8
b) Compuestos antifisiológicos	9
C. Factores antinutricionales	10
D. Lectinas	11
2. Propiedades biológicas	13
3. Propiedades químicas	14

4. Efectos tóxicos	15
5. Aplicaciones	15
IV. JUSTIFICACION	17
V. OBJETIVOS	18
A. Objetivo General	18
B. Objetivos Específicos	18
VI. MATERIALES Y METODOS	19
A. Materiales y reactivos	19
B. Métodos	20
1. Análisis Proximal	20
a) Determinación de proteína, grasa, fibra, humedad y cenizas	20
2. Purificación de Lectinas	20
a) Extracción de lectinas	20
b) Preparación de la matriz de estroma empleando eritrocitos humanos	21
c) Purificación de lectinas por cromatografía de afinidad	22
3. Caracterización de las lectinas de frijol negro y amaranto	22
a) Actividad hemaglutinante de las lectinas	22
a1. Preparación de eritrocitos	22
a2. Prueba de hemaglutinación	23
a3. Determinación de proteína soluble	23
b) Estudios de inhibición de la aglutinación	24
c) Determinación de peso molecular mediante electroforesis (PAGE)	24
c1. Tinción con Coomassie	25
c2. Tinción con nitrato de plata	25
d) Contenido de carbohidratos totales	25

e) Determinación de metales	26
e1. Efecto de los iones metálicos sobre la hemaglutinación	26
f) Estabilidad al pH	26
g) Termoestabilidad	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
A. Análisis Proximal	28
B. Purificación de lectinas	30
C. Caracterización de lectinas de frijol negro y amaranto	39
1. Actividad hemaglutinante	39
a) Actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos humanos	39
b. Actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos de animales	42
2. Estudios de inhibición de la aglutinación	44
3. Determinación de peso molecular	47
4. Contenido de carbohidratos totales	54
5. Contenido de metales	56
a) Efecto de iones metálicos sobre la hemaglutinación	59
6. Estabilidad al pH	62
7. Termoestabilidad	66
VIII. CONCLUSIONES	71
IX. BIBLIOGRAFIA	73
X. GLOSARIO	93
XI. ANEXOS	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis proximal de las muestras de frijol negro y amaranto.....	29
Figura 2. Patrón cromatográfico de lectina de frijol de vara (FN1) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.....	31
Figura 3. Patrón cromatográfico de lectina de frijol de surco (FN2) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.....	32
Figura 4. Patrón cromatográfico de lectina de amaranto (AM) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.....	34
Figura 5. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de frijol de vara.....	50
Figura 6. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de frijol de surco.....	51
Figura 7. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de amaranto.....	53
Figura 8. Contenido de carbohidratos totales.....	55
Figura 9. Contenido de metales de la lectina de frijol de vara.....	57
Figura 10. Contenido de metales de la lectina de frijol de surco.....	58
Figura 11. Contenido de metales de la lectina AM.....	60

Figura 12. Estabilidad de la lectina de frijol de vara (FN1) a diferentes condiciones de pH.....	63
Figura 13. Estabilidad de la lectina de frijol de surco (FN2) a diferentes condiciones de pH.....	64
Figura 14. Estabilidad de la lectina de semilla de amaranto (AM) a diferentes condiciones de pH.....	65
Figura 15. Estabilidad de la lectina FN1 a diferentes valores de temperatura....	67
Figura 16. Estabilidad de la lectina FN2 a diferentes valores de temperatura....	68
Figura 17. Estabilidad de la lectina AM a diferentes valores de temperatura.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Purificación de lectina de frijol de vara (FN1).....	35
Tabla 2. Purificación de lectina de frijol de surco (FN2).....	37
Tabla 3. Purificación de lectina de amaranto (AM).....	38
Tabla 4. Actividad hemaglutinante de las lectinas puras empleando eritrocitos humanos.....	41
Tabla 5. Actividad hemaglutinante de las lectinas purificadas de frijol negro y amaranto utilizando eritrocitos de animales.....	43
Tabla 6. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de FN1.....	45
Tabla 7. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de FN2.....	46
Tabla 8. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de AM.....	48
Tabla 9. Peso molecular de las lectinas purificadas.....	49
Tabla 10. Actividad hemaglutinante de la lectina desmetalizada y con adición de metales.....	61

I.- RESUMEN

Las leguminosas y los cereales son una fuente rica en proteínas, hidratos de carbono, fibra dietética, vitaminas y minerales; sin embargo contienen sustancias antifisiológicas, tales como las lectinas que son proteínas o glicoproteínas ubicuas, de origen no inmune, capaces de reconocer e interaccionar reversiblemente con carbohidratos de superficies celulares. La importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas, tales como aglutinación de eritrocitos y otras células como linfocitos, espermatozoides, plaquetas y bacterias, inducción de mitosis y efectos citotóxicos en linfocitos y aglutinación de virus, entre otras.

El objetivo del presente trabajo fue la extracción, purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de lectinas de frijol negro y amaranto cultivados en el Estado de Hidalgo.

Las lectinas purificadas presentan un contenido de proteína total, mayor al 17%. Las lectinas de frijol negro son glicoproteínas tetraméricas compuestas de subunidades idénticas de un peso molecular de 27.34 kDa para frijol de vara y 28.17 kDa para frijol de surco; la lectina de amaranto es una proteína compuesta por dos subunidades con un peso molecular de 26.68 y 28.43 kDa; las tres lectinas son metaloproteínas que contienen y requieren para ejercer su actividad biológica iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} . Las lectinas purificadas presentan mayor especificidad hacia eritrocitos humanos tipo O tripsinizados y sin tripsinizar, así como a los eritrocitos de hámster y conejo; solo la lectina de amaranto presenta inhibición de la aglutinación cuando es tratada con monosacáridos. Todas las lectinas son estables a pH ácido, neutro y básico. Las lectinas presentan una alta estabilidad y actividad biológica a temperaturas entre 25-60 °C; a temperaturas mayores la actividad hemaglutinante disminuye considerablemente debido a la desnaturalización de las proteínas. Estos resultados proporcionan una valiosa información respecto a las características bioquímicas y fisicoquímicas de las lectinas purificadas.

II. INTRODUCCION

Las leguminosas y los cereales son una rica y económica fuente de proteínas, carbohidratos, minerales y fibra dietaria (Rehman, 2001), sin embargo el valor nutritivo de estos alimentos puede verse afectado por diversos factores antinutricionales tales como las lectinas. Algunas lectinas presentan toxicidad en los seres humanos al interactuar con eritrocitos o actuar específicamente en determinadas células (células epiteliales, linfocitos, espermatozoides y plaquetas, entre otras) ocasionando diversas reacciones adversas. Las lectinas también despiertan interés científico debido al gran potencial que poseen cuando se utilizan de forma pura en reacciones biológicas para fines de diagnóstico clínico e investigaciones sobre la estructura de proteínas y carbohidratos en células pudiendo obtener diversos tratamientos alternativos a enfermedades como lo es el cáncer, el cual tiene una mayor incidencia dentro de nuestra sociedad; por lo tanto, es importante purificar y caracterizar lectinas de vegetales cultivados en nuestro Estado y así contribuir con estas líneas de investigación.

El frijol ocupa un lugar importante entre las leguminosas de mayor producción y consumo en África, India y América Latina (Bourges, 1987; Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993); es una rica fuente de proteínas, hidratos de carbono y vitaminas del complejo B como son la niacina, la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina. Igualmente proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio y tiene un alto contenido en fibra; sin embargo puede contener factores tóxicos pero esa toxicidad solo se presenta cuando están crudos o mal cocidos, ya que con una buena cocción se destruyen estos factores (Levy y col, 1985).

La semilla de amaranto es considerada como un pseudocereal, ya que tiene propiedades similares a las de los cereales pero botánicamente no lo es, aunque todo el mundo la ubica dentro de este grupo (Lehmann, 1991). Tiene un

alto contenido de proteínas, minerales entre los que se encuentran el sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre, manganeso, níquel y hierro además de vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y vitamina C; sin embargo también puede contener factores antifisiológicos que se definen como sustancias de naturaleza no fibrosa, que al ser ingeridas pueden interferir con la utilización de los nutrientes, afectando el crecimiento y la salud en seres humanos y en animales (Jaffé, 1980; Martínez y Larralde, 1984).

Tanto el frijol como el amaranto contienen diversos factores antinutricionales que incluyen los oligosacáridos, taninos, inhibidores de tripsina, ácido fítico y lectinas, entre otros. Estas sustancias pueden inhibir enzimas digestivas, dañar la mucosa intestinal o modificar la absorción de nutrientes (Alfaro, 1988; Figueroa, 1984), asimismo estos compuestos pueden afectar la digestibilidad de proteínas y carbohidratos que pueden ocasionar serias implicaciones en la salud de los individuos o de los animales (Huissman, 1992); también se relacionan con la reducción de la biodisponibilidad de los minerales (D'Mello, 1995); sin embargo, a pesar de los efectos negativos de los factores antinutricionales, diversas investigaciones científicas han demostrado el papel benéfico de estos en la prevención y tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. (Terrill y col, 1992; Guzmán-Maldonado, 1998; Gallegos y col, 2004).

Las lectinas han sido estudiadas ampliamente y son útiles para el estudio de diversos procesos biológicos, principalmente se utilizan para la detección de transformaciones malignas en células, como agentes anticancerígenos, como fármacos para prevenir metástasis, así como para la tipificación de grupos sanguíneos (Sharon y Lis, 1998). Por estas y otras razones, hoy en día es interesante conocer más acerca de las características bioquímicas, fisicoquímicas, biológicas y toxicológicas de las lectinas, por lo que el presente tiene como finalidad purificar y caracterizar lectinas de frijol negro y amaranto cultivados en el Estado de Hidalgo.

III. ANTECEDENTES

A. Leguminosas

Las leguminosas son todos los granos secos que vienen en vainas, como el frijol, habas, lentejas, soya y garbanzos; son un conjunto de especies que forman parte de la familia de las Leguminosas (*Leguminosae*), también llamada Fabáceas (*Fabaceae*). Las tres subfamilias en que se divide son Papilionadas (*Papilionoideae*), Mimosoídeas (*Mimosoideae*) y Cesalpinoídeas (*Caesalpinoideae*). Son una de las fuentes más importantes de energía y nutrimentos como proteínas, carbohidratos y vitaminas (complejo B y E); así como de minerales como calcio, hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio y magnesio, especialmente en países en vías de desarrollo (Veríssimo, 1999).

1. Frijol

En México, el cultivo del frijol junto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad, su consumo es generalizado en todos los estratos sociales, por lo que la importancia de este grano en la dieta actual del país sigue siendo fundamental. (SAGARPA, 2000)

El frijol se cultiva en todas las regiones del país bajo todas las condiciones de suelo y clima, prácticamente se produce en todos los Estados de la República Mexicana destacando las regiones templada-semiárida y la cálida con invierno seco, tanto por la superficie sembrada como por el volumen de producción; es una de las principales variedades demandadas en el ámbito nacional y el Estado de Hidalgo participa a nivel nacional con una producción de 24, 030 toneladas por año (SAGARPA, 2000).

a) Características del frijol negro

En México se cultivan cerca de 70 variedades de frijol que de acuerdo con la norma, se dividen en: negros, amarillos, rosados, bayos, pintos, etc. y se caracterizan por su tamaño, forma, color y tipo de crecimiento. El género *Phaseolus* presenta cuatro especies: *Phaseolus vulgaris* L, *Phaseolus coccinerus* L, *Phaseolus lunatus* L y *Phaseolus acutifolius* A. La especie *Phaseolus vulgaris* comprende una amplia diversidad de tipos, que podrían dar origen a más de 500 cultivares comerciales (Veríssimo, 1999).

El frijol negro es una leguminosa que constituye una rica fuente de proteínas e hidratos de carbono, además es abundante en vitaminas del complejo B, como niacina, riboflavina, ácido fólico y tiamina; también proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio, y presenta un alto contenido de fibra (Bosque-Morales, 1981).

El frijol negro tiene un bajo contenido de grasa 2.5%, no obstante tiene un alto porcentaje de fosfolípidos, ácido linoléico, láurico, palmítico y esteroico (Matthews, 1989); los carbohidratos son los componentes mayoritarios presentes en un 63.5% aproximadamente, la mayor parte son carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos) es menor y esta formada principalmente por rafinosa y estaquinosa (Tobar, 1992). Respecto a su contenido de proteína es de 21.8% aproximadamente (Serrano y Goñi, 2004). Las principales proteínas que se han caracterizado son albúminas, globulinas, prolaminas y gluteninas; es una buena fuente de aminoácidos aromáticos, lisina leucina e isoleucina. Sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptofano y treonina (Blanco y col, 1991).

El consumo de frijol negro aporta el 15.9%, 19.1% y 134.4% de las cantidades de ingesta recomendadas de zinc, hierro y ácido fólico respectivamente. El contenido en hierro es alto (4.82%), aunque tiene una

biodisponibilidad muy baja (0.8%), posiblemente debido a la presencia de otros componentes no nutritivos presentes en los frijoles (Serrano y Goñi, 2004).

b) Compuestos antifisiológicos

El completo aprovechamiento del frijol es afectado por la presencia de ciertos factores antifisiológicos tales como los inhibidores de proteasas, lectinas, fitatos y compuestos fenólicos (Carmona y col, 1991; Trago 2000), los cuales disminuyen la utilización de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. La inactivación o la eliminación de estos factores se hace necesaria para incrementar su calidad, los tratamientos térmicos usuales a los que son sometidas las leguminosas para ablandar su textura y así ser consumidas, también eliminan o disminuyen los factores antinutricionales e incrementan su valor nutricional, digestibilidad de proteínas y de almidones (Chiou, 2000). El consumo de lectinas provenientes del frijol se relaciona con toxicidad, debido a su efecto aglutinante de glóbulos rojos. Sin embargo, se ha observado que las fitohemaglutininas pueden influenciar la glicemia por uniones en las células de la mucosa intestinal, en donde causan una disminución en la absorción de nutrientes. Estudios con modelos de animales (ratas y ratones) han mostrado que las fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* limitan el crecimiento de tumores no digestivos por medio de una promoción de la hiperplasia del epitelio intestinal (Pryme y col, 1999).

B. Cereales

Pertenecen a la familia botánica de las Gramíneas (*Gramineae* o *Poaceae*); también se incluyen en ella especies como la quinua y el amaranto, de la familia botánica de las Quenopodiáceas (*Chenopodiaceae*). Se caracterizan porque la semilla y el fruto son prácticamente una misma cosa: los granos de los cereales. Los más utilizados en la alimentación humana son el trigo, el arroz y el maíz, aunque también son importantes la cebada, el centeno, la avena y el mijo (Veríssimo, 1999). Los cereales y sus derivados son ricos en

carbohidratos, fibra, grasa y proteínas; la composición en aminoácidos de las proteínas de los cereales depende de la especie y variedad; en general son pobres en aminoácidos esenciales, por lo que se les cataloga como proteínas de moderada calidad biológica; contienen minerales como el calcio, fósforo (aunque la presencia de ácido fólico interfiere parcialmente su absorción), hierro y en menor cantidad potasio; además de todas las vitaminas del complejo B, vitamina E y carecen de vitamina A (Rico, 2000).

1. Amarantho

El amaranto es un pseudocereal con alto valor nutritivo debido al contenido de proteínas, aminoácidos y minerales. Es originario de México y de Perú donde se siembra en baja escala (Rivillas, 2005). Junto con el maíz, el frijol y la chíá, el amaranto fue uno de los principales productos para la alimentación de las culturas precolombinas de América. Para los mayas, aztecas e incas el amaranto fue la principal fuente de proteínas y se consumía como verdura y grano reventado. Además estuvo asociado a los ritos religiosos, a los dioses y a la visión cósmica de estas culturas. Con la llegada de los españoles a América y durante la Conquista, el amaranto fue eliminado de la dieta indígena por razones religiosas y políticas por lo que la cultura del cultivo y consumo del amaranto casi desaparecen, solamente en los lugares más apartados de la conquista española se mantuvo la producción de amaranto. (Becerra, 2000).

En los últimos años se ha ampliado su mercado de consumo en países industrializados como Estados Unidos, Japón y Alemania. Con excepción de México, el consumo de alimentos procesados con amaranto ha sido principalmente en el ramo naturista, sin embargo, se ha constatado la presencia creciente de productos elaborados con amaranto destinados al mercado masivo.

Su cultivo ha llegado hasta nuestros días en gran parte por la resistencia a heladas, plagas y a su adaptación en diferentes tipos de suelo (González-Castañeda, 2005); diversos estudios sobre la composición química del grano, han demostrado que puede ser un valioso complemento de cereales y leguminosas debido a la alta cantidad de proteína de reserva del grano y al contenido de ciertos aminoácidos esenciales (Gómez - Lorenze, 1999). La proteína tiene un balance de aminoácidos aceptable, en particular contiene el aminoácido esencial lisina, el cual, en los cereales es deficiente.

El amaranto es un cultivo muy importante, tanto para la alimentación humana como animal, la proteína de amaranto se acerca a la proteína ideal. Actualmente, se siembra amaranto en varios estados, sin embargo los estados que más producen son: Puebla, Tlaxcala y el Estado de México, en otros estados se siembra en menor cantidad, por ejemplo en Chiapas, Campeche, D.F., Morelos, Guanajuato, Sinaloa, Sonora, Durango, Baja California Sur, Guerrero, Hidalgo, Chihuahua, Oaxaca, Michoacán y Jalisco (Gonzales-Castañeda, 2005).

a) Características del amaranto

Existen cerca de 50 especies que se encuentran en regiones templadas y tropicales del mundo. Probablemente en América Central no se encuentran todas las especies, pero cerca de 40 son conocidas en toda América del Norte. De las 50 especies encontradas en todo el mundo, 7 de ellas son las que se consideran más conocidas. Estas son: *Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amaranthus. polygonoides* L., *Amaranthus scariosus*, *Amaranthus spinosus* y *Amaranthus viridis* (Espitia, 1994). Las más frecuentemente usadas para semillas son las *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, siendo esta última la más cultivada en México.

El amaranto es una planta anual productora de pequeñas semillas en abundancia. Estas semillas tienen propiedades particulares que, aun no siendo gramíneas, se pueden conservar por tiempo prolongado sin que pierdan sus propiedades. La semilla del amaranto tiene un color que varía desde el café claro al negro, y su pequeño tamaño causa dificultad en el manejo y almacenamiento. Su peso va de 0.61 a 0.62 mg/semilla y la mayor concentración de proteína se encuentra en el germen (Díaz-Ortega, 2003). Una de sus principales propiedades es que revienta a altas temperaturas; esta forma del amaranto (palomita) cuenta un alto contenido nutritivo; respecto a su composición química tiene un a humedad del 8%, fibra cruda 5%, grasa 7 %, cenizas 3.4%, carbohidratos 76% y 15 al 18 % de proteína y presencia de lisina y metionina, además de un alto contenido de fibra, calcio, hierro y vitaminas A y C. El contenido de proteína y grasa es superior al de los demás cereales (Duarte-Correa, 1986).

Tradicionalmente con el amaranto se preparan palanquetas llamadas alegrías con miel de abeja o con piloncillo. No es panificable por la ausencia de gluten, pero se puede anexar a la harina de trigo para panificación y repostería, y con maíz y soya para tortillería. Otros usos incluyen pastas alimenticias y colorantes y, entre otras más, la producción de plásticos biodegradables. Con amaranto se preparan también atoles, papillas y mazapanes. El amaranto ha sido considerado por la OMS y la NASA como uno de los alimentos recomendados para el futuro (Amarantum: Asociación Mexicana del Amaranto, 2006).

b) Compuestos antifisiológicos

El amaranto contiene factores tóxicos o antifisiológicos que limitan la absorción de diversos nutrientes. Estos factores son inhibidores de tripsina, fitatos, oligosacáridos, saponinas y lectinas (Barros, 1997). Para disminuir sus efectos, la semilla de amaranto y sus productos deben someterse a un tratamiento de

inactivación como puede ser el reventado ya que se alcanzan altas temperaturas que destruyen estos compuestos. Estos factores interfieren en la digestión de las proteínas en el intestino, disminuyendo la asimilación de las proteínas propias del amaranto; así como en la absorción de minerales, formando complejos con hierro, zinc, calcio, magnesio y cobre, disminuyendo o limitando su utilización biológica.

C. Factores antinutricionales

El termino antinutrientes hace referencia a aquellos compuestos presentes de forma natural en un alimento que interfieren negativamente, en mayor o menor grado, en la absorción y metabolismo de sustancias nutritivas (Valle-Vega, 2000).

Además de ser fuente de proteína, hidratos de carbono, fibra dietética, algunas vitaminas y minerales; las leguminosas y los cereales son bajos en grasa y sodio, no tienen colesterol pero contienen una buena cantidad de oligosacáridos y sustancias antifisiológicas (Attia, 1994). Algunos de los factores antifisiológicos son los inhibidores de proteasa, lectinas, taninos, saponinas, cianógenos, factores antivitaminas e inhibidores de amilasa, entre otros (Siddhuraju, 1995).

Uno de los factores antifisiológicos más estudiados son las lectinas que son glicoproteínas, de origen no inmunológico, formadas por más de una subunidad proteica, que se caracterizan por ligar carbohidratos o glicoconjugados con alta especificidad, uniéndose de manera reversible sin alterar su estructura covalente (Rini, 1995; Sousa, 1995); han sido implicadas en efectos tóxicos y en la disminución en la tasa de crecimiento observada al alimentar animales de laboratorio con plantas o semillas comestibles que contienen la lectina cruda (Figueroa, 1984), su efecto primario como factor

antinutricional se relaciona con el hecho de que se unen a la mucosa de la pared intestinal y alteran su capacidad de absorber nutrientes (Jaffé, 1980); sin embargo este efecto es eliminado generalmente por medio de un tratamiento térmico adecuado (Figueroa, 1984; Peñate, 1987).

D. Lectinas

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas, obtenidas fundamentalmente de plantas, que tienen la propiedad de unirse específicamente a carbohidratos. El primer estudio sobre lectinas lo reportó Stillmark en 1888 al observar el fenómeno de hemaglutinación con extractos de semilla de *Ricinus communis*, cuya proteína llamada Ricina, aglutina eritrocitos (Sharon y Lis, 1972). Fue hasta el año de 1919 que se obtuvo la primera lectina en forma cristalina, descubierta por James B. Summer a partir del frijol *Canavalia ensiformes* llamada concaavalina A. Con el tiempo se fueron descubriendo nuevos extractos proteicos de semillas de otras plantas que también mostraban la capacidad de aglutinar eritrocitos. Si los carbohidratos se encuentran en las membranas de los eritrocitos, las lectinas los reconocen provocando su aglutinación, por lo que reciben el nombre de hemaglutininas o fitohemaglutininas en el caso de ser lectinas vegetales (Boyd, 1954). Con los años se identificaron, purificaron y caracterizaron nuevas lectinas de bacterias, hongos y animales vertebrados e invertebrados como cangrejos, camarones, caracoles, lombrices y moluscos, donde están presentes fundamentalmente en la hemolinfa y órganos sexuales. También se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales, y son particularmente abundantes en semillas, donde llegan a constituir hasta del 2 al 10% de las proteínas totales. También se ha localizado lectinas en hojas, tallos, raíces y cortezas, en menores cantidades que las reportadas en semillas (Lis y Nathan 1981, Sousa 1995) (Anexo 1).

El primero en plantear el término lectina fue Boyd y col en 1954, al observar que algunas aglutininas obtenidas de semillas de plantas podían reconocer a un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo. Sin embargo Golstein y col (1980) propusieron que de acuerdo a esa definición las lectinas son proteínas o glicoproteínas de enlace con carbohidratos que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados.

Esta definición incluye, los siguientes aspectos: a) las lectinas tienen por lo menos dos lugares de unión a los carbohidratos específicos de las células que aglutinan polisacáridos, glicoproteínas o glicolípidos, b) la especificidad de la lectina se define en función de los monosacáridos u oligosacáridos que inhiben las reacciones de aglutinación, precipitación o agregación inducidas por las lectinas y c) las lectinas no desarrollan ninguna actividad metabólica sobre el azúcar al cual se unen (Frane, 1982).

1. Clasificación

Se conocen seis familias de lectinas: lectinas de leguminosas, lectinas de cereal, lectinas P, C, y S, y pentraxinas, estos últimos en animales (Arason, 1996). En función de su especificidad de unión a los azúcares terminales en las cadenas de carbohidratos, las lectinas se clasifican en cinco grupos: a) lectinas que se unen a la glucosa/manosa, b) lectinas que se unen a la N-acetilglucosamina, c) lectinas que se unen a la galactosa/N-acetilgalactosamina, d) lectinas que se unen a la L-fucosa y e) lectinas que se unen al ácido siálico (Goldstein y col, 1997).

La clasificación de lectinas de acuerdo a su especificidad hacia monosacáridos enmascara el hecho de que exhiben a menudo una gran especificidad hacia los di, tri y tetrasacáridos y que ciertas lectinas interactúan solamente con oligosacáridos (Anexo 2).

