



TESIS DE MAESTRÍA

**Purificación de las lectinas de *Vigna unguiculata* y su actividad
antioxidante**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA

IBQ. Pedro Mancera Castro

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Aurea Bernardino Nicanor

CO-DIRECTORA DE TESIS

Dra. María del Carmen Valadez Vega

Celaya, Gto., Junio 2021



Instituto Tecnológico de Celaya
Departamento de Ingeniería Bioquímica

Celaya, Gto., 09/Junio /2021
POSGRADO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
OFICIO No. PIBQ-01-36-2021
Asunto: Autorización de Impresión Tesis

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
PRESENTE

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada:

“Purificación de las lectinas de *Vigna unguiculata* y su actividad antioxidante”.

Presentada por el alumno: **C. Pedro Mancera Castro**, con número de control **M1903031**, Aspirante al Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron **APROBAR y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

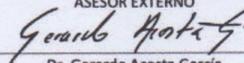
ATENTAMENTE
*La técnica por un México mejor **
EL COMITÉ TUTORIAL



Dra. A. reza Bernardino Nicanor
DIRECTOR DE TESIS

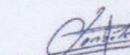

Dr. Leopoldo González Cruz
SECRETARIO



Dra. María del Carmen Valadez Vega
ASESOR EXTERNO


Dr. Gerardo Acosta García
VOCAL

COORDINADOR DE LA MAestrÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Dr. Leopoldo González Cruz
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
en Celaya

C.c. p. Dr. Gerardo Acosta García. - Presidente del Consejo de Posgrado

**POSGRADO DE INGENIERÍA
BIOQUÍMICA**

LGC/mgg



Av. Antonio García Cubas #600 esq. Av. Tecnológico, Colonia
Alfredo V. Bonfil, C.P. 38010 Celaya, Gto.
Tel. 01 (461) 611 75 75
e-mail: lince@celaya.tecnm.mx
tecnm.mx | celaya.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Celaya, Gto., 14 de junio de 2021

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Asunto: CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

DR. JOSÉ LÓPEZ MUÑOZ

DIRECTOR DEL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CÉLAYA

P R E S E N T E

En la Ciudad de Celaya, Guanajuato, México, el día 14 del mes de junio del año 2021, el que suscribe **C. Pedro Mancera Castro**, alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica** con No. de control **M1903031**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra. Aurea Bernardino Nicanor**, y cede los derechos del presente trabajo titulado **“Purificación de las lectinas de *Vigna unguiculata* y su actividad antioxidante”** al **Tecnológico Nacional de México - Instituto Tecnológico de Celaya** para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos obtenidos en la investigación sin el permiso del autor o directora del trabajo. Este podrá ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: **pedromancera.ibq@gmail.com** y **aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

A T E N T A M E N T E

C. Pedro Mancera Castro

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química y Bioquímica de Alimentos perteneciente al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya

Este trabajo de investigación fue financiado por el Tecnológico Nacional de México (clave: 7757.20-P)

Pedro Mancera-Castro agradece a CONACYT por la beca de estudios de Maestría (No. CVU 958449)

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Lectinas	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Clasificación	2
1.2. Lectinas vegetales	4
1.3. Lectinas de leguminosas	8
1.3.1. Generalidades	8
1.3.2. Ubicación de la lectina (en plantas y semillas).....	8
1.3.3. Función de las lectinas dentro y fuera de la célula vegetal	9
1.3.3.1. Funciones externas	9
1.3.3.2. Funciones internas	10
1.3.4. Características estructurales	10
1.3.4.1. Estructura primaria	10
1.3.4.2. Estructura secundaria.....	11
1.3.4.3. Estructura terciaria.....	12
1.3.4.4. Estructura cuaternaria	13
1.3.4.4.1. Isolectinas	13
1.3.5. Contenido de iones y carbohidratos.....	16
1.4. Purificación de lectinas de leguminosas	18
1.5. Género <i>Vigna</i>	22
1.5.1. Generalidades	22

1.5.2. <i>Vigna unguiculata</i>	23
1.5.2.1. Generalidades	23
1.5.2.2. Taxonomía	24
1.5.2.3. Composición proximal	25
1.5.2.4. Estudios sobre la actividad biológica de las proteínas de <i>V. unguiculata</i>	25
1.6. Actividad antioxidante.....	26
1.6.1. Estrés oxidativo	26
1.6.2. Actividad antioxidante.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS.....	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1. Materiales	31
2.1.1. Material vegetal	31
2.1.2. Material biológico	31
2.2. Métodos	31
2.2.1. Obtención de harina.....	31
2.2.2. Obtención del concentrado proteínico	31
2.2.3. Extracción y purificación de lectinas.....	32
2.2.4. Determinación de proteína soluble	32
2.2.5. Determinación de la actividad hemaglutinante	32
2.2.5.1 Preparación de eritrocitos	32
2.2.5.2. Actividad hemaglutinante (AH)	33
2.2.6. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	34
2.2.6.1 Tratamiento de la muestra	34
2.2.6.2. FRAP	34

2.2.6.3. ABTS*+	34
2.3. Estrategia experimental.....	36
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Material vegetal	37
3.2. Contenido de proteína en harina de frijol vaquita	38
3.3. Purificación de lectinas de frijol vaquita	38
3.4. Actividad hemaglutinante	41
3.5. Efecto de las etapas de purificación de las lectinas sobre la actividad antioxidante	41
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS	45
REFERENCIAS	46
ANEXO 1: curvas de calibración.....	60
ANEXO 2: Productividad.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de lectinas hacia otras moléculas, células y organismos.....	2
Figura 2. Comparación de secuencia de aminoácidos de subunidades de lectinas de leguminosas con diferente especificidad a carbohidratos de reconocimiento e identificación de zonas de aminoácidos conservados (resaltados en azul).	11
Figura 3. Estructura secundaria, A) representación en subunidades; B) representación gráfica [cadena beta (color verde), cadena alfa (color azul), vueltas (color rosa), estructura desconocida en UniProKB (color gris)].....	12
Figura 4. Estructura terciaria de una subunidad de la lectina concavalina A. a) representación gráfica de una subunidad; b) representación de un dímero	12
Figura 5. Diferentes estructuras cuaternarias de lectinas de leguminosas conocidas en la actualidad	13
Figura 6. Interacción de iones metálicos en la lectina Concanavalina A y su sitio de unión al carbohidrato α -metil-manósido	16
Figura 7. Subunidades de lectinas que presentan glicosilación (glicoproteínas) y no glicosilación	18
Figura 8. Relación y distribución de subgéneros pertenecientes al género <i>Vigna</i>	22
Figura 9. Especies domesticadas del género <i>Vigna</i> que representan la diversidad en la morfología de las semillas.....	23
Figura 10. Morfología (<i>V. unguiculata</i>): A) diferentes fenotipos de semilla, B) flor, C) vaina y hojas.....	24
Figura 11. Protocolo para preparación de eritrocitos al 2% en PBS. (A) colecta de sangre; (B) sangre en tubos con anticoagulante; (C) centrifugación; (D) lavados con PBS; (E) centrifugación; (F) paquete globular (eritrocitos).....	33
Figura 12. Estrategia experimental.....	36
Figura 13. <i>Vigna unguiculata</i> . A) semillas. B) grosor, C) largo y ancho de la semilla.....	37
Figura 14. Cromatograma de la purificación de lectina de frijol vaquita (<i>Vigna unguiculata</i>) por cromatografía de afinidad (matriz fetuína-agarosa).	39

Figura 15. Efecto de las etapas de purificación de lectina de frijol vaquita sobre la actividad antioxidante: A) radical ABTS* ⁺ y B) radical FRAP.....	43
Figura 16. Curva de calibración – Actividad antioxidante: FRAP [100-1000 μM de Trolox como estándar].....	60
Figura 17. Curva de calibración – Actividad antioxidante: ABTS [100-1000 μM de Trolox como estándar].....	60
Figura 18. Curva de calibración – Determinación de proteína soluble: método Bradford [0.1-0.6 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar]	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes clasificaciones de lectinas y sus características	3
Tabla 2. Características de lectinas de diferentes plantas.....	5
Tabla 3. Clasificación de lectinas de origen vegetal en función de su estructura y proteínas relacionadas con la evolución.....	6
Tabla 4. Purificación y caracterización estructural, bioquímica y biológica de isolectinas de especies de la familia Fabaceae	15
Tabla 5. Purificación y parámetros de purificación de algunas lectinas de leguminosas.....	19
Tabla 6. Matriz de afinidad y buffers empleados en la purificación de lectinas de diferentes leguminosas	21
Tabla 7. Caracterización taxonómica de frijol vaquita (<i>V. unguiculata</i>).....	24
Tabla 8. Composición proximal y principales componentes bioactivos de <i>V. unguiculata</i>	25
Tabla 9. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS).....	26
Tabla 10. Purificación de lectinas de frijol vaquita (<i>Vigna unguiculata</i>) ¹	40
Tabla 11. Actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos (A y O) de las lectinas del frijol vaquita (<i>V. unguiculata</i>)	41

RESUMEN

Las lectinas son proteínas que no son producto de una respuesta inmune, muestran especificidad al unirse a carbohidratos y otras glicoproteínas, de forma libre o enlazados a membranas celulares, causando su aglutinación o precipitación. La aplicación de estas biomoléculas se ha extendido en diversas áreas de la medicina, inmunología, glicobiología, farmacología, entre otras. Las lectinas pueden ser obtenidas de fuentes vegetales, animales o microbiológicas, entre las más ampliamente utilizadas y estudiadas se encuentran aquellas de origen vegetal, en donde las leguminosas representan una fuente importante de estas moléculas. Sin embargo, las lectinas obtenidas a partir del género *Vigna* han sido poco estudiadas, como es el caso de la especie *Vigna unguiculata* (frijol vaquita). Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue realizar la purificación de las lectinas de *Vigna unguiculata* y evaluar la actividad antioxidante de esta proteína. El frijol fue obtenido del municipio de Tulancingo, Hidalgo; y se determinó dimensiones (largo, ancho y grosor) y contenido de proteína cruda (método Kjeldahl). Las lectinas fueron purificadas por medio de cromatografía de afinidad (matriz fetuína-agarosa) a partir del extracto proteínico obtenido por medio de precipitación por sulfato de amonio; el proceso de purificación fue monitoreado por medio de la cuantificación de la proteína soluble (método de Bradford), absorbancia (280 nm) y la hemaglutinación de eritrocitos humanos A y O. La actividad antioxidante se evaluó con los métodos FRAP y ABTS. Las semillas presentaron un tamaño promedio de 1.08 ± 0.13 cm largo, 0.60 ± 0.06 cm ancho y 0.75 ± 0.05 cm grosor y contienen 22.78 % de proteína. La lectina se logró separar entre las fracciones 54 a 68, alcanzando una actividad específica de 11906.98 UH/mg con un grado de purificación de 69.30 y rendimiento de 0.44%. La actividad hemaglutinante fue de 512 UH en eritrocitos del grupo A y B. La actividad antioxidante de la lectina ($236.9 \mu\text{mol ET/g}$) determinada por ABTS, fue 4 veces mayor, en comparación con el extracto proteínico ($58.7 \mu\text{mol ET/g}$) y 5 veces superior a la mostrada por la harina ($48.6 \mu\text{mol ET/g}$), mientras que con el método de FRAP la lectina no mostró actividad, debido posiblemente a las condiciones de pH del medio que al parecer afectan la actividad de la lectina, sin embargo, la harina presentó $10.7 \mu\text{mol ET/g}$ y el extracto proteínico $8.3 \mu\text{mol ET/g}$. Este estudio presenta la base para una posterior caracterización bioquímica y de estabilidad a diferentes agentes fisicoquímicos y enzimáticos, así como su posible aplicación en el área biológica y médica.

ABSTRACT

Lectins are proteins that are not the product of an immune response. They show specificity by binding to carbohydrates and glycoproteins, in free form or link to cell membranes, causing their agglutination or precipitation. The application of these biomolecules has been extended to diverse areas of medicine, immunology, glycobiology pharmacology, among others. Lectins can be obtained from vegetal, animal, or microbiological sources, but vegetal lectins are the most widely used and studied, where legume lectins represent an important source of these molecules. However, lectins obtained from the *Vigna* genus have been little studied, as is the case with the cowpea seeds (*Vigna unguiculata*). The objective of the present study was to carry out the purification from *Vigna unguiculata* and to evaluate the antioxidant activity of this protein. For this purpose, cowpea seeds were used from Tulancingo, Hidalgo; and their dimensions (length, width, and thickness) and crude protein were determined (by Kjeldahl's method). The lectins were purified by affinity chromatography (fetuín-agarose matrix) from the proteinic extract obtained by precipitation with ammonium sulfate, and the purification process was monitored by soluble protein quantification (Bradford's method), absorbance (280 nm), and hemagglutination (human erythrocytes A and O). Antioxidant activity was evaluated by FRAP and ABTS methods. The seeds presented a mean size of 1.08 ± 0.13 cm length, 0.60 ± 0.06 cm width, and 0.75 ± 0.05 cm thickness, and their protein content was 22.78%. The lectin was possible to separate between fractions 54 to 68, obtaining a specific activity of 11906.98 UH/mg with a purification factor of 69.30 and 0.44% yield. The hemagglutinating activity was 512 UH on human erythrocytes (A and O). The antioxidant activity of lectin determined by the ABTS method; was 4-fold greater than proteinic extract ($58.7 \mu\text{mol ET/g}$) and 5-fold superior to flour ($48.6 \mu\text{mol ET/g}$). In the FRAP method, lectin did not show activity, possibly, due to the pH-medium conditions that appear to affect the activity of the lectin, causing its precipitation, however, flour and proteinic extract showed $10.7 \mu\text{mol ET/g}$ and $8.3 \mu\text{mol ET/g}$, respectively. This study represents the basis for subsequent biochemical characterization and stability to different physical-chemical and enzymatic agents. As well as its possible application in the biological and medical area.

INTRODUCCIÓN

Lectinas se denominan a las proteínas que se combinan con mono y oligosacáridos de forma reversible y con alta especificidad; a diferencia de los anticuerpos que se unen a carbohidratos, no son producto de una respuesta inmune y carecen de actividad catalítica. Las lectinas pueden actuar como moléculas de reconocimiento dentro y en la superficie de las células, destacando su reconocimiento biológico con otras células, microorganismos o biomoléculas, teniendo la capacidad de aglutinar células o precipitar glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos). Por lo cual, su aplicación se ha extendido en la medicina, inmunología, farmacéutica, entre otras áreas. Los principales estudios y aplicaciones que se han llevado a cabo con lectinas es la evaluación de su actividad antitumoral y antimetastática en diferentes líneas celulares y la activación de linfocitos (células inmunitarias); así como aplicaciones más avanzadas como la tipificación de sangre, identificación y separación celular. Estas moléculas pueden ser obtenidas y purificadas a partir de fuentes microbianas, animales o vegetales, estas últimas son las más estudiadas, principalmente aquellas provenientes de la familia de las leguminosas.

Las leguminosas se caracterizan por proporcionar un alto contenido de proteínas y carbohidratos complejos, como fibra dietética y almidón resistente, y bajos niveles de lípidos, además de ser una fuente importante de minerales y vitaminas. Además, proporcionan compuestos bioactivos que contribuyen a la prevención de enfermedades crónicas. En el género *Vigna* se han encontrado diferentes componentes bioactivos como taninos, compuestos fenólicos, fibra dietaria, almidón resistentes, y proteínas biológicamente activas como inhibidores de tripsina y lectinas, pero su estudio ha sido poco o muy limitado.

Por lo cual, en el presente trabajo se realizó la purificación de las lectinas de *Vigna unguiculata* y la determinación de su actividad antioxidante, con la finalidad de sentar las bases sobre su estabilidad, estructura, y así determinar su posible actividad biológica.

1. ANTECEDENTES

1.1. Lectinas

1.1.1. Generalidades

Lectinas provienen del latín, *legere*, que significa “seleccionar o elegir”, las cuales, son las proteínas o glicoproteínas que se combinan con mono y oligosacáridos de forma reversible con alta especificidad; a diferencia de los anticuerpos que se unen a carbohidratos, no son producto de una respuesta inmune (Hamid *et al.*, 2013; Sharon & Lis, 2013), carecen de actividad catalítica hacia el carbohidrato al que se unen, ya que no lo modifican, como las enzimas específicas a carbohidratos (quinasas, glucosidasas, etc.) (Sharon & Lis, 2013). Las lectinas pueden actuar como moléculas de reconocimiento dentro de las células y en las superficies celulares (**Figura 1**), destacando su reconocimiento biológico célula-célula, célula-virus, célula-bacteria, célula-ameba; y las interacciones lectina-glicoproteína, lectina-toxina, lectina-lectina, lectina-glicolípido (Sharon & Lis, 2004), teniendo la capacidad de aglutinar células o precipitar glicoconjugados (glicoproteínas, glicolípidos) (Mishra *et al.*, 2019).

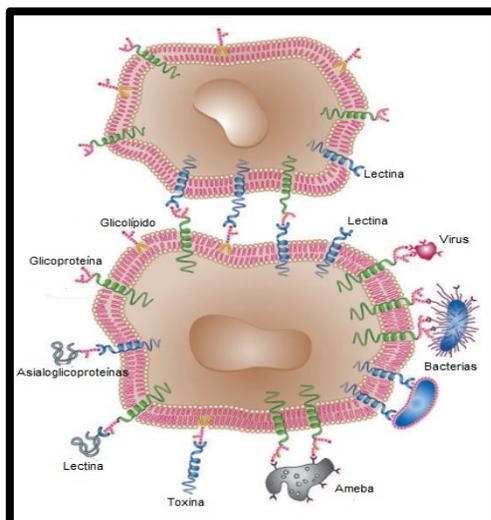


Figura 1. Interacción de lectinas hacia otras moléculas, células y organismos

Fuente: Modificada de Sharon & Lis, 2004

1.1.2. Clasificación

Las lectinas son una familia heterogénea de proteínas de unión a carbohidratos con diferentes estructuras moleculares, propiedades bioquímicas y biofísicas, y muy probablemente presentan diversas funciones biológicas (Peumans & Van Damme, 1995; Tsaneva & Van Damme, 2020; Van Damme *et al.*, 1998). Debido a esta heterogeneidad es posible clasificar a las lectinas de acuerdo con diferentes criterios: 1) en función de los dominios de unión a carbohidratos, 2) por su origen,

3) por su contenido de carbohidratos y 4) en función de su estructura y proteínas relacionadas con la evolución (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diferentes clasificaciones de lectinas y sus características

Clasificación		Características	Referencia
En función de los dominios de unión a carbohidratos	Merolectinas	Un único sitio de unión a carbohidratos	Mishra <i>et al.</i> , 2019; Peumans & Van Damme, 1995
	Hololectinas	Al menos dos dominios de unión hacia carbohidratos, los cuales son idénticos o muy homólogos. Son capaces de aglutinar células y precipitar glicoconjugados	
	Quimerolectinas	Contienen un dominio de unión a carbohidratos, está marcado con otro dominio que tiene actividad enzimática.	
	Superlectinas	Son una clase distinta de hololectinas, ya que poseen dos dominios de unión a carbohidratos no idénticos que reconocen azúcares estructuralmente diferentes	
Por su origen	Microorganismos	Presentes en virus, bacterias, hongos y levaduras. Sirven como moléculas de reconocimiento y unión hacia las células diana, participan en el proceso de infección de las células	Mishra <i>et al.</i> , 2019; Sharon & Lis, 2004
	Animales	Se dividen en familias según el carbohidrato o dominio al que se unen: galectinas, RBL, CTL, XTL, P, F y pentraxinas. Participan en la defensa directa, reconocimiento celular y modulación del sistema inmune	
	Vegetales	Se encuentran en todos los órganos y tejidos, principalmente en semillas cortezas, bulbos y rizomas. Participan en la defensa contra la depredación (humanos y animales), insectos y patógenos	
Por su contenido de carbohidratos	Glicoproteínas	Estos carbohidratos no parecen ser necesarios en la unión de la lectina con su carbohidrato específico o en la actividad biológica de la lectina	Sharon & Lis, 1990
	No glicoproteínas		
En función de su estructura y proteínas relacionadas con la evolución	FLTA	Familia de lectinas tipo amaranto	Van Damme <i>et al.</i> , 1998
	FLUQ	Familia de lectinas tipo unión a quitina	
	FLFC	Familia de lectinas del floema <i>Cucurbitaceae</i>	
	FLRJ	Familia de lectinas relacionadas con jacalina	
	FLMM	Familia de lectinas de monocotiledóneas con unión a manosa	
	RIP	Proteínas inactivadoras de ribosomas tipo 2	
FLL	Familia de lectinas de leguminosas		

RBL: lectinas de unión a ramnosa. CTL: lectinas de tipo C. XTL: lectinas de tipo X. P: lectinas de tipo P. F: lectinas de tipo F.