2. Propiedades biológicas

Las lectinas ejercen importantes funciones en los organismos donde se encuentran, algunas de las cuales todavía no se conocen con precisión. En general las lectinas están relacionadas con fenómenos de reconocimiento y adhesión celular (Calderó, 1990) (Anexo 3). En las plantas las lectinas juegan un papel importante ya que funcionan como anticuerpos para proteger las plantas contra microorganismos fitopatogénicos, así como la protección de contra el ataque de los insectos depredadores de la semilla (Liener, 1976; Janzen, 1977), por otro lado se ha encontrado que están involucradas en el transporte y almacenaje de carbohidratos (Etzler, 1985); están implicadas en la relación de las plantas leguminosas con sus organismos simbióticos fijadores de nitrógeno (Dentro de los sistemas biológicos contribuyen en fijar el nitrógeno, quizás el más promisorio, desde el punto de vista agronómico, lo constituye la asociación simbiótica entre las bacterias del género *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas (Desai, 1976)). Se ha reportado de las lectinas tienen un sitio de unión y reconocimiento hacia polisacáridos o lipopolisacáridos superficiales de bacterias fijadoras de nitrógeno del genero *Rhizobium* los cuales proveen a la planta del nitrógeno necesario (Hamblin y Kent, 1973; Schmidt, 1974).

A las hemaglutininas se les conoce por su propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana o de otros animales, en una forma similar a los anticuerpos, e incluso manifiestan una marcada especificidad, además de una alta sensibilidad hacia ciertos glóbulos rojos.

La aglutinación es la manifestación más importante de la interacción de la lectina con las células. Consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos o carbohidratos) sobre la superficie celular (Rodríguez y col, 2004). Cuando las células que se aglutinan son glóbulos rojos (eritrocitos) humanos, el fenómeno se denomina

hemaglutinación (Anexo 4). La distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es diferente para cada aglutinina utilizada, lo cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico. La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por lo tanto no son específicas de grupo. Las específicas aglutinan eritrocitos humanos preferentemente de un determinado grupo sanguíneo. Esta especificidad permite usar a las lectinas como reactivo de tipificación de grupo sanguíneo y en la identificación de individuos secretores.

3. Propiedades químicas

La mayoría de las lectinas reaccionan preferentemente con los azúcares terminales no reductores, sin embargo algunas también reaccionan con los componentes internos o ramificados de las cadenas de carbohidratos (Calderó, 1990). La unión entre los carbohidratos y las lectinas se asemeja a la unión antígeno-anticuerpo, el tipo de enlace que se establece es lábil, no covalente y reversible (Anexo 5). La actividad biológica de las lectinas se puede atribuir en parte a los iones metálicos que son componente esencial de la estructura nativa de la mayoría de las lectinas leguminosas. (Lotan, 1983). En ocasiones algunas lectinas requieren iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , para mantener activos sus lugares de unión ya que en ausencia de estos la lectina pierde actividad y no se produce reacción. Además de su carbohidrato específico, varias lectinas de leguminosas poseen un sitio hidrofóbico que une compuestos no polares como adenina y ácido indolacético. Se cree que la estabilidad de la estructura nativa de la mayoría de las lectinas es causada por las interacciones hidrofóbicas. Tales sitios hidrofóbicos forman cavidades en la estructura de las lectinas y pueden desempeñar un papel biológico importante o pueden realzar las funciones de las lectinas en el ciclo vital de las plantas (Etzler, 1986).

4. Efectos tóxicos

Entre los efectos tóxicos de algunas fitohemaglutininas, se presenta un retraso en el crecimiento e incluso muerte, como puede observarse al incorporar semillas de soya cruda en la dieta de conejillos de indias recién destetados (Silverstein, 1982). Aunque el origen de estas proteínas sea diferente, los efectos tóxicos son los mismos, lo que varía es la intensidad. El efecto dañino es una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema, o sea que reaccionan con las criptas y vellos intestinales, pero en diferente región de acuerdo a la especificidad de la hemaglutinina, lo que ocasiona una interferencia no específica con la absorción de los nutrimentos, por consiguiente hay un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere (Jaffé, 1980; Liener, 1986). Algunas lectinas al parecer no resisten el proceso hidrolítico de las enzimas digestivas, por lo que no presentan un alto riesgo, como es el caso de las lectinas del garbanzo (*Cicer arietinum*).

La destoxificación de los alimentos que contienen hemaglutininas es por medio de tratamiento térmico pero cuando no se inactivan adecuadamente, el efecto puede ser muy drástico; incluso en experimentación animal se puede presentar la muerte (Liener, 1986).

5. Aplicaciones

El incremento en el número de aplicaciones biológicas de lectinas ha estimulado la investigación respecto a la purificación y caracterización de estas proteínas con actividad hemaglutinante (Lima, 1995). Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología (Hernández y col, 1999) (Anexo 6). Las lectinas se emplean en la caracterización de grupos sanguíneos humanos, así como en la identificación de nuevos grupos sanguíneos. Sus propiedades mitogénicas permiten que se

utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son: la evaluación de la producción de citoquinas (interferon e interleuquinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de pacientes con enfermedades de alto impacto social como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la leishmaniasis (Born y col, 1995; Itichi, 1996). Se han empleado para análisis cromosómicos en citogenética humana (Sharon y Lis, 1989). Las lectinas forman parte de conjugados como lectina-lectina, lectina-enzimas y lectina-anticuerpos, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas cromatográficas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas, así como también la purificación de enzimas y de las propias lectinas (Kong, 1997). Otra área importante en la cual se emplean las lectinas es la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas. Además se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de las células tumorales, se utilizan también para la inmunización contra virus productores de inmunodeficiencia y algunos tumores y como medicamentos para prevenir metástasis (Brotchi, 1997).

IV. JUSTIFICACION

En nuestro Estado existe una gran cantidad de vegetales con alto contenido proteico, que pueden ser fuentes potenciales de obtención de lectinas por lo que este proyecto esta dirigido a la purificación y caracterización de lectinas que purificadas ejercen efectos benéficos sobre la salud; ya que debido al aumento de diversas enfermedades, es necesario contribuir con diversas líneas de investigación en el área clínica, suministrando una fuente rica en lectinas para que otros investigadores puedan proporcionar tratamientos alternativos a diversas enfermedades entre ellas, el cáncer, el cual hoy en día es uno de los principales padecimientos que afectan a la población en general.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

- ✚ Extraer, purificar y caracterizar lectinas de semillas de frijol negro y de amaranto cultivados en el Estado de Hidalgo.

B. Objetivos Especificos

- ✚ Determinar el porcentaje de proteína, grasa, fibra, cenizas y humedad a las semillas de frijol y amaranto.
- ✚ Extraer y purificar lectinas de las semillas de frijol y de amaranto mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de estroma de eritrocitos humanos.
- ✚ Caracterizar las lectinas purificadas mediante su peso molecular, la actividad hemaglutinante, la inhibición de la aglutinación, el contenido de carbohidratos totales y la concentración de metales.
- ✚ Determinar el efecto de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} sobre la actividad biológica de la lectina.
- ✚ Determinar la estabilidad de las lectinas por medio de cinéticas de pH y temperatura.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Materiales y reactivos

- ✚ Frijol de vara negro (*Phaseolus spp*) cultivado en la Huasteca Hidalguense (FN1)
- ✚ Frijol de surco negro (*Phaseolus spp*) proveniente de la Huasteca Hidalguense (FN2)
- ✚ Semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en Mixquiahuala, Hidalgo. (AM)
- ✚ Eritrocitos humanos tipo A, O y B.
- ✚ Eritrocitos de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), hámster (*Cricetus cricetus*), pollo (*Gallus gallus*), borrego (*Ovis aries*), cerdo (*Sus domesticus*) y res (*Bos taurus*).
- ✚ Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico (J.T. Baker, Sigma-Aldrich, Bio Rad, Amersham Biosciences).

B. Métodos

1. Análisis Proximal

a) Determinación de proteína, grasa, fibra, humedad y cenizas

Se utilizaron los Métodos de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990), para analizar tres semillas de amaranto (dos provenientes de Mixquiahuala y una de Progreso, Hgo.); así como dos muestras de frijol negro cultivados en la Huasteca Hidalguense con la finalidad de determinar el contenido de humedad (Método: 925.09 y 7.003), cenizas (Método: 923.03), proteína cruda (Método: 977.14), extracto etéreo (Método: 920.29) y fibra cruda (Método: 962.09).

2. Purificación de Lectinas

a) Extracción de lectinas

Las semillas de frijol negro y amaranto fueron pulverizadas en un molino para granos (Micro Mill, H37252) y tamizadas en una malla numero 60.

La extracción de la fracción hemaglutinante se realizó según la metodología reportada por Mejía y col, (1989). Tanto de las harinas de frijol como la de amaranto; se extrajeron las lectinas con una solución reguladora de fosfatos-salino (PBS) 0.01 M, pH 7.4, en relación 1:10 (W/V), se agitó durante 16 h a 4° C; posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min. El precipitado se desechó y el concentrado proteico correspondiente a los extractos crudos se dializó contra tres cambios de PBS durante 24 h a 4 °C.

La preparación de las muestras para la purificación de las lectinas se efectuó a partir del extracto crudo dializado, del cual la proteína fue precipitada

empleando sulfato de amonio al 70%. El precipitado fue separado por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C, posteriormente se resuspendió en PBS y dializó contra PBS por 24 h. El concentrado proteico obtenido fue congelado para su posterior purificación por cromatografía de afinidad (Mejía y col, 1989).

b) Preparación de la matriz de estroma empleando eritrocitos humanos

La matriz de estroma de eritrocitos humanos se preparó de acuerdo a la técnica de Zenteno y col (1988), en donde se diluyeron 3 paquetes de sangre humana fresca en un volumen igual de PBS, para la separación de la fracción eritrocitaria se realizó un gradiente con ficoll (Amersham Biosciences) en relación 20:30 (Anexo 7). La fracción de eritrocitos se lavó tres veces por centrifugación (Centrifuga Hermle Z 323 K Labnet) a 5000 rpm durante 10 min con solución salina (0.9%).

Los eritrocitos fueron lisados con cinco litros de agua destilada en agitación constante durante 24 h a 4 °C. Al término de este tiempo los lisados fueron separados mediante centrifugación a 15, 000 rpm durante 20 min, se colectó el botón (estroma) y el sobrenadante fue desechado. El estroma colectado (220 mL), se lavó siete veces con agua destilada hasta que tomó un color rosado. Posteriormente se fijó el estroma en glutaraldehido 2% (glutaraldehido 2: estroma 1) durante toda la noche a 4 °C con agitación continua. El estroma fue lavado cinco veces con agua, se le adicionó una solución de glicina 1M en proporción 1:2 estroma-glicina, en constante agitación durante toda la noche. Se lavó con solución salina 0.9% hasta que el sobrenadante quedó claro.

Para montar la columna se hidrato Shepadex G25 mediano (Amersham Biosciences PD-10), durante 12 h y se mezcló al estroma en proporción 40:60. La matriz fue montada en una columna de vidrio de 2.5 x 30 cm. La matriz de

afinidad fue bloqueada con albúmina bovina (1mg/mL). Finalmente fue lavada y almacenada en solución reguladora de fosfatos – salino pH 7.4 con azida de sodio 5%, para su uso posterior en la purificación de lectinas.

c) Purificación de lectinas por cromatografía de afinidad

La purificación se realizó en una columna cromatográfica empleando la matriz de estroma de eritrocitos humanos previamente preparada. Se agregaron 20 mL de cada extracto proteico a la columna, lavándola con 200 mL de PBS, la elusión de la lectina se efectuó con una solución de ácido acético 3%, colectando fracciones de 3 mL y la detección de la lectina se realizó mediante un espectrofotómetro UV (Perkin Elmer Lambda 40 UV/Vis spectrometer) a 280 nm (Anexo 8).

Las fracciones que contenían la lectina de cada muestra se dializaron contra tres cambios de agua desionizada. Las lectinas purificadas fueron liofilizadas y conservadas en congelación para los experimentos posteriores.

3. Caracterización de las lectinas de frijol negro y amaranto

a) Actividad hemaglutinante de las lectinas

a1. Preparación de eritrocitos

Se empleó sangre humana fresca de tipos sanguíneos A, O y B de donadores sanos, así como sangre de animales (pollo, res, conejo, cerdo, hámster y borrego). La sangre se colectó en tubos con EDTA al 2% como anticoagulante, se mezcló con mucho cuidado a fin de no lisar los eritrocitos y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min para separar los eritrocitos del plasma sanguíneo (Anexo 9). Los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS a una concentración de 2%.

Una fracción de la suspensión de eritrocitos fue tratada con tripsina (0.6 mg/mL) en 10 mL de PBS y se incubaron por una hora a 37 °C con agitación constante. Los eritrocitos tripsinizados se lavaron tres veces con PBS y fueron resuspendidos en PBS a una concentración de 2%.

a2. Prueba de hemaglutinación

Se realizó empleando el método de diluciones seriadas con una solución de eritrocitos (Jaffé, 1980). Para la hemaglutinación se emplearon microplacas de 96 pozos. A cada pozo se agregaron 50 µL de la muestra de lectina y se efectuaron diluciones seriadas de orden 2 con PBS, a continuación a cada pozo se le agregó 50 µL de la suspensión de eritrocitos, dejando incubar una hora a temperatura ambiente y se determinó la última dilución que presentó aglutinación con lo cual se obtuvo el título de aglutinación.

Las unidades de hemaglutinina se definen como el inverso de la última dilución que presenta aglutinación positiva (Thompson y col, 1986). La actividad específica de lectinas se calculó dividiendo el título de aglutinación entre los mg de proteína soluble presente en los 50 µL de la muestra determinada por el método de Bradford (1976).

a3. Determinación de proteína soluble

Se utilizó el método de Bradford (1976). En un tubo de ensayo se mezclaron 100 µL de la lectina con 3 mL de reactivo de Bradford (0.01% de Coomassie G, 5% de etanol al 95% y 10% de ácido orto-fosfórico al 85%) esta reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La absorbancia se determinó a 595 nm en un espectrofotómetro UV (Perkin Elmer Lambda 40 UV/Vis spectrometer). Se realizó una curva de calibración empleando seroalbúmina bovina como estándar.

b) Estudios de inhibición de la aglutinación

En esta prueba se determinó la capacidad de algunos carbohidratos simples (manosa, rafinosa, glucosa, galactosa y fructosa) para inhibir la reacción de hemaglutinación. Para la prueba se tomaron 50 μ l de cada carbohidrato a una concentración de 0.5 M y se efectuaron diluciones seriadas de orden 2 con PBS, se agregaron 50 μ L de lectina y la reacción se dejó reposar una hora a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 50 μ L de la suspensión de eritrocitos tripsinados y sin tripsinizar, dejando incubar una hora a temperatura ambiente y se determinó la concentración mínima que fue necesaria para inhibir la hemaglutinación.

c) Determinación de peso molecular mediante electroforesis (PAGE)

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE) se realizó de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970), empleando un gel de corrida al 12% en una cámara para electroforesis vertical mini VE (Amersham Biosciences, N.J., USA). Se aplicaron 20 μ L de muestra en cada pozo del gel y se realizó la electroforesis a temperatura ambiente con un voltaje de 180 V y una corriente de 45 mA. La proteína fue teñida con una solución de azul Coomassie. El peso molecular de cada lectina se estimó empleando una mezcla de marcadores de peso molecular: fosforilasa B, albúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soya y lactoalbúmina (97, 66, 45, 30, 20, 14 kDa, respectivamente).

La electroforesis en geles nativos (NATIVO – PAGE) se realizó de acuerdo al método de Laemmli (1970) en un gel de poliacrilamida al 7% y se emplearon tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), lactato deshidrogenasa (142 kDa) y albúmina bovina (66 kDa) como estándares de peso molecular. Para la separación de la lectina la electroforesis se realizó a

45 mA y 180 V a 4 °C y las bandas separadas fueron visualizadas mediante tinción con plata.

c1. Tinción con Coomassie

Después de la electroforesis, los geles obtenidos mediante SDS – PAGE fueron teñidos con una solución de Coomassie para geles (0.1% Coomassie brilliant R en ácido acético 10%, metanol 40% en agua) durante 30 min. Posteriormente se destiñeron con solución fijadora (ácido acético 10%, metanol 40% en agua) y se lavaron con agua desionizada.

c2. Tinción con nitrato de plata

Los geles obtenidos de la electroforesis en condiciones nativas (NATIVO-PAGE), fueron sumergidos en solución fijadora para plata (10% ácido acético, 40% etanol) por 20 min. Posteriormente fueron incubados por 45 min con una solución de nitrato de plata (nitrato de plata 0.1%, etanol 20% y formaldehído 0.0027%). La solución de plata se desechó y los geles se lavaron con agua desionizada durante 1 min; a los geles se les agregó una solución reveladora (carbonato de sodio 2.5%, 20% de etanol y 0.01% de formaldehído) hasta observar las bandas de proteína, posteriormente los geles fueron lavados con agua desionizada.

d) Contenido de carbohidratos totales

Para su realización se empleó la técnica cuantitativa de Dubois (1956) en la cual los carbohidratos son convertidos a furfural y compuestos homólogos por acción del ácido y del fenol, produciendo un complejo colorido. En un tubo de ensaye se mezclaron 200 µl de la muestra de lectina, con 200 µL de una solución de fenol al 5% (w/v), a la mezcla se adicionó 1mL de ácido sulfúrico

concentrado y la reacción se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente el tubo de reacción se agitó y se dejó reposar 30 min; transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 490 nm. La concentración de carbohidratos se estimó interpolando la absorbancia obtenida con una curva de calibración empleando glucosa como estándar.

e) Determinación de metales

La lectina se dializó contra una solución de EDTA (0.02 M) en NaCl (0.15 M) durante 12 horas, al término de este tiempo la lectina fue digerida con una solución de ácido nítrico al 38%; la concentración de calcio, magnesio, manganeso, cobre y zinc fue detectada en un espectrofotómetro de plasma (Plasma ICP- OES, optima 3000XL), empleando un estándar para cada metal determinando la concentración de los metales en partes por billón (ppb).

e1. Efecto de los iones metálicos sobre la hemaglutinación

La lectina fue desmetalizada contra una solución de EDTA (0.02 M) en NaCl (0.15 M) durante 12 h y se determinó su título de aglutinación en micro placas de 96 pozos. Para determinar el efecto de los metales sobre la aglutinación, a cada pozo se le agregó 50 μ L de PBS, 50 μ L de lectina y 50 μ L de una solución que contenía iones metálicos (CaCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2) esta reacción se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron eritrocitos humanos tipo O, y se observó el título de aglutinación.

f) Estabilidad al pH

Se incubó cada muestra de lectina durante una hora a temperatura ambiente con los siguientes buffers: acetato de sodio (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), fosfato

de sodio (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5), tris-HCl (pH 8.0, 8.5) y glicina-NaOH (pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5), cada solución a una concentración de 0.02M. Posteriormente cada solución fue dializada contra dos cambios de PBS durante 12 h a 4 °C y a continuación se realizaron las pruebas de hemaglutinación a cada una de ellas empleando eritrocitos humanos tipo A y O tripsinizados.

g) Termoestabilidad

Las soluciones de lectinas se calentaron en baño María durante 30 min a las siguientes temperaturas: 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C. Al término de este tiempo cada muestra fue enfriada en hielo y se realizaron las pruebas de aglutinación empleando eritrocitos humanos tipo A y O tripsinizados

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Análisis Proximal

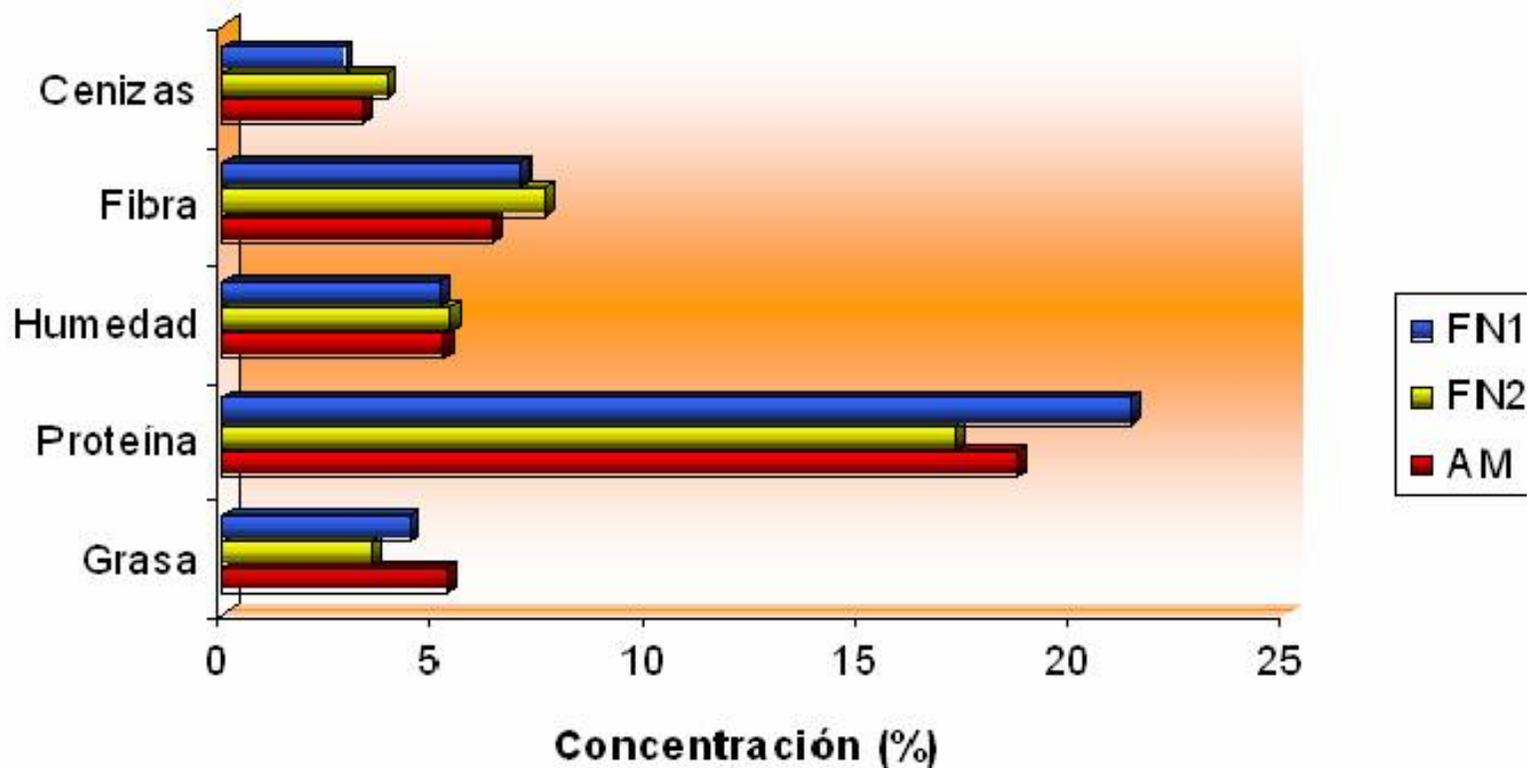
El análisis proximal fue realizado para dos muestras de frijol negro, así como para tres muestras de amaranto (dos semillas cultivadas en Mixquiahuala y una en Progreso, Hidalgo). Este análisis se llevo a cabo con la finalidad de cuantificar principalmente el contenido de proteína total de las muestras y así determinar que tan viable sería la purificación de una lectina proveniente de dichas semillas.

Los resultados obtenidos en las leguminosas indicaron que tenían un alto contenido de proteína por lo cual se decidió trabajar con ambos tipos de semilla. Por otro lado, los pseudocereales analizados mostraron que solo una semilla de amaranto proveniente de Mixquiahuala presentaba una concentración de proteína (18%) más alto que el de las otras dos (12 y 15% para las semillas de Progreso y Mixquiahuala, respectivamente). Estas variaciones en el contenido de proteína dependen del tipo de suelo y de las diferentes condiciones de cultivo que afectan principalmente la concentración de nutrientes presentes en las semillas (Monteros y col, 1993).

En base a los resultados anteriores y para los fines de este trabajo, se eligieron las dos semillas de frijol, así como una de las semillas de amaranto cultivada en Mixquiahuala, por ser las mejores fuentes de obtención de proteína (>17%).

En la Figura 1 se observa que el contenido de proteína para las semillas de frijol es de 21 y 17% (para FN1 y FN2 respectivamente), estos porcentajes están dentro de los niveles de proteína reportado por otros autores (19.5% Cárdenas y col, 2000; 16.95 – 23.24% Osorio y col, 2003; 21.8 % Serrano y Goñi, 2004; 23.7% Espinosa – Moreno, 2005).

Figura 1. Análisis proximal de las muestras de frijol negro y amaranto



FN1: Frijol de vara
FN2: Frijol de surco
AM: Semilla de amaranto

También se puede observar un 18% de proteína para la semilla de amaranto, este dato concuerda con lo reportado por Calderón y col (1991) y Bressani y col (1993) quienes encontraron entre un 12 -19% de proteína en estas semillas; mientras que Monteros y col (1993) encontraron un 17.54%; de igual forma, Hevia y col (2002) obtuvieron una concentración de proteína entre 15.4 -18.2 %. Asimismo, los contenidos de grasa, humedad, ceniza y fibra en las tres semillas se encuentran dentro de los parámetros reportados en diversas investigaciones (Calderón y col, 1991; Bressani y col, 1993; Cárdenas y col, 2000; Hevia y col, 2002; Serrano y Goñi, 2004).