1.2. Lectinas vegetales

Las lectinas de origen vegetal se encuentran en todas las estructuras de la planta, pero algunos tejidos son fuentes muy ricas en esta macromolécula, como son las semillas, cortezas, bulbos, rizomas, etc., pero también se han detectado lectinas en raíces, brotes, hojas y flores, aunque en cantidades mucho menores (Van Damme *et al.*, 1998), como se observa en la **Tabla 2**. En cuanto a cantidad, las lectinas vegetales representan del 0.1 a 10% de proteína total en semillas o tejidos vegetales, siendo las semillas de leguminosas las de mayor abundancia (Tsaneva & Van Damme, 2020; Van Damme, 2014). Las lectinas de origen vegetal juegan un papel importante en la defensa contra los depredadores (animales herbívoros y el hombre), insectos y patógenos (hongos y bacterias) (Ribeiro *et al.*, 2018; Van Damme *et al.*, 1998).

Las lectinas vegetales generalmente se consideran un grupo muy heterogéneo de proteínas porque los estudios bioquímicos comparativos indican claramente que difieren entre sí con respecto a sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, estructura molecular, especificidad de unión a carbohidratos y actividades biológicas, pero es posible clasificar a las familias en grupos de acuerdo con las características de la proteína o del dominio de unión a carbohidratos (Van Damme *et al.*, 1998). Se han clasificado en siete grupos (**Tabla 3**), siendo todos estudiados y caracterizados, como son: Tipo amaranto, lectinas de unión a quitina, lectinas del floema *Cucurbitaceae*, lectinas relacionadas con jacalina, lectinas de monocotiledóneas con unión a manosa, proteínas inactivadoras de ribosomas.

Tabla 2. Características de lectinas de diferentes plantas

Familia o tribu	Lectina representativa	Especificidad carbohidrato	Composición	Peso molecular ¹	Subunidades	Fuente
Diocleae	Concavalina A	α -D-manosa (D-glucosa)	Rica en Asx y Ser; poca Met; no contiene Cys y CH	104 000	Tetramero de subunidades idénticas	Semilla
Vicieae	Favina	α -D-manosa (D-glucosa)	Rica en Asx y Thr; poca Met o Cys; 3% CH	53 000	Tetramero de 2 cadenas (PM 5 571) 2 cadenas (PM 20 700)	Semilla
Phaseoleae	Soya	α -D-GalNAc ²	Rica en Asx, Ser, Leu y Ala; poca Met; no contiene Cys; 7% de CH	120 000	Tetramero de subunidades idénticas o casi idénticas	Semilla
Loteae	<i>Lotus tetragonolobus</i>	α -L-fucosa	Rica en Asx, Ser y Thr; poca Met; no contiene Cys; 8% de CH	120 000	Tetramero de subunidades idénticas	Semilla
Hedysareae	Cacahuate	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc ²	Rica en Asx, Ser y Thr; poca Met; no contiene Cys y CH	110 000	Tetramero de subunidades idénticas	Semilla
Caesalpinoideae	<i>Griffonia simplicifolia</i>	β y α -D-GlcNAc ³	Rica en Ser, Asx, Thr, Gly y Leu; poca Met; 4% de CH	113 000	Tetramero de subunidades idénticas	Semilla
Euphorbeaceae	<i>Ricinus communis</i> aglutinina	β -D-galactosa	Rica en Asx, Glx, Ser, Thr, Leu y Ile; poca Cys, Met y Phe; 12% CH	120 000	Tetramero de 2 cadenas (PM 32 000) 2 cadenas (PM 36 000)	Semilla
Solanaceae	Papa	Oligomeros de β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc ³	Rica en hidroxiprolina, Cys, Ser y Gly; no contiene Phe; 50% CH; rica en arabinosa	50 000 100 000	Mezcla de monómero y dímero	Tub

¹ Da-Daltón. ² N-acetil-D-galactosamina. ³ N-acetil-D-glucosamina. PM: peso molecular; CH: carbohidratos; Tub: tubérculo; Asx: ácido aspártico; Ser: serina; Met: metionina; Cys: cisteína; Thr: treonina; Leu: leucina; Ala: alanina; Gly: glicina; Glx: glutamina; Ile: isoleucina; Phe: fenilalanina.

Fuente: Modificado de Etzler, 1985

Tabla 3. Clasificación de lectinas de origen vegetal en función de su estructura y proteínas relacionadas con la evolución

Grupo	Especies representativas y evolución	Estructura molecular	Especificidad de unión a CH	Hemaglutinación	Rol fisiológico
FLTA	Especies de la familia de <i>Amaranthus</i> . Su secuencia no es similar a la lectina de otra familia	Representan del 3-5 % de la proteína soluble. Son proteínas homodiméricas compuestas de subunidades de aprox. 33kDa, que no están glucosiladas. El polipéptido tiene 299 residuos y consta de dos dominios homólogos	La lectina es inhibida por GalNAc pero tiene una afinidad mayor hacia el disacárido Gal β (1,3)GalNAc	Sin especificidad serológica en humanos y en varias especies animales	No es tóxica, ni tiene propiedades antinutricionales en humanos y animales. En plantas tiene función de defensa contra depredadores
FLUQ	Proteínas que contienen al menos un “dominio de heveina” (proteína de 43 aminoácidos del árbol <i>Hevea brasiliensis</i>) que tiene unión a quitina	Son merolectinas, hololectinas o quimerolectinas. Estructura monomérica o dimérica de aproximadamente 8-70 kDa cada subunidad dependiendo la familia	Quitina [(GlcNAc) _n] y algunas familias muestran afinidad hacia el ácido siálico	Sin especificidad serológica en humanos, y algunas lectinas no presentan hemaglutinación	Dependiendo la familia, pero protegen a la planta de hongos, bacterias, insectos
FLFC	Lectinas que se encuentran en el floema de especies de <i>Cucurbitaceae</i> con unión a quitina, pero no tienen dominio de heveina	Estructura dimérica, compuesta de subunidades idénticas de aproximadamente 25 kDa, que no están glucosiladas.	Oligomeros de GlcNAc (de 3-9 residuos)	---	Este tipo de lectinas reacciona con otra proteína que se encuentra en el floema formando un gel, que en caso de heridas en la planta las bloquea

FLRJ	Jacalina es el nombre para la lectina de las semillas (<i>Artocarpus integrifolia</i>). En la actualidad, el término se utiliza como un nombre colectivo para todas las lectinas que están relacionadas en estructura y evolución con la lectina jacalina	Representan aprox. el 50% de la proteína soluble. Esta familia comprende dos subgrupos con estructura diferente: 1) tetrámero con subunidades idénticas y 2) dímero con subunidades idénticas que no están glucosiladas	Comprende dos subgrupos con una especificidad de unión a carbohidratos diferentes: 1) residuos terminales de α -D-galactosilo Gal β (1,3)GalNAc; 2) manosa/maltosa	---	No existen estudios concluyentes, pero existe la hipótesis que en la semilla sirve como proteína de almacenamiento con una característica adicional que es la defensa contra depredadores
FLMM	Se refiere a una superfamilia específica a manosa y solo se han encontrado en plantas monocotiledóneas	Tetrámero de subunidades idénticas de 12 kDa cada una	Son específicas para manosa, principalmente si se encuentra en oligosacáridos	Algunas no presentan hemaglutinación	No se conoce a detalle la función en las plantas
RIP	Se conocen comúnmente como proteínas que inactivan catalíticamente los ribosomas eucariotas	Son quimerolectinas, ya que tienen dominio enzimático y dominios de unión a carbohidratos	La mayoría son específicos hacia Gal o GalNAc, o ambos	Presentan hemaglutinación, pero presentan toxicidad alta, ejemplo la ricina	En plantas su función es la defensa contra predadores. Toxicidad intermedia a alta en animales y humanos
FLL	Lectinas que se encuentran exclusivamente en la familia <i>Leguminosae</i>	Dímeros o tetrámeros, glicosilados o no, con subunidades idénticas o no de aproximadamente 20-50 kDa	Difieren mucho con la especificidad hacia carbohidratos	Hemaglutinación en eritrocitos humanos y animales	Defensa contra predadores y simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno

FLTA: familia de lectinas tipo amaranto; FLUQ: familia de lectina tipo unión a quitina; FLFC: familia de lectina del floema *Cucurbitaceae*; FLRJ: familia de lectinas relacionadas con jacalina; FLMM: familia de lectina de monocotiledóneas con unión a manosa; RIP: proteínas inactivadoras de ribosomas tipo 2; FLL: familia de lectinas de leguminosas; Gal: galactosa; GalNAc: N-acetil-galactosamina; GlcNAc: N-acetil-glucosamina.

Fuente: compilado de Van Damme *et al.*, 1998.

1.3. Lectinas de leguminosas

1.3.1. Generalidades

Las lectinas de leguminosas representan la familia más grande y estudiada, ya que se han estudiado más de 100 miembros de esta familia, aislados de 70 géneros diferentes. La mayoría de estas moléculas se han aislado de semillas maduras, y representan generalmente del 1 al 10% de la proteína soluble total; en algunas especies, se han observado concentraciones de lectina más altas (hasta el 50%), mientras que en otras menos del 0.1% (Sharon & Lis, 2002).

Las lectinas de leguminosas pueden obtenerse fácilmente en forma purificada y exhiben una asombrosa variedad de especificidades hacia carbohidratos (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos) y glicoproteínas (Sharon & Lis, 2002).

Las lectinas de leguminosas han sido de importancia en la disciplina científica, ya que varias se han convertido en herramienta indispensable en la investigación biológica y biomédica, utilizándose ampliamente en la medicina, agricultura, biotecnología y en el desarrollo de herramientas para la detección de enfermedades (Tsaneva & Van Damme, 2020; Van Damme *et al.*, 1998).

1.3.2. Ubicación de la lectina (en plantas y semillas)

Varias semillas de leguminosas contienen una, dos o más lectinas diferentes, que se encuentran predominantemente en las células del parénquima de almacenamiento de los cotiledones de semillas maduras (Etzler, 1985). Además de los cotiledones, en algunos casos se ha informado cantidades apreciables de lectinas en los embriones y pequeñas cantidades en las cubiertas de las semillas (Etzler, 1986). A estas lectinas se les denomina como “lectinas clásicas” (Van Damme, 2014).

Por otra parte, se ha demostrado que las lectinas de leguminosas se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso para posteriormente entrar a la vía secretora. El transporte intracelular ocurre desde el retículo endoplásmico rugoso a través del aparato de Golgi hasta las vacuolas (Van Damme *et al.*, 1998). Las lectinas de las leguminosas se encuentran ubicadas en vacuolas proteínicas de almacenamiento (también conocidas como cuerpos proteínicos) (Etzler, 1985). Sin embargo, existen reportes que confirman que también es posible encontrarlas en la pared celular (Van Damme, 2014).

Existe otro grupo de lectinas que se denominan “lectinas inducibles”, ya que las plantas sintetizan cantidades mínimas de proteínas que se unen a carbohidratos al exponerse a situaciones de estrés como sequía, alto contenido de sal, tratamiento con fitohormonas, ataque de patógenos, insectos, etc. Este tipo de lectinas se localizan en el núcleo y/o citoplasma de las células vegetales. Se sabe de la importancia de la interacción proteína-carbohidrato mediada por lectinas en el citoplasma y el núcleo donde desempeñan un papel importante en la fisiología de estrés de la célula (Van Damme, 2014).

1.3.3. Función de las lectinas dentro y fuera de la célula vegetal

Se ha estudiado la función o funciones biológicas que tienen las lectinas dentro y fuera de la célula, sin embargo, no ha sido esclarecido completamente, ya que, aunque las lectinas de leguminosas presentan secuencias homologas, no se les puede atribuir tan fácilmente una función biológica en común, ya que la especificidad hacia carbohidratos puede ser variable. Pero se pueden dividir las funciones biológicas en dos posibles grupos: Funciones externas; donde la lectina se une a ligandos (carbohidratos) de fuente extrañas como animales, hongos, bacterias, etc. participando principalmente como proteína de defensa; y otro grupo donde la lectina interactúa con ligandos (carbohidratos) de la planta y/o semilla, donde tiene alguna función fisiológica y participa como auténtica proteína de almacenamiento (Rüdiger & Gabius, 2002; Van Damme *et al.*, 1998).

1.3.3.1. Funciones externas

La investigación sobre la función de las lectinas en plantas y semillas ha sido muy extensa, y en la actualidad se sigue con la elucidación de los mecanismos que regulan estas funciones (Tsaneva & Van Damme, 2020). Como primer punto, en su entorno natural las plantas suelen estar expuestas a estrés abiótico (hídrico, por temperatura y por nutrientes), y para hacer frente a estos problemas, algunas plantas han desarrollado una sofisticada gama de respuestas fisiológicas, como es la expresión de lectinas, lo que da como resultado plantas con mayor resistencia y rendimiento (Lannoo & Van Damme, 2014).

Respecto al estrés biótico se ha documentado que las lectinas participan en la defensa de la planta contra bacterias, virus, hongos y levaduras al inhibir su crecimiento y propagación (Coelho *et al.*, 2017; Lannoo & Van Damme, 2014), sin embargo, se requieren estudios más completos para elucidar la base molecular, ya que la capacidad para inhibir el crecimiento difiere entre especies y familias de microorganismos (Lagarda-Diaz *et al.*, 2017). Se ha confirmado que algunas lectinas

vegetales, principalmente las de leguminosas, provocan efectos tóxicos que van desde una leve molestia, desnutrición, respuesta alérgica, hasta la intoxicación mortal en insectos y/o animales. La razón es que muchas lectinas reconocen residuos de carbohidratos que se encuentran presentes en la superficie de las células epiteliales expuestas a lo largo del tracto intestinal, y representan sitios de unión potenciales para las lectinas de leguminosas, y destaca la resistencia de la lectina a la proteólisis enzimática (Peumans & Van Damme, 1995; Van Damme, 2014; Van Damme *et al.*, 1998).

Otra función externa que se ha estudiado, es la participación en la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces, ya que las lectinas se unen a restos de carbohidratos de la superficie bacteriana y aglutinan las bacterias, favoreciendo la fijación de nitrógeno (De Hoff *et al.*, 2009; Rüdiger & Gabius, 2002).

1.3.3.2. Funciones internas

Se han formulado muchas hipótesis sobre la función de las lectinas de leguminosas en la célula, sin embargo, se sigue investigando, con el fin de elucidar los mecanismos fisiológicos y moleculares que presentan estas moléculas en la célula vegetal (Ambrosi *et al.*, 2005; John *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente las lectinas se encuentran predominantemente en las células del parénquima de almacenamiento de los cotiledones de semillas maduras, y destacan por su participación como proteína de almacenamiento, que generalmente se degradan durante la germinación, lo antes mencionado es una hipótesis, sin embargo, esto no responde por qué las lectinas poseen sitios de unión para carbohidratos (Etzler, 1986; Rüdiger & Gabius, 2002). Esto lleva a otras hipótesis, como es la participación como agentes de control en la diferenciación y división celular, particularmente en el proceso de germinación (Etzler, 1986; Rüdiger & Gabius, 2002; Sharon & Lis, 2002); y el transporte de carbohidratos en la planta y semillas (Corredor Casas *et al.*, 2016; Rüdiger & Gabius, 2002).

1.3.4. Características estructurales

1.3.4.1. Estructura primaria

La estructura primaria de las lectinas de esta familia es notablemente homóloga, con aproximadamente 20% de aminoácidos idénticos, los cuales son resaltados en azul en la **Figura 2** (Rameshwaram *et al.*, 2009). Los aminoácidos conservados incluyen varios de los que participan

en enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión a carbohidratos, y casi todos los sitios que coordinan los iones metálicos (Sharon & Lis, 2001).

Las subunidades que forman las lectinas de leguminosas están formadas por una sola cadena polipeptídica con un promedio de aproximadamente 250 aminoácidos, aunque existe evidencia de que algunas subunidades de lectinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas (Peumans *et al.*, 2001).

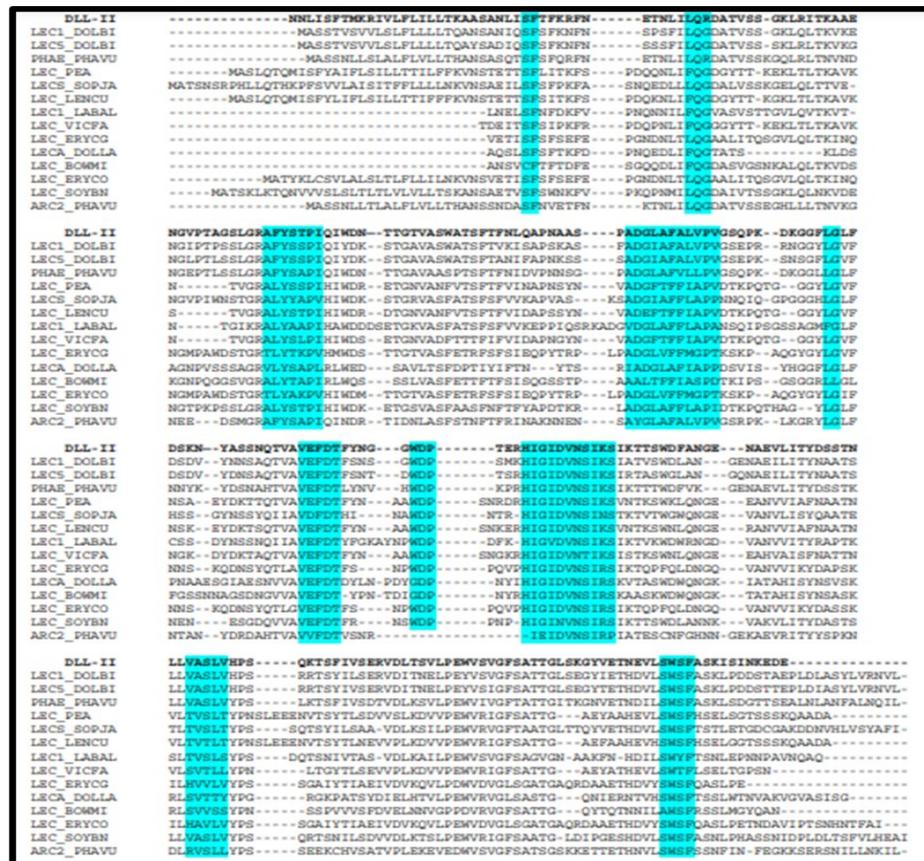


Figura 2. Comparación de secuencia de aminoácidos de subunidades de lectinas de leguminosas con diferente especificidad a carbohidratos de reconocimiento e identificación de zonas de aminoácidos conservados (resaltados en azul).