B. Purificación de lectinas

Las lectinas de las dos muestras de frijol negro, así como, la lectina de amaranto, fueron purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad, empleando una matriz de estroma de eritrocitos humanos.

En la Figura 2 se presenta el patrón cromatográfico de la lectina FN1 donde se observa un solo pico al ser eluido con una solución de ácido acético al 3%, la fracción colectada (33 mL) corresponde a la lectina, lo cual se pudo comprobar por medio de pruebas de hemaglutinación con eritrocitos humanos tipo O y A tripsinizados y sin tripsinizar. La fracción aglutinante (lectina) fue dializada contra agua desionizada y liofilizada para su uso posterior.

En el patrón cromatográfico de la lectina FN2 se puede observar el pico donde se eluye la lectina utilizando ácido acético 3% (Figura 3), la fracción colectada (pico), presentó una aglutinación muy alta al utilizar eritrocitos humanos lo cual indica que se trata de una proteína altamente aglutinante (lectina) posteriormente fue dializada y liofilizada para utilizarla en diversas pruebas.

Figura 2. Patrón cromatográfico de lectina de Frijol de vara (FN1) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.

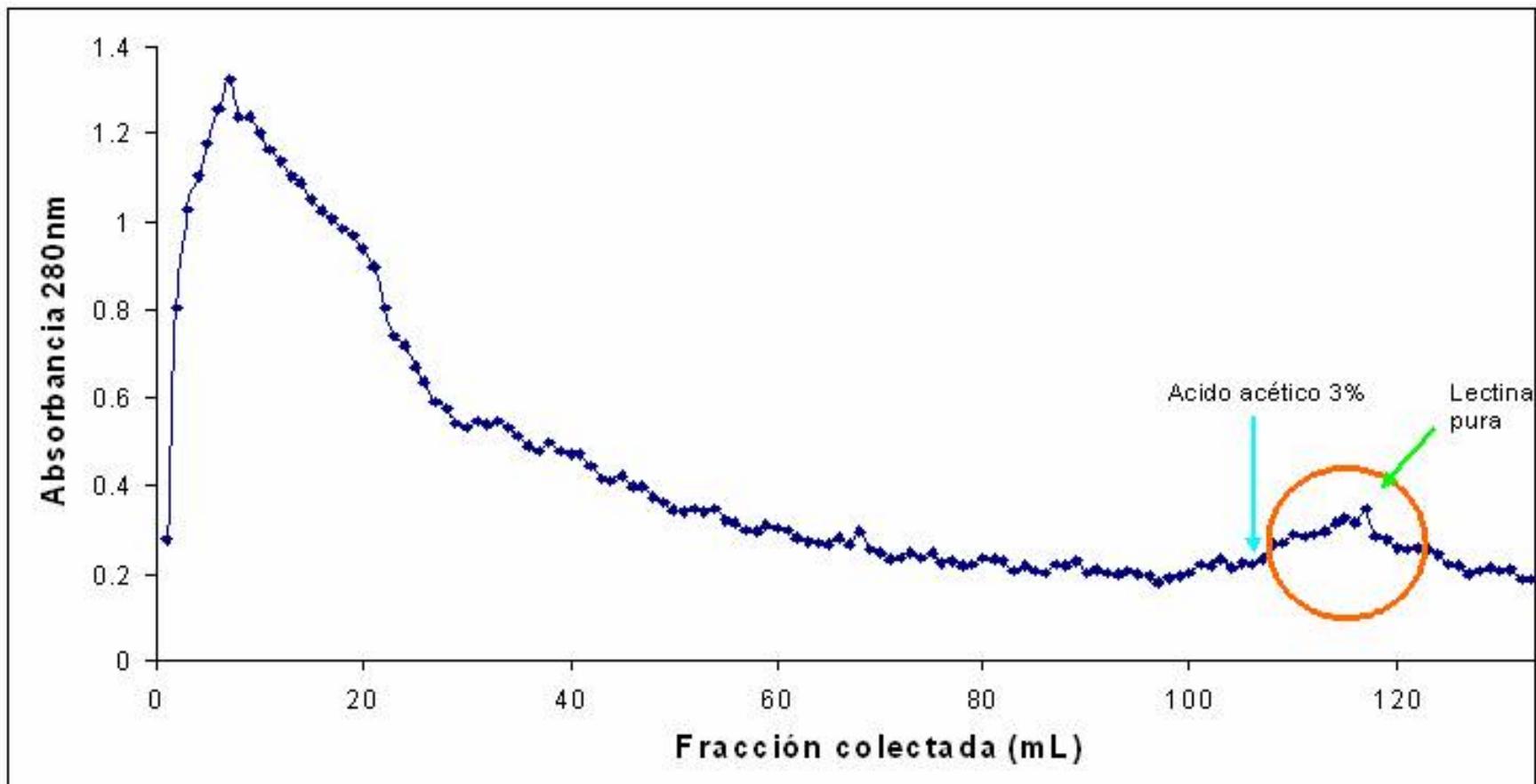
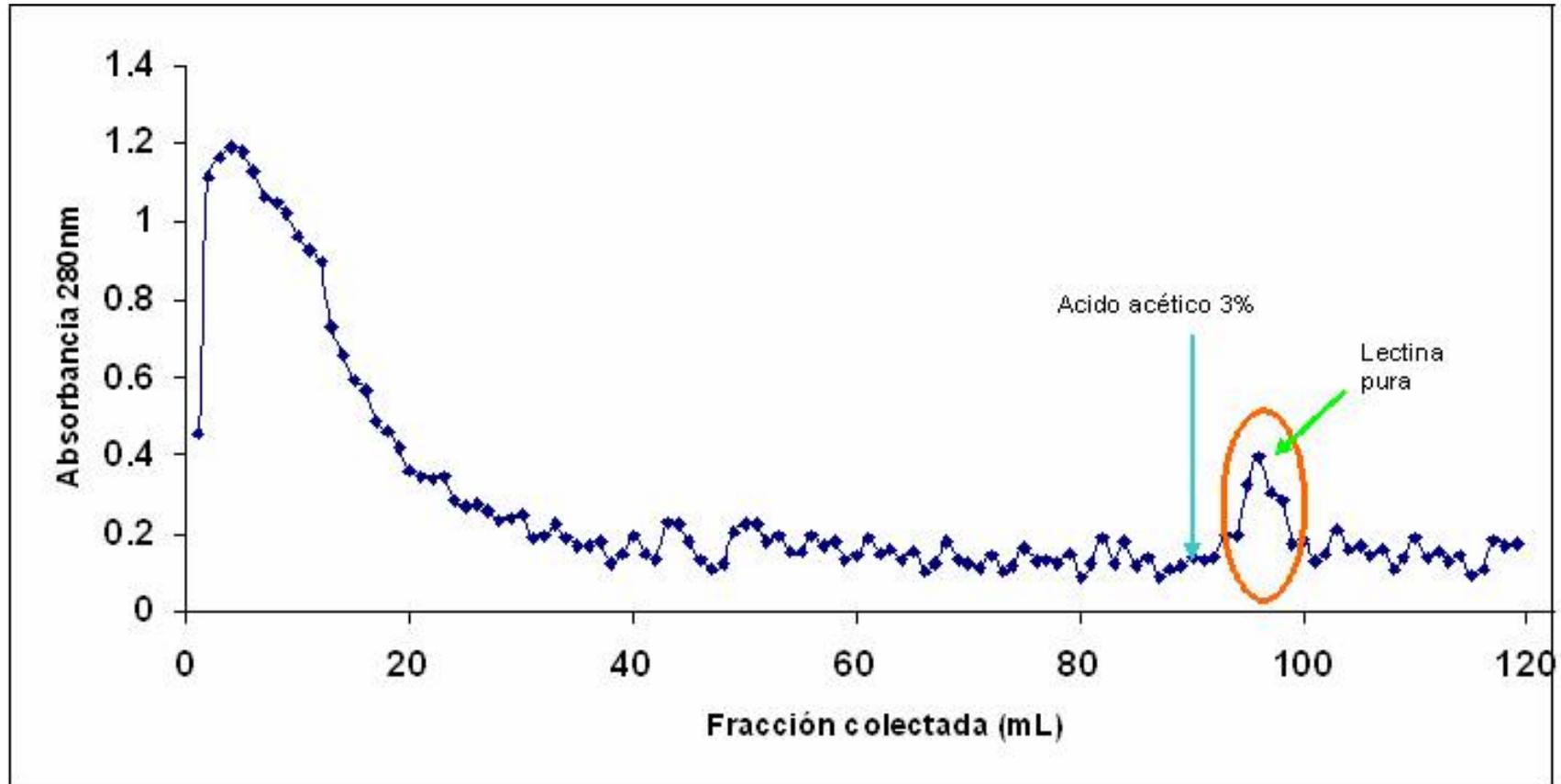


Figura 3. Patrón cromatográfico de lectina de Frijol de surco (FN2) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.



La lectina AM presentó un patrón cromatográfico similar a las líneas de frijol (Figura 4), donde se observa la obtención de un solo pico (después de ser eluido con ácido acético), correspondiente a la fracción colectada (21 mL) que contenía a la lectina purificada, la cual se dializó y liofilizó para determinar su capacidad eritroaglutinante con eritrocitos humanos y de animales, así como para análisis físicoquímicos y bioquímicos.

La purificación de las lectinas de frijol negro y amaranto mediante la columna de afinidad empleando la matriz de estroma de eritrocitos humanos, fue una buena opción, sin embargo la purificación podría mejorarse para obtener un rendimiento mayor, empleando alguna glicoproteína como la fetuína, la cual presenta mayor afinidad hacia lectinas extraídas de frijol tépari (Valadez-Vega, 2004). Las lectinas tienen mayor especificidad por carbohidratos complejos que forman parte de la estructura de las membranas celulares (Liener, 1986).

A continuación se presentan los datos de rendimiento y hemaglutinación obtenidos de cada una de las lectinas durante su purificación, así como el porcentaje de proteína recuperada en base a la proteína soluble determinada por el método de Bradford.

Los resultados obtenidos de las pruebas de hemaglutinación con eritrocitos tripsinizados tipo A, para la lectina FN1 se presentan en la Tabla 1 donde se puede observar que en la fracción retenida correspondiente a la lectina se recuperó un 50% de la actividad hemaglutinante, mientras que cuando la prueba se realizó con eritrocitos tipo O el porcentaje de recuperación de la actividad hemaglutinante fue solamente de 25%. Cuando los eritrocitos no fueron tripsinizados, los resultados revelaron que la lectina recuperó un 100% de la actividad hemaglutinante. Sin embargo, solamente se recuperó el 0.0044 % de la proteína soluble extraída de la semilla.

Figura 4. Patrón cromatográfico de lectina de Amaranto (AM) en columna de afinidad con matriz de estroma de eritrocitos humanos.

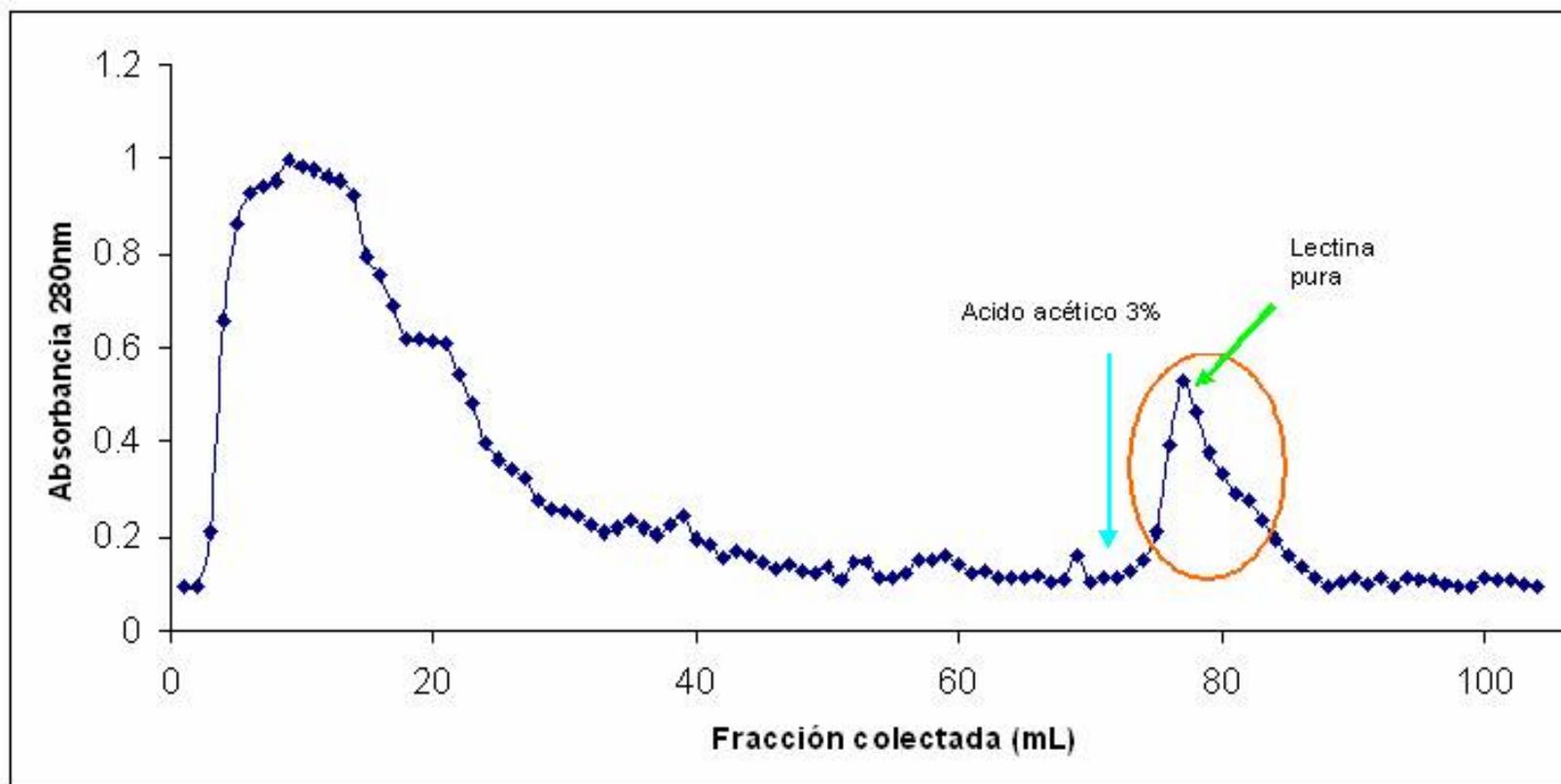


Tabla 1. Purificación de lectina de frijol de vara (FN1)

Fracción	Proteína mg/ml	Proteína Recuperada (%)	Título				Recuperación actividad (%)			
			A	O	AT	OT	A	O	AT	OT
Ext. Crudo	1086.47	100	2	2	16	16	100	100	100	100
No retenido	673.20	61.9621	1	1	0	0	50	50	0	0
Retenido	0.0488	0.00449161	2	2	8	4	100	100	50	25

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
 OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

En la Tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas de hemaglutinación realizadas para FN2 con eritrocitos tipo A para la fracción que corresponde a la lectina los cuales nos muestran que solo se recuperó un 0.00076% de la actividad hemaglutinante observada en el extracto crudo, mientras que cuando se utilizaron eritrocitos del grupo sanguíneo O se observa una recuperación de actividad de 0.00097%. La fracción no retenida presenta una alto título de aglutinación con eritrocitos humanos tipo O y A, lo cual sugiere que pueden existir otras fracciones con actividad hemaglutinante que no mostraron afinidad hacia la matriz de estroma de eritrocitos humanos. Cuando se utilizaron los mismos eritrocitos pero sin tripsinizar se observa una recuperación de actividad hemaglutinante de 6.25 % para ambos eritrocitos. Por otro lado, la proteína recuperada fue de 0.1026% en base a la proteína soluble cuantificada.

Dentro de los resultados obtenidos para la lectina AM, se observó que la recuperación de actividad hemaglutinante fue de 50% cuando se utilizaron eritrocitos tipo A para la prueba de aglutinación realizada (Tabla 3). Mientras que cuando se usaron eritrocitos tipo O en dicha prueba solamente se recuperó un 0.00076% de la actividad respecto al extracto crudo. La fracción no retenida también mostró una alta actividad hemaglutinante lo cual puede indicar que hubo lectinas en esa fracción no afines a la matriz de estroma de eritrocitos humanos y por lo tanto no puede ser retenida. La recuperación de la actividad hemaglutinante de la lectina fue de 50% cuando se utilizaron eritrocitos tipo O sin tripsinizar, sin embargo al utilizar eritrocitos del grupo sanguíneo A no tripsinizados, solo se recuperó un 6.25 % de la actividad biológica. Sin embargo la proteína recuperada respecto a la proteína soluble fue de 0.0303%.

La fracción no retenida de la muestra de FN1, así como de la muestra AM presentaron una aglutinación relativamente baja, lo cual puede indicar que la lectina contenida en estas muestras presenta una mayor afinidad a la matriz utilizada.

Tabla 2. Purificación de lectina de frijol de surco (FN2)

Fracción	Proteína mg/ml	Proteína Recuperada (%)	Título				Recuperación actividad (%)			
			A	O	AT	OT	A	O	AT	OT
Ext. Crudo	1034.77	100	1.3744E+11	1.1259E+15	1.09E+12	4.5E+17	100	100	100	100
No retenido	114.95	11.1086	1073741824	5.6295E+14	6.87E+10	1.8E+16	0.78125	50	6.3027	4
Retenido	0.1062	0.010263	8589934592	7.0369E+13	8388608	4.39E+12	6.25	6.25	0.0007696	0.0009755

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
 OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Tabla 3. Purificación de lectina de amaranto (AM)

Fracción	Proteína mg/ml	Proteína Recuperada (%)	Título				Recuperación actividad (%)			
			A	O	AT	OT	A	O	AT	OT
Ext. Crudo	368.847	100	64	1048576	256	16777216	100	100	100	100
No retenido	125.79	34.1023	4	4194304	8	16777216	6.25	400	3.125	100
Retenido	0.1121	0.03039	4	524288	128	128	6.25	50	50	0.00076294

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
 OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Los resultados obtenidos en las tablas de purificación, muestran que todas las fracciones presentan una considerable afinidad hacia eritrocitos humanos tipo O tripsinizados y sin tripsinizar al realizar la prueba de aglutinación, mientras que cuando son utilizados los eritrocitos tipo A no existe gran actividad hemaglutinante.

Estos resultados podrían atribuirse a lectinas específicas para la fucosa, ya que éstas son glicoproteínas que tienen especificidad por los azúcares de membrana presentes en los eritrocitos ya que se conoce que existen diferentes carbohidratos unidos a proteínas (glucoproteínas) en la membrana de los eritrocitos, es decir, los eritrocitos tipo A tienen N-acetilgalactosamina, mientras que los eritrocitos tipo O contienen fucosa; ambos como carbohidratos terminales (Landsteiner, 1927) (Anexo 10).

La especificidad de las lectinas puede comprobarse mediante pruebas de inhibición utilizando glicoproteínas, glicopeptidos, oligosacáridos y carbohidratos sencillos. Esta especificidad se define convencionalmente en base de una prueba de inhibición de haptenos tipo Landsteiner en el que varios azúcares son probados respecto a su capacidad de inhibir la aglutinación de glóbulos rojos (Ryder y col, 1994).

C. Caracterización de lectinas de frijol negro y amaranto

1. Actividad hemaglutinante

a) Actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos humanos

En las pruebas de determinación de la actividad hemaglutinante se utilizaron eritrocitos humanos del grupo sanguíneo tipo A, O y B tripsinizados y sin tripsinizar, así como, eritrocitos tripsinizados de animales. En estas pruebas se

determinó la actividad hemaglutinante de la lectina purificada de amaranto y de ambos tipos de frijol, comparada con la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA - E).

En la Tabla 4 se presentan los resultados de hemaglutinación obtenidos de las lectinas purificadas en comparación con aquellos obtenidos con *Phaseolus vulgaris* (PHA), donde se observa que la actividad hemaglutinante de las lectinas es mayor cuando los eritrocitos humanos son tripsinizados. Estos resultados muestran que la lectina de FN2 presenta una mayor actividad hemaglutinante comparada con todas las muestras restantes, siendo más afín hacia eritrocitos tipo O tripsinizados, seguido de eritrocitos tipo B y A.

Al realizar pruebas comparativas de actividad hemaglutinante de las lectinas purificadas con la lectina de PHA, se observó que la lectina FN2 presenta aglutinaciones muy similares a la de PHA, mientras que las lectinas FN1 y AM tuvieron unos títulos de aglutinación menores. La lectina FN2 presentó aglutinación cuando se utilizaron eritrocitos sanguíneos tipo B, mientras que las lectinas FN1 y AM tienen una actividad menor y muestran una mayor especificidad hacia otro tipo de eritrocitos (A y O). Sin embargo, las tres lectinas purificadas presentaron altos títulos de aglutinación al utilizar eritrocitos sanguíneos tipo O lo cual indica que las lectinas muestran mayor afinidad hacia la fucosa, componente principal de la membrana de los eritrocitos (Landsteiner, 1927) (Anexo 10).

La aglutinación producida por las lectinas en los tres grupos sanguíneos de humanos podría ser explicada por el hecho de que el gen H (unidad fundamental de la herencia que codifica la producción de la enzima fucosiltransferasa), es capaz de colocar fucosa en el azúcar terminal, formándose la sustancia H, la cual consiste en la unión de cinco azúcares, cuya secuencia es: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, galactosa y unida a esta última la fucosa.

Tabla 4. Actividad hemaglutinante de las lectinas puras empleando eritrocitos humanos

Lectina	Concentración mg/mL	Título de hemaglutinación					
		Eritrocitos humanos no tripsinizados			Eritrocitos humanos tripsinizados		
		A	O	B	A	O	B
AM	0.148	4	32	0	128	128	64
FN1	0.148	2	2	0	16	4	16
FN2	0.148	16384	1073741824	4096	2097152	4.39E+12	67108864
PHA-E	0.148	32768	262144	1024	16777216	4294967296	1677216

AM: Lectina de semilla de Amaranto
 FN1: Lectina de Frijol de vara
 FN2: Lectina de Frijol de surco
 PHA-E: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

Esta sustancia H, es común para todos los azúcares presentes en la membrana de los eritrocitos del sistema ABO (H), diferenciándose en la presencia de azúcares adicionados a la galactosa terminal. En el grupo A la sustancia H presenta adición de un N- acetilgalactosamina y el grupo B una galactosa, mientras que los eritrocitos del grupo sanguíneo O no presentan adición de azúcares en la sustancia H (Wendell, 1983) (Anexo 11).

Asimismo dichas lectinas presentan títulos de aglutinación más altos cuando los eritrocitos han sido tripsinizados porque la tripsina es una enzima que rompe los enlaces peptídicos detrás de los aminoácidos Lys y Arg, es decir, de aminoácidos que son componentes de la fracción proteica unida al eritrocito, de esta manera se deja disponible al carbohidrato constituyente de la superficie de los eritrocitos con el cual se presenta la aglutinación (Eylar y col, 1962) (Anexo 12).

b. Actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos de animales

La Tabla 5 presenta los resultados de hemaglutinación obtenidos al utilizar eritrocitos de distintos animales en las lectinas purificadas de frijol negro y amaranto; como se puede observar las tres lectinas tienen una mayor afinidad hacia los eritrocitos de hámster ya que ahí se observa el mayor título de aglutinación. La lectina FN2 muestra los títulos de aglutinación más altos, mientras que los títulos más bajos los da la lectina AM.

Respecto a las aglutinaciones realizadas con eritrocitos de animales, se observó que las tres lectinas muestran una mayor afinidad hacia eritrocitos de hámster y de conejo, lo cual se explica gracias a que la composición y estructura de los eritrocitos en cada animal es diferente y pueden ser afines a cualquier lectina. Las lectinas FN1 y AM no muestran especificidad hacia los eritrocitos correspondientes a res, así como a los eritrocitos de borrego.

Tabla 5. Actividad hemaglutinante de las lectinas purificadas de frijol negro y amaranto utilizando eritrocitos de animales.

Lectina	Título					
	Conejo	Pollo	Hámster	Res	Cerdo	Borrego
AM	8	16	3.43E+10	0	4	0
FN1	128	32	1.12E+15	0	16	2
FN2	134217728	262144	7.92E+28	1024	524288	8192

Los eritrocitos fueron previamente tripsinizados

La variabilidad de estos resultados se puede explicar porque reportes previos han indicado que algunas lectinas no presentan especificidad hacia ningún tipo de eritrocitos (Golstein y Poretz, 1986).

2. Estudios de inhibición de la aglutinación

Para esta prueba se emplearon carbohidratos simples como glucosa, galactosa, manosa, rafinosa y fructosa. La prueba de inhibición se realizó en microplacas de 96 pozos, empleando eritrocitos humanos tipo O y A tripsinizados y sin tripsinizar para los extractos crudos, mientras que para la lectina pura se utilizaron eritrocitos tipo O tripsinizados. En estos experimentos la concentración de la lectina fue la misma, no así la de los carbohidratos que fue variando, finalmente se reconoció la concentración del carbohidrato que producía la inhibición de la aglutinación.