La secuencia de aminoácidos la obtuvieron de la base de datos UniProtKB y el alineamiento de múltiples secuencias con el programa CLUSTAL W 1.82. *Dolichos biflorus* (DLL-II, LEC5_DOLBI, LEC1_DOLBI), *Phaseolus vulgaris* (PHAE_PHAVU, ARC2_PHAVU), *Vicia faba* (LEC_PEA, LEC_VICFA), *Sophora japonica* (LECS_SOPJA), *Lens culinaris* (LEC_LENCU), *Laburnum alpinum* (LEC1_LABAL), *Dolichos lablab* (LECA_DOLLA), *Erythrina corallodendron* (LEC_ERYCO), *Bowringia mildbraedii* (LEC_BOWMI), Glycine max (LEC_SOYBN)

Fuente: Rameshwaram *et al.*, 2009

1.3.4.2. Estructura secundaria

En la **Figura 3** se demuestra que en lectinas de leguminosas, aproximadamente el 60% de los elementos de su estructura secundaria se componente de hebras/cadenas β (Srinivas *et al.*, 2001).

Cada subunidad está constituida por $\approx 12-18$ hebras β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles (giros), lo que genera una estructura aplanada en forma de domo (**Figura 3A**). La mayoría de los aminoácidos que no se encuentran en una estructura definida, se encuentran en bucles y curvas que conectan el resto de la estructura de la lectina, como se puede observar en la **Figura 3B** (Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

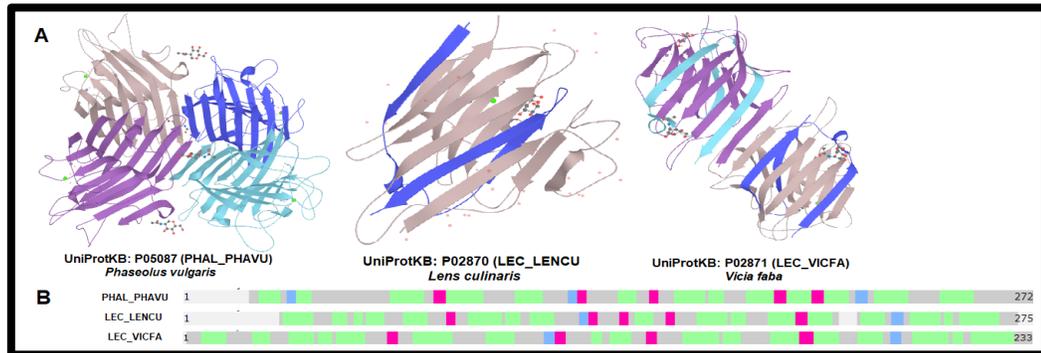


Figura 3. Estructura secundaria, A) representación en subunidades; B) representación gráfica [cadena beta (color verde), cadena alfa (color azul), vueltas (color rosa), estructura desconocida en UniProKB (color gris)]

1.3.4.3. Estructura terciaria

Las subunidades de las lectinas de leguminosas presentan una arquitectura tipo “jelly-roll”, la cual se muestra en la **Figura 4**, que es una estructura β -sándwich, caracterizada por la presencia de 2 β -hojas antiparalelas. En la parte “trasera” se encuentra una β -hoja plana conformada por aproximadamente 6 hebras, en la parte “delantera” una β -hoja curva conformada de aproximadamente 7 hebras, sin embargo, éstas dos hojas se encuentran conectadas por una β -hoja plana de 5 hebras que forma el “techo”. (Ambrosi *et al.*, 2005; Srinivas *et al.*, 2001).

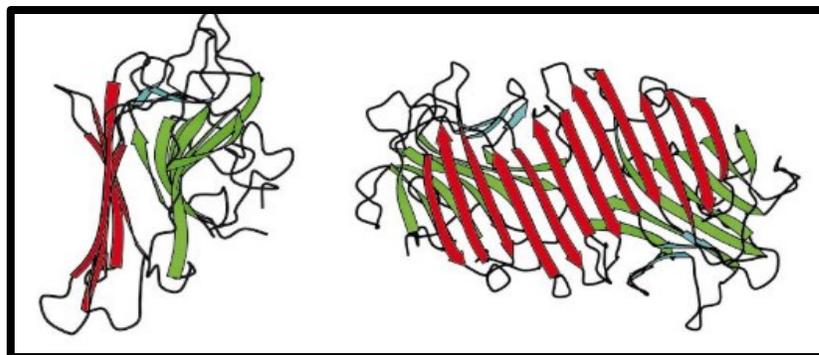


Figura 4. Estructura terciaria de una subunidad de la lectina concavalina A. a) representación gráfica de una subunidad; b) representación de un dímero

Fuente: Srinivas *et al.* (2001)

1.3.4.4. Estructura cuaternaria

Con respecto a su estructura cuaternaria, las lectinas de leguminosas son tradicionalmente subdivididas en dos categorías. Un grupo consta de lectinas con subunidades idénticas o casi idénticas, mostrando homogeneidad; el otro grupo se caracteriza por tener subunidades no idénticas o heterogéneas, las cuales al unirse pueden formar isolectinas/isoformas (Peumans *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). Como se puede observar en la **Figura 5**, en lectinas de leguminosas la unión de subunidades puede formar principalmente dímeros o tetrámeros, cada una con mínimo un sitio de unión a carbohidratos (Sharon & Lis, 2002); también teniendo en cuenta que cada subunidad puede estar formada por una o dos cadenas polipeptídicas, y glicosiladas o no, por tanto, se distinguen 8 posibles estructuras cuaternarias de lectinas de leguminosas (Peumans *et al.*, 2001).

Es de importancia la estructura cuaternaria en el reconocimiento específico hacia carbohidratos complejos. De igual manera, la actividad biológica de las lectinas puede estar determinada por la disposición espacial de sus lugares de unión a azúcares, que determinan la capacidad para distinguir azúcares y glicoconjugados (glicolípidos y glicoproteínas) en la superficie celular (Dam & Brewer, 2004; Shiniti Nagano, 2007).

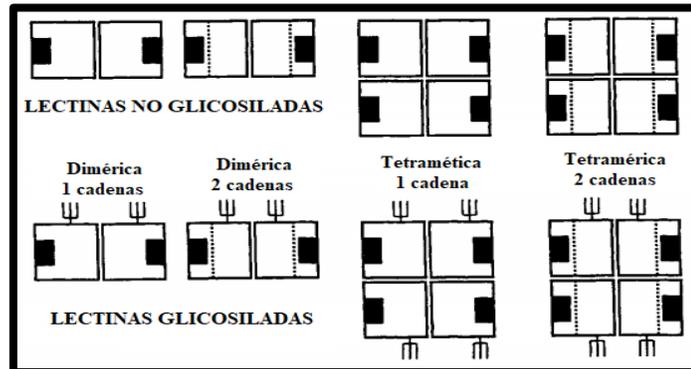


Figura 5. Diferentes estructuras cuaternarias de lectinas de leguminosas conocidas en la actualidad

Fuente: Modificado de Peumans *et al.* (2001)

1.3.4.4.1. Isolectinas

Las isolectinas o isoformas de lectinas, se forman con la unión de diferentes subunidades y en diferentes orden de unión, dando como resultado lectinas con diferente actividad biológica y características estructurales y fisicoquímicas (**Tabla 4**) (Elola & Fink, 1995; Peumans *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). Como se ha mencionado, existen secuencias conservadas en la estructura primaria, secundaria y la terciaria de lectinas de leguminosas, sin embargo, la estructura cuaternaria puede presentarse en dímeros y tetrámeros, con una gran variabilidad en la secuencia en la que se asocian las subunidades (Brinda *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2001).

Una de las primeras lectinas purificadas fue la fitohemaglutinina (PHA) de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), la cual presenta un peso molecular nativo de aproximadamente 125 kDa con estructura tetramérica. Esta lectina presenta cinco isolectinas/isoformas tetraméricas con proporciones variables de subunidades polipeptídicas reactivas a leucocitos o reactivas a eritrocitos. La subunidad leucoaglutinante (L-PHA) se une a los linfocitos con un alto grado de especificidad; y la subunidad eritroaglutinante (E-PHA) aglutina eritrocitos, pero no linfocitos. La isolectina E₄ aglutina solamente eritrocitos y la isolectina L₄ solo actúa en leucocitos. Los tetrámeros E₃L₁, E₂L₂ y E₁L₃ presentan actividad eritroaglutinante y leucoaglutinante en proporción a la cantidad de cada tipo de subunidad (Zenteno *et al.*, 1994).

La purificación de isolectinas o isoformas presentes en leguminosas se puede llevar a cabo por técnicas cromatográficas como es la filtración en gel (Paiva & Coelho, 1992), cromatoenfoco (Datta *et al.*, 1988) y la más utilizada la cromatografía de intercambio (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007; Guzmán-Partida *et al.*, 2004; Paiva & Coelho, 1992; Zenteno *et al.*, 1994). La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas en función de las diferencia en la carga superficial de las moléculas, por lo tanto, la separación se lleva a cabo por las interacciones de las proteínas con la fase estacionaria (Fekete *et al.*, 2015). La matriz se encuentra altamente cargada, positiva (intercambio aniónico) o cargada negativamente (intercambio catiónico). Las proteínas con una carga superficial neta opuesta a la de la fase estacionaria se unirá a la resina. Para eluir las proteínas se utiliza un gradiente que va de concentración baja a alta de una disolución salina, comúnmente se utiliza NaCl, para intercambiar las proteínas por aniones (Cl⁻) o cationes (Na⁺) (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

Para la detección de isoformas o isolectinas se pueden utilizar diferentes herramientas como es la electroforesis (condiciones nativas, SDS-PAGE, en dos dimensiones). También es posible detectar isolectinas, cuando en las primeras etapas de purificación se utilizan la cromatografía de intercambio iónico, ya que a cada pico presente en el cromatograma de purificación se le realiza hemaglutinación (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007).

En la caracterización estructural de las isolectinas se utilizan técnicas electroforéticas convencionales y para conocer las diferencias entre la secuencia de aminoácidos, las bandas de los geles de electroforesis se digieren con tripsina, y los fragmentos de péptidos se determinan mediante MALDI-TOF (ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo) (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007; Guzmán-Partida *et al.*, 2004).

Tabla 4. Purificación y caracterización estructural, bioquímica y biológica de isolectinas de especies de la familia Fabaceae

Especie	Isolectina	Purificación	Caracterización estructural, bioquímica y biológica	Referencia
<i>Cratylia molis</i> Mart	Iso 2	Filtración en gel	PM/S de 60 kDa. Aglutina eritrocitos sin especificidad. Carbohidrato específico: α -metilmanósido. No es glicoproteína. pH isoeléctrico: 4.15-6.7	Paiva & Coelho (1992)
	Iso 3	Cromatografía intercambio iónico	PM/S de 31 kDa. Aglutina eritrocitos sin especificidad. Carbohidrato específico: D-galactosa. Es glicoproteína. pH isoeléctrico: 5.25-5.8	
<i>Acacia constricta</i>	VL2		PMN: 133 kDa. PM/S: 34 kDa. Estructura tetramérica. pH isoeléctrico: 5.5-7.3. Especificidad hacia la tiroglobulina principalmente. Aglutina eritrocitos sin especificidad ABO. Es glicoproteína.	Guzmán-Partida <i>et al.</i> (2004)
	VL3	Cromatografía de intercambio catiónico	PMN: 133 kDa. PM/S: 34 kDa. Estructura tetramérica. pH isoeléctrico: 5.5-7.9. Especificidad hacia la asialofetuína principalmente. Aglutina eritrocitos sin especificidad ABO. Es glicoproteína.	
	VL4		PMN: 133 kDa. PM/S: 34 kDa. Estructura tetramérica. pH isoeléctrico: 6.5-8.4. Especificidad hacia la asialofetuína principalmente. Aglutina eritrocitos sin especificidad ABO. Es glicoproteína.	
<i>Phaseolus acutifolius</i> var. <i>escumite</i>	FI FII FIII FIV	Cromatografía de intercambio iónico	PMN: 121 kDa. PM/S: 30 kDa. Es glicoproteína. Aglutina eritrocitos sin especificidad ABO y animales. Actividad mitogénica en linfocitos. Especificidad hacia glicoproteínas. Difiere en la secuencia de aminoácidos.	Castillo-Villanueva <i>et al.</i> (2007)
<i>Vigna umbellata</i>	P1	Cromatoenfoco	PMN: 80 kDa. PM/S: 40 kDa (doble cadena polipeptídica de 18 y 22 kDa). Estructura dimérica. Especificidad hacia eritrocitos tipo A. Especificidad hacia la N-acetilgalactosamina.	Datta <i>et al.</i> (1988)
	P1		PMN: 100 kDa. PM/S: 25 kDa. Estructura tetramérica. Especificidad hacia grupo tipo B. Especificidad hacia la galactosa.	
<i>Vigna unguiculata</i>	α -AP	Cromatografía de afinidad	PM/S: 28 kDa. Actividad antifúngica y antiviral. Inhibe α -glucosidasa.	Ye <i>et al.</i> (2000)
	β -AP		PM/S: 12 kDa. Actividad antifúngica y antiviral. Inhibe α - y β -glucosidasa.	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	L ₄	Cromatografía de intercambio iónico	MI: 34. AE: 0.5.	Zenteno <i>et al.</i> (1994)
	L ₃ E ₁		MI: 29. AE: 1.4.	
	L ₂ E ₂		MI: 18. AE: 12.2.	
	L ₁ E ₃		MI: 5. AE: 20.4.	
	E ₄		MI: 1. AE: 41.8.	
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA I	Cromatografía hidrofóbica	Aglutina eritrocitos desialilados tipo O. PM/S: 24.5 kDa. Especificidad hacia la lactosa. Se observaron diferencias en el contenido de aminoácidos y estabilidad a temperatura.	Ortiz <i>et al.</i> (2000)
	PNA II			
	PNA III			
	PNA IV			

PM/S: peso molecular/subunidad. PMN: peso molecular en condiciones nativas. MI: índice mitogénico. AE: actividad específica (unidades de hemaglutinación/ μg proteína).

1.3.5. Contenido de iones y carbohidratos

Las lectinas de leguminosas son el único grupo de lectinas que contienen en su estructura cationes divalentes en sitios de unión a metales específicos (Van Damme *et al.*, 1998). Los principales cationes metálicos que se encuentran presentes son Ca^{2+} y Mn^{2+} (Weis & Drickamer, 1996), y los residuos de aminoácidos que son necesarios para la unión de estos cationes metálicos, están marcadamente conservados en todas las lectinas de leguminosas (Peumans *et al.*, 2001), tal como se observa en la **Figura 6**, siendo el ácido aspártico y la asparagina los aminoácidos que se coordinan con los cationes metálicos antes mencionados; estos aminoácidos participan indirectamente en la unión de la lectina con su carbohidrato específico (T. K. Dam & Brewer, 2007).

Los iones metálicos confieren un alto grado de estabilidad estructural en las lectinas de leguminosas, dándoles estabilidad térmica y resistencia a proteólisis (John *et al.*, 2013); y se ha concluido que son de vital importancia para que la lectina tenga la capacidad de unirse al carbohidrato al que muestra especificidad (Zhang *et al.*, 2008), ya que se encuentran muy cerca de los sitios de unión a carbohidrato, lo que ayuda a formar una conformación estable llamada “cerrada” (Brewer *et al.*, 1983), cuando se desioniza la molécula se pierde el sitio de unión de la lectina con su carbohidrato específico, y por ende la actividad biológica (T. K. Dam & Brewer, 2007).

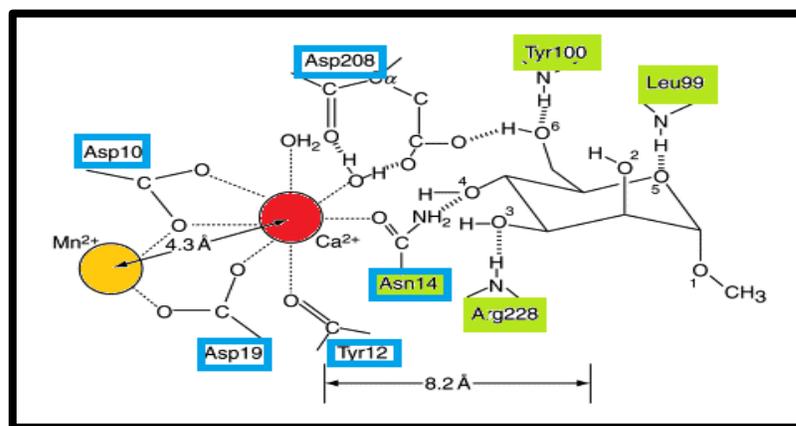


Figura 6. Interacción de iones metálicos en la lectina Concanavalina A y su sitio de unión al carbohidrato α -metilmanósido

Círculo color rojo representa el ion Ca^{2+} , círculo color amarillo ion Mn^{2+} , cuadros color azul representan los aminoácidos que se unen a los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , cuadros de color verde representan los aminoácidos que participan en el sitio de unión a carbohidratos. Nomenclatura de aminoácidos: Asp, ácidos aspártico; Asn, asparagina; Tyr, tirosina; Arg, arginina; Leu, leucina.

Fuente: Modificada de Naismith *et al.* (1994)

Diferentes estudios han evaluado el efecto que tiene el desionizar con agentes quelantes la estructura de las lectinas sobre su estabilidad y actividad biológica. Jiang *et al.* (2019) desionizaron una fracción de lectina de frijol Zihua Snap (*Phaseolus vulgaris*) con EDTA y evaluaron su actividad hemaglutinante, encontrando que esta se perdió completamente después del proceso. Posteriormente, se evaluó el efecto de agregar iones metálicos a la lectina desionizada, como: Cu^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Ca^{2+} ; demostrando que los cationes Cu^{2+} , Na^+ , Ba^{2+} , K^+ , Fe^{2+} y Fe^{3+} , no tuvieron un efecto de restaurar la actividad de hemaglutinación de la lectina, mientras que los iones Mn^{2+} y Ca^{2+} restauraron completamente la actividad hemaglutinante, y Mg^{2+} de forma parcial. Concluyendo que la desionización es un proceso reversible, pero solo con los iones esenciales; además la estructura de la lectina tuvo efectos conformacionales, cambiado a una estructura “abierta” cuando es desionizada, y “cerrada” cuando se encuentra en forma nativa, lo cual influye en la pérdida de la actividad biológica (Jiang *et al.*, 2019).

La mayoría de las lectinas de leguminosas son glicoproteínas, que contienen hasta un 10% de carbohidratos, la forma es una N-glicosilación, donde los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina. En la **figura 7** se muestra que los constituyentes de carbohidratos pueden ser de dos tipos: 1) N-acetilglucosamina y manosa, 2) xilosa con o sin L-fucosa; se ha demostrado que estos carbohidratos no parecen ser necesarios en la unión de la lectina con su azúcar específico o en la participación en las actividades biológicas (aglutinación de células, etc.) (Sharon & Lis, 1990).

Sin embargo, la N-glicosilación de proteínas vegetales juega un papel importante para muchos procesos biológicos, incluidos el plegamiento de proteínas, estabilidad de las proteínas, ensamblaje, las interacciones proteína-proteína o la función biológica, pero el requisito para cada uno de estos procesos es específico para cada glicoproteína (Hebert *et al.*, 2014; Strasser, 2016; Vitale & Bollini, 1995). También se ha estudiado y concluido que la N-glicosilación de proteínas vegetales puede contribuir en la alergenicidad en modelos animales y humanos (Marsh *et al.*, 2011).

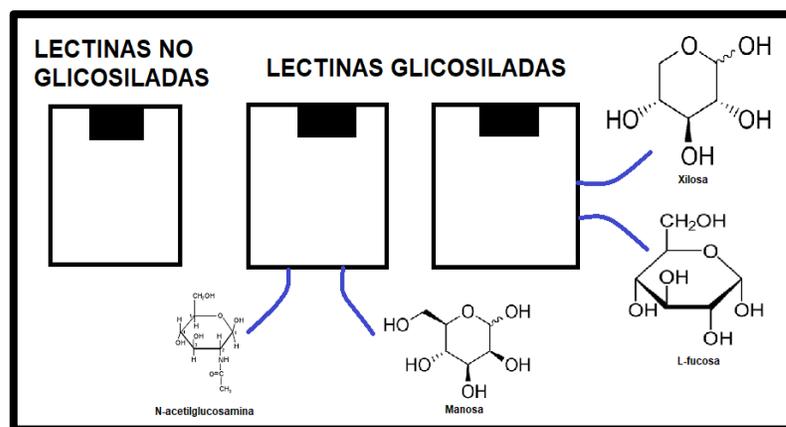


Figura 7. Subunidades de lectinas que presentan glicosilación (glicoproteínas) y no glicosilación

1.4. Purificación de lectinas de leguminosas

El proceso de purificación de lectinas puede comenzar con el pretratamiento de las semillas o harina de las leguminosas con el fin de evitar interferencias que podrían afectar la purificación. Como puede ser el retiro de la testa de la semilla, esto por el contenido de taninos y colorantes que podrían llegar a alterar la precipitación de las proteínas y/o provocar daños irreversibles a la columna cromatográfica usada en la purificación (He *et al.*, 2018). De igual manera, se pueden llevar a cabo procesos de pre extracción de los lípidos o grasas con disolventes orgánicos (por ejemplo: metanol o éter dietílico) en leguminosas donde el contenido de aceite es mayor (soya o cacahuate) en comparación con otras especies (Goldstein & Poretz, 1986).

Después, el aislamiento generalmente comienza con una extracción de la proteína soluble con una disolución salina o buffer a pH casi neutro (valores entre 6 y 8) (Goldstein & Poretz, 1986); como segunda etapa, es la concentración de proteínas, mediante la precipitación de estas por efecto de sales (sulfato de amonio, etc.), ácidos (ácido acético, etc.) o disolventes orgánicos (acetona, etc.) (Lam & Ng, 2011). Sin embargo, estas etapas (extracción de proteína soluble y precipitación de proteína) no son decisivas en el proceso de purificación, ya que se puede llevar solo una, dependiendo la decisión de los investigadores para la purificación de lectinas.

Seguido de la precipitación de proteínas, típicamente se aplican de uno a cuatro pasos cromatográficos para la purificación (He *et al.*, 2018), y las técnicas de purificación más utilizadas y adecuadas para su uso son la filtración en gel, el intercambio iónico y la cromatografía de afinidad (Gautam, Shrivastava, *et al.*, 2018; Nascimento *et al.*, 2012), así como una combinación de estas tres técnicas (Hamid *et al.*, 2013). También, se han estudiado otras técnicas cromatográficas novedosas con menor costo de producción, mayor eficiencia en la purificación y con menor

dificultad en la aplicación a mayor escala, como son la separación magnética, tecnología de membranas, sistema acuoso de dos fases y precipitación de afinidad (Nascimento *et al.*, 2012).

El aislamiento de lectinas se puede lograr mediante una combinación de diferentes técnicas de purificación (Lam & Ng, 2011), las cuales se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Purificación y parámetros de purificación de algunas lectinas de leguminosas

Especie	Purificación de lectina Cromatografía o etapa ¹	PM ² (kDa)	Rendimiento ² (%)	AE ²	GP ²	Referencia
<i>Vigna radiata</i>	Extracto crudo (NaCl 0.15 M pH 8), <i>salting out</i> [(NH ₄) ₂ SO ₄], intercambio iónico (DEAE- sepharose), filtración en gel (sephadex G-75), de afinidad (galactosyl-sepharose)	25	1.7	73.1	192.4	Tripathi <i>et al.</i> (2018)
<i>Vigna mungo</i>	Salting out [(NH ₄) ₂ SO ₄], intercambio iónico (CM-Sepharose), filtración en gel (AcA44), filtración en gel-FPLC (Superose-12)	BGL-I ND BGL-II ND	16.6 5.5	101386 98462	114 110	Suseelan <i>et al.</i> (1997)
<i>Vigna sesquipedalis</i> cv ground bean	De afinidad (Affi-Gel blue gel), intercambio iónico-FPLC (mono S), filtración en gel-FPLC (Superdex 75 HR 10/30)	30	ND	9150	15	Wong & Ng, (2003)
<i>Vigna umbellata</i>	Aislamiento de globulinas, cromatoenfoque (PBE-94; gradiente pH 3-5), HPLC (Protein Pak 1 125)	P1 18 y 22 P4 25	ND ND	29.8 727.0	ND 316.1	Datta <i>et al.</i> (1988)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Extracto crudo (buffer Tris-HCl pH 7.3), de afinidad (affi-gel blue gel), intercambio iónico-FPLC (mono-S), filtración en gel-FPLC (superdex 200)	30	0.85	4267	15.80	Sharma <i>et al.</i> (2009)
<i>Phaseolus acutifolius</i> var. <i>escumite</i>	Extracción salina, de afinidad (estroma tipo O), intercambio iónico (mono-S HR 5/20)	FI FII 30 FIII FIV	ND	4410 6940 4829 5410	119 187 130 146	Castillo- Villanueva <i>et al.</i> (2007)

¹ Entre paréntesis se muestra la columna cromatográfica empleada o la sal para la precipitación de proteínas. ² Se muestran los resultados de la lectina o fracciones de lectinas en la última etapa de purificación. PM: peso molecular. AE: actividad específica (UH/mg proteína). GP: grado de purificación. ND: no determinado.

Uno de los métodos más utilizados para la purificación de las lectinas es la cromatografía de afinidad, ya que se puede purificar eficazmente lectinas de leguminosas conociendo la especificidad hacia carbohidratos y haciendo una selección cuidadosa de la resina o matriz de afinidad (Gautam, Shrivastava, *et al.*, 2018); ya que este tipo de cromatografía se basa en la interacción específica entre ligandos inmovilizados en una fase sólida o semi sólida y la proteína y/o glicoproteína a purificar (Coelho *et al.*, 2012; Lee & Lee, 2004; Lis & Sharon, 1981).

En la purificación de lectinas por cromatografía de afinidad se requiere un cierto grado de conocimiento y comprensión de la naturaleza de las interacciones entre la molécula a purificar y el ligando (carbohidrato específico) para ayudar a determinar la selección de un ligando de afinidad apropiado y así planificar el procedimiento de purificación (Urh *et al.*, 2009). Una matriz adecuada es un requisito previo para la cromatografía de afinidad, ya que una purificación exitosa depende de la selección de un soporte sólido o semisólido adecuado y un ligando inmovilizado conveniente (Ayyar *et al.*, 2012; Urh *et al.*, 2009).

Lis & Sharon (1981) describieron tres principales tipos de matrices de afinidad aplicadas para la purificación de lectinas: 1) soporte sólido o semisólido (polisacáridos nativos o modificados), 2) glicoproteínas o glicopéptidos unidos al soporte y 3) mono o disacáridos unidos al soporte. En los tres tipos de matrices es necesario un tipo de soporte para la purificación. Sin embargo, los soportes deben contar con especificaciones para garantizar una purificación efectiva. Ayyar *et al.* (2012) especifican algunas de estas características: debe ser sólido o semisólido, uniforme, macroporoso hidrofílico, química y mecánicamente estable, selectivo, exhibir una absorción inespecífica mínima, debe ser insoluble en el disolvente o buffer de purificación y por último debe proporcionar una gran área de superficie para la unión del ligando. En la **Tabla 6** se presentan las características del soporte de algunas matrices empleadas para la purificación de lectinas de leguminosas. El soporte puede ser natural, sintético o inorgánico, destacando la agarosa (sepharose), geles de dextrano (sephadex, superdex), polímeros de metacrilato y acrilamida modificada, gel de sílice y derivados, poliestireno, entre otros (Ayyar *et al.*, 2012; Varilova *et al.*, 2006). Los ligandos pueden ser glicoproteínas o glucopéptidos, como es tiroglobulina, glucopéptidos de mucina gástrica de cerdo, ovomucoide, mucina de bovinos, fetuína, etc.; otro tipo de ligandos son los mono o disacáridos y puede ser fucosa, galactosa, manosa, N-acetilgalactosamina, lactosa, maltosa, melibiosa, galactosilos, entre muchos otros (**Tabla 6**) (Lis & Sharon, 1981).

Los puntos más importantes para considerar en la estrategia de purificación de lectinas es el rendimiento y factor/grado de purificación (basado en la actividad específica de la lectinas) (He *et*

al., 2018), sin embargo, es importante tomar en cuenta que las semillas de leguminosas deben presentar un alto contenido de lectinas o actividad hemaglutinante, esto con la finalidad de obtener un rendimiento mayor y disminuir costos en la purificación (Gautam, Shrivastava, *et al.*, 2018; Lam & Ng, 2011).

Tabla 6. Matriz de afinidad y buffers empleados en la purificación de lectinas de diferentes leguminosas

Especie	Soporte	Ligando	Buffer de solubilidad	Buffer de elución	Referencia
<i>Phaseolus coccineus</i>	Agarosa	Fetuína	PBS pH 7.4	Glicina-HCl 0.05 M, pH 2.8	Morales- Cerdea, 2014
<i>Phaseolus acutifolius</i>				Glicina-HCl 0.05 M, pH 2.5	Valadez-Vega <i>et al.</i> , 2011
<i>Phaseolus acutifolius</i>	Sephadex G-25	Estroma eritrocitario (tipo O)	PBS pH 7.4	Ácido acético 3 % v/v	Castillo- Villanueva <i>et al.</i> , 2007
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Affi-gel blue gel Agarosa Cibacron Blue F3GA		Tris-HCl 1 M, pH 7.3	NaCl 1 M en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.3	Sharma <i>et al.</i> , 2009
			Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6	NaCl 1 M en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6	Ang <i>et al.</i> , 2014
	Sephadex G-75	Estroma eritrocitario (tipo O)	PBS pH 7.4 con 0.1 % p/v azida de sodio	Glicina-HCl 0.2 M, pH 2.5	Vargas- Albores <i>et al.</i> , 1993
	Agarosa	Fetuína	PBS pH 7.4	Glicina-HCl 0.05 M pH 2.8	De Mejia <i>et al.</i> , 2005
<i>Vigna radiata</i>	Sepharose	Galactosilo	NaCl 0.15 M en Tris-HCl 0.02 M, pH 8.0	Galactosa 0.1 M en NaCl 0.15 M	Tripathi <i>et al.</i> , 2018
<i>Vigna sesquipedalis</i>	Affi-gel blue gel Agarosa Cibacron Blue F3GA		Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6	NaCl 1 M en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6	Wong & Ng, 2003

1.5. Género *Vigna*

1.5.1. Generalidades

El género *Vigna* incluye siete subgéneros (*Ceratotropis*, *Haydonia*, *Lasiocarpa*, *Macrorhycha*, *Plectotropis*, *Sigmoidotropis* y *Vigna*) (**Figura 8**) (Boukar *et al.*, 2013), pero solo especies de tres subgéneros (*Ceratotropis*, *Plectotropis* y *Vigna*) han sido domesticadas y cultivadas (Pandiyani *et al.*, 2012). El subgénero *Ceratotropis* es también conocido como *Vigna* Asiático y el subgénero *Vigna* comúnmente llamado *Vigna* Africano (Bisht & Singh, 2013; Boukar *et al.*, 2013; Pandiyani *et al.*, 2012).

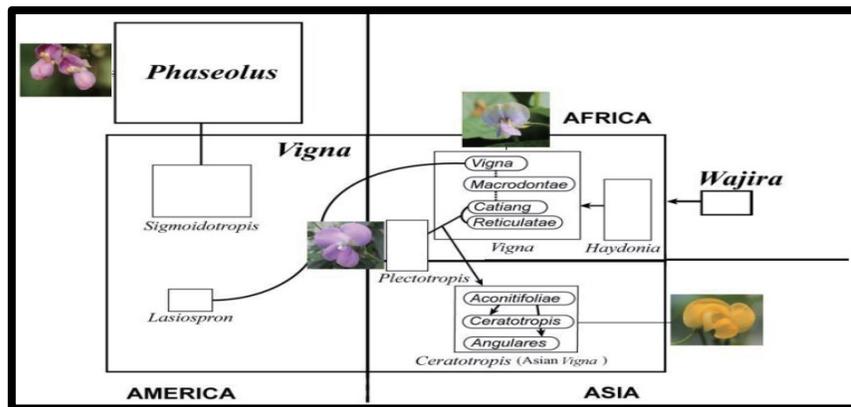


Figura 8. Relación y distribución de subgéneros pertenecientes al género *Vigna*

Fuente: Tomooka *et al.*, 2011

Se ha documentado que el género *Vigna* (familia Fabaceae) está comprendido por un poco más de 100 especies, pero solo alrededor de nueve o diez especies han sido domesticadas, como se muestra en la **Figura 9**, mientras que el resto son especies silvestres subaprovechadas (Harouna *et al.*, 2018; Tomooka *et al.*, 2014); que presentan características agronómicas adecuadas, como es la resistencia a enfermedades (Oyatomi *et al.*, 2016); por lo tanto, la morfología vegetativa y las características agronómicas importantes de las especies silvestres de *Vigna* presentan una amplia gama de diversidad que podría explotarse en la domesticación y la mejora de los cultivos, aunque también se podría aprovechar nutricionalmente ya que pocos estudios han caracterizado al género *Vigna* como una fuente importante de proteínas (Harouna *et al.*, 2018).

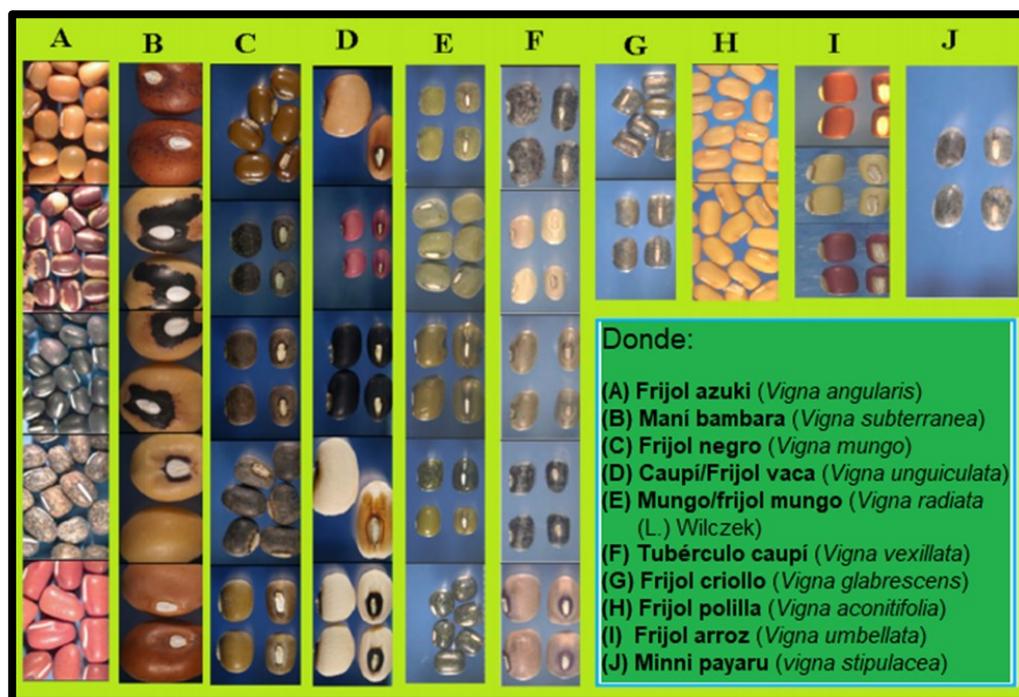


Figura 9. Especies domesticadas del género *Vigna* que representan la diversidad en la morfología de las semillas

Fuente: Modificado de Harouna *et al.*, 2018

1.5.2. *Vigna unguiculata*

1.5.2.1. Generalidades

Vigna unguiculata, presentada en la **Figura 10**, es conocido en México como frijol vaquita o caupí, pero en el mundo se le ha designado una infinidad de nombres siendo el más popular cowpea (Awika & Duodu, 2017; Estrada Domínguez *et al.*, 2018); pero en África de donde es originario se le conoce como Niébé, aunque puede variar dependiendo el grupo étnico (Diouf, 2011).

Esta leguminosa es originaria de África, siendo domesticada en ese continente, pero también se ha evidenciado su cultivo en Asia, sur de Europa, sur de los Estados Unidos, América Central y Suramérica (Diouf, 2011; Lonardi *et al.*, 2019), observándose su crecimiento en un amplio rango de condiciones climáticas que van desde las semiáridas hasta subhúmedas (Rivas-Vega, 2006); se destaca su tolerancia a baja fertilidad del suelo, debido a sus tasas altas de fijación de nitrógeno (Ehlers & Hall, 1997), así como su habilidad para crecer en suelos ácidos y alcalinos (Fery, 1990).

En México, es una fuente importante de alimento para la población rural de los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Tamaulipas (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2008). De esta especie de frijol se consumen los granos secos, vainas

verdes, plantas en crecimiento y la planta completa se usa como forraje (Ehlers & Hall, 1997; Estrada Domínguez *et al.*, 2018).



Figura 10. Morfología (*V. unguiculata*): A) diferentes fenotipos de semilla, B) flor, C) vaina y hojas

Fuente: Tomooka *et al.*, 2011

1.5.2.2. Taxonomía

En la **Tabla 7** se presenta la caracterización taxonómica presentada por Márquez-Quiroz *et al.*, 2015.

Tabla 7. Caracterización taxonómica de frijol vaquita (*V. unguiculata*)

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Tribu	Phaseoleae
Subtribu	Phaseolinae
Género	<i>Vigna</i>
Especie	<i>Vigna unguiculata</i> L.

Fuente: Márquez-Quiroz *et al.*, 2015

1.5.2.3. Composición proximal

El frijol vaquita presenta alta concentración de proteínas y ha mostrado la presencia de lectinas como parte de su composición, así como de otros compuestos biológicamente activos, los cuales se exponen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Composición proximal y principales componentes bioactivos de *V. unguiculata*

Composición proximal ¹ (%)	
Humedad	9.7-10.1
Proteína	18.6-26.9
Extracto etéreo	0.8-1.6
Fibra (insoluble)	1.7-3.0
Cenizas	2.7-4.7
Componentes bioactivos	
Lectinas ²	125-300
Inhibidores de tripsina (TIU/mg proteína)	37-91
g/Kg	
Ácido fítico	6.2-15.3
Taninos	3.9-11.9
TS	413.9
% con base al almidón total	
RDS	2.9
SDS	32.1
RS	64.9

Fuente: Compilado de Antova *et al.*, 2014; Domínguez-Perles *et al.*, 2016; Marconi *et al.*, 1997

¹ expresado en base húmeda. ² HA: actividad hemaglutinante (expresado como el recíproco de la mayor dilución que presenta hemaglutinación; g/mL). TS: almidón total; RDS: almidón de rápida digestión; SDS: almidón de lenta digestión; RS: almidón resistente.

1.5.2.4. Estudios sobre la actividad biológica de las proteínas de *V. unguiculata*

Se han llevado a cabo diferentes estudios, donde se ha aislado, purificado y extraído proteínas del frijol vaquita (*V. unguiculata*), como son lectinas, péptidos bioactivos y otras proteínas con actividad biológica.