En la Tabla 6 se encuentran los resultados de inhibición de la hemaglutinación obtenidos tanto para el extracto crudo como para la lectina pura (FN1) de frijol de vara, donde se muestra que todos los carbohidratos excepto la glucosa presentan inhibición de la aglutinación en los extractos crudos cuando esta se lleva a cabo con eritrocitos humanos tipo A sin tripsinizar, mientras que con eritrocitos tipo O sin tripsinizar solo presentan inhibición la glucosa y la fructosa. Por otro lado cuando los eritrocitos son tripsinizados solo la rafinosa presenta inhibición de la hemaglutinación al ser tratado con eritrocitos tipo O. En la lectina pura no se presenta afinidad hacia ningún carbohidrato.

Por otro lado, el extracto crudo de FN2 presenta inhibición de la aglutinación con galactosa y manosa cuando la prueba es realizada con eritrocitos tipo A y con glucosa y fructosa con eritrocitos tipo O, ambos sin tripsinizar (Tabla 7); mientras que cuando los eritrocitos tipo O son tripsinizados

Tabla 6. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de FN1.

Monosacáridos	Concentración inhibitoria de carbohidratos (M)				
	Extracto Crudo				Lectina
	A	O	AT	OT	OT
Glucosa	0	7.81x10 E-3	0	0	0
Galactosa	0.0625	0	0	0	0
Manosa	0.25	0	0	0	0
Fructosa	7.81x10 E-3	3.90x10 E-3	0	0	0
Rafinosa	0.125	0	0	0.5	0

A: Eritrocitos humanos tipo A

O: Eritrocitos humanos tipo O

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados

OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Tabla 7. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de FN2.

Monosacáridos	Concentración inhibitoria de carbohidratos (M)				
	Extracto Crudo				Lectina
	A	O	AT	OT	OT
Glucosa	0	7.81x10 E-3	0	0	0
Galactosa	0.25	0	0	0	0
Manosa	0.5	0	0	0.25	0
Fructosa	0	0.25	0	0	0
Rafinosa	0	0	0	0	0

A: Eritrocitos humanos tipo A

O: Eritrocitos humanos tipo O

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados

OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

solo se presenta inhibición con manosa. Por otro lado, con ninguno de los carbohidratos se presentó inhibición de la aglutinación cuando se utilizó la lectina pura.

Los estudios de afinidad a carbohidratos mostraron que ninguno de los carbohidratos estudiados inhibió la actividad hemaglutinante de la lectina contenida en las dos semillas de frijol, sin embargo los extractos crudos presentan afinidad hacia algunos carbohidratos, este resultado puede indicar que en los extractos existen proteínas, enzimas y carbohidratos que pueden interferir en la inhibición de la aglutinación. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios ya que generalmente las lectinas de frijol no presentan afinidad hacia los carbohidratos simples y tienen una mayor afinidad hacia glicoproteínas, oligosacáridos y glicopéptidos (Sharon y Lis, 1998; Valadez-Vega, 2004) (Anexo 13).

En la Tabla 8 se observa que el extracto crudo de AM presenta afinidad hacia la mayoría de los carbohidratos estudiados cuando se utilizan tanto eritrocitos tipo A como en los del grupo sanguíneo O tripsinizados y sin tripsinizar. Asimismo, los resultados obtenidos con la lectina pura muestran que con todos los monosacáridos estudiados a diferente concentración se presenta inhibición de la aglutinación. Estos resultados indican que esta lectina puede ser clasificada como específica para glucosa y manosa (Singh y col, 1994; Maldonado y col, 1998; Hernández y col, 1999).

3. Determinación de peso molecular

El peso molecular de las lectinas purificadas de frijol negro y amaranto se estimó mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturizantes. El peso molecular aproximado de la lectina FN1 fue de 27.34 kDa en condiciones desnaturizantes y en condiciones nativas el peso molecular

Tabla 8. Efecto de carbohidratos sobre la inhibición de la aglutinación en extracto crudo y lectina pura de AM.

Monosacáridos	Concentración inhibitoria de carbohidratos (M)				
	Extracto Crudo				Lectina
	A	O	AT	OT	OT
Glucosa	0	3.90x10 E-3	0.25	0	3.90x10 E-3
Galactosa	4.76x10 E-7	0	0.25	0	1.95x10 E-3
Manosa	2.38x10 E-7	0	9.53x10 E-7	0.0625	9.76x10 E-4
Fructosa	1.19x10 E-7	3.90x10 E-3	2.98x10 E-8	9.53x10 E-7	1.95x10 E-3
Rafinosa	1.52x10 E-5	0.5	9.53x10 E-7	0	4.88x10 E-4

A: Eritrocitos humanos tipo A

O: Eritrocitos humanos tipo O

AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados

OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

obtenido fue de 109.36 kDa (Tabla 9), esto se puede comprobar observando la Figura 5 que presenta una sola banda correspondiente a una subunidad asimétrica, en el gel obtenido en la electroforesis nativa también se observó una sola banda que correspondía a un peso molecular aproximadamente cuatro veces mayor al obtenido por SDS (datos no mostrados) lo cual indica que la lectina es una proteína constituida por cuatro subunidades idénticas.

Tabla 9. Peso molecular de las lectinas purificadas

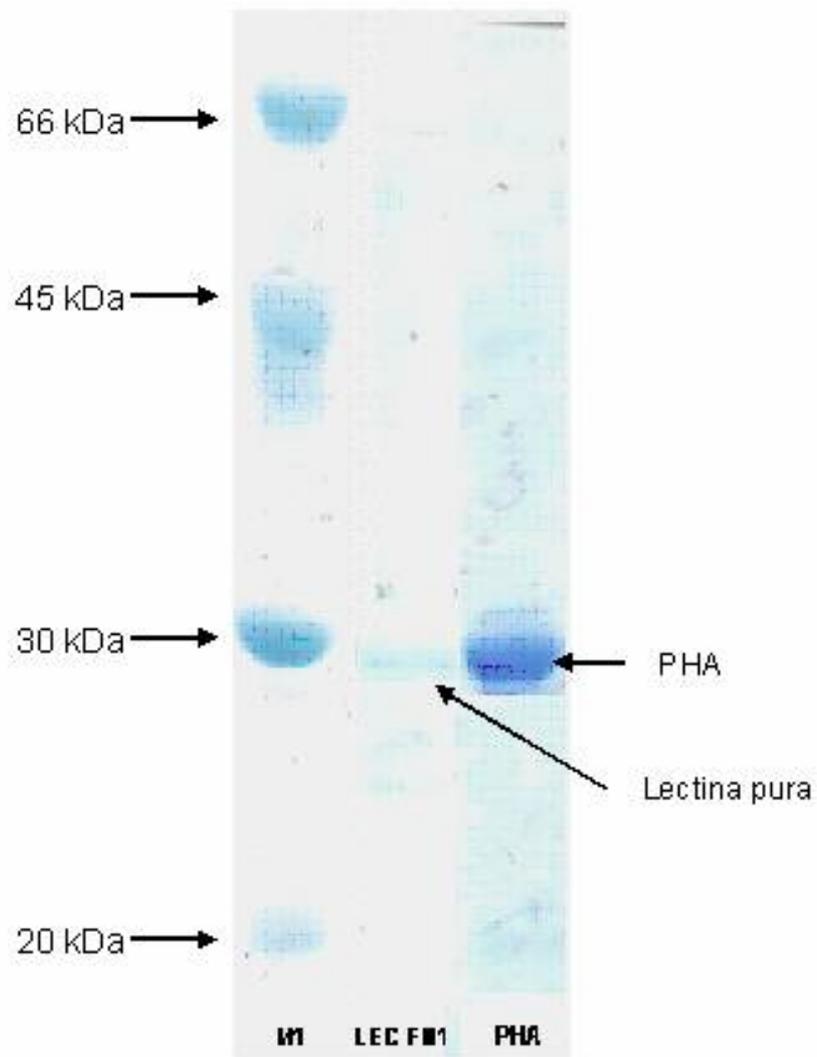
LEC	PM SDS (kDa)	PM NATIVO (kDa)
AM	S1= 26.68, S2= 28.43	54.37
FN1	27.34	109.36
FN2	28.17	112.68
PHA-E	28	112

AM: Lectina de semilla de Amarantho
 FN1: Lectina de Frijol de vara
 FN2: Lectina de Frijol de surco
 PHA-E: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

El peso molecular aproximado para la lectina FN2 fue de 28.17 kDa (Tabla 9), obtenido por SDS – PAGE; la banda obtenida mediante el gel en condiciones nativas (datos no mostrados) indica que la lectina es una proteína tetramérica constituida por subunidades idénticas con un peso molecular de 112.68 kDa, lo cual se puede comprobar observando la Figura 6 donde se obtuvo una sola banda indicando el peso molecular de una subunidad.

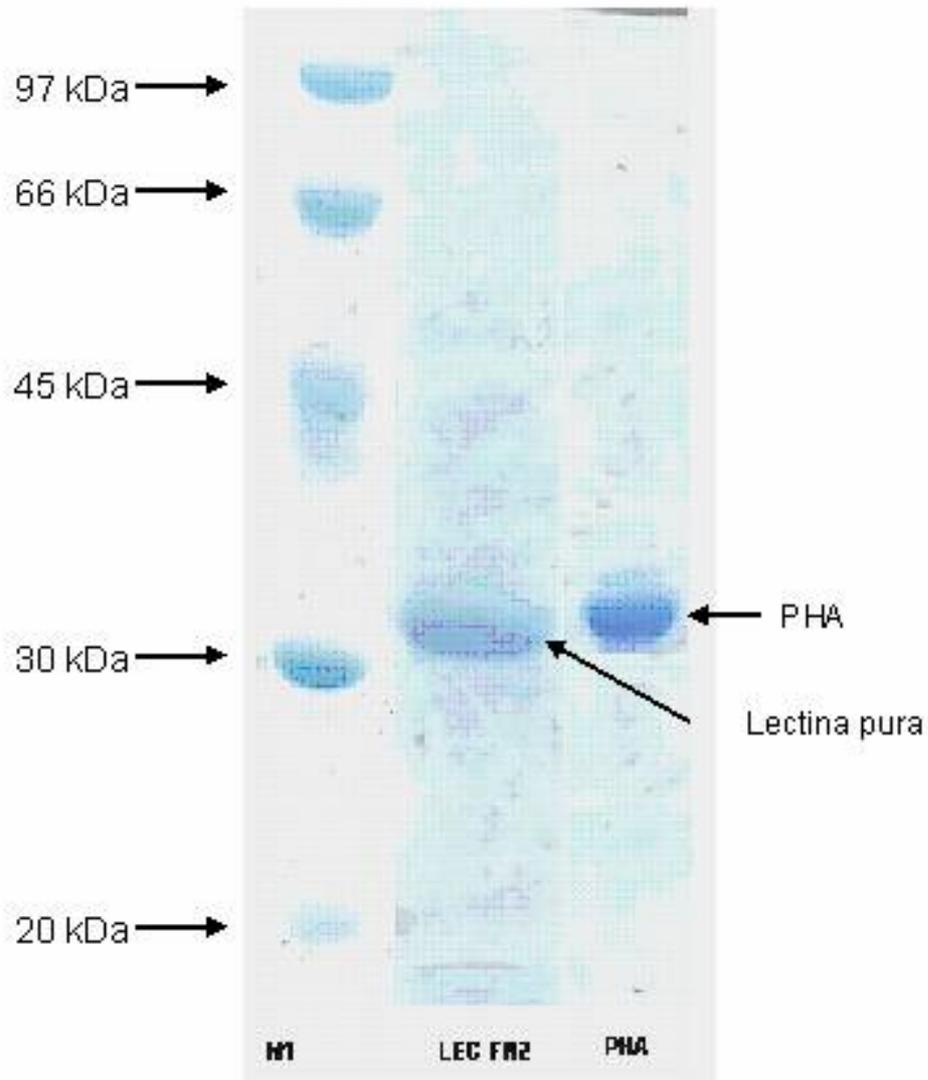
Estos resultados indican que solo se purificó una proteína pero puede haber una mezcla de isoformas para cada lectina; el peso molecular aparente nos da indicios de que las lectinas purificadas de frijol son proteínas tetraméricas constituidas por subunidades idénticas ya que el peso molecular

Figura 5. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de frijol de vara



M1: Marcadores de peso molecular
FN1: Lectina pura de Frijol de vara
PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

Figura 6. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de frijol de surco



M1: Marcadores de peso molecular
FN2: Lectina pura de Frijol de surco
PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

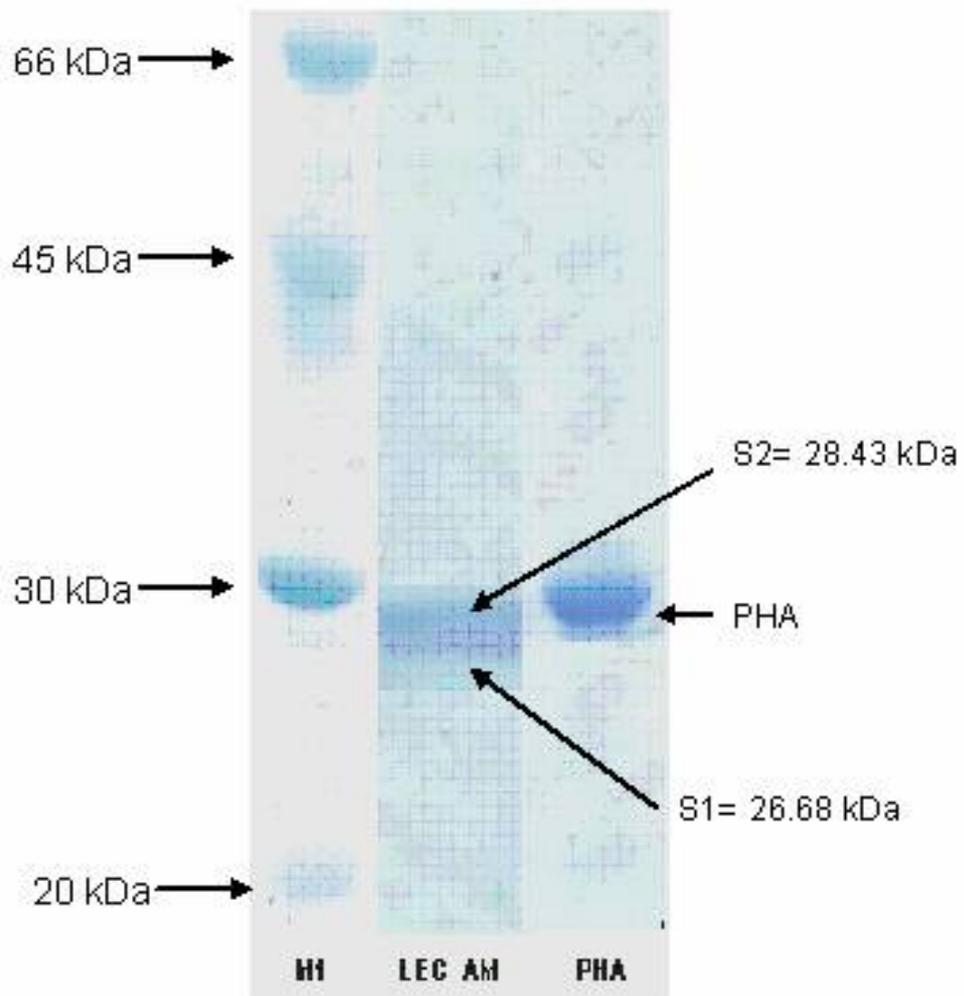
obtenido por PAGE en condiciones nativas nos da un peso molecular aproximadamente cuatro veces mayor al obtenido por SDS.

Sharon y Lis (1990) reportan que las lectinas de leguminosas consisten de dos o cuatro subunidades con un peso molecular entre 25 – 30 kDa. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por otros autores quienes reportan un peso molecular entre 25 y 35 kDa para diversas líneas de *Phaseolus spp* (Nowaková, 1974; Lotan, 1975; Miller 1975; Pandolfino, 1979; Felsted, 1981; Ochoa y col, 1982; Vargas y col, 1988; Pratt y col, 1990; Cavada y col, 1996; Quezada y col, 2006).

Por otro lado, la lectina de amaranto presentó dos subunidades con un peso molecular de 26.68 y 28.43 kDa (Tabla 9), con un peso total de la proteína de 55.11 kDa esto se comprobó gracias a que el resultado obtenido por PAGE en condiciones nativas donde solamente se observó una sola banda con un peso molecular de aproximadamente 54.37 kDa (Tabla 9).

En la Figura 7 se pueden observar las dos bandas obtenidas por SDS-PAGE que indican que la lectina de amaranto es una proteína compuesta por dos subunidades. Los resultados obtenidos para cada monómero de la lectina de amaranto son cercanos a los reportados por diversos autores, quienes reportan a la lectina de amaranto como una proteína dimerica. Hernández y col (1999) obtuvieron un peso molecular para cada monómero de 35 kDa, mientras que Ozeki y col (1996) obtuvieron un peso molecular de 36 kDa; así como para la lectina obtenida de *Amaranthus caudatus* (Rinderle y col, 1989) con un peso molecular de 33 – 36 kDa. Singh y col (1994) encontraron una sola banda de 29 kDa para *A. hypochondriacus*. Koeppe y col (1988), así como Maeshima (1985) obtuvieron dos bandas similares de una lectina de *Amaranthus cruentus* sobre un gel realizado en condiciones desnaturizantes (SDS – PAGE) cuyo peso molecular es de 25 y 28 kDa el cual concuerda con el peso molecular obtenido para el amaranto estudiado en este trabajo.

Figura 7. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras de lectina de amaranto



M1: Marcadores de peso molecular
AM: Lectina pura de Am aranto
PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*
S1: Subunidad 1
S2: Subunidad 2

El peso molecular en condiciones nativas, correspondiente a la proteína integra, concuerda con el obtenido por varios autores, quienes reportan pesos moleculares que van de 58 a 70 kDa para diversas lectinas de amaranto (Maeshima, 1985; Koeppe y col, 1988; Rinderle y col, 1989; Singh y col, 1944; Ozeki y col, 1996; Hernández y col, 1999).

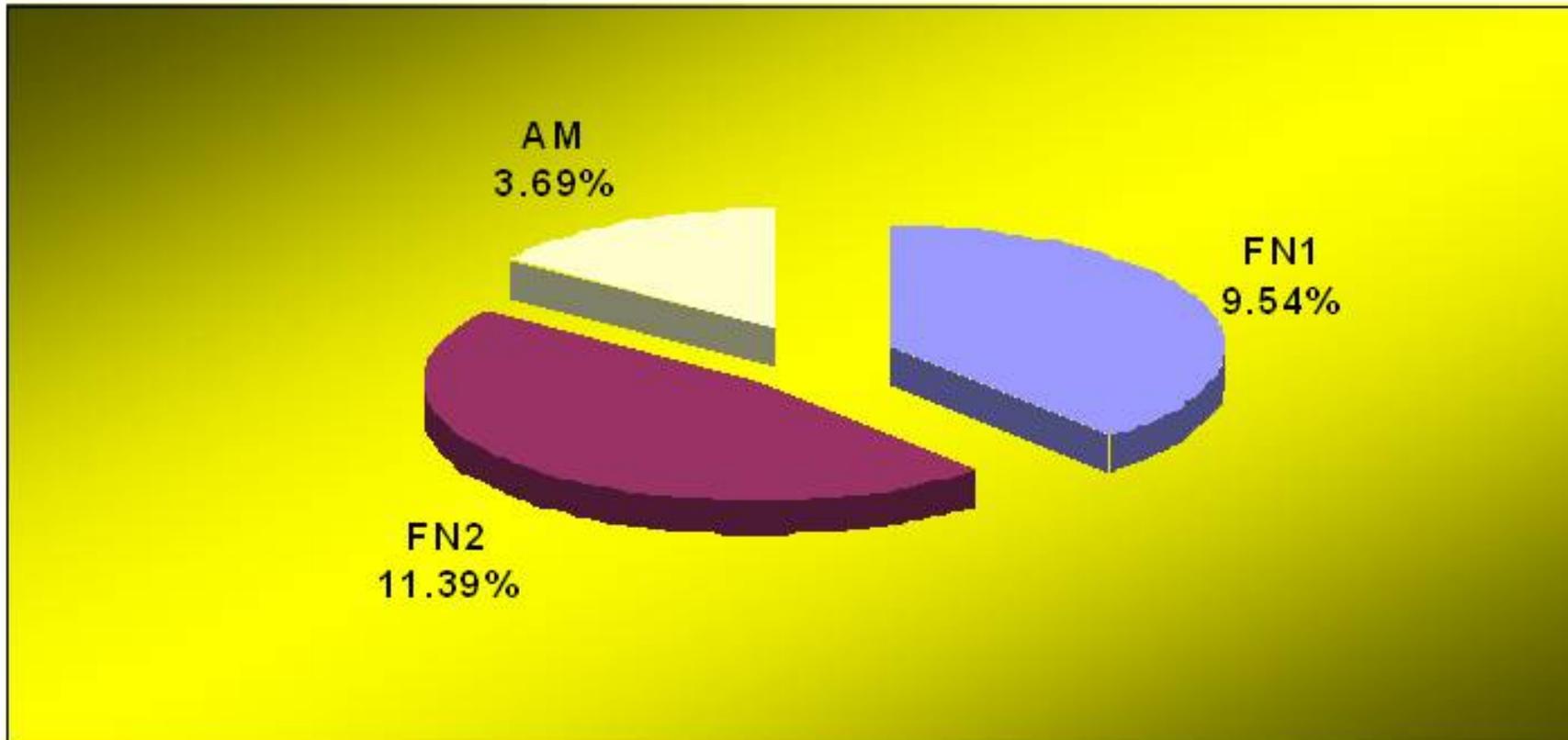
La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE polyacrilamide gel electrophoresis) es sin duda una de las técnicas más ampliamente utilizada para caracterizar mezclas complejas de proteínas (García Pérez, 2000).

La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico que permite conocer el peso molecular aparente de las proteínas estudiadas; sin embargo, para una determinación de peso molecular más precisa de las lectinas obtenidas se pueden realizar pruebas por espectrometría de masas de tipo Matriz assisted Laser Description/Ionization con detector Time of Flight (MALDI TOF) (Anexo 14) y filtración en gel (Anexo 15).

4. Contenido de carbohidratos totales

En la Figura 8 se puede observar el contenido de carbohidratos presentes en las lectinas purificadas, donde se puede observar que las tres lectinas purificadas son glicoproteínas. La lectina FN1 tiene una concentración de carbohidratos de 9.54 %; mientras que la lectina FN2 presentó el contenido mayor de carbohidratos (11.39 %). Esta reportado en numerosas investigaciones que las lectinas de frijol contienen entre un 6 y 20% de carbohidratos totales (Takahashi, 1966; Galbraith, 1970; Nowaková, 1974; Angelisová, 1977; Lis y Sharon, 1978; Ochoa y col, 1982; Pusztai y Fiona, 1985; Vargas y col, 1988), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Figura 8. Contenido de carbohidratos totales



FN1: Lectina de Frijol de vara
FN2: Lectina de Frijol de surco
AM: Lectina de *Amaranthus hypocondriacus*

Por otro lado la lectina AM obtuvo una concentración de carbohidratos de 3.69 %. Este resultado difiere con los publicados por Hernández y col (1999), que reportan para el amaranto un 8% de carbohidratos, mientras que Ozeki y col (1996) no encontraron carbohidratos en la lectina de *Amaranthus hypocondracus* var. Mexico. Singh y col (1994) encontró que la lectina de *A. tricolor* tiene un contenido total de carbohidratos entre 1.13 – 1.17%.