Los aislados proteínicos del frijol vaquita han mostrado actividad antioxidante (Thumbrain *et al.*, 2020), mientras que los péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática (pepsina-pancreatina y flavourzyme) de su proteína mostraron actividad antihipertensiva, como inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-1), en los péptidos >10 (51.34%), >5 (46.45%), >3 (51.61%), >1 (77.77%) y <1 kDa (79.57%); los péptidos <1 kDa mostraron mayor actividad *in vitro* e *in vivo*,

al inhibir la ECA-1 y reducir la presión arterial en ratas (Cú-Cañetas *et al.*, 2015). Se ha purificado dos lectinas (α -AFP y β -AFP) de harina de *V. unguiculata* compuestas de unidades, de peso molecular de 28 kDa y 12 kDa, respectivamente; la cuales presentaron actividad antifúngica y antiviral contra el virus VIH, encontrándose mayor inhibición con la fracción β -AFP (Ye *et al.*, 2000).

1.6. Actividad antioxidante

1.6.1. Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), exhibidas en la **Tabla 9**, son producidas por los organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal del oxígeno molecular, estos denominados como oxidantes endógenos, aunque también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) entran en esta categoría (Birben *et al.*, 2012). El humo del cigarro, exposición al ozono, hiperoxia, radiación ionizante y iones de metales pesados, pertenecen a otro grupo denominado como oxidantes exógenos, ya que poseen o pueden producir radicales libres como ROS y RNS que interaccionan con la célula (Birben *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2016).

Tabla 9. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS)

Oxidante	Fórmula	Reacción
Anión superóxido	O_2^-	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$ $2O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Hipoxantina + H_2O + $O_2 \leftrightarrow$ xantina + H_2O_2 Xantina + H_2O + $O_2 \leftrightarrow$ ácido úrico + H_2O_2
Radical hidroxilo	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Ácido hipocloroso	HOCl	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radicales peroxilo	$ROO\bullet$	$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$
Radical hidroperoxilo	$HOO\bullet$	$O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO\bullet + OH^-$

Fuente: Birben *et al.* (2012)

El cuerpo humano está equipado con una variedad de antioxidantes que sirven como contrapeso al efecto de los oxidantes, llamados antioxidantes endógenos. Estos pueden ser clasificados en dos categorías: Enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasa, hemo oxigenasa-1, glutatión peroxidadas, tiorredoxinas, peroxirredoxinas, glutatión transferasa, glutaredoxinas) y no enzimáticos como es la vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), glutatión y carotenoides (β -caroteno) (Birben *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo ocurre cuando el equilibrio entre antioxidantes y oxidantes (ROS, RNS, radicales libres) se interrumpe debido al agotamiento de los antioxidantes o a la acumulación de oxidantes, por lo tanto, un sistema biológico es incapaz de desintoxicar fácilmente las especies reactivas o para reparar el daño celular resultante; esto conduce a la acumulación de ROS y RNS en el cuerpo o las células, causando toxicidad celular y provocando daño en la función biológica de otras macromoléculas como proteínas intracelulares, lípidos de membrana, lipoproteínas, DNA, pérdida de función de enzimas (Birben *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2016; Prior & Wu, 2013; Quintanar-Escorza & Calderón-Salinas, 2009). Cuando ocurren estos daños a la célula, puede contribuir al inicio de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer (Reuter *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2006), entre otras enfermedades.

Hay otro tipo de antioxidantes denominados exógenos, los cuales provienen de la dieta (Quintanar-Escorza & Calderón-Salinas, 2009), entre los que se destacan: Vitaminas (A, B, C, E) y minerales (zinc, selenio, manganeso, cobre) (Prior & Wu, 2013), compuestos fenólicos (flavonoides, antocianinas, carotenos, taninos, etc.) (Kuskoski *et al.*, 2005), y proteínas biológicamente activas (péptidos bioactivos, globulinas, etc.) (Arise *et al.*, 2019); todos estos compuestos provenientes de fuentes animales y vegetales.

1.6.2. Actividad antioxidante

Pisoschi & Pop (2015) definieron el término “antioxidante” con base en sus criterios de clasificación como “enzimáticos y no enzimáticos, preventivos o reparadores, endógenos y exógenos, primarios y secundarios, hidrosolubles y liposolubles, naturales o sintéticos. Antioxidantes primarios son principalmente rompedores de cadenas, capaces de eliminar especies de radicales mediante la donación de hidrógeno. Los antioxidantes secundarios son inhibidores del oxígeno singlete, descomponedores de peróxido, quelantes de metales, inhibidores de enzimas oxidativas o absorbentes de radiación UV.” Y de manera más sencilla, Sun *et al.* (2018) definieron a la actividad/capacidad/poder/potencial antioxidante como “la capacidad o habilidad de un compuesto o mezcla de compuestos para prevenir o detener las reacciones oxidativas que se producen a otra moléculas.”

Los ensayos de actividad antioxidante se han clasificado como *in vitro* e *in vivo* acorde a sus aplicaciones. Se han desarrollado una gran cantidad de métodos *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante (ácido ascórbico, Folin-Ciocalteu, ABTS+*, TRAP, DPPH*, DMPD, FRAP, etc.) aplicables en diferentes tipos de matrices como plasma, bebidas, vegetales y frutas (Alam *et al.*,

2013; Schlesier *et al.*, 2002). Estos protocolos se basan en sustancias cromógenas de naturaleza radical, la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración de antioxidantes, y por lo tanto indica la actividad antioxidante (Kuskoski *et al.*, 2005). Referente a modelos *in vivo*, los ensayos se basan en administrar la muestra (a analizar) a animales (ratones, ratas, etc.) en un régimen de dosificación definido; después de un período de tiempo los animales se sacrifican y se usan sangre o tejidos para evaluar la actividad antioxidante (FRAP, estimación de glutatión reducido, peroxidasa y S-transferasa, método de superóxido dismutasa, catalasa, peroxidación lipídica, ensayo LDL, ensayo radical NO*, entre otros) (Alam *et al.*, 2013; Chanda & Dave, 2009). Los métodos *in vitro* proporcionan una indicación útil de las actividades antioxidantes, pero los datos obtenidos por estos métodos son difíciles de aplicar a los sistemas biológicos (Antolovich *et al.*, 2002). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski *et al.*, 2005).

JUSTIFICACIÓN

Desde hace tiempo se ha estudiado el papel que juegan las lectinas de leguminosas en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, evaluando su potencial biológico en sistemas *in vitro* e *in vivo*. De igual forma, existen múltiples reportes que investigan la posible toxicidad de las lectinas, como es el daño a nivel gastrointestinal o incluso una reacción alérgica. Una de las lectinas que se consideran importantes son las provenientes del frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) debido al alto consumo de esta leguminosa que se tiene en nuestro país, por lo cual se considera relevante su purificación y determinación de su actividad antioxidante, lo cual sentará las bases para determinar su potencial farmacológico en sistemas *in vivo*.

HIPÓTESIS

Las lectinas del frijol vaquita (*V. unguiculata*) pueden ser purificadas por medio de cromatografía de afinidad y poseen capacidad para aglutinar por lo menos dos tipos de eritrocitos humanos.

OBJETIVOS

General

Realizar la purificación y determinación de la actividad antioxidante de las lectinas del frijol vaquita (*Vigna unguiculata*).

Específicos

1. Realizar la caracterización física (dimensiones) y contenido de proteína cruda de las semillas de frijol vaquita.
2. Determinar las condiciones óptimas para la purificación de una fracción de lectina de frijol vaquita por medio de cromatografía de afinidad.
3. Determinar la actividad hemaglutinante de las lectinas obtenidas en eritrocitos humanos del grupo A y O.
4. Determinar la actividad antioxidante de las lectinas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material vegetal

Frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) del Municipio de Tulancingo de Bravo, en el Estado de Hidalgo.

2.1.2. Material biológico

Sangre humana (A y O) para la separación de eritrocitos.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de harina

Las semillas de frijol vaquita se seleccionaron manualmente y se eliminó el material extraño, posteriormente se sometieron a un proceso de molienda hasta la obtención de un polvo fino que se tamizó a través de la malla No. 40 ($\leq 400 \mu\text{m}$). Se determinó el contenido de proteína cruda con la metodología de la AOAC (1995) (955.04, factor de conversión 6.25). La harina se almacenó a temperatura ambiente en frascos de vidrio hasta su uso.

2.2.2. Obtención del concentrado proteínico

Como primer paso se obtuvo el extracto crudo con la metodología reportada por De Mejía *et al.* (1990), con algunas modificaciones. Se preparó una dispersión de harina de frijol en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) en una relación 1:10 p/v, la cual se mantuvo en agitación constante por 16 horas a 4°C, después se centrifugó (10 000 rpm, 1 hora, 4°C) (GS-15R Centrifugue, Beckman, USA), posteriormente se desechó el precipitado, colectando el sobrenadante (extracto crudo). Como segundo paso se precipitó la proteína soluble con la metodología reportada por Valadez-Vega *et al.* (2014), con algunas modificaciones. El extracto crudo se mezcló con sulfato de amonio (J.T. Baker, México) hasta un 70% de saturación, y se mantuvo en agitación (100 rpm) durante una hora a 4°C. Posteriormente, la proteína precipitada se separó por centrifugación (10 000 rpm, 1 hora, 4°C). El sobrenadante se eliminó y el pellet (extracto proteínico) se resuspendió en 10 mL de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) para posteriormente dializar en una membrana de diálisis (MWCO 25 000 Da, Sprecra/Por™, USA) con tres cambios de PBS durante 24 horas, para eliminar trazas de sulfato de amonio. El extracto proteínico se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso.

2.2.3. Extracción y purificación de lectinas

Se utilizó la metodología reportada por Valadez-Vega *et al.* (2014), con modificaciones; la cual se llevó a cabo en una columna cromatográfica de 3 x 20 cm (Bio-Rad, USA) empleando una matriz de fetuína-agarosa (F3256, Sigma-Aldrich, México), regulando el flujo con una bomba peristáltica (Econo Gradient Pump, Bio-Rad, USA) y colectando fracciones con un colector semiautomatizado (Model 2110, Bio-Rad, USA). Se agregaron 2 mL del concentrado proteínico obtenido en la sección 2.2.2 en la columna y se lavó con 120 mL de PBS a una velocidad de 3 mL/min, la elución de las lectinas (fracción hemaglutinante) se efectuó con una disolución de glicina-HCl 0.05 M, pH 2.8 a la misma velocidad; se colectaron fracciones de 3 mL, determinando su absorbancia a 280 nm para detectar la presencia o ausencia de lectinas en cada fracción. Las fracciones colectadas del pico de lectinas se dializaron contra agua desionizada con 3 cambios durante 24 horas. Las lectinas purificadas se congelaron, liofilizaron y se conservaron a -20°C para estudios posteriores.

2.2.4. Determinación de proteína soluble

Se utilizó el protocolo descrito por Bradford (1976), en el cual se tomó una muestra de 100 µL de extracto proteínico y se mezcló con 3 mL de reactivo de Bradford (azul de coomassie brillante G-250 (161-0406, Bio-Rad, USA) 0.01 % p/v, etanol absoluto (Meyer, México) 4.7 % v/v y ácido fosfórico (Fermont, México) 8.5 % v/v), se colocaron en un tubo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm contra un blanco de reactivo. Se preparó una curva de calibración (**Anexo 1**) con albumina de suero bovino (BSA) (05470, Sigma-Aldrich, México) como estándar a concentraciones de 0.1-0.6 mg/mL.

2.2.5. Determinación de la actividad hemaglutinante

2.2.5.1 Preparación de eritrocitos

Para la preparación de los eritrocitos se utilizó sangre humana fresca tipo A y O de donadores sanos, siguiendo el protocolo de extracción y purificación que se resume en la **Figura 11**. La sangre se colectó en tubos con EDTA al 2 % como anticoagulante, se mezcló suavemente con el fin de no lisar los eritrocitos y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min para separar los eritrocitos del plasma. El precipitado que contiene los eritrocitos se separó, desechando el sobrenadante (plasma, leucocitos y plaquetas), los eritrocitos se resuspendieron en 3 volúmenes de PBS y se mezclaron

suavemente, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, el sobrenadante se desechó y se colectó nuevamente el precipitado que contiene los eritrocitos, este proceso se repitió 3 veces para eliminar los restos de plasma, finalmente los eritrocitos se resuspendieron en PBS hasta una concentración del 2 % de eritrocitos y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

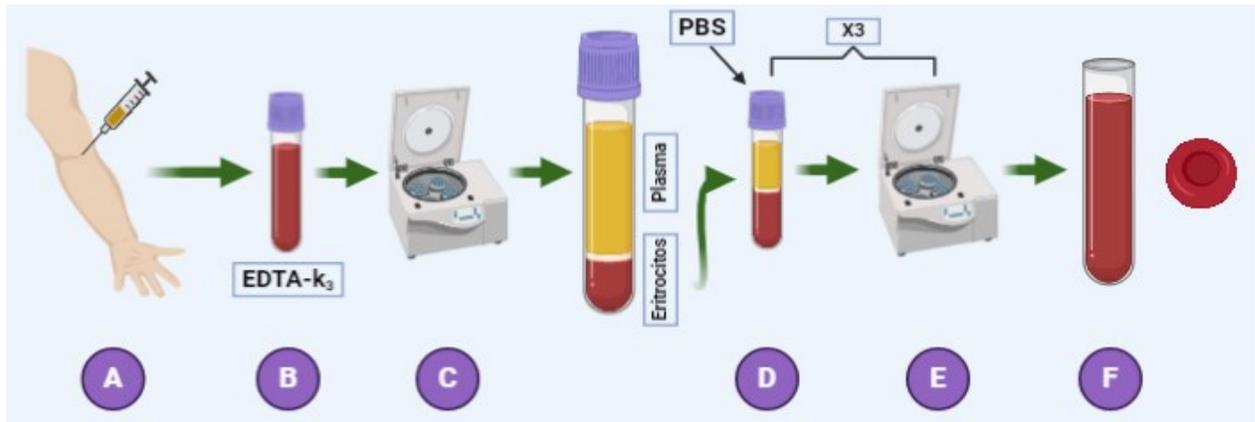


Figura 11. Protocolo para preparación de eritrocitos al 2% en PBS. (A) colecta de sangre; (B) sangre en tubos con anticoagulante; (C) centrifugación; (D) lavados con PBS; (E) centrifugación; (F) paquete globular (eritrocitos)

2.2.5.2. Actividad hemaglutinante (AH)

La actividad hemaglutinante de las lectinas obtenidas durante los procesos de extracción y purificación se determinó mediante la técnica de dilución en serie descrita por Sharma *et al.* (2009). Se realizaron diluciones seriales por triplicado en una microplaca de fondo plano de 96 pozos; para ello, a cada pozo se adicionaron 50 μ L de PBS, al primer pozo se le agregaron 50 μ L de extracto proteínico o disolución de lectinas, se homogenizó y se tomaron 50 μ L del primer pozo, pasándolo al segundo y así sucesivamente para realizar todas las diluciones, a cada pozo se le adicionaron 50 μ L de la suspensión al 2 % de eritrocitos en PBS, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (≈ 20 °C), y se observaron los pozos donde se tomó aquél con la última dilución que presenta aglutinación, el cual representa el título de aglutinación. El título de hemaglutinación (unidad hemaglutinante, UH) se define como el recíproco de la dilución más alta que exhibe actividad de aglutinación (Thompson *et al.*, 1986). La actividad específica de la lectina se calculó dividiendo el título de aglutinación entre los miligramos de proteína soluble presente en los 50 μ L de la muestra, determinada por el método de Bradford.

2.2.6. Actividad antioxidante *in vitro*

2.2.6.1 Tratamiento de la muestra

Una cantidad conocida de harina, concentrado proteínico o lectina se agregaron a un 1 mL de agua destilada en tubos Eppendorf, posteriormente, se dispersó la muestra por 5 min en vortex a velocidad baja, evitando la presencia de espuma; a continuación, la muestra se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, recolectando el sobrenadante (extracto acuoso).

2.2.6.2. FRAP

El ensayo de poder reductor de hierro se llevó a cabo con el protocolo descrito por Benzie & Strain (1999), el cual se basa en la reacción del radical Fe^{3+} -TPTZ con el antioxidante presente en la muestra, en condiciones de pH ácido, provocando la reducción del complejo y coloreando la reacción (Fe^{2+} -TPTZ). El reactivo FRAP se preparó mezclando buffer de acetato de sodio (300 mM, pH 3.6), disolución TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine; 10 mM en 40 mM HCl) (T1253, Sigma-Aldrich, México) y cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 20 mM) (Merck, México) en una proporción 10:1:1 v/v/v. Una alícuota de 100 μL de muestra se hizo reaccionar con 3000 μL de reactivo FRAP recién preparado, posteriormente la reacción se incubó por 4 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 593 nm contra un blanco de reactivos. Se realizó una curva de calibración (**Anexo 1**) usando varias concentraciones de Trolox (100-1000 μM) (228813, Sigma-Aldrich, México) como estándar. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra).

2.2.6.3. ABTS^{*+}

Se determinó por el método del radical ABTS^{*+} detallado por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones, el cual se basa en la reducción de la coloración producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{*+}) con el antioxidante presente en la muestra. El radical catión ABTS^{*+} se preparó a partir de una disolución estándar de ABTS (A1888, Sigma-Aldrich, México) 7 mM en agua destilada y persulfato de potasio (J.T. Baker, México) 2.45 mM en disolución de ABTS, incubados a temperatura ambiente en obscuridad por 12-16 h. El radical se diluyó en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm. 20 μL de muestra se hicieron reaccionar con 1980 μL de radical ABTS^{*+} diluido, para posteriormente incubar a temperatura ambiente durante 6 minutos. Por último, se procedió a medir la absorbancia a 734 nm. Se realizó una curva de calibración

(**Anexo 1**) usando varias concentraciones de Trolox (100-1000 μM) (228813, Sigma-Aldrich, México) como estándar. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra).