5. Contenido de metales

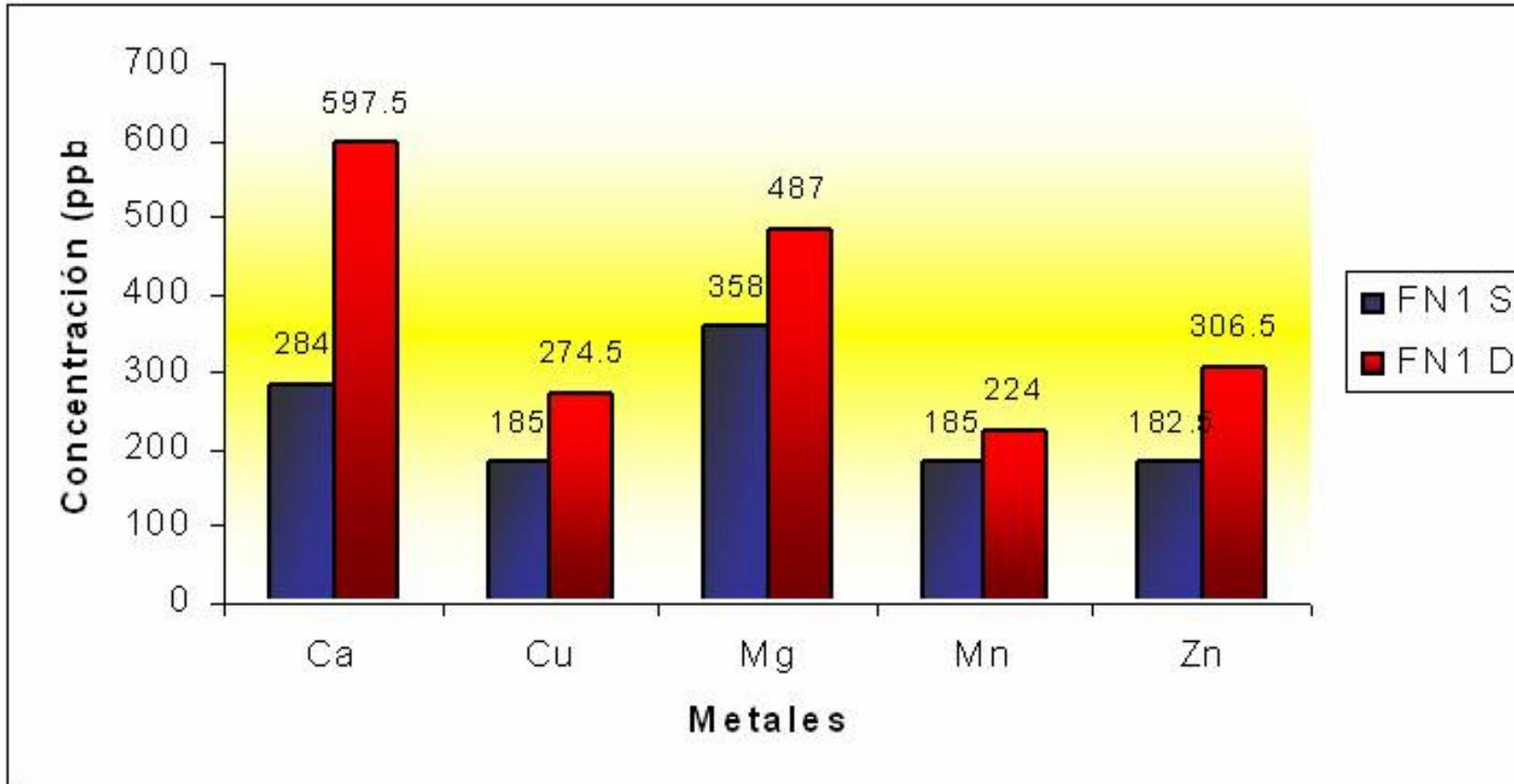
Los resultados de cuantificación de metales en las lectinas puras de frijol negro y amaranto se presentan en las figuras siguientes, donde la concentración de metales se reporta en partes por billón (ppb).

Para las tres lectinas estudiadas en este trabajo, se encontró que en su estructura contienen iones metálicos como calcio, magnesio, manganeso, cobre y zinc.

En la Figura 9 se muestran los datos obtenidos para la lectina FN1, donde el calcio y el magnesio se encontraron en mayor concentración (597.5 y 487 ppb, respectivamente) cuando la lectina fue dializada, mientras que cuando no se dializó, el magnesio fue el metal mayoritario (358 ppb).

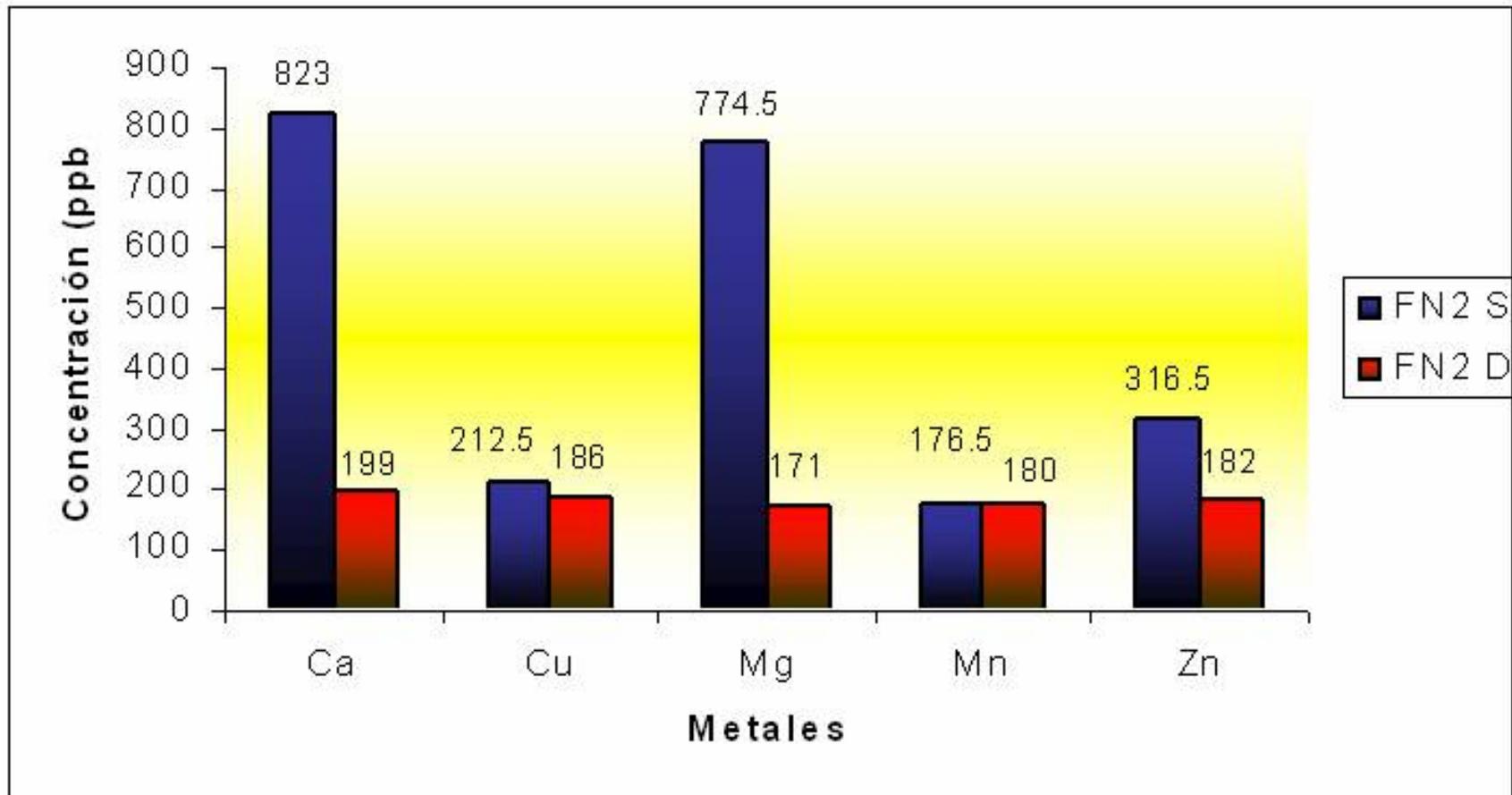
La concentración de metales en la lectina FN2 cuando esta ha sido dializada y sin dializar se presenta en la Figura 10 y como se puede observar para ambos casos el calcio y el magnesio fueron los metales en mayor concentración. La lectina de *Phaseolus vulgaris* posee estos mismos iones y su presencia es esencial tanto para la unión a los carbohidratos como para la mitogenicidad de la proteína. Los dos iones metálicos están ligados por cuatro moléculas de agua y seis residuos de aminoácidos (una histidina, un glutámico, una asparagina, dos aspártico y un residuo hidrofóbico) (Hamelryck, 1996).

Figura 9. Contenido de metales de la lectina de frijol de vara



FN1 S Lectina de Frijol de vara sin dializar
FN1 D Lectina de Frijol de vara dializada

Figura 10. Contenido de metales de la lectina de frijol de surco



FN1 S Lectina de Frijol de surco sin dializar
FN1 D Lectina de Frijol de surco dializada

Por otro lado, los metales en mayor concentración cuando la lectina AM se dializó fueron el cobre y zinc (161.5 y 155 ppb, respectivamente), mientras que cuando la lectina no se trató, el metal mayoritario fue manganeso (186 ppb), como se puede observar en la Figura 11.

En todas las lectinas vegetales existen dos iones metálicos por monómero (un ión Ca^{2+} y un ión de un metal de transición, fundamentalmente Mn^{2+}) situados en la vecindad del sitio de unión a los carbohidratos (Sharon y Lis, 1990) y está reportado en diversas investigaciones que la mayoría de las lectinas son metaloproteínas, porque dentro de su estructuras contienen diversos iones metálicos, los cuales son muy importantes para que la lectina realice su actividad biológica (Golstein y col, 1970).

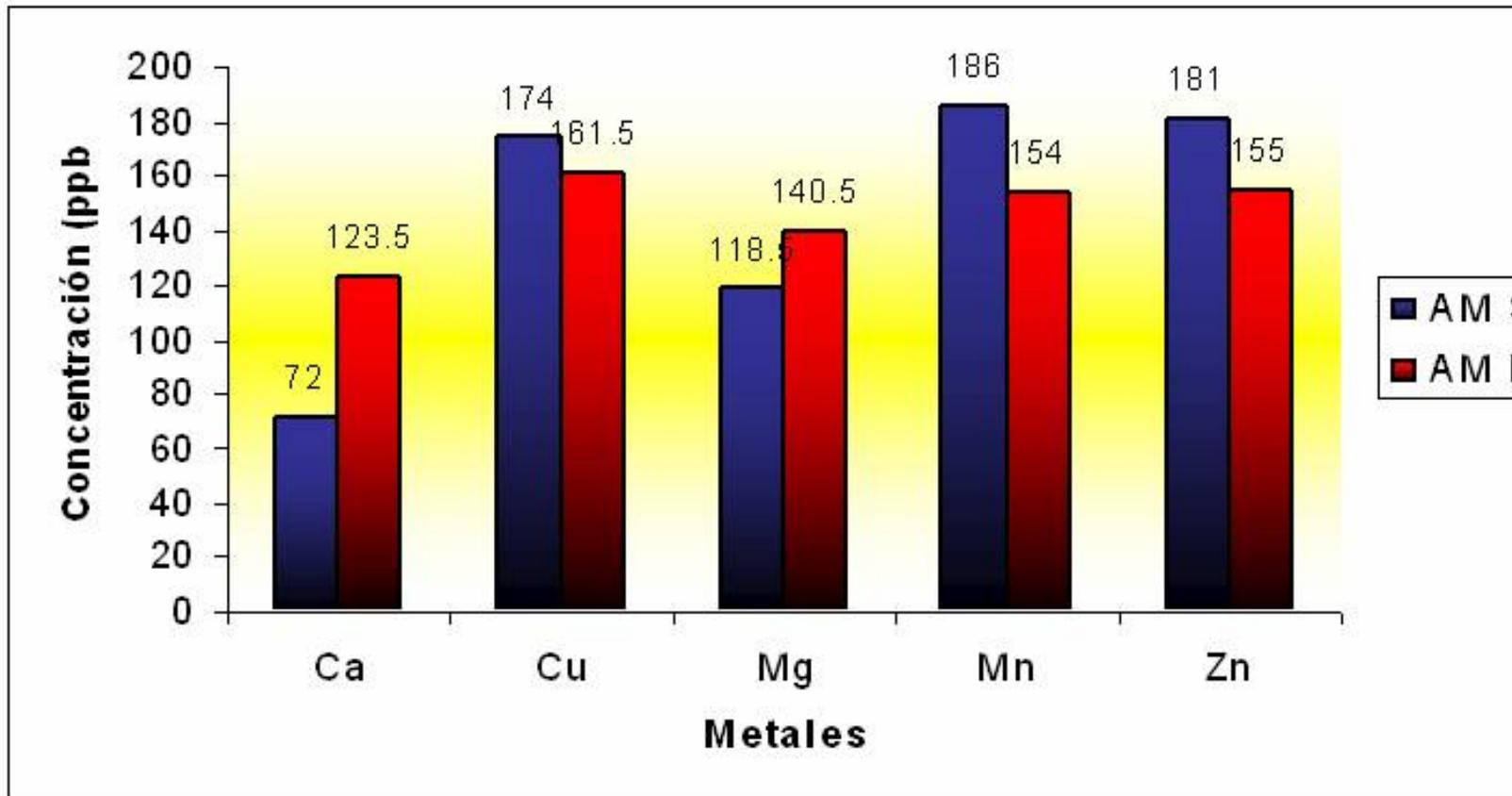
Estos resultados difieren de los obtenidos para lectinas vegetales, ya que la mayoría de estas requieren principalmente calcio, magnesio y manganeso para su función biológica (Galbraith, 1970; Jaffe, 1977; Pandolfino, 1979; Young, 1982; Moreira y col, 1983; Coelho Da Silva, 2001; Cavada y col, 1996).

a) Efecto de iones metálicos sobre la hemaglutinación

En la Tabla 10 se observa que las lectinas AM y FN1 pierden totalmente su actividad biológica cuando le han sido eliminados los metales mediante diálisis, sin embargo se observa que cuando los metales han sido resustituidos mediante soluciones de CaCl_2 , MgCl_2 y MnCl_2 , la actividad es recuperada en su totalidad y mostrando un mayor requerimiento de magnesio para las tres lectinas analizadas, seguido de calcio y manganeso.

Como se puede observar, las tres lectinas estudiadas requieren principalmente magnesio para recuperar su actividad biológica, mientras que el manganeso fue el metal menos efectivo para restaurar la actividad hemaglutinante.

Figura 11. Contenido de metales de la lectina AM



FN1 SD Leticina de semilla de amaranto sin dializar
FN1 D Leticina semilla de amaranto dializada

Tabla 10. Actividad hemaglutinante de la lectina desmetalizada y con adición de metales

Lectina	Lectina Desmetalizada (Título)	Lectina reconstituida con metales (Título)		
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
AM	0	8192	1048576	512
FN1	0	128	4096	4
FN2	16	6.87E+10	1.09E+12	2048

Existen numerosos reportes que indican que algunas lectinas disminuyen o pierden su actividad biológica cuando se les han eliminado algunos iones, pero al ser resustituidos su actividad es recuperada (Galbraith y Golstein, 1972; Cavada y col, 1996; Bonay y Fresno, 2000; Lima y col, 2005). Sin embargo existen reportes para tres tipos de amaranto (*A. caudatus*, *A. tricolor* y *A. hypocondriacus* var. México) que no requieren iones metálicos para ejercer su actividad biológica (Rinderle, 1989; Singh, 1994; Ozeki, 1996).

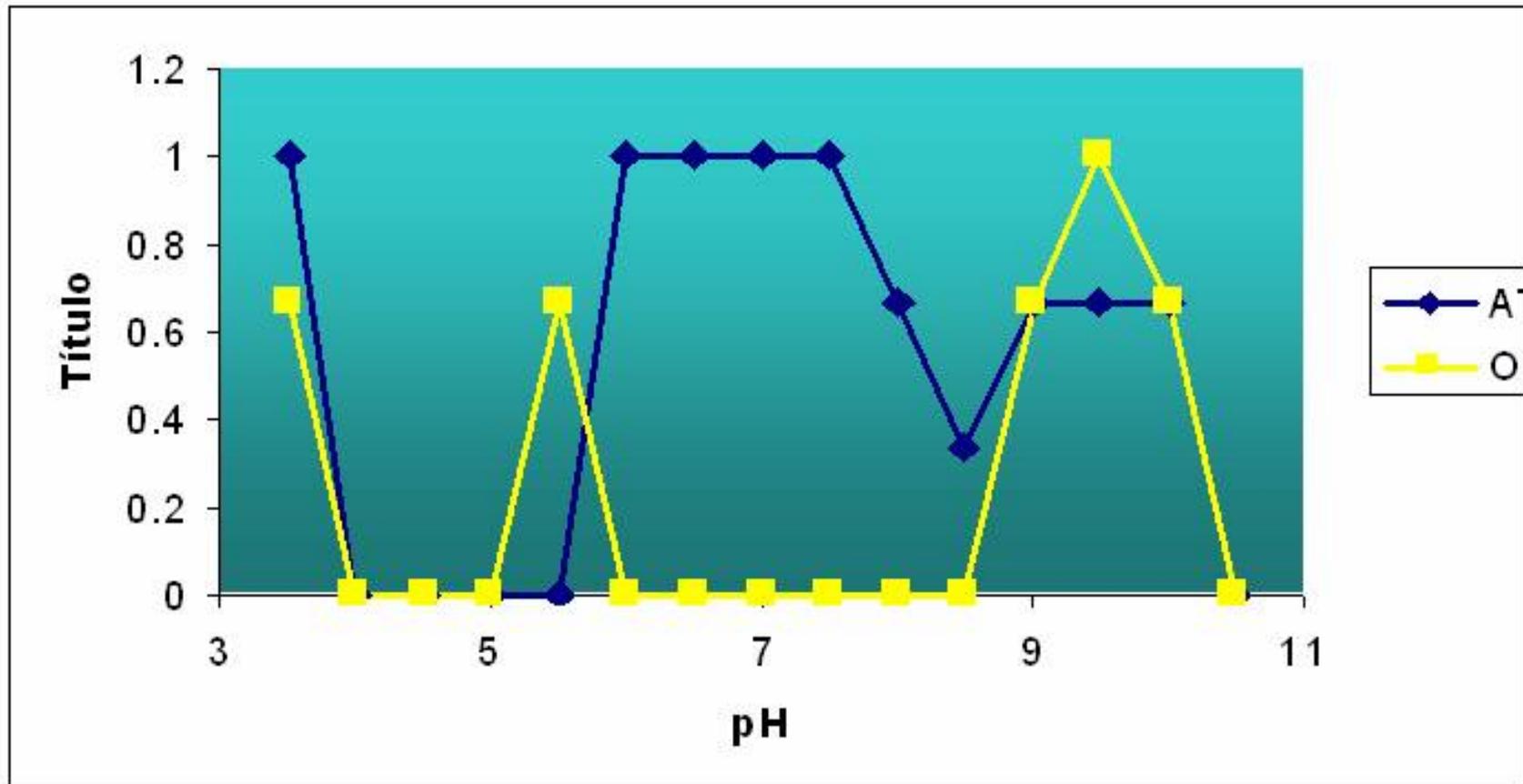
6. Estabilidad al pH

La estabilidad al pH de las lectinas de cada muestra se midió incubando las lectinas a diferentes condiciones de pH empleando soluciones amortiguadoras y posteriormente se realizó la prueba de aglutinación utilizando eritrocitos humanos tipo O y A tripsinizados, para observar su actividad y estabilidad biológica.

En la Figura 12 se puede observar que la lectina FN1 es muy estable a pH 3.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5, cuando se realiza la aglutinación con eritrocitos tipo A; sin embargo cuando la muestra se trata con eritrocitos tipo O la lectina solo es estable a pH 9.5. La lectina FN2 es más estable a pH ácido (3.5, 5.5, 6.0) cuando se utilizan eritrocitos tipo A, pero cuando se realizó la prueba de hemaglutinación con eritrocitos tipo O, la lectina es más estable a pH básico (9.5, 10.0, 10.5), lo cual se puede observar en la Figura 13.

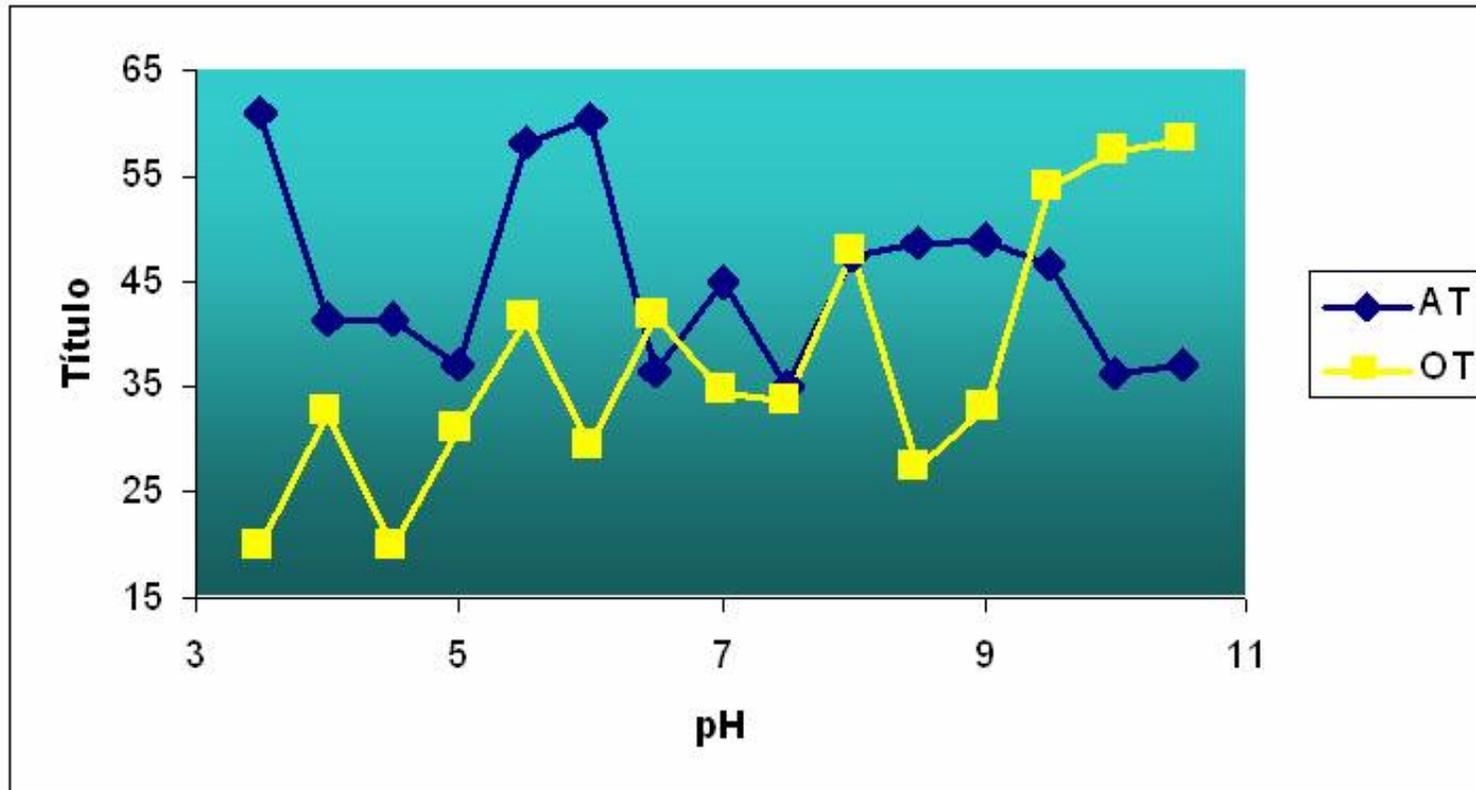
Por otro lado, la Figura 14 proporciona los resultados de la estabilidad al pH de la lectina AM, donde se puede observar que esta lectina es estable a pH neutros (7.0, 7.5 y 8.0) cuando se han utilizado eritrocitos humanos del grupo sanguíneo A observándose una actividad eritroaglutinante considerablemente alta; mientras que al utilizar eritrocitos tipo O la lectina es más estable a pH 6.0.

Figura 12. Estabilidad de la lectina de frijol de vara (FN1) a diferentes condiciones de pH



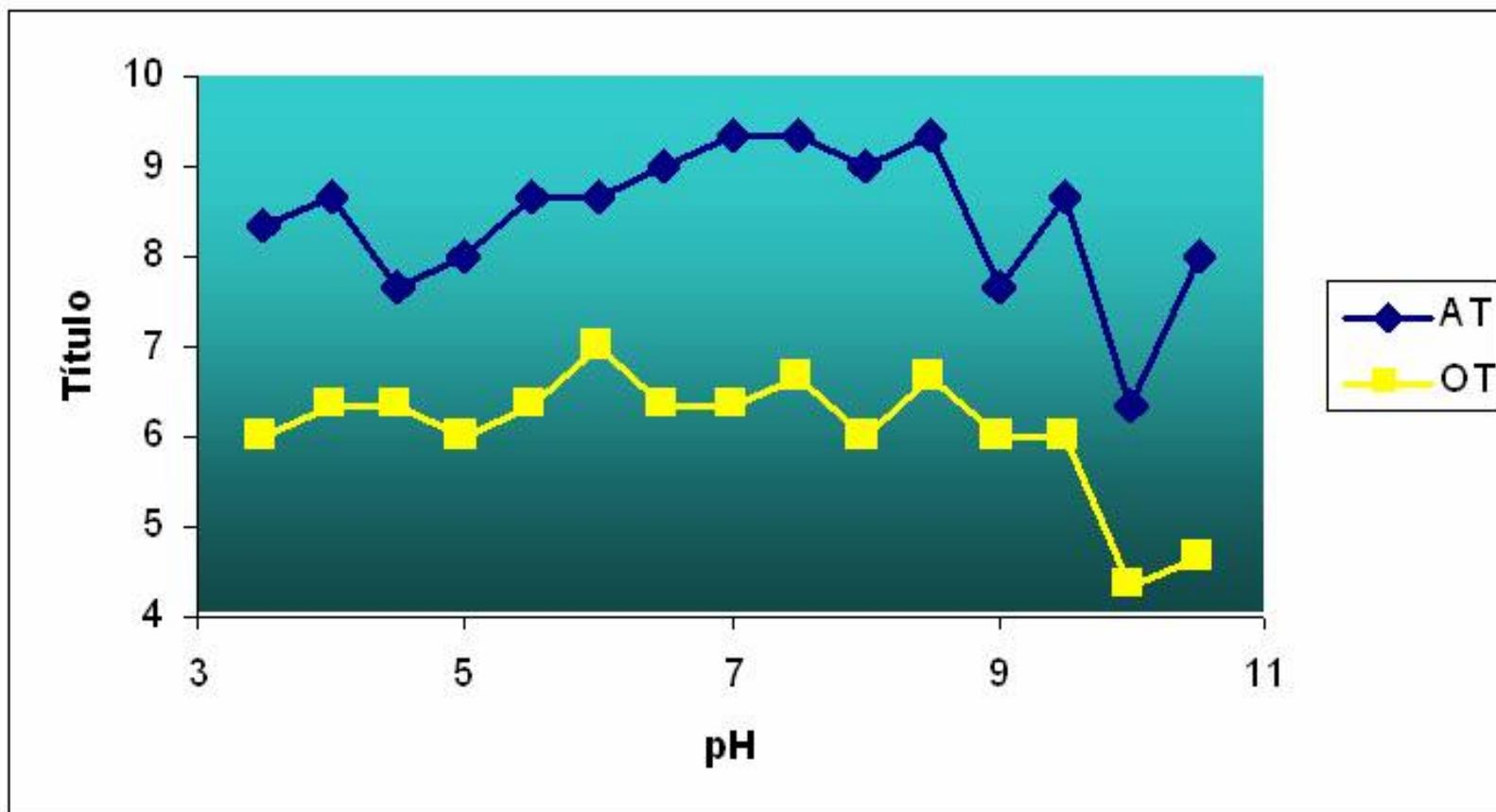
AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Figura 13. Estabilidad de la lectina de frijol de surco (FN2) a diferentes condiciones de pH



AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Figura 14. Estabilidad de la lectina de semilla de amaranto (AM) a diferentes condiciones de pH



AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Estos resultados concuerdan con los reportados para diversos tipos de lectinas vegetales extraídas de diferentes fuentes (Galbraith, 1970; Nachbar, 1980; Rinderle, 1989; Kawagishi, 1994; Machuka, 1999; Bonay, 2000; Rodríguez-Macedo, 2003; Kobayashi, 2004; Zamudio, 2005) y asimismo, nos indican que las lectinas extraídas de las tres muestras son muy estables y conservan gran parte de su actividad biológica en diversos puntos ya sean ácidos, neutros o básicos.

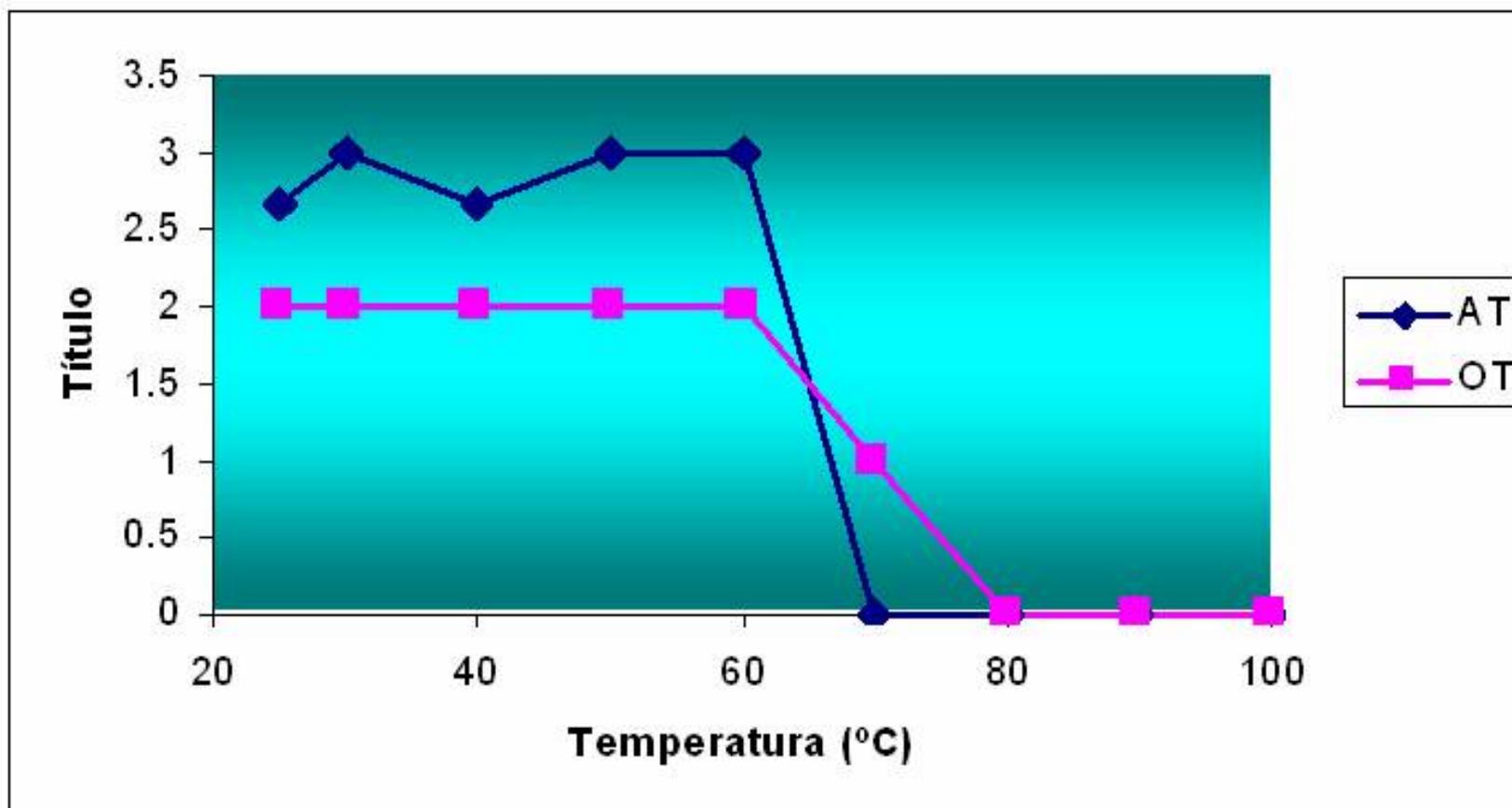
7. Termoestabilidad

Esta prueba se llevó a cabo calentando las lectinas de frijol negro y amaranto a diferentes temperaturas comprendidas entre 25 y 100°C, posteriormente se realizó la prueba de aglutinación utilizando eritrocitos humanos tipo O y A tripsinizados, con la finalidad de conocer su estabilidad y actividad biológica.

La lectina FN1 es muy estable a temperaturas menores a los 60°C (Figura 15), ya que al sobrepasar dicha temperatura la lectina disminuye considerablemente o pierde totalmente su actividad biológica y estabilidad. De igual manera la lectina FN2 mostró una alta estabilidad cuando la temperatura no sobrepasa los 60°C, ya que a temperaturas más altas pierde o se anula completamente su actividad lo cual se puede observar en la Figura 16. Asimismo, en la Figura 17 se muestra la estabilidad de la lectina AM, la cual tiene un comportamiento similar a las de frijol ya que es estable hasta los 60°C porque a temperaturas mayores pierde o se anula su actividad biológica y estabilidad.

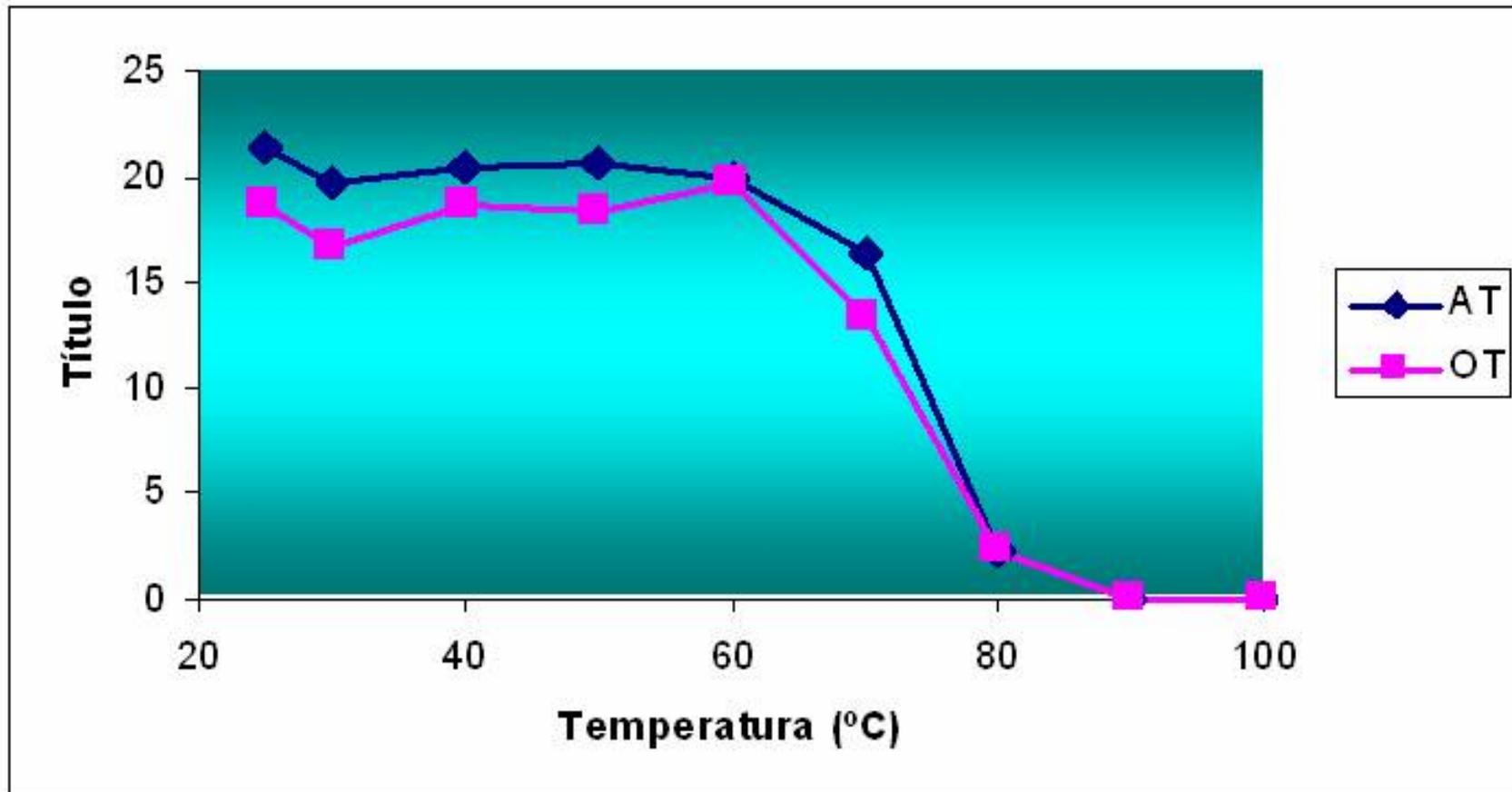
Como se puede observar ninguna de las lectinas soporta temperaturas mayores a 60 °C que se ve claramente como a esta temperatura disminuyen considerablemente o pierden totalmente su estabilidad y por tanto su actividad biológica de aglutinar eritrocitos de los grupos sanguíneos A y O.

Figura 15. Estabilidad de la lectina FN1 a diferentes valores de temperatura



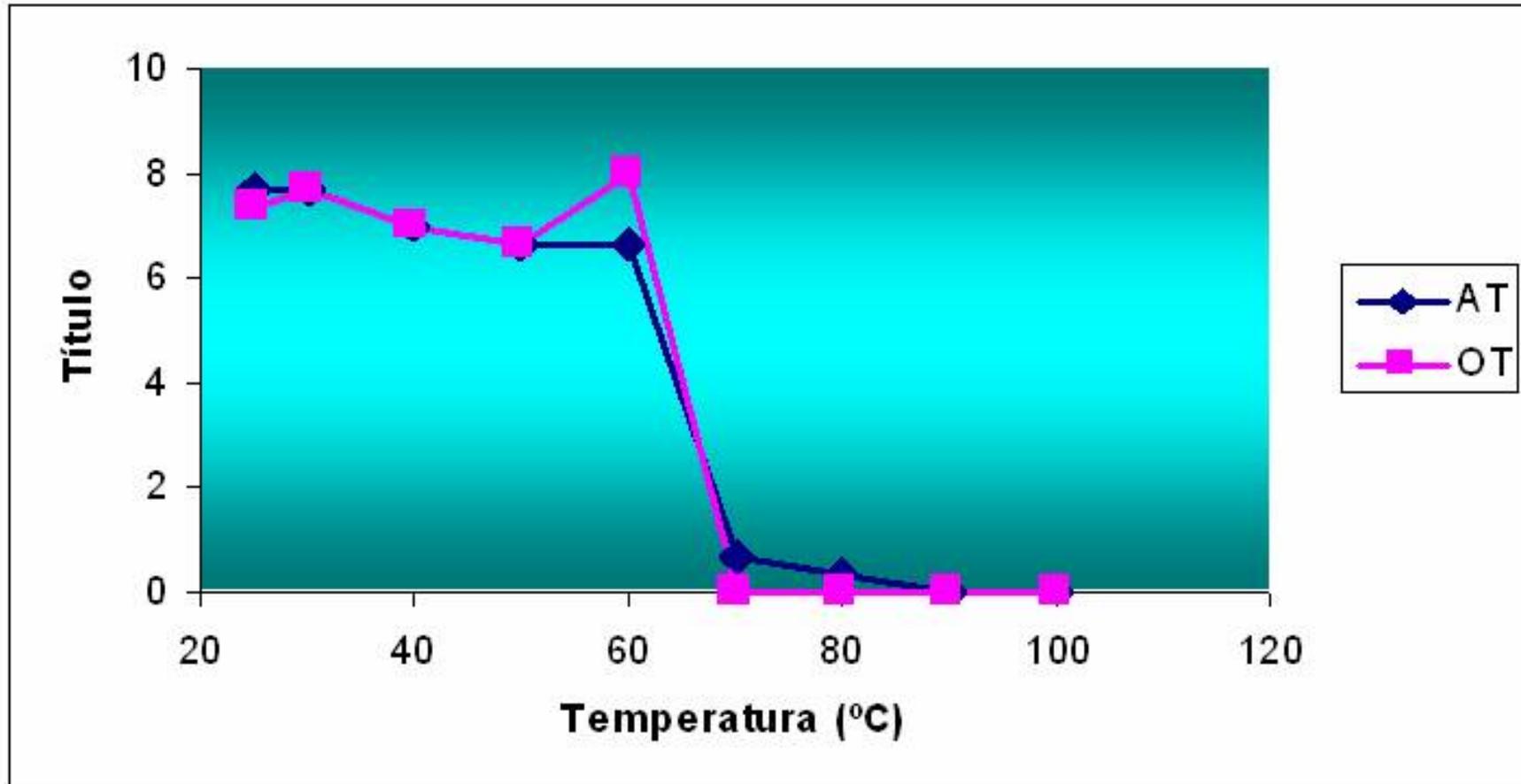
AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Figura 16. Estabilidad de la lectina FN2 a diferentes valores de temperatura



AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Figura 17. Estabilidad de la lectina AM a diferentes valores de temperatura



AT: Eritrocitos humanos tipo A tripsinizados
OT: Eritrocitos humanos tipo O tripsinizados

Estos resultados concuerdan con los reportados para diferentes lectinas provenientes de plantas y animales estudiadas anteriormente (Singh, 1994; Bonay, 2000; Kobayashi, 2004; Zamudio, 2005 y Rodríguez-Macedo, 2005) y también sugieren que a altas temperaturas las lectinas han sido desnaturalizadas por lo tanto ya no conservan sus mismas propiedades. Sin embargo otros autores han reportado que existen lectinas provenientes de vegetales y leguminosas que son termoestables (Kilpatrick, 1980; Peumans, 1983; Coelho Da Silva, 2001; Rodríguez Macedo, 2003).

Como es ya conocido, muchas moléculas proteicas sólo retienen su actividad biológica dentro de una fluctuación muy limitada de temperatura y de pH. La exposición de proteínas solubles o globulares a pH extremos o a temperaturas elevadas, les hace experimentar un cambio conocido como desnaturalización, el efecto más visible del cual, consiste en un descenso de su solubilidad y por tanto la pérdida de la actividad biológica (Lehninger, 1990).

VIII. CONCLUSIONES

- ✚ Las semillas de frijol negro y amaranto, son aptas para la extracción y purificación de lectinas debido a su cantidad total de proteínas (21 % para FN1, 17% para FN2 y 18% para AM).
- ✚ Las lectinas purificadas de frijol negro son glicoproteínas (9.54% y 11.39% de carbohidratos para FN1 y FN2 respectivamente) formadas por cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de 27.34 kDa para la lectina de frijol de vara y 28.17 kDa para la lectina de frijol de surco.
- ✚ La lectina de amaranto es una glicoproteína (3.69% de carbohidratos) formada aparentemente por dos subunidades cuyo peso molecular es de 26.68 y 28.43 kDa.
- ✚ La actividad hemaglutinante para cada lectina varía dependiendo del tipo sanguíneo, mostrando mayor afinidad hacia eritrocitos humanos tipo O.
- ✚ La lectina FN2 presenta un mayor título de aglutinación hacia todos los tipos de eritrocitos tanto humanos como animales, lo que sugiere que esta lectina podría tener un potencial tóxico más alto que las otras lectinas estudiadas.
- ✚ Todas las lectinas presentaron una actividad aglutinante considerablemente alta cuando fueron utilizados eritrocitos de hámster y conejo para las pruebas de hemaglutinación.
- ✚ Las lectinas purificadas de frijol no mostraron afinidad hacia los carbohidratos estudiados, sin embargo la lectina de amaranto mostró afinidad por manosa, fructosa, glucosa, galactosa y rafinosa.

- ✚ Las lectinas purificadas presentaron iones metálicos tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} como parte constituyente de su estructura.
- ✚ Las tres lectinas son metaloproteínas que dependen mayormente de calcio, magnesio y manganeso, para realizar su actividad biológica.
- ✚ Las lectinas varían su estabilidad a todos los valores de la escala de pH FN1 es más estable a pH ácido, FN2 conserva su actividad biológica a pH tanto ácido como básico y finalmente la lectina AM, presenta una mayor estabilidad en pH neutro y básico.
- ✚ Todas las lectinas son estables a temperaturas por debajo de los 60 °C, perdiendo su actividad biológica a temperaturas más altas debido a la desnaturalización de la proteína.
- ✚ Los resultados obtenidos en este trabajo presentan una valiosa información acerca de las principales características de lectinas provenientes de frijol negro y amaranto, sin embargo aún faltan otros estudios por realizar como la purificación empleando una matriz más afín a la lectina como podría ser de fetuína, ovoalbúmina, fibrinógeno, entre otras. Para la caracterización de las lectinas purificadas se requieren otros estudios como MALDI-TOF y filtración en gel, para conocer su peso molecular con mayor exactitud; determinación de punto isoeléctrico, composición de aminoácidos y secuenciación del grupo amino terminal; dentro de las pruebas biológicas faltan estudios de mitogenicidad, citotoxicidad y mutagenicidad, entre otros.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Alfaro, Y. Elaboración de harina de pejibaye (*Bactris gasipaes* H. B. K.) para consumo animal. Tesis Licenciatura en Tecnología de Alimentos. San José. Universidad de Costa Rica. 1988. 128.
2. Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. 2005.
<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Oryctolaguscuniculus00.pdf>
3. Amarantum: Asociación Mexicana del Amaranto A. C. (AMA). 2006.
www.amaranta.com.mx
4. Angelisová, P., Hascovek C. Isolation and chemical characterization of a highly purified phytomitogen from *Phaseolus coccinerus* seeds. Eur J Biochem. 1978. 83:163-168.
5. AOAC. Official Methods of Analysis. 13^a Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, EE.UU. 1990. 78, 79, 237, 247, 272.
6. Arason, G. J. Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. Fish Shellfish Immunol. 1996. 6: 277-289.
7. Attia, R.S., El-Tabey Shehata, A.M., Aman, M.E., Hamza, M.A. Effect of cooking and decortication on the physical properties the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Food Chem. 1994. 50:125-131.

8. Bale, M. S., Anuradha, G. B., Ganapati, V. H., Ramachandra, S. N., Srikanth, K., Shashikala, R. I. Immunolocalization and functional role of Sclerotium rolfsii lectin in development of fungus by interaction with its endogenous receptor. *Glycobiol.* 2004. 14: 951-957.
9. Bardoez, S. Effect of phytohaemagglutinin on intestinal cell proliferation. Role of polyamines. *Arch Latinoamer Nutr.* 1994. 44:16-20.
10. Barros, C. y Buenrostro, M. Amaranto, fuente maravillosa de sabor y salud. Ed. Grijalbo, México, 1997. 5-16
11. Becerra, R. Biodiversitas. Boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 2000. 5: 1-6.
12. Bello, G. B., Rivera, P. M., Maldonado, H. Karl Landsteiner: Premio Nobel 1930 de Fisiología y Medicina. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 2001. 58: 902-906.
13. Blanco, A., Bressani, R. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr.* 1991. 41:38-51.
14. Blood, D. C., Henderson J. A., Radostits M. O. *Medicina Veterinaria.* Ed. Interamericana. 1988. 1352-1356.
15. Bonay, M. P. Fresno, M. Lectins from tropical sponges: purification and characterization of lectins from *Genus aplysina*. *J Biol Chem.* 2000. 275: 29283-29289.
16. Born, J., Uthgenannt, D., Dodt, C., Nunnighoff, D., Ringvol, E. Cytokine production and lymphocyte subpopulation in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech Ageing Dev.* 1995. 84:113-126.
17. Bosque Morales, M. L. Características físicas, químicas y nutricionales de cinco variedades de frijol común negro (*Phaseolus vulgaris*). Tesis. 1981. ICTA, Guatemala.

17. Bourges, R. H. Las leguminosas en la alimentación. II Parte. Publicación del Instituto Nacional de la Nutrición, CONASUPO y sus Empresas Industriales. Cuadernos de Nutrición. 1987. 10: 22-30.
18. Boyd, W. C., Slapeigh, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science. 1954. 119: 419-426.
19. Boyd, W. C., Slapeigh, E. Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. Immunol. 1954. 73: 226-229.
20. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. Analyt Biochem. 1976. 72: 248-254.
21. Bressani, R. Navarreto, D, Garcia-Soto, A, Elias, L. Culinary practices and consumption characteristics of common beans at the rural home level. Arch Latinoamer Nutr. 1988.18: 925- 934.
22. Bressani, R., De Martell, Godínez. Protein quality evaluation of amaranth in adult humans. Plants Food Human Nutr. 1993. 43:123-143.
23. Brotchi, J., Danguy, A., Kiss, R. Lectin histochemistry of astrocytic tumors and in vitro characterization of lectin-induced modifications on the proliferation of SW1088, U373 and U87 human astrocytic cell lines. J Neuro Oncol. 1997. 34: 111-122.
24. Calderó, J., Campo, E. Lectinas: utilidad en histología e histopatología. Patología. 1990. 23:127-135.
25. Calderón, E., González, Bressani R. Características agronómicas, físicas, químicas y nutricias de quince variedades de amaranto. Turrialba. 1991. 41: 458-464.

26. **Cárdenas, Q. H., Gómez, B. C., Díaz, N. J., Camarena, M. F.** Evaluación de la calidad de la proteína de 4 variedades mejoradas de frijol. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 2000. 14: 22-27.
27. Carmona, A., Seidl, D. S., Jaffé, W. G. Comparison of extraction on methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. *J Sci Food Agric.* 1991. 56: 291-301.
28. Cavada, S., Ramos, M. V., Cordeiro, E. F., Grangeiro, T. B., Abreu, O. J. T., Fontenelle, U de C., Azevedo, M. R. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* benth seeds. *R Bras Fisiol Veg.* 1996. 8: 37-42.
29. Chiou, R. Y., Chen, S. L. Isoflavone transformation during soybean Koji preparation and subsequent Miso fermentation supplemented with ethanol and NaCl. *J Agric Food Chem.* 2001. 49: 3656-3660.
30. Coelho da Silva, A. L., Goes Horta, A. C., Azevedo, M. R. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. *Ex. Steua. R. Bras Fisiol Veg.* 2001. 13: 262-269.
31. Desai, N. N., Neuberger, A. Purification of the glycoprotein lectin from the broad bean (*Vicia faba*) and a comparison of its properties with lectins of similar specificity. *Biochem J.* 1976. 155: 127-133.
32. Díaz Ortega, A., Escalante, J. A., Trinidad S. A., Sanchez, G. P., Mapez, S. C., Martinez, M. D. Rendimiento, eficiencia agronomica del nitrógeno y eficiencia en el uso del agua en amaranto en función del manejo del cultivo. *Terra Latinoam.* 2003. 22: 109-116.
33. D'Mello, J.P.F., Acamovic, T., Walker, A.G. Nutritive value of jack beans (*Canavalia ensiformes* (L) DC) for young chicks. *Tropical Agriculture.* 1995. 62: 145-150.