2.3. Estrategia experimental

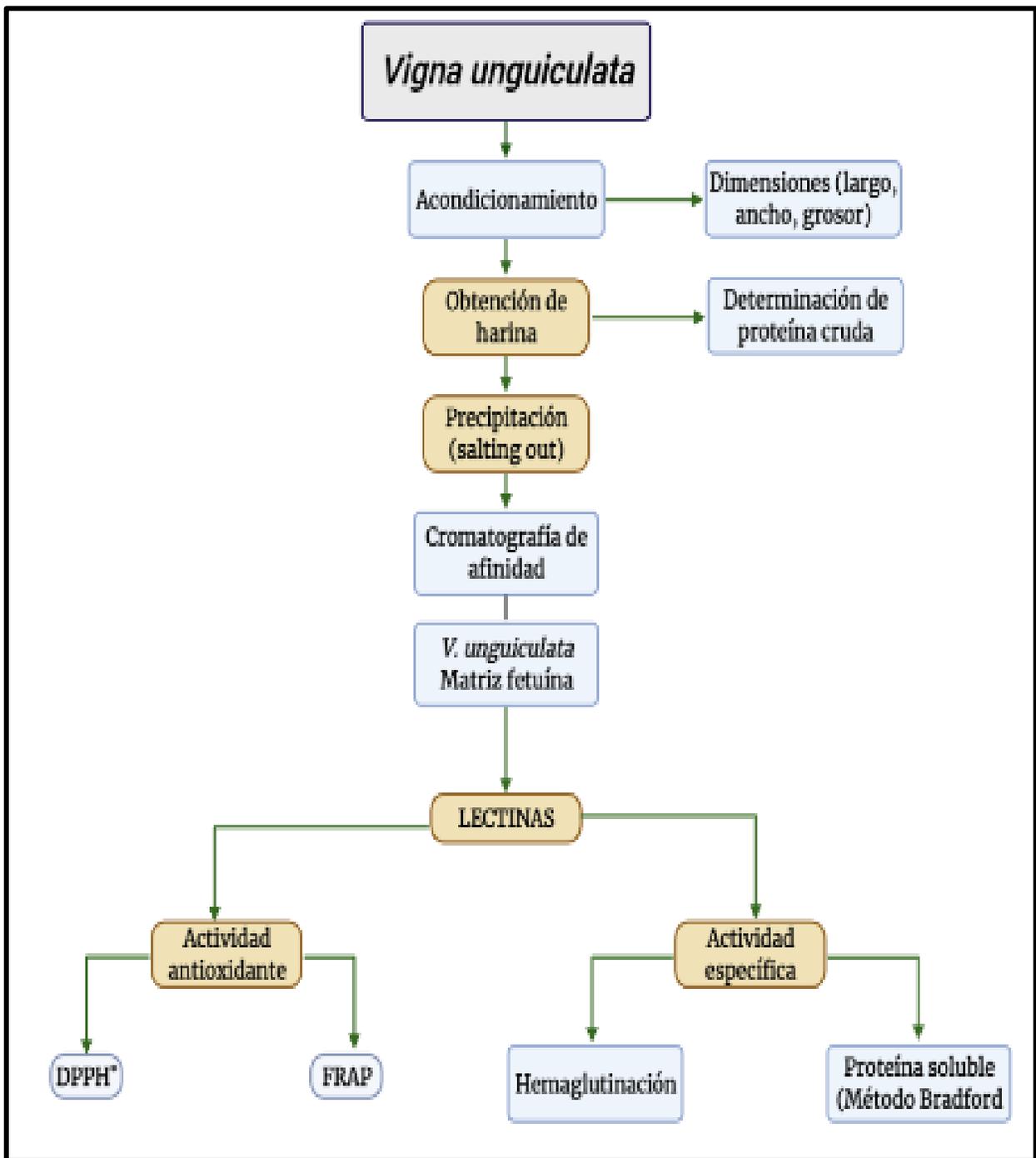


Figura 12. Estrategia experimental

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Material vegetal

El frijol vaquita es de color blanco con negro (**Figura 12A**), el color negro se presenta en forma de manchas irregulares con lados circulares, la forma del frijol es ovalada, y el hilo de color blanco; sin embargo, estas características difieren con otras variedades estudiadas, ya que se ha reportado una variedad de color crema y cerca del hilo de color café (Souza Rocha *et al.*, 2014), otra variedad reportada tiene color anaranjado con el hilo color crema (NAROGenebank, 2017). Herniter *et al.* (2018), reportan variedades de color negro, negro con manchas pequeñas color crema, y semillas color café ; estas diferencias evidencian la variabilidad morfológica entre especies del género *Vigna*, y entre variedades de una misma especie (Harouna *et al.*, 2018).

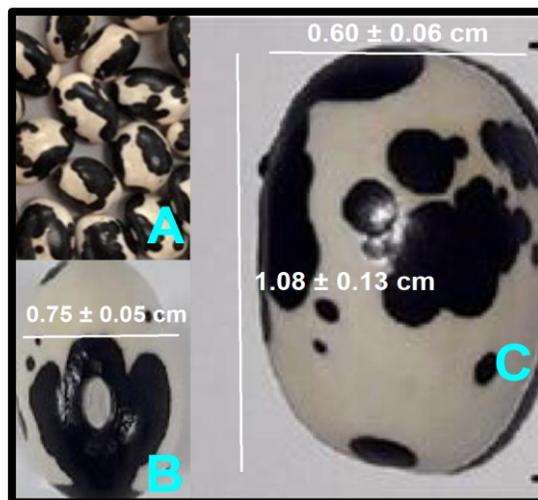


Figura 13. *Vigna unguiculata*. A) semillas. B) grosor, C) largo y ancho de la semilla

Las dimensiones promedio del frijol vaquita, presentadas en las **Figura 13B** y **Figura 13C**, analizadas en el presente trabajo fueron de 1.08 ± 0.13 cm de largo (L), 0.60 ± 0.06 cm de ancho (A) y 0.75 ± 0.05 cm de grosor (G), los cuales son superiores a lo reportado por Márquez-Quiroz *et al.* (2015) para variedades de frijol vaquita cultivadas en Tabasco (L: 0.71-0.83 cm; A: 0.53-0.59 cm; G: 0.43-0.48 cm) y semejante para variedades cultivadas en Camerún (L: 0.74-0.92 cm; A: 0.55-0.73 cm; G: 0.38-0.58 cm) analizadas por Kaptso *et al.* (2008).

Las diferencias observadas en las características fenotípicas de las semillas de distintas variedades en una misma especie, se deben a las condiciones de fertilización y el contenido de minerales presentes en el suelo, así como, a las condiciones climáticas, irrigación, entre otros factores ambientales y edáficos (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015).

3.2. Contenido de proteína en harina de frijol vaquita

El contenido de proteína total del frijol vaquita utilizado en el presente estudio fue de 22.78 ± 0.18 % (factor de conversión 6.25), este porcentaje concuerda con lo reportado por Antova *et al.* (2014) quienes encontraron entre un 22.5-25.6% de proteína en semillas de cuatro accesiones cultivadas en Nigeria, mientras que Domínguez-Perles *et al.* (2016) para 28 accesiones cultivadas en Portugal obtuvieron un contenido de proteína entre 18.6-26.9%; de manera similar, Gupta *et al.* (2010) encontraron una concentración de proteínas entre 22.4-27.9% para 21 genotipos cultivados en India.

Estas diferencias en el contenido de proteína entre el frijol vaquita analizado en el presente trabajo y los reportados son atribuidas a la especie, variedad, condiciones de cultivo, clima, micronutrientes y macronutrientes, riego, entre otras (Hatamikia *et al.*, 2019).

3.3. Purificación de lectinas de frijol vaquita

La **Figura 13** muestra el cromatograma obtenido en la purificación de la lectina de frijol vaquita, presentando un comportamiento semejante a los reportados para la separación de otras lectinas, utilizando el mismo método cromatográfico y misma matriz de afinidad (fetuína-agarosa), para leguminosas del género *Phaseolus*, como es el frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007; De Mejia *et al.*, 2005; Valadez-Vega *et al.*, 2011), frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (De Mejia *et al.*, 2005) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) de las variedades negro y morado (Morales-Cerda, 2014).

El cromatograma muestra tres fases o regiones características de la purificación de lectinas: No retenida (fracciones $\approx 1-25$), en la cual eluye la proteína que no presenta afinidad o la capacidad de unirse a la matriz de fetuína-agarosa, lo que permite salir de la columna de manera rápida, esta fase se lleva a cabo aproximadamente en los primeros 25 min de iniciada la purificación; fase de estabilización (fracciones $\approx 26-39$) (en ≈ 13 min se completa la fase), en la cual se puede observar que todavía existe proteína que no presenta afinidad, pero tal vez, por su tamaño tarda mayor tiempo en eluir de la matriz, hasta la fracción 39 se puede observar que existe una estabilización por medio de la absorbancia ($UA \leq 0.005$). En la fracción 40 (minuto 40) se inyectó el buffer glicina-HCl pH 2.8 con la finalidad de cambiar las condiciones de operación, siendo el medio ácido el cual favorece la liberación de la proteína retenida en la columna cromatográfica, lo que se refleja con la presencia de un pico (fracciones $\approx 54-68$), y tarda aproximadamente 14 min en obtenerse la fracción de lectina. Posteriormente las fracciones se juntaron y dializaron contra agua destilada, y

se corroboró que ese pico corresponde a lectinas, por medio de pruebas de hemaglutinación con eritrocitos humanos (A y O).

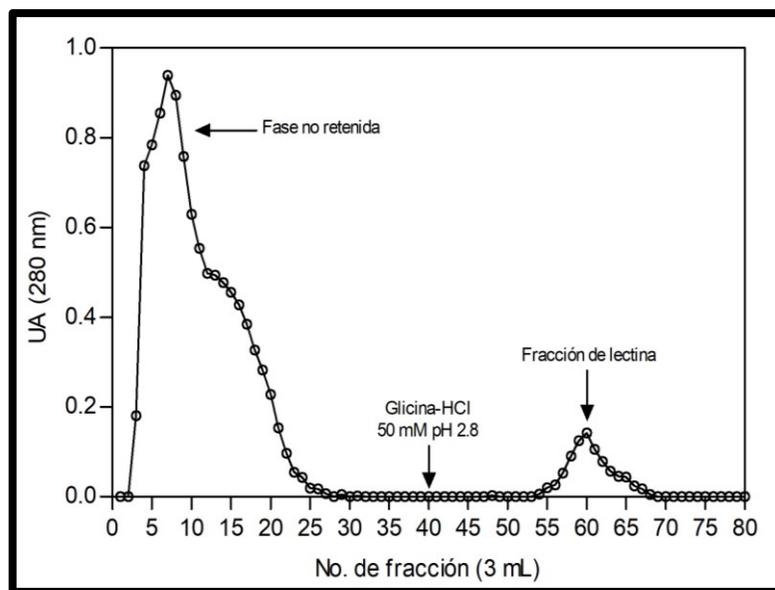


Figura 14. Cromatograma de la purificación de lectina de frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) por cromatografía de afinidad (matriz fetuina-agarosa).

Se colectaron fracciones de 3 mL y se monitoreó la absorbancia a 280 nm. UA: unidades de absorbancia.

Durante el proceso de purificación (**Tabla 10**) se observó un decremento del contenido de proteína (hasta un 99.56% para la lectina) y del rendimiento (0.44% en la lectina), lo cual es debido a que el proceso de purificación descarta aquellas proteínas que no presentan las características de afinidad de las lectinas, lo que a su vez incrementa el grado de purificación (69.30). Este comportamiento ha sido observado por diferentes autores al realizar la purificación de lectinas de otras leguminosas como *Phaseolus acutifolius* (0.586% y 26) (Valadez-Vega *et al.*, 2011), *Vigna radiata* (1.7% y 192.47) (Tripathi *et al.*, 2018), *Phaseolus vulgaris* (0.85% y 15.80) (Sharma *et al.*, 2009), *Phaseolus lunatus* (0.76% y 13.1) (Wu *et al.*, 2016), *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto (0.56% y 15.4) (Ang *et al.*, 2014), *Phaseolus vulgaris* cv. cacahuate (189) (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

En la **Tabla 10** se presenta la actividad específica de las lectinas, observando que es mayor que la mostrada para el extracto crudo y extracto proteínico, lo cual es atribuido al proceso de purificación (He *et al.*, 2018).

La actividad específica de la lectina obtenida en el presente trabajo fue inferior a la reportada para *Vigna mungo*, de acuerdo al estudio de Suseelan *et al.* (1997) quienes reportan dos fracciones de

lectina con actividad específica de 101386 UH/mg (BGL-1) y 98462 UH/mg (BGL-II), así como para *Vigna sesquipedalis* cv ground bean reportada por Wong & Ng (2003) con una actividad específica de 9150 UH/mg; mientras que el resultado obtenido en el presente trabajo es superior para *Vigna umbellata*, donde Datta *et al.* (1988) reportaron valores inferiores para dos fracciones con especificidad a diferentes tipo de eritrocitos: fracción 1 (29.8 UH/mg) específico para eritrocitos del grupo B y fracción 2 (727 UH/mg) con especificidad para eritrocitos del grupo A. También en especies del género *Phaseolus* se han purificado lectinas, por ejemplo, el resultado obtenido en el presente trabajo es superior a la actividad específica de la lectina purificada de *Phaseolus lunatus* (2293 UH/mg) (Wu *et al.*, 2016) y para *Phaseolus vulgaris* (10240 UH/mg) (Fang *et al.*, 2010); pero inferior (226376.51 UH/mg) a una lectina purificada de *Phaseolus acutifolius* (Valadez-Vega *et al.*, 2011).

Las diferencias mostradas entre las actividades hemaglutinantes reportadas y la obtenida en la lectina analizada en el presente trabajo, puede ser debida a varios factores tales como la fuente de eritrocitos empleados (humanos A, O y B; animales), ya que regularmente para evaluar la actividad específica durante el proceso de purificación se emplea el tipo de eritrocito donde se observa presencia de actividad y la mayor actividad hemaglutinante. También, la presencia de varias isolectinas y sus diferentes características influyen, por ejemplo, Datta *et al.* (1988) reportó dos isolectinas en *Vigna umbellata*, una hacia eritrocitos tipo B y la otra hacia eritrocitos tipo A, caso contrario a Castillo-Villanueva *et al.* (2007) que encontraron cuatro isoformas en *Phaseolus acutifolius* sin especificidad serológica en humanos, pero el ensayo se llevó a cabo con eritrocitos tipo O.

Tabla 10. Purificación de lectinas de frijol vaquita (*Vigna unguiculata*)¹

Etapa de purificación	Proteína (mg)	Título de hemaglutinación (UH)		Actividad específica (UH/mg)		Grado de purificación	Rendimiento (%)
		Tipo A	Tipo O	Tipo A	Tipo O		
Extracto crudo	968.51	128	256	171.81	343.62	1	100
Concentrado proteínico	89.95	4 096	4 096	4 553.64	4 553.64	26.50	9.28
Lectinas	4.31	512	512	11 906.08	11 906.08	69.30	0.44

¹ Resultados para 10 gramos de harina.

3.4. Actividad hemaglutinante

Las pruebas de hemaglutinación de la lectina obtenida en el presente trabajo (**Tabla 11**) mostraron que la lectina presenta especificidad hacia los eritrocitos humanos del tipo A y O, con un título de hemaglutinación de 512 en ambos casos, lo cual, es debido a que se ha demostrado que los grupos sanguíneos del sistema ABO están compuestos por una secuencia de 4 carbohidratos (sustancia precursora) conformados por Glucosa-Galactosa-Acetil-glucosamina-Galactosa, que se encuentran en la membrana de los eritrocitos, los cuales son la base para la unión de otros carbohidratos, para dar lugar a la tipificación del sistema ABO. Posteriormente el gen H, codifica para la producción de la enzima transferasa H, que une una molécula de L-fucosa a la galactosa terminal, formándose el antígeno H, denominándose grupo sanguíneo O. Posteriormente, son formados los grupos sanguíneos A y B, ya que entran a una segunda ronda con la enzima transferasa A y transferasa B, respectivamente. Transferasa A adiciona acetil-galactosamina y transferasa B galactosa. Entonces, los azúcares terminales de los grupos ABO quedan de la siguiente manera: grupo O (L-fucosa), grupo A (L-fucosa + acetil-galactosamina) y grupo B (L-fucosa + galactosa) (Arbeláez García, 2009).

Tabla 11. Actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos (A y O) de las lectinas del frijol vaquita (*V. unguiculata*)

Etapa de purificación	Título de hemaglutinación (UH)	
	Eritrocitos tipo A	Eritrocitos tipo O
Extracto crudo	128	256
Concentrado proteínico	4 096	4 096
Lectina	512	512

3.5. Efecto de las etapas de purificación de las lectinas sobre la actividad antioxidante

La actividad antioxidante en el método ABTS^{*+}, se presenta en la **Figura 14A**, la cual muestra diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), incrementando de manera directamente proporcional con las etapas de purificación; caso contrario al método FRAP (**Figura 14B**), el cual presenta cambios estadísticos significativos ($p < 0.05$), disminuyendo la actividad antioxidante al ir aumentando las etapas de purificación, siendo notorio que la lectina no presentó la capacidad de reducir el radical FRAP.

El extracto crudo mostró una actividad antioxidante, reportada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, de 48.61 por el radical ABTS y de 10.76 por el radical FRAP.

La actividad antioxidante cuantificada por medio del radical ABTS, es superior a lo reportado por Katerere *et al.* (2012) para una variedad cultivada en Sudáfrica (7.6 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra) y Gutiérrez-Uribe *et al.* (2011) para semillas cultivadas en Yucatán, México con un resultado de 4.04 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra; pero inferior a lo obtenido por Ng *et al.* (2011) para semillas de Malasia (74 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra).

Por otro lado, la inhibición del radical FRAP es superior a lo reportado por Katerere *et al.* (2012) para una variedad de *V. unguiculata* cultivada en Sudáfrica (5.8 $\mu\text{mol ET/g}$); existen otros estudios que evidencian el potencial de reducir el radical FRAP por efecto del frijol vaquita, sin embargo, no son comparables ya que utilizan Fe^{2+} o sulfato de hierro como estándar (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011; Sombié *et al.*, 2018; Zia-ul-haq *et al.*, 2013).

En harina y extracto crudo se atribuye su actividad antioxidante principalmente a los compuestos fenólicos (Awika & Duodu, 2017; Grela *et al.*, 2017), en *Vigna unguiculata* se han reportado; ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico), flavonoles (O-glicósidos derivados de la quercetina), proantocianidinas (derivados de la catequina), antocianinas (O-glicósidos derivados de la delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina y peonidina), los cuales han mostrado tener actividad antioxidante (Awika & Duodu, 2017). Por otra parte, se ha reportado que las albuminas y globulinas, parecen participar en la actividad antioxidante, ya que se encuentran en mayor cantidad en las proteínas totales de las semillas (Dash & Ghosh, 2017).

La actividad antioxidante del extracto proteínico tanto con ABTS (58.79 $\mu\text{mol ET/g}$) como con FRAP (8.34 $\mu\text{mol ET/g}$), confirma el poder antioxidante de la proteína aislada del frijol vaquita al igual que lo reportado por Thumbrain *et al.* (2020), el cual podría ser atribuido a la composición de aminoácidos de las proteínas, ya que el ácido aspártico, prolina, triptófano, tirosina, metionina, cisteína, leucina, arginina, alanina, fenilalanina e histidina han mostrado tener actividad antioxidante (Chi *et al.*, 2015). De igual manera, la interacción proteína-polifenol puede contribuir en la actividad antioxidante del extracto proteínico, ya que se ha encontrado que las proteínas de alimentos interactúan con compuestos fenólicos por unión no covalente (Carbonaro *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante de las lectinas de leguminosas ha sido muy poco estudiada, por ende, existen pocos reportes, sin embargo, cada vez hay mayor interés en esta actividad. Por ejemplo, Gautam, Gupta, *et al.* (2018) purificaron la lectina de *Cicer arietinum* L y encontraron una actividad antioxidante por radical DPPH entre $\approx 30\text{-}70\%$ (20-100 $\mu\text{g/mL}$); e Lacerda *et al.* (2017) evaluaron la capacidad de inhibir la actividad de los radicales ABTS (326 $\mu\text{mol ácido ascórbico/g}$) y DPPH (82.9 $\mu\text{mol ácido ascórbico/g}$) de la lectina PLUN (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel).

En el presente estudio se obtuvieron resultados de 236.94 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS) y 0 $\mu\text{mol TE/g}$ (FRAP). Dado que cada ensayo de actividad antioxidante tiene su propio potencial redox, mecanismo de acción, velocidad y capacidad de respuesta a los antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, así como la condiciones de operación del ensayo (Çekiç *et al.*, 2009). En el ensayo ABTS, el efecto antioxidante de proteínas purificadas parece estar correlacionada con su contenido de grupos sulfihídrido (SH), puentes disulfuro, la composición específica de aminoácidos o su similitud con moléculas biológicas sintetizadas por el organismo vivo con actividad antioxidante (superóxido dismutasa [SOD] y glutatión peroxidasa [GSH-Px]) (Huang *et al.*, 2010). Además se ha demostrado que la presencia de leucina-histidina-prolina en la secuencia de la proteína, así como, la presencia de treonina y cisteína pueden contribuir en la actividad antioxidante (Srivastava *et al.*, 2012).

Sin embargo, en el ensayo FRAP, debido a que su pH de operación es ácido (3.6), el H^+ pueden afectar el estado de ionización de la proteína alterando las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria, causando su desnaturalización, y por ende la precipitación de la proteína. Además, se ha observado que los compuestos de bajo peso molecular tienen una mayor interacción con el radical, provocando una eficiente inhibición del mismo, por lo tanto, se enfatiza esta limitación para evaluar la actividad antioxidante de proteínas y péptidos de alto peso molecular (Çekiç *et al.*, 2009). De igual manera, el grupo tiol que se encuentra en algunos aminoácidos y proteínas reacciona muy lentamente con el radical FRAP (Benzie & Devaki, 2018).