34. Duarte Correa, A., Jokl, L., Carlsson, R. Chemical constituents in vitro protein digestibility, and presence of antinutritional substances in amaranth grains. Arch Lat Nutr. 1986. 36: 319-326.
35. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956. 28: 350-356.
36. Escribano, J., Rubio, A., Alvarez-Ortiz, M., Molina, A., Fernandez, J. A. Purification and characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) J Agric Food Chem. 2000. 48: 457-463.
37. Espinosa Moreno, J., Centurión Hidalgo, Dora., Solano, M., García Gordillo, G. Leguminosas de Grano de Consumo Tradicional en Tabasco: Determinación del Contenido Nutricional. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2005. Guanajuato, Gto.
38. Espitia, R. E. Breeding of grain amaranth. En: O. Paredes-López, Amaranth. Biology, Chemistry and Technology. Ed. Ann Arbor. Londres. 1994. 23-38.
39. Etzler, M. Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. Plant Physiol. 1995. 36: 209-234.
40. Eylar, E. N., Macloff, M. A., Brody, O. R. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J Biol Chem. 1962. 237: 1992-1998.
41. Felsted, R. L., Leavitt, R. D., Chen, C. Bachur, N. R., Dale, R. M. K. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. Biochim Biophys Acta. 1981. 668: 132-141.

42. Figueroa, M., Manzini, J., Lajolo, F. Aco antinutricional dasfitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, L. Arch Latinoam Nutr. 1984. 24: 488-499.
43. Frane, H. Lectins definition and classification. Acta Histochem. 1982. 71:19-
44. Friedman, M. Nutricional value of proteins from different food sources. A review. J Agric Food Chem. 1996. 44: 6-29.
45. Galbraiht, W. y Goldstein, I. J. Phytohemagglutinins: a new class of metalloproteins. Isolation, purification, and some properties of the lectin from *Phaseolus lunatus*. FEBS Lett. 1970. 9: 197-201.
46. Galbraiht, W. y Goldstein, I. J. Phytohemagglutinin of the lima bean (*Phaseolus lunatus*). Isolation, characterization, and interaction with type A blood-group substance. Biochemistry. 1972. 11: 3976-3984.
47. Gallegos, J. A., Gonzales, R. F., Ibarra, F. J., Preza, A. M., Reyes, M. G., Rosales, M., Rocha, N. E. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos fenólicos de variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para la determinación de su efecto quimioprotector. Presentado en XXIX Premio Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2005. Durango, México.
48. García Pérez, H. M. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico. 2000. 1: 31-34.
49. Goldstein, I. J. What should be called lectin. Nature. 1980. 285: 66-68.
50. Goldstein, I. J. y Poretz, R. D. Isolation, physico-chemical characteristics, and carbohydrate-binding specificity of lectins. Academic Press. 1986. 35.

51. Goldstein, I. J.; Poretz, R. D. In *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*; Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J., Eds.; Academic Press, Inc.: Orlando, 1986. 33-247.
52. Goldstein, I. J. Lectin Structure Activity: The Story Is Never Over. *J Agric Food Chem.* 2002. 50: 6583-6585.
53. Gómez Lorenze, F. Perspectivas del cultivo del Amaranto *Amaranthus spp.* En la comarca Lagunera. *Amaranto Cultivo y aprovechamiento.* 1999: 233-238.
54. González Castañeda, J., Arroyo Torres, I., Borodanenko, A., Carballo Monsivais, C. Efecto de la Época de Cosecha en las Características Físicas, Químicas y Funcionales del Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Presentado en: VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Guanajuato. México. 2005.
55. Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J.A., Alvarez-Muñoz, M. A., García Delgado, S. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agric Tec Mex.* 1998. 28: 159-173.
56. Hamblin, J. y Kent, S. P. Possible role of phytohaemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nat New Biol.* 1973. 245: 28–30.
57. Hamelryck, T. W., Loris, R., Bouckaert, J., Wyns, L. Structural features of the legume lectins. *Trends Glycosci Glycotech.* 1988. 10: 336-349.
58. Hamelryck, T. W., Dao-Thi, M. H., Poormans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L., Loris, R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem.* 1996. 271: 20479-20485.

59. Hernández, P., Martín, G. O., Rodríguez de Pablos, Y. Ganem, B. Aplicaciones de las lectinas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999. 15: 91-95.
60. Hernández, P., Bacilio, M., Porras, F. Juárez, S. Debray, H., Zenteno, E., Ortiz, B. A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypochondriacus* lectin. Prep Biochem Biotechnol. 1999. 29: 219-234.
61. Hernandez, P., Tetaert, D., Vergoten, G., Debray, H., Jiménez, M. C., Alvarez, G., Agundis, C., Degand, P., Zenteno, E. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypochondriacus* lectin for O-glycopeptides. Biochim Biophys Acta. 2004. 1674: 282-290.
62. Herrera I, González E, Romero J. Fibra dietética soluble, insoluble y total en leguminosas crudas y cocidas. Arch Latinoamer Nutr. 1998. 48: 179-182.
63. Hevia, H., Berti, D., Wilckens, E. Contenido de proteína y algunas características del almidón en semillas de amaranto (*amaranthus* spp.) cultivado en Chillan, Chile. Agro sur. 2002. 30: 24-31.
64. Hoefer. Protein electroforesis application guide. Hoefer Scientific Instrument. San Francisco, Cal. USA 1994. 15-45.
65. Huissman, J. Aspects of antinutritional factors (ANFs) in relation to nutrition and pollution. In 19th Worlds Poultry Congress. Amsterdam. 1992.
66. Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J., Perez, S., Wyns, L., Loris, R. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. J Biol Chem. 2000. 275: 17541-17548.

67. Itichi, S., Yamano, Y., Osame, M., Hall, W. A kinetic comparative study on lymphocyte responses to superantigen and phytohemagglutinin: reciprocal presentation of superantigen on surface of activated lymphocytes. *Cell Immunol.* 1996. 173: 312-326.
68. Jaffé, C. L. Ehrlich-Rogozinski, S. Lis, H. y Sharon, N. Transition metal requirements of soybean agglutinin. *FEBS Lett.* 1977. 82: 191-196.
69. Jaffé, W.G. Hemagglutinin. In: Toxic constituents of plant foodstuff. Ed. by I.E. Liener. New York, U.S.A., Academic Press. 1980. 73-102.
70. Janzen, D. H., Juster, H. B., Bell, E.A. Toxicity of Secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle (*C. maculatus*). *Phytochem.* 1977. 16: 223- 227.
71. Kaneda, Y., Whittier, F., Yamanaka, H., Carredano E., Gotoh, M., Sota, H., Hasegawa, Y., Shinohara, Y. The high specificities of *Phaseolus vulgaris* Erythro- and Leukoagglutinating lectins for bisecting GlcNAc or β 1-6-linked branch structures, respectively, are attributable to loop B. *J Biol Chem.* 2002. 277: 16928-16935.
72. Kawagishi, H., Yamawaki, M., Isobe, S., Usui, T., Kimura, A., Chiba, S. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadae*. *J Biol Chem.* 1994. 269: 1375-1379.
73. Kilpatrick, D. C. Purification and some properties of a lectin from the fruit juice of the tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochem. J.* 1980. 185: 269-272.
74. Kiss, R., Camby, I., Duckworth, D., Dekker, R., Salmon, I. In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, *Concanavalin A*, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut.* 1997. 40: 253-261.

75. Kobayashi, Y., Kobayashi, K., Umehara, K., Dohra, H., Murata, T., Usui, T., Kawagishi, H. Purification, characterization, and sugar binding specificity of an N-glycolylneuraminic acid-specific lectin from the mushroom *Chlorophyllum molybdites*. J Biol Chem. 2004. 279: 53048-53055.
76. Koeppe, S. J., Rupnow, J. H. Purification and characteristics of a lectin from the seeds of amaranth (*Amaranthus cruentus*). J Food Sci. 1988. 53: 1412-1417.
77. Kong, Z. L., Chiang, L. C., Fang, F., Shinohara, K., Pan, P. Immune bioactivity in shell fish toward serum-free cultured human cell lines. Biosci Biotechnol Biochem. 1997. 61: 24-28.
78. Laemmli, U. K. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. Nature. 1970. 227: 680-685.
79. Lahfa, F. B., Dahmani, Y., Trouthaud, D., Deshaux, D. Nutritional influences on in vitro splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus* (Rodentia gerbilliadae). Cell Mol Biol Res. 1995. 41: 387-390.
80. Lajolo, F. M., y Genovese, M. I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. J Agric Food Chem. 2002. 50: 6592-6598.
81. Landsteiner, K., Levine, P. A new agglutinable factor differentiating individual human blood groups. Proc Soc Exp Biol Med. 1927. 24: 600.
82. Lehmann, J.W. The industrialization and commercialization of Amaranth an alternate approach. In: Primer Congreso Internacional del Amaranto. Septiembre 22-27. Oaxtepec, Morelos. México. 1991.
83. Lehninger, L. A. Bioquímica. Segunda edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1990. 59-64.

84. Levy, A., De Stein, R., Márquez, C. Jaffé, W. El valor bioquímico y nutricional de las semillas del haba de lima (*Phaseolus lunatus*) en comparación con las de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoam. Nutr. 1985. 25: 70-79.
85. Liener, I. R. Legume toxins in relation to protein digestibility -a review. J Food Sci 1976. 41: 1076 - 1081.
86. Liener, I. E. Implications of antinutricional components in soybean foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 1994. 34: 31-67.
87. Liener, I. E., Sharon, N. y Goldstein, U. J. The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine. Ed Academic press, INC. London. 1986. 35-209.
88. Lima, A. I., Holanda, S., Ponte F., Barros B., Mapurunga, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. R Bras Fisiol Veg. 1995. 7:15-19.
89. Lima, P. M. E., Carneiro, M. E., Nascimento, A. E., Grangeiro, T. B., Holanda, M. L., Amorim, N. R. C., Benavides, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae). J Agric Food Chem. 2005. 53: 6414-6419.
90. Lis, H. y Sharon, N. Soybean agglutinin: a plant glycoprotein J. Biol. Chem. 1978. 253: 3468-3476.
91. Lis, H. y Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. Annu Rev Biochem. 1986. 55: 35-67.
92. Lotan, R. Differentiation-associated modulation of lactoside binding lectins in cancer cells. Lectins and Cancer. 1983. 153-169.

93. Lotan, R., Lis, H. y Sharon, N. Aggregation and fragmentation of soybean agglutinin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1975. 62: 144-150.
94. Machuka, J. S., Okeola, O. G., Van Damme, Els. J. M., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., Peumans, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochem.* 1999. 51: 721-728.
95. Machuka, J. E., Van Damme, J. M., Peumans, W. J. Effects of plant lectins on the development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. *Entomol Exp Applic.* 1999. 93: 179–186.
96. Maeshima, M., Sasaki, T., Asahi, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochem.* 1985. 24: 1899-1902.
97. Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Perez, A., Molina, J., Zenteno, E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj J.* 1998. 15: 615-622.
98. Martinez, J. A., Larralde, J. Developmental changes on protein turnover in growing rat fed on diets containing field beans (*Vicia faba* L.) as a source of protein. *Arch. Lat. Nutr.* 1984. 34: 465-476.
99. Matthews, R. Legumes, Chemistry, Technology and Nutrition. Marcell Dekker, Inc USA. 1989. 389.
100. Mejia, E. G., Hanskins, C. N., Paredes-López, O. y Shannon, L. M. The lectins and the lectin CRMs of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary-common beans (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Biochem.* 1989. 14: 117-126.

101. Méndez López I. Reacción antígeno-anticuerpo en inmunohematología. En: XXXIII Congreso Mexicano de Patología Clínica. 2003. Hospital de Cardiología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. México D.F.
102. Miller, J. B., Hsu, R., Heinrikson, R. y Yachnin, S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. 72: 1388-1391.
103. Monteros, J., Nieto, C., Caicedo, V., Rivera, M., Vimos, N. "Alegria" primera variedad mejorada de amaranto para la sierra ecuatoriana ecuador. Archivos Departamento de Nutrición. 1993. Quito, Ecuador.
104. Moreira, R. A., Barros, A. C. H., Stewart, J. C., y Pusztai, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). Planta. 1983. 158: 63-69.
105. Mosby. Diccionario de medicina. 4ª edición. Editorial Oceano. España.
106. Nachbar, M. S., Oppenheim, J. D., Thomas, J. O. Lectins in the U.S. Diet. Isolation and characterization of a lectin from the tomato (*Lycopersicon esculentum*). J Biol Chem. 1980. 255: 2056-2072.
107. Nowaková, N. y Kocourek, J. Studies on phytohemagglutinins: Isolation and characterization of hemagglutinins from scarlet runner seeds (*Phaseolus coccineus* L.). Biochim Biophys Acta. 1974. 359: 320-333.
108. Ochoa, J. L., Kristiansen, T. Purification and partial characterization of an agglutinin from *Phaseolus coccineus* var. alubia. Biochim Biophys Acta. 1982. 705: 396-404.

109. Osorio-Díaz, P., Méndez-Montealvo, G., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J., Sánchez-Muñoz, J., Bello-Pérez, L. Starch bioavailability in two commercial bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) and in industrialized beans. *Agrociencia*. 2003. 37: 6-10.
110. Ozeki, M., Kememura, K., Moriyama, K., Itoh, Y., Furuichi, Y. Umekawa, H. Takahashi, T. Purification and characterization of a lectin from *Amaranthus hypochondriacus* var. Mexico seeds. *Biosci Biotech Biochem*. 1996. 60: 2048-2051.
111. Pandolfino, E. y Magnuson, J. A. Mn^{2+} and Ca^{2+} binding to the Lima bean lectins. *J Biol Chem*. 1979. 255: 870-873.
112. Peña Díaz Antonio. *Bioquímica*. Segunda edición. Editorial Limusa. México 1990. 42-44.
113. Peñate, M., Bencomo, A., Sampere, E., Hernandez, M., Porrata, C., Ponce de León. Evaluación nutricional de las semillas de ipil-ipii (*Leucaena leucocephala*), casco de vaca (*Bauhinia monandra*) y algarrobo de olor (*Albizia lebbbeck*). *Arch Lat Nutr*. 1987. 38: 956-964.
114. Peumans, W. J., Stinissen, H. M. y Carlier, A. The rice lectin and its relationship to cereal lectins. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 1983. 178: 423-431.
115. Pollack, W., Hager, H., Reckel, R. A study of the forces involved in the second stage of the hemagglutination. *Transfusion*. 1965. 5: 158-163.
116. Pratt, R. C., Singh N. K., Shade, R. E., Murdock, L. L., Bressan, R. A. Isolation and partial characterization of a seed lectin from Tepary bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiol*. 1990. 93: 1453-1459.

117. Pryme, I., Pusztai, A., Bardoez, S., Ewen, S. The induction of gut hyperplasia by phytohaemagglutinin in the diet and limitation of tumour growth. *Histol Histopathol* 1999; 13: 575-583.
118. Pusztai, A., Fiona, G., Brewer, A. C. Effect of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) toxin on tissue weight and composition and some metabolic functions of rats. *Brit J Nutr.* 1985. 54: 95-103.
119. Quesada, S., Nanne, C., González, L. Lectins of *Erythrina poeppigiana* and *Erythrina steyermarkii* (Leguminosae): characterization and mitogenic effect. *Rev Biol Trop.* 1998. 46:1039-1046.
120. Rehman, Z., Salariya, A. M., Zafar, S. I. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 2001. 73: 351-355.
121. Reyes-Moreno, C. y Paredes-López, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans- A review. *Critical Review. Food Sci Nutr.* 1993. 33: 227-286.
122. Rico, H. M. A. Los cereales. Publicado en: II Congreso Iberoamericano de Expertos en Nutrición. Hospital Universitario la Paz. Madrid. 2000.
123. Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L., Ratcliffe, R. M. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. *J Biol Chem.* 1989. 264: 16123-16131.
124. Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Remsen, E. E. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry.* 1990. 294: 17253-17255.
125. Rini, J. M. Lectin structure. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 1995. 24: 551-577.

126. Rivillas, A., Soriano, G. Peptidos antifungicos novedosos aislados de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*: Estrategia emergente. Presentado en: VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México. 2005.

127. Rodrigues Macedo, M. L., Damico, D. C., Machado, M. G., Toyama, M. H., Marangoni, S., Novello, J. C. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). J Agric Food Chem. 2003. 51: 2980-2986.

128. Rodriguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J., Gattuso, S. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las Fabaceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Anales Afa. 2004. 16: 247-248.

129. Ryder, S. D., Smith, J. A., Rhodes, E. G., Parker, M., Rodes, J. M. Proliferative responses of HT29 and Caco2 human colorectal cells to a panel of lectins. Gastroenter. 1994. 106: 85-93.

130. SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de Frijol en México 1990 – 2000.

<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/Archivos/Frijol90-00.pdf>

131. Sathé, S. R., Rangnekar, P. D. Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. Isolation and partial characterization of black gram (*Phaseolus mungo* L.) starch. J Food Sci. 1982. 47: 1524-1538.

132. Schmidt, E. L., Biesbrock, J. A., Bohlool, B. B., Marx, D. H. Study of mycorrhizae by means of fluorescent antibody. *Can J Microbiol.* 1974. 20: 137–139.
133. Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., Kempis, J., Kotz, M. ILA, the human 4-IBB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lines. *Cancer Lett.* 1995. 107: 285-291.
134. Serrano, J., Goñi, I. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *ALAN.* 2004. 54: 36-44.
135. Sharma, V. y Surolia A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J Mol Biol.* 1997. 267: 432-445.
136. Sharon, N. y Lis, H. Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* 1972. 177: 949-58.
137. Sharon, N y Lis, H. Legume lectins: a large family of homologous proteins. *Faseb J* 1990. 4: 3198-3208.
138. Sharon, N y Lis, H. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev.* 1998. 98: 637-674.
139. Sharon, N y Lis, H. How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. *J Agric Food Chem.* 2002. 50: 6586-6591.
140. Sharon, N. y Lis, H. Review. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. 2003. *Glycobiol.* 2004. 14: 53-62.

141. Siddhuraju, P., Vijayakumari, K., Janardhanan, K. Nutrient and chemical evaluation of raw seeds of *Xylia Xylocarpa*: an underutilized food source. Food Chem. 1995. 53: 299-304.
142. Silverstein, S. C. y Wright, S. D. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b X receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. J Exp Med. 1983. 156: 1149–1164.
143. Singh, J., Kamboj, K. K., Kamboj, S. S., Shangary, S., Sandhu, R. S. Amaranthus hypochondriacus and A. tricolor lectins: isolation and characterization. Ital J Biochem. 1994. 43: 207-218.
144. Sousa, B.; Azebedo, R.; Abreu, J.; Barboza, T. Primary structure and functions of plant lectins. R Bras Fisiol Veg. 1995. 5: 193-201.
145. Takahashi, T., Ramachandramurthy, P., Liener, I. E. Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. Biochim Biophys Acta. 1967. 133: 123-133.
146. Tanda, N., Mori, S., Nose, M., Saito, T., Song, S. T., Sato, A. Expression of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin-binding oligosaccharides in oral squamous cell carcinoma: possible association with the metastatic potential. Pathol Int. 1996. 46: 639-645.
147. Tanzima, Y., Kashem, A., Razzaque, A., Absar, N. Purification and characterization of three galactose specific lectins from Mulberry seeds (*Morus sp.*). Eur J Biochem. 2001. 268: 6005–6010.
148. Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., Barry, T. N. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. J Sci Food Agric. 1992. 58: 321-329.

149. Thompson, L. U. Tenebau, A. B. y Hui, H. Effect of lectins and the mixins of proteins on rate protein digestibility. 1986. J Food Sci. 51: 150-153.
150. Tobar, J. Bioavailability of Starch in processed legumes. Importance of physical inaccessibility and retrogradation. Tesis Doctoral, Universidad de Lund. 1992.
151. Tomassetti, P., Cometa, G., Del Vecchio, E., Baserga, M. Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. Cancer Genet Cytogenet. 1995. 79: 123-136.
152. Trago LC, Donangelo CM, Trago NMF, Knudsen KE. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. J Agric Food Chem 2000. 48: 2082-2086.
153. Tsien, E. L. Accumulation of soybean lectin-binding polysaccharide during growth of *Rhizobium japonicum* as determined by hemagglutination inhibition assay Schmidt. Appl Environ Microbiol. 1980. 39: 1100–1104.
154. Valadez Vega, M. C. Purificación, caracterización y propiedades bioactivas de las lectinas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*, var. Latifolius). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Sonora. Hermosillo, Sonora.
155. Valdés, A., Hernández, B. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2001. 17: 98-107.
156. Valle Vega, P. Lucas Florentino B. Toxicología de alimentos. Documento publicado por el Instituto Nacional de Salud Pública y el Centro Nacional de Salud Ambiental. México. 2000

157. Vargas, F., Maldonado, G., Montano, L. F. y Zenteno, E. Isolation and biological activity of *Phaseolus vulgaris* var. Cacahuate lectin. *Biol Biochem Clinical Biochemistry*. 1988. 6: 321-326.
158. Veríssimo, L. A. Leguminosas grano. En: *Enciclopedia practica de la agricultura y ganaderia*. Ed. Océano. 1999. 353-354.
159. Wendell, F. *Microbiología. Inmunohematología*. 1983. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 402-416.
160. Yagi, F., Iwaya, T., Haraguchi, T., Goldstein, I. J. The lectin from leaves of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb. (gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *Eur J Biochem*. 2002. 269: 4335–4341.
161. Young, N. M., Neurohr, K. J. y Williams, R. E. Unique effects of glycopeptides on the circular dichroism of concanavalin A, peanut agglutinin and the pea lectin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. 701: 142-145.
162. Zenteno, E., Ochoa, J. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochem*. 1988. 27: 313-317.

X. GLOSARIO

Anticuerpos: Proteínas pertenecientes al grupo de las gamma-globulinas o inmunoglobulinas, constituidas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro, dos cadenas se denominan pesadas y las otras dos ligeras. A su vez, cada una de las cadenas ligeras y pesadas, incluye una región variable, cuya secuencia de aminoácidos es peculiar de cada anticuerpo, y una región constante, con la misma secuencia en todos los anticuerpos.

Antígeno: Cualquier sustancia extraña que, introducida en el interior de un organismo, provoque una respuesta inmunitaria, estimulando la producción de anticuerpos.

Citoquinas: Mensajeros químicos diversos y potentes secretadas por las células de su sistema inmunológico. Representan las señales principales de comunicación de sus células T. Las citoquinas incluyen interleuquinas, factores de crecimiento e interferones.

Citotoxicidad: Estudio de los efectos tóxicos sobre determinadas células.

Edema: Acumulo anormal de líquido en los espacios intersticiales, saco pericardiaco, espacio intrapleural, cavidad peritoneal o capsulas articulares.

Epitelio: Cubierta o revestimiento de los órganos internos y externos del cuerpo. Está constituido por células unidas entre si por material conjuntivo dispuesto en un numero variable de capas de distintos tipos.

Eritrocito: Sinónimo de glóbulo rojo y de hematíe. Es una célula bicóncava, desprovista de núcleo, cuyo metabolismo es uno de los más reducidos. Asegura, sin embargo, el mantenimiento de dos funciones importantes: la función respiratoria (el transporte del oxígeno de los pulmones a los tejidos) y la

función de deformabilidad (propiedad por la que el eritrocito puede desplazarse por los pequeños vasos sanguíneos que son conocidos como capilares, los cuales son el lugar privilegiado de los intercambios nutricionales – gaseosos, hormonales, vitamínicos, etc.- entre las células de nuestro organismo).

Espectrofotometría: Es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, una determinada longitud de onda. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida. El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida.

Estroma: Tejido de sostén o matriz de un órgano, independiente del parénquima. Entre los distintos tipos de estroma se encuentran el estroma vítreo, que rodea el humor vítreo del ojo y el estroma de Rollet, que contiene la hemoglobina del hematíe.

Haptenos: Se define como hapteno aquel grupo químico definido, de pequeño tamaño, que por sí mismo es incapaz de desencadenar una respuesta inmune (es decir, no es inmunógeno), pero que unido covalentemente a una molécula portadora se comporta como inmunógeno (llegando a constituir el único determinante inmunodominante del conjugado).

Hemolinfa: Líquido incoloro, que lleva además un pigmento con función respiratoria (hemocianina). Transporta células como fagocitos (para digerir elementos extraños) y hemocitos (para transportar los pigmentos respiratorios).

Hiperplasia: Es el aumento en la producción de células en un órgano o tejido normales. Un exceso de tejido normal.

Interleuquina: Proteína con numerosas funciones en el sistema inmunitario. Hay cuatro tipos diferentes: IL1-IL4.

Interferon: Proteína celular natural formada cuando se exponen las células a un virus u otra partícula extraña de ácido nucleico. Puede amplificar la habilidad del sistema inmunológico para reconocer al cáncer como un invasor extraño.

Leishmaniasis: Infección producida por cualquiera de las especies del género *Leishmania*. Puede ser cutánea o visceral.

Linfocitos: Son las células responsables de las respuestas inmunitarias. Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células, así como de funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes, incluida la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B.

Metástasis: Transferencia de una enfermedad o proceso patológico desde un órgano o sector a otro no directamente conectado con el primero. Metástasis tumoral es la extensión discontinua de un tumor a territorio más o menos alejado de la neoplasia primaria, formándose un tumor secundario cuyas células parenquimatosas son semejantes a las del tumor de origen y no a las del órgano en que asienta la metástasis.