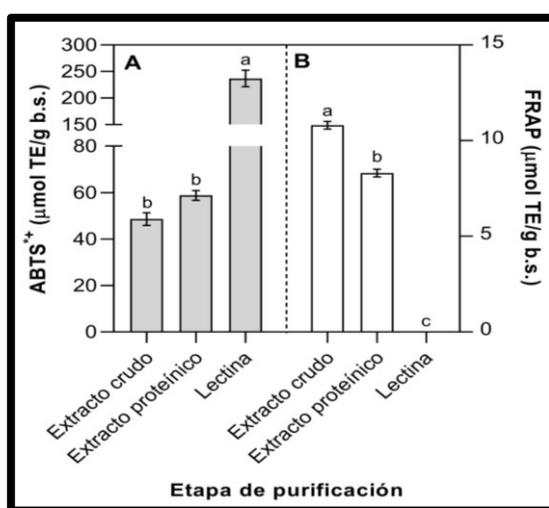


Figura 15. Efecto de las etapas de purificación de lectina de frijol vaquita sobre la actividad antioxidante: A) radical ABTS⁺ y B) radical FRAP

Los resultados son el promedio \pm desviación estándar (n=3). Letras diferentes en cada barra indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre medias por la prueba de Tukey.

CONCLUSIONES

1. Las lectinas del frijol vaquita pudieron ser parcialmente purificadas utilizando una matriz de fetuína-agarosa, dichas lectinas mostraron una actividad hemaglutinante de 11906.98 UH/mg y capacidad para aglutinar eritrocitos del grupo A y O.
2. Las lectinas mostraron una actividad antioxidante 5 veces superior a la mostrada por la harina y 4 veces por el extracto proteínico en el radical ABTS, sin embargo, por las condiciones ácidas del medio la actividad antioxidante de las lectinas no mostró la capacidad de inhibir el radical al usar el radical FRAP, lo que es un indicio de la sensibilidad de la estructura de la lectina.

PERSPECTIVAS

- Realizar la caracterización estructural.
 1. Técnicas electroforéticas (Native-PAGE, SDS-PAGE, electroforesis bidimensional)
 2. Contenido de carbohidratos totales
 3. Identificación y cuantificación de iones metálicos
 4. Determinación de enlaces disulfuro y sulfhidrilo libre
 5. Determinar la composición de aminoácidos
- Efectuar la caracterización bioquímica de la lectina.
 1. Actividad hemaglutinante (eritrocitos tipo B y AB; especies animales)
 2. Efecto de los iones metálicos sobre la actividad hemaglutinante
 3. Conocer el carbohidrato específico al cual la lectina presenta afinidad para unirse. Por la inhibición de la actividad hemaglutinante utilizando monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y glicoproteínas
- Determinar la estabilidad de la lectina a diferentes agentes fisicoquímicos y enzimáticos.
 1. Estabilidad a temperatura y pH
 2. Resistencia a proteólisis enzimática (tripsina, quimotripsina)
 3. Resistencia a agentes reductores y desnaturalizantes (SDS, urea, DTT)
- Caracterizar la actividad antioxidante utilizando otros modelos *in vitro* (radicales sintéticos y en células).

REFERENCIAS

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: Tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593–1608. <https://doi.org/10.1039/b414350g>
- Ang, A. S. W., Cheung, R. C. F., Dan, X., Chan, Y. S., Pan, W., & Ng, T. B. (2014). Purification and Characterization of a GlucosamineBinding Antifungal Lectin from Phaseolus vulgaris cv. Chinese Pinto Beans with Antiproliferative Activity Towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 672–686. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0542-2>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Antova, G. A., Stoilova, T. D., & Ivanova, M. M. (2014). Proximate and lipid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivated in Bulgaria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.12.005>
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Arbeláez García, C. A. (2009). Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina & Laboratorio*, 15(7–8), 329–347.
- Arise, R. O., Acho, M. A., Yekeen, A. A., Omokanye, I. A., Sunday-Nwaso, E. O., Akiode, O. S., & Malomo, S. O. (2019). Kinetics of angiotensin -1 converting enzyme inhibition and antioxidative properties of *Azadirachta indica* seed protein hydrolysates. *Heliyon*, 5(5), e01747. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01747>
- Awika, J. M., & Duodu, K. G. (2017). Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *Journal of Functional Foods*, 38, 686–697. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.002>
- Ayyar, V. B., Arora, S., Murphy, C., & O’Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>

- Benzie, I. F. F., & Devaki, M. (2018). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In Resat Apak, E. Capanoglu, & F. Shahidi (Eds.), *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications* (1st ed., pp. 77–106). John Wiley & Sons Ltd.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299(1995), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2009.09.001>
- Bisht, I. S., & Singh, M. (2013). Asian Vigna. In M. Singh, I. Singh Bisht, & H. Upadhyaya (Eds.), *Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement* (pp. 237–267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397935-3.00010-4>
- Boukar, O., Bhattacharjee, R., Fatokun, C., Kumar, P. L., & Gueye, B. (2013). Cowpea. In M. Singh, I. Singh Bisht, & H. Upadhyaya (Eds.), *Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement* (pp. 137–156). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397935-3.00006-2>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brewer, C. F., Brown, R. D., & Koenig, S. H. (1983). Metal Ion Binding and Conformational Transitions in Concanavalin A: A Structure-Function Study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1(4), 961–997. <https://doi.org/10.1080/07391102.1983.10507497>
- Brinda, K. V., Mitra, N., Surolia, A., & Vishveshwara, S. (2004). Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Science*, 13(7), 1735–1749. <https://doi.org/10.1110/ps.04651004>
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76(P1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Castillo-Villanueva, A., Caballero-Ortega, H., Abdullaev-Jafarova, F., Garfias, Y., Jiménez-Martínez, M. C., Bouquelet, S., & Zenteno, E. (2007). Lectin from *Phaseolus acutifolius* var.

- escumite: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *J. Agric. Food Chem.*, 55(14), 5781–5787.
- Çekiç, S. D., Başkan, K. S., Tütem, E., & Apak, R. (2009). Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols. *Talanta*, 79(2), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.061>
- Chanda, S., & Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981–996.
- Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Ren, X. J., Deng, S. G., & Wu, C. W. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. *Food Chemistry*, 168, 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.117>
- Coelho, Luana C.B.B., Santos, A. F. S., Napoleão, T. H., Correia, M. T. S., & Paiva, P. M. G. (2012). Protein Purification by Affinity Chromatography. In R. Ahmad (Ed.), *Protein Purification* (pp. 53–72). InTech, Open Access Publisher. <https://doi.org/10.5772/29947>
- Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso, Silva, P. M. D. S., Lima, V. L. D. M., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., Napoleão, T. H., & Correia, M. T. D. S. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>
- Corredor Casas, Y. Z., Montaña Reyes, E. A., & Vega Castro, N. A. (2016). Lectinas con dominio de leguminosa: Características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidad. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science*, 32(2), 157–169.
- Cú-Cañetas, T., Ancona, D. B., Tintoré, S. G., Peraza, M. S., & Guerrero, L. C. (2015). Estudios de inhibición in vitro de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihipertensivo de fracciones peptídicas de *V. Unguiculata*. *Nutricion Hospitalaria*, 32(5), 2117–2125. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9624>
- Dam, T. K., & Brewer, C. F. (2007). Fundamentals of Lectin-Carbohydrate Interactions. In H. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology* (Vols. 3–4, pp. 397–452). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00058-1>
- Dam, Tarun K., & Brewer, C. F. (2004). Multivalent Protein-Carbohydrate Interactions: Isothermal

- Titration Microcalorimetry Studies. *Methods in Enzymology*, 379(2002), 107–128. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)79006-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)79006-0)
- Dash, P., & Ghosh, G. (2017). Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food Bioscience*, 18, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.12.004>
- Datta, P. K., Basu, P. S., & Datta, T. (1988). Purification of human erythrocytes specific lectins from rice bean, *Phaseolus calcaratus* syn. *Vigna umbellata*, by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 431, 37–44.
- De Hoff, P. L., Brill, L. M., & Hirsch, A. M. (2009). Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics*, 282(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0460-8>
- De Mejía, E. G., Hankins, C. N., Paredes-López, O., & Shannon, L. M. (1990). The Lectins and Lectin-Like Proteins of Tepary Beans (*Phaseolus Acutifolius*) and Teparycommon Bean (*Phaseolus Vulgaris*) Hybrids. *Journal of Food Biochemistry*, 14(2), 117–126. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1990.tb00825.x>
- De Mejia, E. G., Valadez-Vega, M. D. C., Reynoso-Camacho, R., & Loarca-Pina, G. (2005). Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6842-0>
- de Souza Rocha, T., Real Hernandez, L. M., Chang, Y. K., & de Mejía, E. G. (2014). Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. *Food Research International*, 64, 799–809. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.016>
- Diouf, D. (2011). Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] “omics” research for genetic improvement. *African Journal of Biotechnology*, 10(15), 2803–2810. <https://doi.org/10.5897/ajbx10.015>
- Domínguez-Perles, R., Machado, N., Abraão, A. S., Carnide, V., Ferreira, L., Rodrigues, M., Rosa, E. A. D. S., & Barros, A. I. R. N. A. (2016). Chemometric analysis on free amino acids and proximate compositional data for selecting cowpea (*Vigna unguiculata* L.) diversity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 53, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.006>
- Duan, X., Wen, Z., Shen, H., Shen, M., & Chen, G. (2016). Intracerebral hemorrhage, oxidative stress, and antioxidant therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–17.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Using ion exchange chromatography to purify a

- recombinantly expressed protein. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 95–103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00008-2>
- e Lacerda, R. R., do Nascimento, E. S., de Lacerda, J. T. J. G., Pinto, L. da S., Rizzi, C., Bezerra, M. M., Pinto, I. R., Filho, S. M. P., Pinto, V. de P. T., Filho, G. C., Gadelha, C. A. de A., & Gadelha, T. S. (2017). Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *95*, 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.097>
- Ehlers, J. D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, *53*, 171–184. <https://doi.org/10.1201/9781351072533>
- Elola, M. T., & Fink, N. E. (1995). Lectinas. I. Plantas Vasculares y Celulares. *Acta Farm. Bonaerense*, *14*(1), 49–61.
- Estrada Domínguez, V., Márquez Quiroz, C., De la Cruz Lázaro, E., Osorio Osorio, R., & Sánchez Chávez, E. (2018). Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con zinc: efecto en el rendimiento y contenido mineral. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *9*(SPE20), 4149–4160. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.986>
- Etzler, M. E. (1985). Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, *36*, 209–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.64.1.721>
- Etzler, M. E. (1986). Distribution and Function of Plant Lectins. In I. E. Liener, N. Sharon, & I. J. Goldstein (Eds.), *The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* (pp. 371–435). Academic Press, Inc.
- Fang, E. F., Lin, P., Wong, J. H., Tsao, S. W., & Ng, T. B. (2010). A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Extralong Autumn Purple Bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2221–2229. <https://doi.org/10.1021/jf903964u>
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guilleme, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *113*, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>
- Fery, R. L. (1990). The cowpea: production, utilization, and research in the United States. *Hort. Rev.*, *12*, 197–222.
- Gautam, A. K., Gupta, N., Narvekar, D. T., Bhadkariya, R., & Bhagyawant, S. S. (2018). Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lectin for biological activity. *Physiology*

- and Molecular Biology of Plants*, 24(3), 389–397. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0508-5>
- Gautam, A. K., Shrivastava, N., Sharma, B., & Bhagyawant, S. S. (2018). Current Scenario of Legume Lectins and Their Practical Applications. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 21(3), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s12892-018-0002-0>
- Goldstein, I. J., & Poretz, R. D. (1986). Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-Binding Specificity of lectins. In I. E. Liener, N. Sharon, & I. J. Goldstein (Eds.), *The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* (pp. 33–214). Academic Press, Inc. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-449945-4.50007-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-449945-4.50007-5)
- Grela, E. R., Kiczorowska, B., Samolińska, W., Matras, J., Kiczorowski, P., Rybiński, W., & Hanczakowska, E. (2017). Chemical composition of leguminous seeds: part I—content of basic nutrients, amino acids, phytochemical compounds, and antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1385–1395. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2849-7>
- Gupta, P., Singh, R., Malhotra, S., Boora, K. S., & Singal, H. R. (2010). Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0007-9>
- Gutiérrez-Urbe, J. A., Romo-Lopez, I., & Serna-Saldívar, S. O. (2011). Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.004>
- Guzmán-Partida, A. M., Robles-Burgueño, M. R., Ortega-Nieblas, M., & Vázquez-Moreno, I. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*, 86, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.02.005>
- Hamid, R., Masood, A., Wani, I. H., & Rafiq, S. (2013). Lectins: Proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(4SUPPL.1), S93–S103. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.34.S18>
- Harouna, D. V., Venkataramana, P. B., Ndakidemi, P. A., & Matemu, A. O. (2018). Under-exploited wild *Vigna* species potentials in human and animal nutrition: A review. *Global Food*

- Security*, 18(June), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.06.002>
- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., & Huang, T. (2018). Phaseolus vulgaris lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 70–83. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>
- Hebert, D. N., Lamriben, L., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2014). The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nature Chemical Biology*, 10(11), 902–910. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1651>
- Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortíz, B., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteínas-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(1), 21–27.
- Huang, W., Deng, Q., Xie, B., Shi, J., Huang, F., Tian, B., Huang, Q., & Xue, S. (2010). Purification and characterization of an antioxidant protein from Ginkgo biloba seeds. *Food Research International*, 43(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.015>
- Jiang, B., Wang, X., Wang, L., Lv, X., Li, D., Liu, C., & Feng, Z. (2019). Two-step isolation, purification, and characterization of lectin from Zihua snap bean (Phaseolus vulgaris) seeds. *Polymers*, 11(5), 785. <https://doi.org/10.3390/polym11050785>
- John, F. C., Tabbasum, K., & Rao, C. P. (2013). Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins. In A. Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 40, pp. 360–378). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00010-2>
- Kaptso, K. G., Njintang, Y. N., Komnek, A. E., Hounhouigan, J., Scher, J., & Mbofung, C. M. F. (2008). Physical properties and rehydration kinetics of two varieties of cowpea (Vigna unguiculata) and bambara groundnuts (Voandzeia subterranea) seeds. *Journal of Food Engineering*, 86(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.09.014>
- Katerere, D. R., Graziani, G., Thembo, K. M., Nyazema, N. Z., & Ritieni, A. (2012). Antioxidant activity of some African medicinal and dietary leafy African vegetables. *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4103–4108. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3674>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lagarda-Díaz, I., Guzman-Partida, A. M., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: Proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/ijms18061242>

- Lagunes-Espinoza, L. del C., Gallardo-López, F., Becerril-Hernández, H., & Bolaños-Aguilar, E. D. (2008). Diversidad cultivada y sistema de manejo de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* en la región de la chontalpa, Tabasco. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *14*(1), 13–21. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.11.047>
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2892-9>
- Lannoo, N., & Van Damme, E. J. M. (2014). Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00397>
- Lee, W. C., & Lee, K. H. (2004). Applications of affinity chromatography in proteomics. *Analytical Biochemistry*, *324*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.031>
- Lis, H., & Sharon, N. (1981). Affinity chromatography for the purification of lectins (A review). *Journal of Chromatography*, *215*, 361–372. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81415-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81415-6)
- Lonardi, S., Muñoz-Amatriaín, M., Liang, Q., Shu, S., Wanamaker, S. I., Lo, S., Tanskanen, J., Schulman, A. H., Zhu, T., Luo, M. C., Alhakami, H., Ounit, R., Hasan, A. M., Verdier, J., Roberts, P. A., Santos, J. R. P., Ndeve, A., Doležel, J., Vrána, J., ... Close, T. J. (2019). The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Plant Journal*, *98*(5), 767–782. <https://doi.org/10.1111/tpj.14349>
- Marconi, E., Ruggeri, S., & Carnovale, E. (1997). Chemical evaluation of wild under-exploited *Vigna* spp. seeds. *Food Chemistry*, *59*(2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00172-0)
- Márquez-Quiroz, C., De-la-Cruz-Lázaro, A., Osorio-Osorio, R., & Sánchez-Chávez, E. (2015). Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *J. Soil Sci. Plant Nutri.*, *15*(4), 839–847.
- Marsh, J. T., Tryfona, T., Powers, S. J., Stephens, E., Dupree, P., Shewry, P. R., & Lovegrove, A. (2011). Determination of the N-glycosylation patterns of seed proteins: Applications to determine the authenticity and substantial equivalence of genetically modified (GM) crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(16), 8779–8788. <https://doi.org/10.1021/jf2010854>
- Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant

- lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, 134(September), 110827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>
- Morales-Cerda, L. (2014). *Separación y caracterización de las lectinas del frijol ayocote (Phaseolus coccineus)*. Instituto Tecnológico de Celaya.
- Naismith, J. H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Hunter, W. N., Raftery, J., Kalb, A. J., & Yariv, J. (1994). Refined structure of concanavalin A complexed with methyl alpha-D-mannopyranoside at 2.0 Angstroms resolution and comparison with the saccharide-free structure. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50(6), 847–858. <https://doi.org/10.1107/S0907444994005287>
- Nascimento, K. S., Cunha, A. I., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2012). An overview of lectins purification strategies. *Journal of Molecular Recognition*, 25(11), 527–541. <https://doi.org/10.1002/jmr.2200>
- Ng, Z. X., Chai, J. W., & Kuppusamy, U. R. (2011). Customized cooking method improves total antioxidant activity in selected vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2), 158–163. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526931>
- Ortiz, B., Bacilio, M., Gorocica, P., Montaña, L. F., Garfias, Y., & Zenteno, E. (2000). The hydrophobic character of peanut (*arachis hypogaea*) isoagglutinins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6267–6270. <https://doi.org/10.1021/jf0006401>
- Oyatomi, O., Fatokun, C., Boukar, O., Abberton, M., & Ilori, C. (2016). Screening wild *Vigna* species and cowpea (*Vigna unguiculata*) landraces for sources of resistance to *Striga gesnerioides*. In N. Maxted, E. M. Dulloo, & B. V. Ford-Lloyd (Eds.), *Enhancing crop gene pool use: Capturing wild relatives and Landrace diversity for crop improvement* (pp. 27–36). CAB Int.
- Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (1992). Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36(2), 113–118. <https://doi.org/10.1007/BF02929691>
- Pandiyan, M., Senthil, N., Anitha, M., Raveendran, M., Sudha, M., Latha, M., Nagarajan, P., Toomoka, N., & Balasubramanian, P. (2012). Diversity analysis of *Vigna* sp through morphological markers. *Wudpecker Journal of Agricultural Research*, 1(September), 335–340.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>

- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Barre, A., & Rougé, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. In A. M. Wu (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 491, pp. 27–54). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7_3
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Prior, R. L., & Wu, X. (2013). Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *American Journal of Biomedical Sciences*, 5(2), 126–139. <https://doi.org/10.5099/aj130200126>
- Quintanar-Escorza, M. A., & Calderón-Salinas, J. V. (2009). La Capacidad Antioxidante Total. Bases Y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89–101. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb093d.pdf>
- Rameshwaram, N. R., Karanam, N. K., Scharf, C., Völker, U., & Nadimpalli, S. K. (2009). Complete primary structure of a newly characterized galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab*. *Glycoconjugate Journal*, 26(2), 161–172. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9173-1>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Ribeiro, A. C., Ferreira, R., & Freitas, R. (2018). Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 58, pp. 1–42). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5>
- Rivas-Vega, M. E. (2006). *Valor nutricional del frijol yorimon (Vigna unguiculata L. Walp) para camarón blanco del pacífico (Litopenaeus vannamei)*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
- Rüdiger, H., & Gabius, H. J. (2002). Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589–613. <https://doi.org/10.1023/A:1020687518999>

- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177–187. <https://doi.org/10.1080/10715760290006411>
- Sharma, A., Ng, T. B., Wong, J. H., & Lin, P. (2009). Purification and Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2009/929568>
- Sharon, N., & Lis, H. (1990). Legume lectins—a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4(14), 3198–3208.
- Sharon, N., & Lis, H. (2001). The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In A. M. Wu (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 491, pp. 1–16). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7_1
- Sharon, N., & Lis, H. (2013). Lectins. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (pp. 701–705). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00217-6>
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53–62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- Sharon, Nathan, & Lis, H. (2002). How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6586–6591. <https://doi.org/10.1021/jf020190s>
- Shiniti Nagano, C. (2007). *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores* [Universitat de València]. https://digital.csic.es/bitstream/10261/22764/1/Tesis_Celso_Nagano.pdf
- Sombié, P. A. E. D., Compaoré, M., Coulibaly, A. Y., Ouédraogo, J. T., De La Salle Tignégré, J. B., & Kiendrébéogo, M. (2018). Antioxidant and phytochemical studies of 31 cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. *Foods*, 7(9), 143. <https://doi.org/10.3390/foods7090143>
- Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N., Swaminathan, C. P., Mitra, N., & Surolia, A. (2001). Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1527(3), 102–111. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00153-2)
- Srivastava, P., Raut, H. N., Wagh, R. S., Puntambekar, H. M., & Kulkarni, M. J. (2012). Purification and characterization of an antioxidant protein (~16 kDa) from *Terminalia*

- chebula fruit. *Food Chemistry*, 131(1), 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.048>
- Strasser, R. (2016). Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 26(9), 926–939.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>
- Sun, Y., Yang, C., & Tsao, R. (2018). Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays. In R Apak, E. Capanoglu, & F. Shahidi (Eds.), *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 1–20). John Wiley & Sons, Inc.
- Suseelan, K. N., Bhatia, C. R., & Mitra, R. (1997). Purification and characterization of two major lectins from *Vigna mungo* (blackgram). *Journal of Biosciences*, 22(4), 439–455.
<https://doi.org/10.1007/BF02703190>
- Thompson, L. ., Tenebaum, A. V., & Hui, H. (1986). Effect of Lectins and the Mixing of Proteins on Rate of Protein Digestibility. *Journal of Food Science*, 51(1), 150–152.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10857.x>
- Thumbrain, D., Dwarka, D., Gerrano, A. S., & Mellem, J. J. (2020). Antioxidant and apoptotic potential of protein isolates derived from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2813–2823. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14535>
- Tomooka, N., Kaga, A., Isemura, T., Vaughan, D., Srinives, P., Somta, P., Thadavong, S., Bounphanousay, C., Kanyavong, K., Inthapanya, P., Pandiyan, M., Senthil, N., Ramamoorthi, N., Jaiwal, P. K., Jing, T., Umezawa, K., & Yokoyama, T. (2011). *Vigna* Genetic Resources. Edited by Norihiko Tomooka and Duncan Vaughan. *The 14th NIAS International Workshop on Genetic Resources – Genetic Resources and Comparative Genomics of Legumes (Glycine and Vigna)*. Tsukuba: National Institute of Agrobiological Science., 11–21.
- Tomooka, N., Naito, K., Kaga, A., Sakai, H., Isemura, T., Ogiso-Tanaka, E., Iseki, K., & Takahashi, Y. (2014). Evolution, domestication and neo-domestication of the genus *Vigna*. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 12(SUPPL. 1), 2011–2014.
<https://doi.org/10.1017/S1479262114000483>
- Tripathi, A., Thakur, N., & Katoch, R. (2018). Studies on lectins from major *vigna* species. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 31(2), 93–100. <https://doi.org/10.5958/0974-4479.2018.00016.3>
- Tsaneva, M., & Van Damme, E. J. M. (2020). 130 years of Plant Lectin Research. *Glycoconjugate Journal*, 37(5), 533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>

- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Affinity Chromatography: General Methods. In B. R. Richard & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 417–438). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3)
- Valadez-Vega, C., Guzmán-Partida, A. M., Soto-Cordova, F. J., Álvarez-Manilla, G., Morales-González, J. A., Madrigal-Santillán, E., Villagómez-Ibarra, J. R., Zúñiga-Pérez, C., Gutiérrez-Salina, J., & Becerril-Flores, M. A. (2011). Purification, Biochemical Characterization, and Bioactive Properties of a Lectin Purified from the Seeds of White Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius* Variety *Latifolius*). *Molecules*, *16*, 2561–2582. <https://doi.org/10.3390/molecules16032561>
- Valadez-Vega, C., Morales-González, J. A., Sumaya-Martínez, M. T., Delgado-Olivares, L., Cruz-Castañeda, A., Bautista, M., Sánchez-Gutiérrez, M., & Zuñiga-Pérez, C. (2014). Cytotoxic and antiproliferative effect of tepary bean lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 cell lines. *Molecules*, *19*(7), 9610–9627. <https://doi.org/10.3390/molecules19079610>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Van Damme, E. J. M. (2014). History of Plant Lectin Research. In J. Hirabayashi (Ed.), *Lectins* (Vol. 1200, pp. 3–13). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6>
- Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., & Rougé, P. (1998). Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *17*(6), 575–692. <https://doi.org/10.1080/07352689891304276>
- Van Damme, E. J., Peumans, W. J., Pusztai, A., & Bardocz, S. (1998). *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley & Sons.
- Vargas-Albores, F., Hernández, J., Córdoba, F., & Zenteno, E. (1993). Isolation of an Immunosuppressive Lectin from *Phaseolus vulgaris* L. cv Cacahuete Using Stroma. *Preparative Biochemistry*, *23*(4), 473–483. <https://doi.org/10.1080/10826069308544570>
- Varilova, T., Madera, M., Pacakova, V., & Stulik, K. (2006). Separation Media in Affinity Chromatography of Proteins - A Critical Review. *Current Proteomics*, *3*(1), 55–79. <https://doi.org/10.2174/157016406777145685>
- Vitale, A., & Bollini, R. (1995). Legume Storage Proteins. In J. Kigel & G. Galili (Eds.), *Seed Development and Germination* (pp. 73–102). Marcel Dekker, Inc.

- Weis, W. I., & Drickamer, K. (1996). Structural Basis of Recognition Lectin-Carbohydrate. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 441–473.
- Wong, J. H., & Ng, T. B. (2003). Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 545–550. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03080-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03080-2)
- Wu, J., Wang, J., Wang, S., & Rao, P. (2016). Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.092>
- Ye, X. Y., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2000). Structurally dissimilar proteins with antiviral and antifungal potency from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Life Sciences*, 67(26), 3199–3207. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00905-X)
- Zenteno, E., Ortega, M., Qin, Z., Montreuil, J., & Debray, H. (1994). Fast purification of phaseolus vulgaris isolectins. *Preparative Biochemistry*, 24(3–4), 175–183. <https://doi.org/10.1080/10826069408010091>
- Zhang, J., Shi, J., Ilic, S., Jun Xue, S., & Kakuda, Y. (2008). Biological properties and characterization of lectin from red kidney bean (*Phaseolus Vulgaris*). *Food Reviews International*, 25(1), 12–27. <https://doi.org/10.1080/87559120802458115>
- Zia-ul-haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., & Feo, V. De. (2013). Antioxidant Activity of the Extracts of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Cultivars Commonly Consumed in Pakistan. *Molecules*, 18(2), 2005–2017. <https://doi.org/10.3390/molecules18022005>

ANEXO 1: curvas de calibración

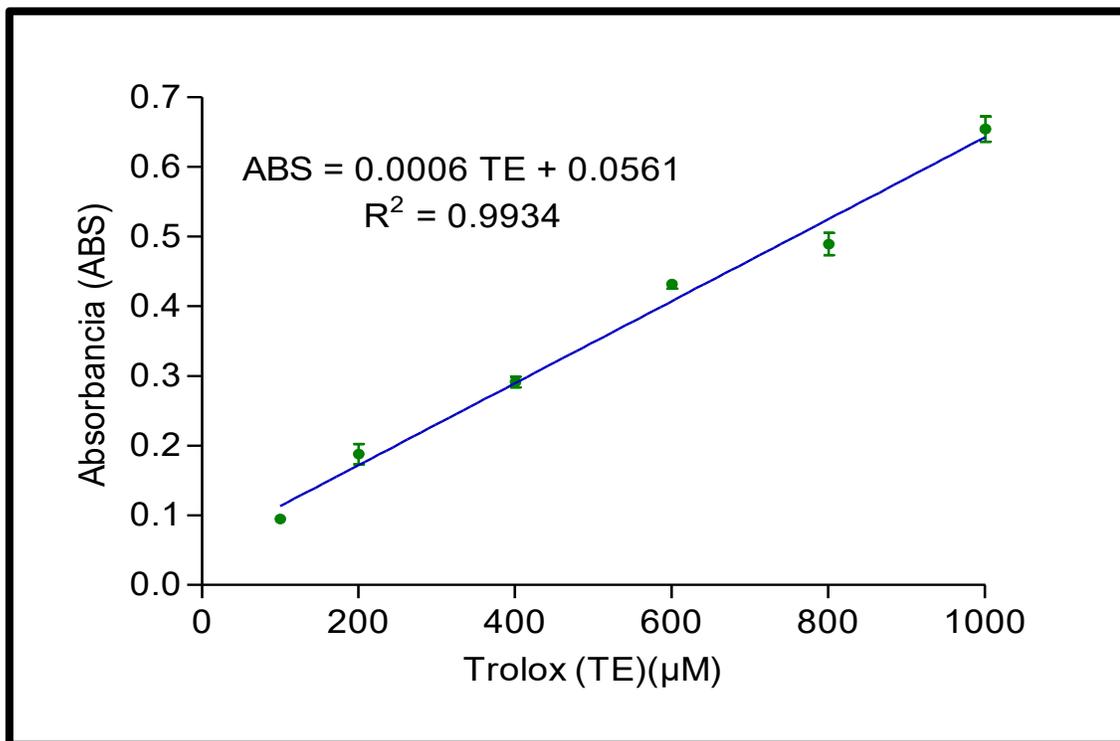


Figura 16. Curva de calibración – Actividad antioxidante: FRAP [100-1000 μM de Trolox como estándar]

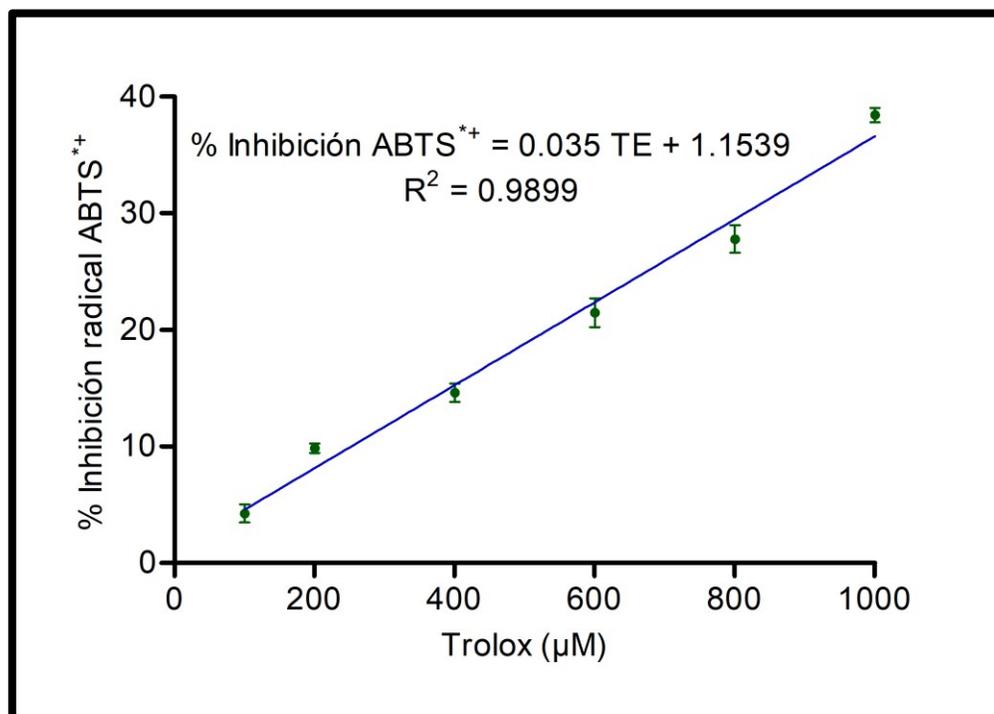


Figura 17. Curva de calibración – Actividad antioxidante: ABTS [100-1000 μM de Trolox como estándar]

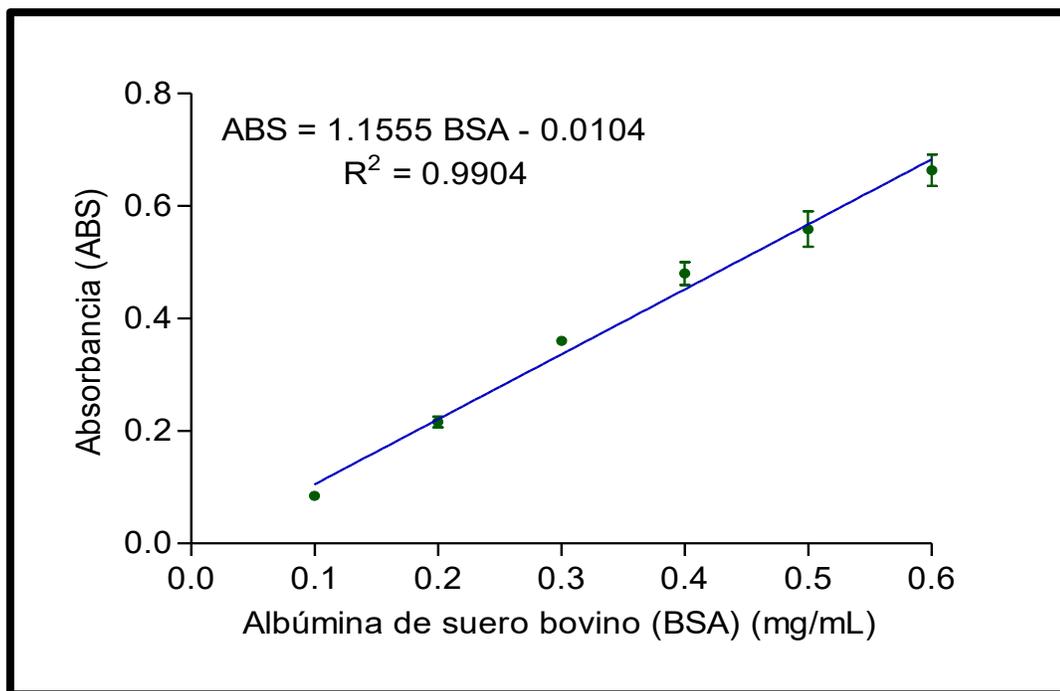


Figura 18. Curva de calibración – Determinación de proteína soluble: método Bradford [0.1-0.6 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar]

ANEXO 2: Productividad

- **Congreso**

P. Mancera-Castro, L. González-Cruz, C. Valadez-Vega, D. Hernández-López, H. Ramírez-Medina, M. Juárez-Goiz, A. Bernardino-Nicanor. (2020). Purificación y caracterización biológica parcial de una lectina de frijol vaquita. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

- **Publicación**

P. Mancera-Castro, L. González-Cruz, C. Valadez-Vega, D. Hernández-López, H. Ramírez-Medina, M. Juárez-Goiz, A. Bernardino-Nicanor. (2021). Purificación y caracterización biológica parcial de una lectina de frijol vaquita. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 6:29-34.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León a 19 de Marzo de 2021

IBQ Pedro Mancera Castro
PRESENTE

A través de este medio tengo el agrado de informarle que su artículo, **Purificación y caracterización biológica parcial de una lectina de frijol vaquita.**

Cuyos autores son: Mancera-Castro P., González-Cruz L., Valadez-Vega C., Hernández-López D., Ramírez-Medina H., Juárez-Goiz M., Bernardino-Nicanor A.

Fue evaluado satisfactoriamente y ha sido aceptado para ser publicado en la Revista de publicación anual: Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, IDCYTA, cuyo ISSN es 2448-7503., en el mes de mayo del 2021.

Me despido enviándole un cordial saludo.



Dr. Juan Gabriel Báez González
Editor de la Revista Investigación y Desarrollo en
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Revista Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos
es una publicación anual

IDCYTA

Purificación y caracterización biológica parcial de una Lectina de Frijol Vaquita

Mancera-Castro P.¹, González-Cruz L.^{1,2}, Valadez-Vega C.³, Hernández-López D.², Ramírez-Medina H.^{1,2}, Juárez-Goiz M.², Bernardino-Nicanor A.^{1,2*}

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Celaya, Posgrado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Celaya, Guanajuato.

² Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica.

³ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud. Pachuca de Soto, Hidalgo.

*aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx

Resumen

Las lectinas son proteínas que no son producto de la respuesta inmune, tienen la capacidad de aglutinar células y precipitar glicoconjugados, ya que actúan como moléculas de reconocimiento dentro de las células y en las superficies celulares, llamando la atención dentro del área biomédica, ya que presentan propiedades biológicas, principalmente capacidad anticancerígena. El objetivo del presente estudio fue purificar y caracterizar parcialmente la lectina de frijol vaquita (*Vigna unguiculata*), así como evaluar su actividad antioxidante, para lo cual, se utilizó frijol vaquita proveniente del estado de Hidalgo, la lectina se aisló por cromatografía de afinidad, utilizando fetuina como matriz, la lectina se obtuvo en las fracciones 54 a la 68, la cual mostró actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos tipo A y O (11 906.98 unidades de hemaglutinación/mg proteína, en ambos casos); además, el grado de purificación aumentó 69.30 veces comparado con el extracto crudo. La lectina mostró inhibición del radical ABTS (pH básico) (236.94 $\mu\text{mol Trolox/g}$), sin embargo, frente al radical FRAP no presentó actividad, debido a las condiciones ácidas del medio. Este estudio representa la base para una posterior caracterización bioquímica y biológica de la lectina y su posible aplicación en el área médica.

Palabras clave: *Vigna unguiculata*, actividad antioxidante, actividad hemaglutinante.

Abstract

Lectins are proteins that are not a product of the immune response, they have the ability to agglutinate cells and precipitate glycoconjugates, since they act as recognition molecules within cells and on cell surfaces, drawing attention within the biomedical area, since they have biological properties, mainly anticancer capacity. The objective of the present study was to partially purify the cowpea lectin (*Vigna unguiculata*) and to evaluate its antioxidant and hemagglutinating activity, to this purpose cowpea seed from the state of Hidalgo were used, the lectin was isolated by affinity chromatography, using fetuin as matrix, obtaining the lectin in the fractions comprised in the range of 54-68, which showed hemagglutination (specific activity) on the human erythrocytes type A and O (11 906.98 hemagglutinating units/mg of protein, in both cases); furthermore, the degree of purification increased 69.30 fold compared to the crude extract. Lectin showed inhibition of the ABTS radical (basic pH) (236.94 $\mu\text{mol Trolox/g}$), however, against the FRAP radical it did not show activity, due to the acidic conditions of the medium. This study represents the basis for a subsequent biochemical and biological characterization of lectin and its possible application in the medical area.

Keywords: *Vigna unguiculata*, antioxidant activity, hemagglutinating activity.

Área: Cereales, leguminosas y oleaginosas