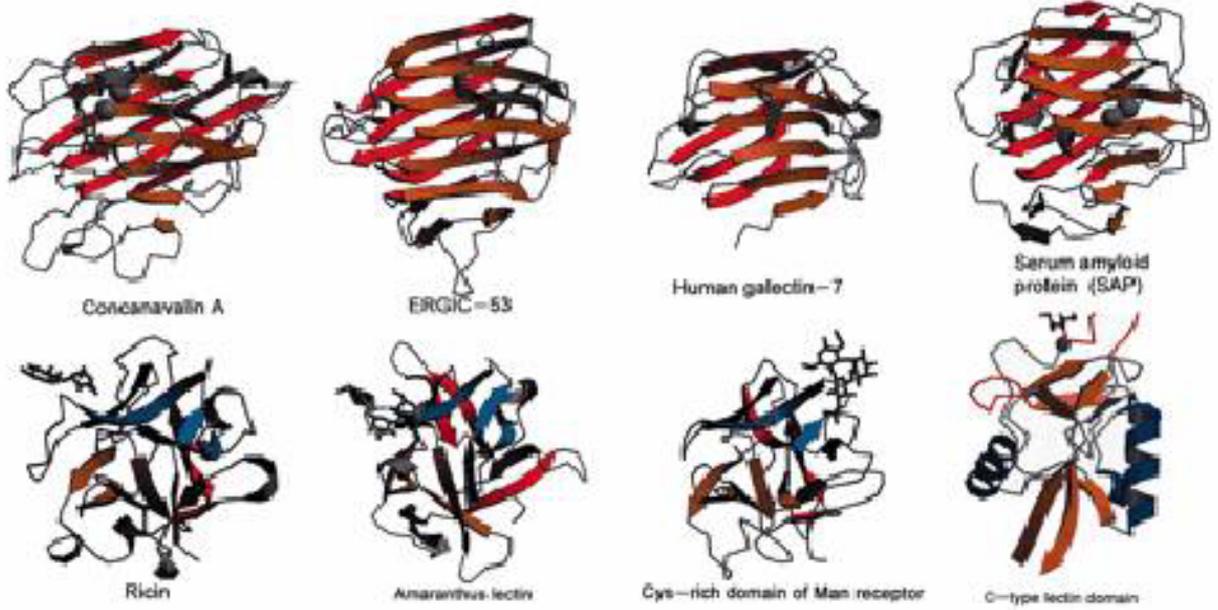
Mitogenicidad: Estudio de la inducción de la mitosis en una célula.

Mutagenicidad: Estudio de la alteración del material genético ocurrida en forma espontánea o por inducción que modifica la expresión original del gen. / Propiedad de una sustancia química de causar cambios permanentes en las características genéticas de un organismo.

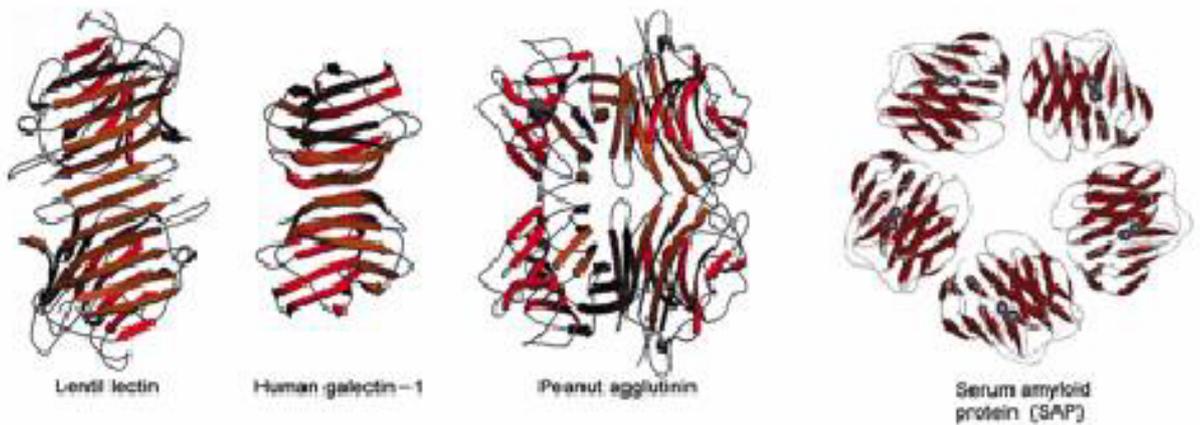
XI. ANEXOS

Anexo 1. Estructuras de lectinas extraídas de diversas fuentes.

A



B



Anexo 2. Tabla de clasificación de lectinas en base a su especificidad de carbohidratos.

Table 1. Specificity Groups^a

lectin				
source	name/abbrev	preferred oligosaccharide ^b	RA ^c	
mannose ^d				
jackbean	concanavalinA/ConA	Man α 6 (Man α 3)Man	130	
<i>Escherichia coli</i> ^e	type 1 fimbriae			
fava bean	favin			
<i>Galanthus nivalis</i> (snowdrop) ^e	GNL	Man α 6 (Man α 3)Man		
<i>Lathyrus ochrus</i>	LOL	octasaccharide		
lentil	LCL			
rat serum	MBP-A ^f			
pea	PSL	fucose-containing hexasaccharide		
N-acetylglucosamine				
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSII			
wheat germ	WGA	(GlcNAc β 4) ₃	3000	
galactose/N-acetylgalactosamine				
<i>Artocarpus integrifolia</i> (jackfruit)	jacalin	Gal β 3GalNAc		
<i>Dolichos biflorus</i> ^g	DBL	GalNAc α 3GalNAc	36 ^h	
<i>Erythrina corallodendron</i> (coral tree)	ECoRL	Gal β 4GlcNAc	30–50 ⁱ	
<i>Helix pomatia</i> (snail) ^e				
lima bean ^g	LBA	GalNAc α 3(Fuc α 2)Gal	43 ^h	
<i>Moluccella laevis</i> ^e (bells of Ireland)	MLL			
peanut ^g	PNA	Gal β 3GalNAc	50 ⁱ	
ricin	RCA II			
soybean ^d	SBA			
fucose				
<i>Argemone argemone</i> (eel)				
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA			
<i>Ulex europeus</i>	UEA I	Fuc α 2Gal β 4GlcNAc β 6R	900	
sialic acid				
<i>Sambucus nigra</i> (elderberry)		NeuAc α 2,3Gal	30–80	
		NeuAc α 2,6Gal	1600	
<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe crab)		NeuAc α 2,6GalNAc	30	

^a For references, see ref 8. ^b For structures of oligosaccharides not shown, see Table 3. ^c Relative affinity compared to that of the monosaccharide; usually based on hemagglutination inhibition assays. ^d Most lectins in this group bind also glucose, often with similar affinity. ^e Lectin does not bind glucose. ^f Although termed mannose binding, this lectin binds mannose, N-acetylglucosamine and fucose with roughly equal affinities. A similar protein, designated MBP-C is found in mammalian liver. ^g Lectin exhibits pronounced preference for N-acetylgalactosamine. ^h With N-acetylgalactosamine as reference monosaccharide. ⁱ With galactose as reference monosaccharide. ^j Does not bind N-acetylgalactosamine.

Anexo 3. Diversas funciones de las lectinas.

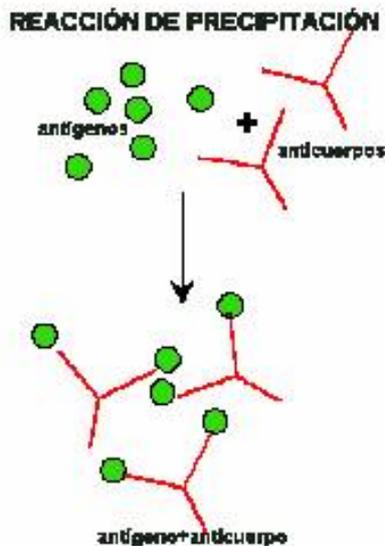
Lectina	Papel en:
Microorganismos	
Amibas	Infección
Bacterias	Infección
Virus de la influenza	Infección
Plantas	
Diversas	Defensa
Leguminosas	Simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno
Animales	
Calnexina, calreticulina, ERGIC-53	Control de la biosíntesis de glicoproteínas
Collectinas	Inmunidad
Dectina-1	Inmunidad
Galectinas	Regulación del crecimiento celular y apoptosis; regulación del ciclo celular; modulación de la interacción célula-célula y célula-sustrato
Receptor macrófago manosa	Inmunidad
Selectinas E y P	Transporta leucocitos a sitios inflamados
Siglecs	Interacciones célula-célula en el sistema inmunológico
Espermadesina	Interacciones del esperma

Anexo 4. Microfotografía del fenómeno de aglutinación de eritrocitos.



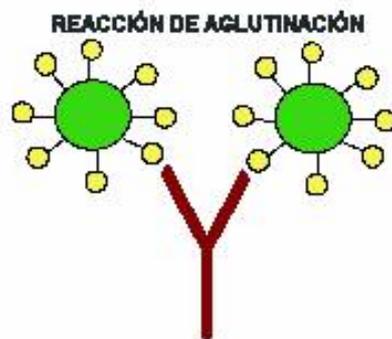
Anexo 5. Reacción antígeno-anticuerpo.

La unión antígeno-anticuerpo es específica, cada anticuerpo reconoce y se une a un determinado antígeno. Esta unión se realiza por medio de uniones intermoleculares entre el antígeno y la zona del anticuerpo, y da lugar al complejo antígeno-anticuerpo según el modelo llave-cerradura. Las reacciones antígeno-anticuerpo tienen diversas consecuencias y existen varios tipos de reacciones:



En este caso el antígeno se encuentra disuelto, y al unirse los anticuerpos a los antígenos se forman unos macrocomplejos moleculares, formándose como una red tridimensional que debido a su tamaño precipita.

En las reacciones de aglutinación, un anticuerpo puede unirse a la vez a dos antígenos, asimismo cada antígeno puede unirse a varios anticuerpos y formar un entramado de complejos antígeno-anticuerpo.



Anexo 6. Diversas aplicaciones de las lectinas.

Identificación y separación celular

Detección, aislamiento y estudios estructurales de glicoproteínas

Investigación de carbohidratos sobre células y organelos; histoquímica y citoquímica

Estimulación mitogénica de linfocitos

Limpieza del hueso para trasplantes

Selección de lectinas resistentes a mutantes

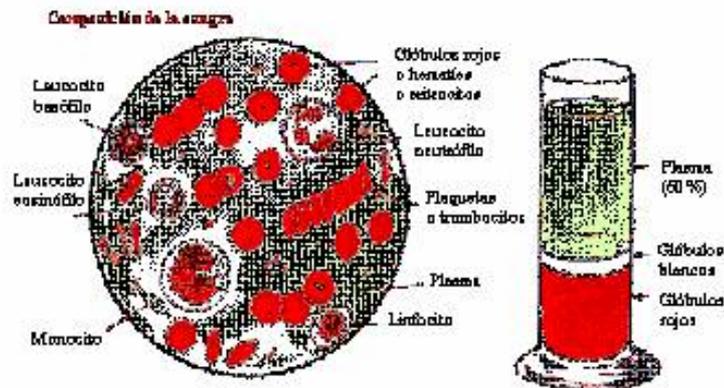
Estudios de la biosíntesis de glicoproteínas

Anexo 7. Separación de los componentes de la sangre.

El ficoll es un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa). Presenta un alto contenido en grupos hidroxilo por lo que tiene una buena solubilidad en medios acuosos. Además no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras. Es estable a pH neutro y alcalino. Debido a sus propiedades, el ficoll se ha utilizado para la separación de células y partículas subcelulares mediante centrifugación en gradiente de densidad que permite que las partículas a sedimentar se muevan por un gradiente de diferentes densidades, hasta que alcancen un punto donde su densidad y la del gradiente son idénticas. La separación de los componentes se puede realizar de forma ascendente utilizando una bomba peristáltica o de forma descendente por punción inferior del tubo y utilizar secuencialmente una serie de tubos recolectores para cada organelo.

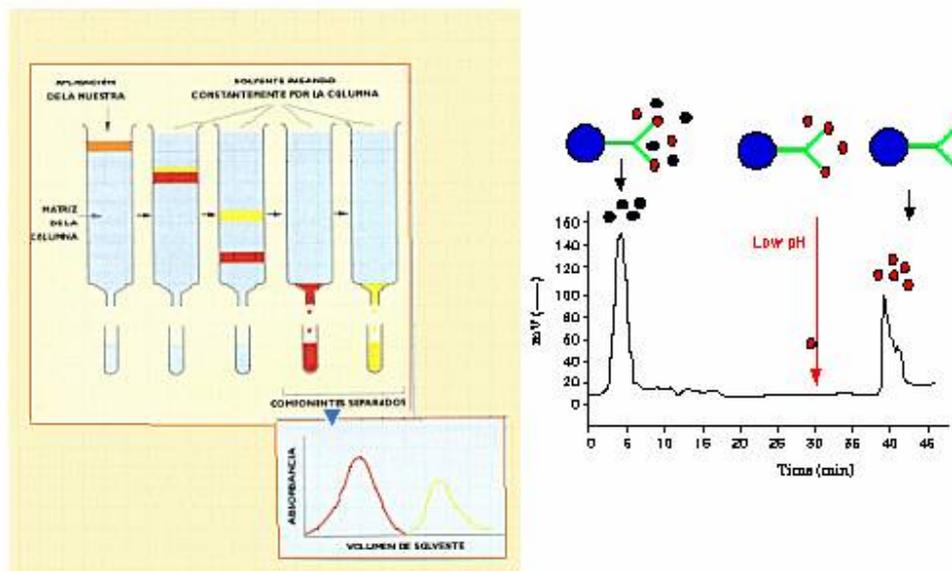


Aislamiento de linfocitos humanos (interfase) por centrifugación usando un gradiente de ficoll.

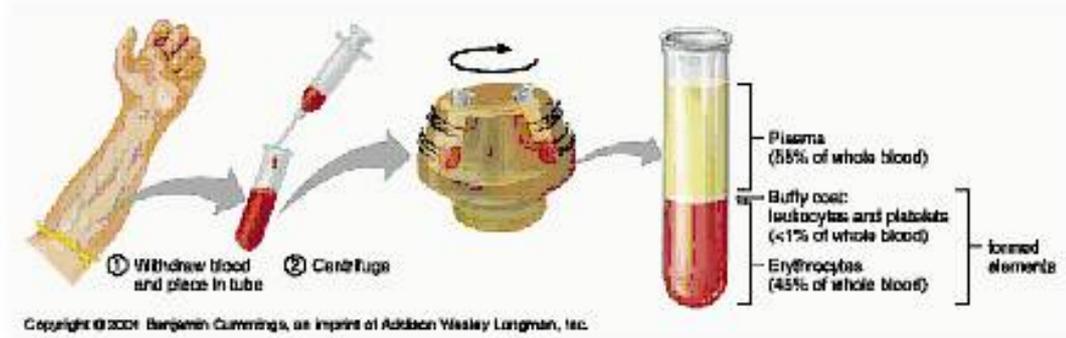


Anexo 8. Cromatografía de afinidad.

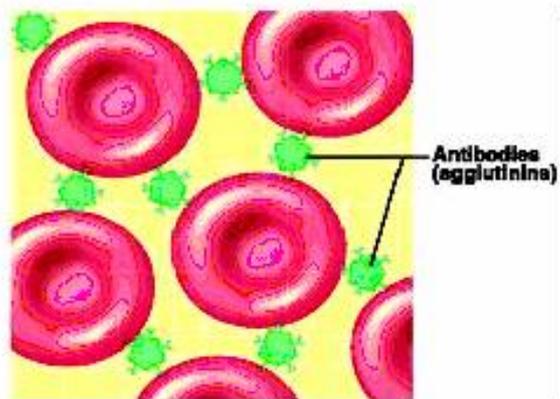
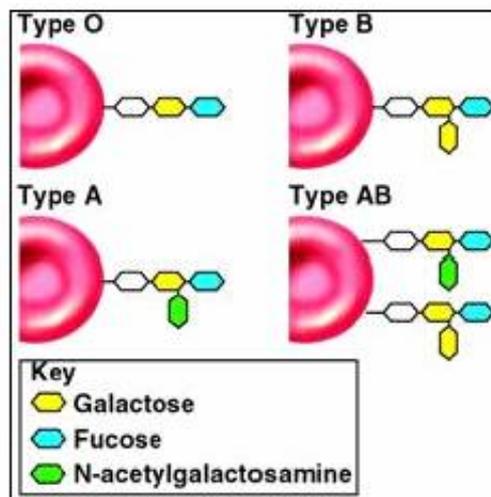
Permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna. Después de que las proteínas que no se unen al ligando son lavadas o eluidas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna se eluye o libera mediante el empleo de una solución que contiene bien ligando libre u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína.



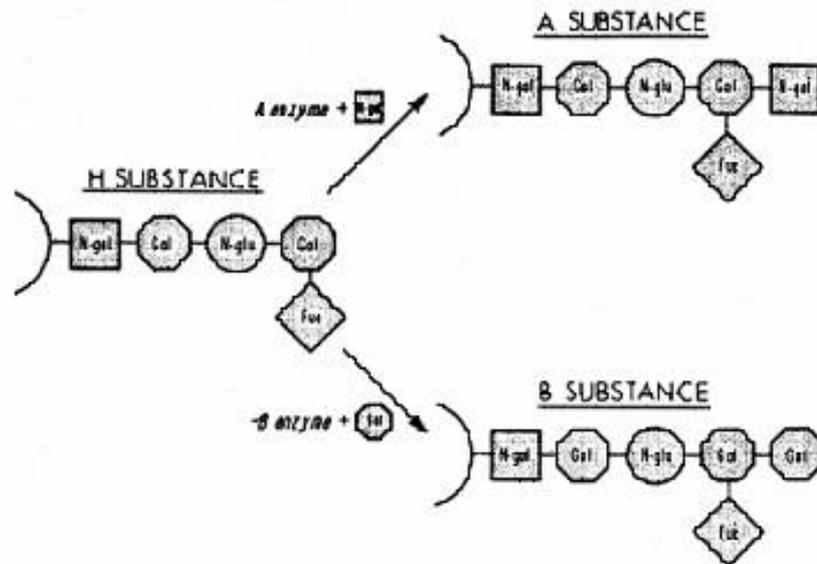
Anexo 9. Preparación de eritrocitos



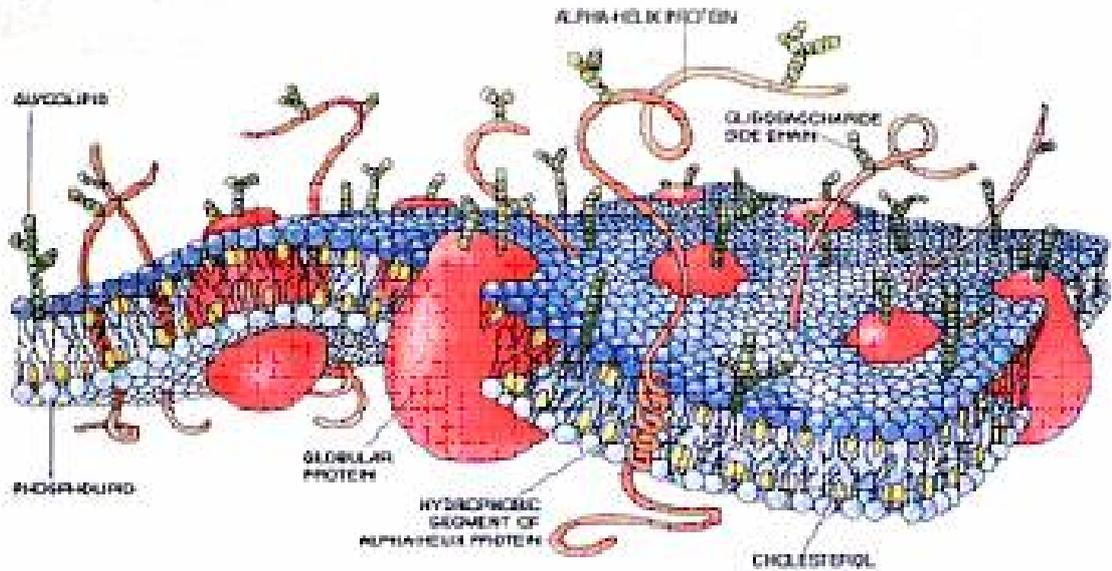
Anexo 10. El sistema de grupos sanguíneos ABO.



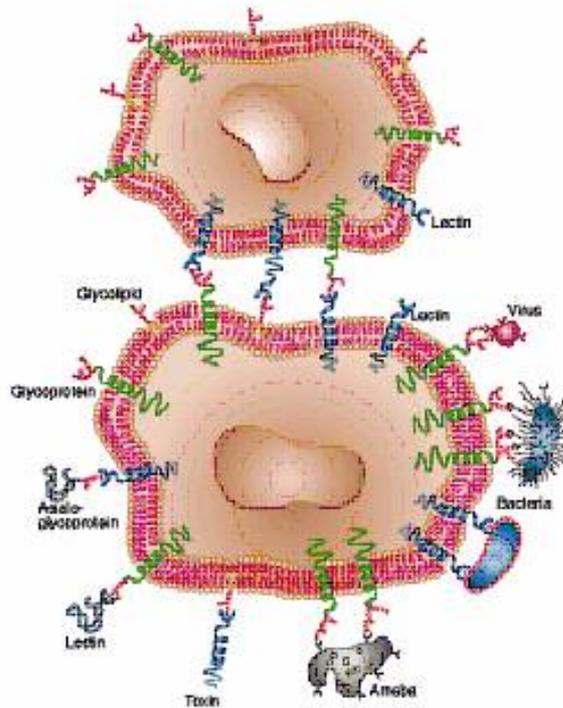
Anexo 11. Grupos sanguíneos ABO. Los antígenos son carbohidratos (H, A, B y AB).



Anexo 12. Membrana del eritrocito (bicapa lipídica).



Anexo 13. Interacciones lectina carbohidrato de la superficie celular.



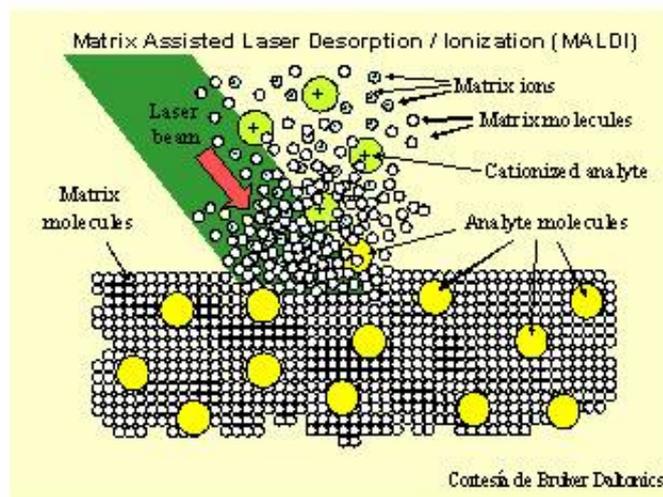
Anexo 14. Espectrometría de masas (MALDI-TOF).

La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa -carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos.

Ionización por MALDI

La muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocrystalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar,

normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa.



Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

El TOF es el analizador que más comúnmente se asocia con experimentos de MALDI, la determinación de la masa en una región de alto vacío se realiza mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector.

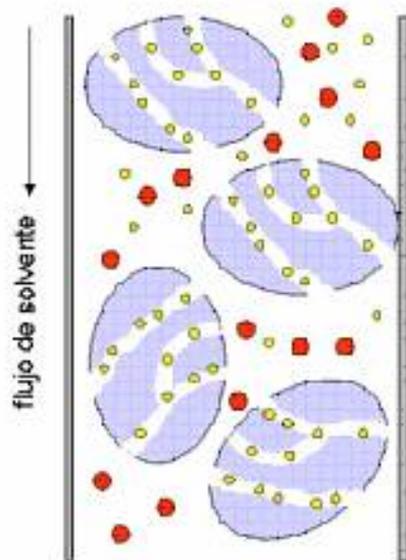
Anexo 15. Cromatografía por filtración en gel.

La cromatografía de exclusión o filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de dos o más sustancias en función de su tamaño molecular.

En la cromatografía de filtración en gel, se rellena una columna con partículas muy pequeñas de una sustancia inerte que contiene pequeños poros (gel). Para realizar la separación de moléculas de distinto tamaño, se aplica sobre el lecho del gel la muestra con estas moléculas.

Al ir realizando la elución, las moléculas con un tamaño mayor que el de los poros del gel se moverán sólo en el espacio que queda entre las partículas, no sufriendo, por lo tanto, retraso en su recorrido a través de la columna (se dice que quedan excluidas del gel). Por el contrario, las moléculas con un tamaño menor que el de los poros difunden hacia el interior y el exterior de éstos, con mayor probabilidad cuanto menor es su tamaño molecular. Por lo tanto, las moléculas eluyen de la columna por orden de tamaño decreciente.

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL



Las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las bolas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor.

Las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las bolas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es superior.

Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular.