



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

“Purificación y Caracterización de lectinas en flores de jamaica  
*Hibiscus sabdariffa L.*”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUIMICO FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA:

**P. Q.F.B. RAQUEL MARTÍNEZ JARDÓN**

DIRECTOR DE TESIS:  
**D.C. BERTHA FENTON NAVARRO**

MORELIA, MICHOACÁN, MEXICO  
julio 2008



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la  
DC Bertha Fenton Navarro en el  
Laboratorio de Glicobiología  
División de Estudios de Posgrado  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"  
UMSNH

Apoyado por:  
COECYT- MICHOACAN CB070261-6

## **Agradecimientos**

A **Dios** por haberme acompañado en cada momento, por permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios. Y por cuidar a mi familia en los días de ausencia.

Directora de la tesis **DC. Bertha Fenton Navarro**, por su ejemplar dirección, sus múltiples enseñanzas, su apoyo personal, por estar dispuesta en cada momento atender las dudas que iban surgiendo. Porque sin su orientación y apoyo no hubiera sido posible realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, que es el finalizar mis estudios de licenciatura, por creer en mí, por hacerme sentir importante y por mostrarme que yo puedo hacer la diferencia, por esto y más ¡**GRACIAS!**

Quiero hacer mención especial a ellos que no podían faltar y de la que estoy más agradecida, por su apoyo constante y generoso, porque han estado a mi lado a cada momento y siempre me animaron a realizar mis sueños. Sin lugar a dudas esta tesis es también en parte suya. A mis padres **María de la Luz Jardón** y **Juan Martínez**, a ellos a quienes les debo todo. Soportaron serenamente nuestra separación como familia y me dieron todo el apoyo del mundo. Nadie va vivir este momento de ver mi tesis acabada con mayor felicidad que ellos.

A mis hermanos **Edna Yuridia** y **Juan Carlos**, quienes me llevaban a despejar mis ideas de vez en cuando. A mis amigos de grandes momentos, **Alfredo, Gloria, Jesús, Leticia y Sherina**, porque son las personas que han hecho mi vida agradable y feliz. Y a todos los amigos y compañeros que me faltaron.

No puedo olvidar por supuesto, a quienes han aligerado el peso de mis preocupaciones, a mis primos y tíos, **Alicia, Consuelo y Manuel**, por su apoyo y confianza. Especialmente a creía mucho en mí, **José Luis Jardón Olvera (qdp)** porque era una persona excepcional y me quería mucho.

A todos mis profesores quienes me han formado, desde pequeña hasta ser una profesionista. **DC. Guadalupe Partida, MFB. Blanca Nateras y QFB. Alma Rosa Ríos**, porque he compartido momentos, consejos muy valiosos para mi formación y porque se tomaron tiempo para la revisión.

A **QFB. Gricelda Pérez Ordaz**, gran profesora, persona y amiga, que sin dudar, me brindo su apoyo desde el inicio de la tesis. A todos y a cada uno con quienes he compartido un momento agradable ¡**GRACIAS!**

Con todo mi cariño y afecto

**RAQUEL MARTINEZ JARDON**

## INDICE GENERAL

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS .....	ii
INDICE GENERAL .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	vi
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	vii
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION	
1. PLANTAS MEDICINALES .....	2
1.1 Descripción de la planta de jamaica.....	2
1.2 Propiedades nutricionales .....	4
1.3 Composición Química .....	4
1.4 Propiedades medicinales y usos tradicionales .....	5
1.5 Propiedades farmacológicas .....	5
2. LECTINAS	
2.1 Definición .....	8
2.2 Descripción .....	8
2.3 Clasificación .....	9
2.4 Estructura .....	10
2.5 Función .....	10
2.6 Usos.....	11
3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	
3.1 Precipitación salina.....	13
3.2 Diálisis .....	14
3.3 Liofilizado.....	14
3.4 Técnicas de separación .....	14
3.4.1 Cromatografía de filtración por gel.....	14
3.4.2 Cromatografía de intercambio iónico .....	14
3.4.3 Cromatografía de afinidad .....	14
3.4.4 Cromatografía de alta resolución .....	15
3.5 Electroforesis .....	15
3.5.1 Electroforesis en Gel .....	15
II JUSTIFICACIÓN.....	16

III HIPÓTESIS .....	16
IV OBJETIVOS .....	16
a) General.....	16
b) Especifico .....	16
V MATERIAL .....	17
VI MÉTODOS.....	17
VII RESULTADOS	
Actividad hemaglutinante .....	19
Precipitación Fraccionada con Sulfato de Amonio.....	20
Especificidad para Carbohidratos .....	25
Termoestabilidad .....	30
Dependencia de cationes.....	36
Cromatografía de intercambio iónico .....	38
Cromatografía de exclusión molecular.....	40
Electroforesis SDS-PAGE .....	41
Propiedades Fisicoquímicas de HLS .....	42
VIII DISCUSIÓN .....	43
IX CONCLUSIONES .....	47
X PERSPECTIVAS .....	48
XI BIBLIOGRAFÍA .....	49

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Estructura antocianinas .....	4
2. Interacción de la lectina, en los procesos celulares .....	11
3. Actividad del extracto crudo .....	19
4. Actividad concentración 0-20% .....	20
5. Actividad concentración 20-40% .....	21
6. Actividad concentración 40-60% .....	22
7. Actividad concentración 60-80% .....	23
8. Actividad concentración 80-100% .....	24
9. Termoestabilidad Extracto Crudo .....	30
10. Termoestabilidad 0-20% .....	31
11. Termoestabilidad 20-40% .....	32
12. Termoestabilidad 40-60% .....	33
13. Termoestabilidad 60-80% .....	34
14. Termoestabilidad 80-100% .....	35
15. Cromatografía de intercambio iónico 60-80% .....	38
16. Cromatografía de exclusión molecular .....	40
17. Electroforesis en SDS-PAGE .....	41

## INDICE DE TABLAS

Numero de Tabla	Pág.
1. Compuestos de la jamaica .....	5
2. Clasificación de las lectinas animales .....	9
3. Clasificación de las lectinas vegetales .....	10
4. Función de las lectinas .....	12
5. Actividad de hemaglutinación extracto crudo .....	19
6. Actividad de hemaglutinación 0-20% .....	20
7. Actividad de hemaglutinación 20-40% .....	21
8. Actividad de hemaglutinación 40-60% .....	22
9. Actividad de hemaglutinación 60-80% .....	23
10. Actividad de hemaglutinación 80-100% .....	24
11. Especificidad de carbohidratos Extracto Crudo .....	25
12. Especificidad de carbohidratos 0-20% .....	26
13. Especificidad de carbohidratos 20-40% .....	26
14. Especificidad de carbohidratos 40-60% .....	27
15. Especificidad de carbohidratos 60-80% .....	27
16. Especificidad de carbohidratos 80-100% .....	28
17. Comparativa de la especificidad para carbohidratos .....	29
18. Termoestabilidad Extracto Crudo .....	30
19. Termoestabilidad 0-20% .....	31
20. Termoestabilidad 20-40% .....	32
21. Termoestabilidad 40-60% .....	33
22. Termoestabilidad 60-80% .....	34
23. Termoestabilidad 80-100% .....	35
24. Dependencia de Cationes Extracto Crudo .....	37
25. Actividad Especifica de HLS .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramos
AE	Actividad específica
C	Concentración mínima
cm	Centímetros
DNA	Acido desoxirribonucleico
EC	Extracto crudo
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
Gal acet	Galactosa acetilada
Glu	Glucosa
GluNAc	N-acetil galactosamina
GSH	Glutación reducido
HLS	Lectina de <i>Hibiscus sabdariffa</i>
kg	Kilogramos
L	Litro
Lac	Lactosa
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacáridos
m	Metros
M	Molar
Man	Manosa
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanometros
NO	Oxido nítrico
°C	Grados centígrados
PCA	Acido protocateico
pp	Precipitado
Rib	Ribosa
ROS	Especies reactivas a oxígeno
SA	Arseniato de sodio
Sac	Sacarosa
Sb	Sobrenadante
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamina dodecil sulfato de sodio
UHE	Unidades de hemaglutinación
Xyl	Xilosa

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Ácido:** Que tiene un pH con valor menor de 7.

**Ácidos grasos:** Ácidos carboxílicos de cadena lineal, los cuales se aislaron por primera vez a partir de las grasas. Los ácidos grasos pueden ser saturados, cuando los eslabones de carbono son únicos y son insaturados cuando al menos dos átomos de carbono están unidos por un enlace doble.

**Antioxidante:** Que combate las acciones de los radicales libres, los cuales se producen naturalmente por el cuerpo durante el metabolismo celular; cuando se produce en exceso, a veces puede tener un efecto degenerativo dañino.

**Antipirético:** Reductor de fiebre

**Antocianina:** Pigmento de las plantas principalmente responsable de dar color rosado, rojo o púrpura. Forma parte del grupo de polifenoles.

**Bacterias:** Agentes infecciosos unicelulares que viven y se reproducen generalmente sobre materia orgánica muerta, y a veces son capaces de causar enfermedades en seres humanos. El estafilococo y el estreptococo son ejemplos de bacterias.

**Cancerígeno:** Productor de cáncer.

**Cápsula:** Fruto seco que abre cuando madura y libera sus semillas por pequeños agujeros (poros) o una abertura transversal, como la fruta de la amapola.

**Carbohidratos:** Son aldehídos o cetonas polihidroxilados. Constituyen una de las familias de macromoléculas de origen biológico más diversas y abundantes.

**Células sanguíneas rojas:** También llamados eritrocitos, son células de la sangre, responsables de llevar oxígeno por medio de la hemoglobina.

**Colesterol:** Sólido ceroso, ejemplo de esteroles. En el cuerpo, el hígado produce el colesterol en la sangre, también contribuye en la creación de hormonas, participa en la elaboración de vitamina D y ácidos biliares, que ayudan a la digestión.

**Diurético:** Incrementa la eliminación de orina.

**Enzima:** Proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas en diversas rutas metabólicas.

**Espasmo:** Contracción muscular que es involuntaria y dolorosa.

**Flavones:** Compuestos de la planta que pertenece al grupo flavonoide, presentes en verduras, fruta, vino o té.

**Flavonoides:** Pigmentos de la planta con efecto diurético, propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas.

**Hipertensión:** Presión arterial elevada, cuyo valor es superior a 110/70mm de Hg

***In vitro*:** Designación de procesos biológicos o experimentos conducidos en un ambiente artificial fuera de un organismo vivo.

***In vivo*:** Designación de procesos biológicos o experimentos conducidos en un organismo vivo.

**Laxante:** Sustancia que estimula la evacuación intestinal.

**Lectinas:** Proteínas o glicoproteínas que unen de manera específica y reversible a mono- y oligosacáridos, no tienen actividad catalítica y en contraste con los anticuerpos no son productos de una respuesta inmune.

**Mucílago:** Sustancia pegajosa del carbohidrato presente en muchas plantas.

**Polifenoles:** Compuestos que contienen varios grupos de fenol. A menudo con característica antibacteriana y antioxidante.

**Proteína:** Péptido con un número de residuos de aminoácidos superior a 100. Son moléculas usadas por el cuerpo, como componente básico, porque realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan la enzimática, hormonal, transportadora (hemoglobina), defensiva (anticuerpos), estructural (colágeno), etc. Las proteínas de todo ser vivo están determinadas genéticamente, es decir, la información genética (genes) determinan qué proteínas tendrá un individuo.

**Radicales libres:** Moléculas orgánicas o inorgánicas, en general son extremadamente inestables y, por tanto, con gran poder reactivo. Se pueden sintetizar en el laboratorio, se pueden formar en la atmósfera por radiación, y también se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno. Actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN.

## RESUMEN

La flor de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*), se utiliza en la elaboración de bebidas refrescantes, gelatinas e infusiones, así como para la preparación de mermeladas, ates, jaleas, cremas y otros derivados. Nutricionalmente contiene vitamina C. En la medicina tradicional los extractos de esta flor, se utilizan para tratar diversas afecciones. Las acciones farmacológicas de los extractos de la flor reportadas incluyen: disminución de colesterol, actividades antioxidantes, antinociceptivas, antipiréticas y antihipertensivas potentes. Los extractos se caracterizan por tener baja toxicidad. La dosis letal vía oral para ratas, es superior a 5000mg/kg. Por sus propiedades nutricionales y farmacológicas reportadas, el extracto es una fuente potencial de productos útiles terapéuticos.

Aunque el extracto ha sido ampliamente analizado y se conoce que dentro de otros componentes contiene principalmente polisacáridos. A la fecha no existen reportes del análisis de lectinas.

En este trabajo se reporta la identificación, purificación y caracterización de una lectina en la flor de jamaica.

El extracto crudo, presentó afinidad con los cuatro grupos sanguíneos, mostrando lectinas con afinidades para los grupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>: GalNAc-Gal-Fuc, para el grupo B: GalNAc-Gal-Fuc, y para el grupo O: Fuc-Gal. Con esta identificación se procedió a purificar a las lectinas utilizando una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La fracción que presentó la mayor actividad fue de 60 a 80% de sulfato de amonio. Esta fracción se escogió para continuar la purificación mediante cromatografías. Primero se utilizó una cromatografía de interacción hidrofóbica, seguida de una de exclusión molecular. El análisis de la pureza así como la obtención del peso molecular aparente se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones nativas.

A la lectina obtenida de la de la flor de la jamaica se le denominó "Lectina de *Hibiscus sabdariffa*" (HLS) con las siguientes propiedades: el peso molecular aparente es de 32,500 Da. Es independiente de la temperatura, no requiere de iones divalentes, es estable en el intervalo de pH 6-8. Tiene la siguiente especificidad a carbohidratos en orden decreciente: Gal>GalNAc>Glu>GalAcet>GluNAc>Lac>Rib>Fuc>Man>Sac>Xyl.

Esta lectina puede estar relacionada con las funciones fisiológicas reportadas de la jamaica.

# I INTRODUCCIÓN

## 1.- Plantas medicinales

Desde nuestros antepasados, el hombre ha utilizado las plantas como una forma de ayuda para poder calmar los dolores y malestares. En la antigua Grecia encontramos a Hipócrates, quien ya recomendaba espárrago y ajo, las cuales se les consideraba diuréticas, la adormidera para inducir el sueño y las hojas de sauce para aliviar el dolor y la fiebre. Desde los egipcios hasta la actualidad, se emplean los principios activos que se encuentran dentro de las plantas (Bahr, 1988).

Las plantas tienen un lugar muy importante en la mayoría de los seres humanos, por que han logrado el bienestar de cada uno. Proporcionan desde armas, utensilios, colorantes, y ropa, hasta llegar a la base más importante, los principios activos (Went, 2001).

Hay poblaciones que distinguen centenares de plantas y saben muchas de las propiedades de cada una, además de utilizarlas para curar enfermedades (Went, 2001), naciendo con ello las plantas medicinales.

Es tan inmenso el mundo vegetal, por lo que su estudio ha llevado años. Tan importantes son las plantas por el gran trabajo que desempeñan; y es que hasta el momento la mitad de los medicamentos que se usan son de origen vegetal y la cuarta parte de ellas contienen extractos o sustancias activas de las plantas (Reader's Digest, 2007).

Existen una gran variedad de hierbas de las cuales se les conocen muchas cualidades y propiedades. Muchas ya tienen investigaciones químicas, biológicas y farmacológicas, y por hacer mención de algunas tenemos a la manzanilla, el ajo y la valeriana, las cuales tienen un estándar clínico muy alto (Dollemore, *et al.*, 1995).

Toda persona ha tomado un té o un extracto, puesto que además de ser económico es muy fácil adquirirlo. Y es que esos remedios para el insomnio, el estrés, los cólicos y las náuseas, solo eran adquiridos en tiendas de productos naturales. Actualmente es tan usual encontrar una gran variedad de tisanas (infusiones) en el mercado local hasta en el centro comercial (Dollemore, *et al.*, 1995; Bahr, 1988).

Las plantas forman parte de la dieta del ser humano, pero además, es importante resaltar que su acción depende del metabolismo de cada persona, por lo que se debe administrar con paciencia y constancia con la finalidad de tener el resultado esperado (Hernandez, 1999; Dollemore, *et al.*, 1995).

Por otra parte, el estudio científico actual de las propiedades curativas de las plantas, promete descubrir propiedades que incluso van más allá de los usos tradicionales ya conocidos.

### 1.1 Descripción de la planta de jamaica

En nuestro país se le conoce como Jamaica, su nombre científico es *Hibiscus sabdariffa*, L, cuya especie es la más empleada con finalidades terapéuticas en México y Centroamérica (<http://www.uv.mx>; Omobuwajo, *et al.*, 2000).

África, es el lugar nativo de *Hibiscus sabdariffa*, L (Omobuwajo, *et al.*, 2000, <http://www.uv.mx>). Existen más de 150 especies del género *Hibiscus*. La especie más empleada con finalidades terapéuticas es el *Hibiscus* de Centroamérica (*Hibiscus sabdariffa* L.) que se encuentra desde el sur de

México hasta Panamá, pero se cultiva en otras regiones tropicales como Tailandia o Senegal. Es conocida con los siguientes nombres comunes: Karkade, Roselle (inglés), Sorrel (inglés del Caribe), Guinea sorrel, Rosa de jamaica, Flor de jamaica, Agrio de Guinea, Quetmia ácida, viña, *bissap* (francés de Senegal), *roselle carcadé* (francés), *omutete* (inglés de Namibia) Saril (Panamá) (Badreldin, *et al.*, 2005, Reader's Digest 2007, <http://es.wikipedia.org>, <http://www.uv.mx>).

La planta de jamaica tiene la siguiente clasificación científica: Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae, Genero: *Hibiscus*, Especie: *sabdariffa*, denominación binaria: *Hibiscus sabdariffa* L. ([http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus\\_sabdariffa](http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus_sabdariffa)).

Para su cultivo se deben tener ciertos cuidados como los son: exposición a una gran cantidad de luz solar, clima caliente y poca humedad, la temporada adecuada es de agosto a noviembre y en su desarrollo quitar la hierba y prevenir las plagas (hormigas), (<http://redescolar.ilce.edu.mx>).

A esta planta se le ha referido como un arbusto, el cual mide alrededor de 2.5m de altura, su tallo tiene una coloración roja, cilíndrica, lisa y suave, sus hojas son verdes y se observan en ellas venas de color rojo que alcanzan a ser largas o cortas, crecen de manera alterna y miden de 7.5 a 12.5 cm de longitud. Las hojas de la parte baja pueden contener de tres a siete lóbulos con orillas dentadas (<http://www.uv.mx>), el crecimiento de esta planta, es con un desarrollo anual (Omobuwajo, *et al.*, 2000).

Las flores aparecen individualmente en las uniones de las hojas y miden 12.5cm de ancho; son de un color amarillo, con un centro de color rosa a marrón, cambian a rosa al final del día, y a esta hora el cáliz es de 3.2 a 5.7cm de longitud, es típicamente rojo, y consiste de cinco largos sépalos con un collar (épicaliz) y de ocho a doce hojas delgadas de 3.2 a 5.7cm colocadas alrededor de la base (<http://www.uv.mx>).

El collar comienza a engrandecerse o ensancharse haciéndose carnoso, quebradizo, jugoso y envuelve completamente la cápsula aterciopelada de 1.25 a 2cm de longitud (<http://www.uv.mx>).

La cápsula es verde cuando está inmadura y tiene cinco válvulas. Cada válvula contiene de tres a cuatro semillas afelpadas de color ligeramente café y en forma de riñón, cada uno miden de 3 a 5mm de longitud. Cuando la cápsula está madura y seca, cambia a color café y se separa (<http://www.uv.mx>).

El cáliz, el tallo y las hojas tienen sabor ácido, muy parecido al arandino agrio de los pantanos (<http://www.uv.mx>), destaca algo curioso que en muy pocas plantas se puede ver y es que las flores se abren solamente por la mañana (<http://eljardin.info>).

## Partes empleadas de la planta y usos

Con la preparación de extractos que provienen de la cocción de las flores de la jamaica, se pueden preparar desde colorantes para jarabes y licores, hasta mermeladas, saborizantes y gelatinas (<http://www.uv.mx>).

La fibra que se pueden extraer, se emplea en la elaboración de canastas y cordajes, así también como en bebidas refrescantes. La semilla que se ha obtenido de la jamaica, constituye una fuente excelente de aceite de cocina (<http://www.uv.mx>).

El uso que se le da a los tallos tiernos, hojas y cálices, es en la preparación de sopas y salsas. Los cálices se ocupan como sustitutos de café (Omobuwajo, 2000).

## 1.2 Propiedades nutricionales

Las propiedades nutricionales del aceite y la semilla hacen que sea una fuente invaluable de alimento debido a su contenido proteico y calórico (33% proteína, 24% carbohidratos y 22% de grasa con base en el peso seco) y sustanciales cantidades de fibra (14% de peso seco como fibra) y considerables micronutrientes. Las flores contienen altos niveles de minerales, tales como hierro (88 mg/100 g), magnesio (442 mg/100 g), calcio (1.28%) y selenio (0.09 mg/kg) y vitamina C (Omobuwajo, *et al.*, 2000, <http://www.uv.mx>).

## 1.3 Composición Química

Los componentes reportados son los siguientes: Ácidos orgánicos (ácidos frutales): ácido hísico, ácido protocateico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido cítrico, ácido hibiscus y ácido tartárico (Badreldin, *et al.*, 2005).

También contienen mucilagos, de efecto antitusígeno (para tratar la tos) y aceites vegetales llamados fitoesteroles.

Diferentes pigmentos como antocianinas, hibiscina, gopitina, quercetina, mirecetina, hibiscetina, hibiscetrina y sabedaretina. De los anteriores, los principales son las antocianinas, que le dan la coloración brillante roja (cianidina) y azul (delfinidina) Figura 1, y la amarilla es causada por los flavonoles y flacones (Prenesti, *et al.*, 2005, <http://www.uv.mx>).

Los compuestos fenólicos son los que le dan el sabor ácido, (además del ácido ascórbico), esta acidez le proporciona frescura y es bactericida. El extracto acuoso en frío va a conservar la frescura, y la vitamina C (Prenesti, *et al.*, 2002). Las antocianinas también tienen una habilidad de reducir el hierro ( $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ ) en el plasma, al igual que los radicales libres (Tsai, *et al.*, 2002). Polisacáridos como: flavonoides, saponinas y pectina. Se ha reportado la presencia de  $\beta$ -caroteno, riboflavina, tiamina, niacina y ácidos ascórbico, málico e hibisco (Salama, 1979, El-Merzabani, 1979, Alarcón, *et al.*, 2007).

Además de diferentes elementos químicos como aluminio, cromo, cobre, hierro, magnesio, calcio y selenio (Alarcón, *et al.*, 2007, <http://www.uv.mx>, <http://www.cuerpomente.com>)

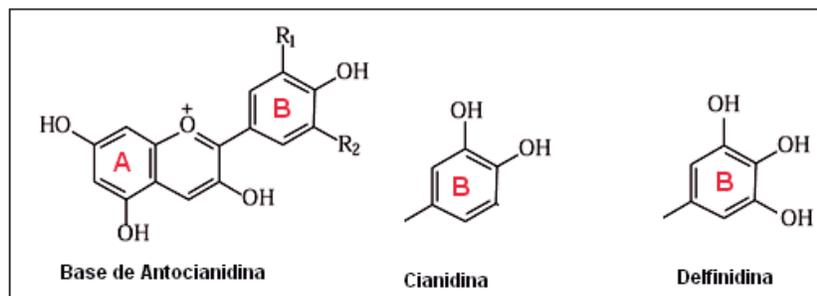


Fig.1 Estructura de las antocianinas

Los compuestos antes descritos se resumen en la siguiente tabla (1):

Elementos Químicos	Ácidos	Pigmentos	Polisacáridos
Aluminio	Ácido Hísbico	Antocianinas	Flavonoides
Cromo	Ácido Protocateico	Hibiscina	Saponinas
Cobre	Ácido Ascórbico	Gospitina	
Hierro	Ácido Málico	Quercetina	
Magnesio	Ácido Cítrico	Mirecetina	
Calcio	Ácido hibiscus	Hibiscetina	
Selenio	Ácido Tartárico	Hibiscetrina	
		Sabedaretina	
		Sabedaretina	

Tabla 1 (Badreldin *et al.*, 2005; Alarcón, *et al.*, 2007; <http://www.uv.mx>)

De los compuestos antes descritos se le han atribuido una amplia gama de funciones biológicas, como son por ejemplo actividad antihipertensiva, antitumoral, baja el colesterol y contra la obesidad (Kim, *et al.*, 2007; De-Xing, *et al.*, 2005). A continuación se describen estas propiedades tanto en la medicina tradicional como en los reportes científicos de actividades farmacológicas.

#### 1.4 Propiedades medicinales y usos tradicionales

En la medicina tradicional se reconoce que la jamaica tiene efectos terapéuticos benéficos para la salud y mínimos efectos colaterales. Por lo que se utilizan los extractos de la flor para tratar diversas afecciones incluyendo hipertensión, enfermedades hepáticas, fiebre, enfermedades de los nervios y calcificaciones en las arterias. Además, tiene acciones antiparasitarias, diuréticas y laxantes, así como por ayudar al proceso digestivo, circulatorio y renal (Wantana, *et al.*, 2007; Badreldin, *et al.*, 2005; Ajay, *et al.*, 2007; Alarcón, *et al.*, 2007).

Igualmente tiene efectos antibacterianos y antifúngicos (Wantana, *et al.*, 2007; Badreldin, *et al.*, 2005, Alarcón, *et al.*, 2007).

Hasta la fecha no se ha observado ningún efecto toxico, indicando estudios que por vía oral, la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en las ratas es de 5000 mg/kg, a excepción que tiene mínimos efectos colaterales, como hipersensibilidad individual (Wantana, *et al.*, 2007, Badreldin, *et al.*, 2005).

#### 1.5 Propiedades Farmacológicas

En base a las propiedades medicinales reportadas, se han realizado investigaciones en las que se han probado las diferentes acciones farmacológicas que posee la jamaica, a continuación se describen las más importantes.

- Antioxidante y antitumoral

Las acciones antioxidantes reportadas se relacionan principalmente con los pigmentos flavonoides (antocianinas) y sus derivados (antocianidinas).

En particular, las antocianinas y sus aglicones se han demostrado como poderosos antioxidantes en modelos donde se resuspenden como emulsificaciones de linoleato de metilo o LDL humanos. Estas actividades son comparables con antioxidantes probados como catequina, flavonoles  $\alpha$ -tocoferol y trolox, incluso sobrepasa la acción antioxidante del ácido ascórbico. Parte de ésta actividad en modelos que contienen lípidos se debe a que actúan como desechos de radicales libres (Marja, *et al.*, 2003).

El extracto de jamaica tiene una actividad antioxidante con protección de estero-esclerosis. Además de funciones anticancerígenas (Tsai, *et al.*, 2002).

Las funciones de la antocianina delphinidina-3 sam *de Hibiscus* en el mecanismo molecular de la inducción de la apoptosis en células HL-60 actúa a través de un radical de oxígeno libre (ROS) mediado por disfunción mitocondrial (De-Xing, *et al.*, 2005).

En otra investigación de las acciones antioxidantes al prevenir los radicales libres, los autores señalan que se debe a la cantidad de polifenoles y antocianinas. Se realizaron infusiones de jamaica con y sin calor. Las infusiones obtenidas con calor (hervidas) tuvieron más acciones antioxidantes en comparación con las obtenidas a temperatura ambiente. Así mismo observaron que las bebidas preparadas al momento del consumo conservan todas sus propiedades antioxidantes y que éstas se pierden después de un tiempo (Prenesti, *et al.*, 2005).

Se hizo un estudio (*in vivo* e *in vitro*) para ver el efecto antioxidante de la jamaica, en la peroxidación lipídica, (LPO), glutatión reducido (GSH), glutatión-s-transferasa (GST), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y vitamina C, se examinaron usando un modelo de arsenato de sodio (SA). Este proyecto se realizó utilizando extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. utilizando ratas (*in vivo*), administrándose vía oral los extractos (200 y 300 mg/kg peso corporal). Observaron una disminución significativa del 37% en la formación de SA en el hígado, lo que señala el efecto protector contra la pro-oxidación de la membrana. Se concluyó que los extractos de las flores secas de jamaica muestran un mecanismo dependiente de la dosis. La protección es por la inactivación de SA (Usoh, 2005).

La acción antioxidante reportada se refiere a la apoptosis, que es un proceso altamente regulado, que involucra la muerte celular, caracterizada por la crenación celular (ruptura de membrana), condensación de cromatina y rompimiento del ácido desoxirribonucleico (DNA) (Tseng, *et al.*, 2000).

El modelo de la regulación de la apoptosis en mamíferos, es el proto-oncogen *bcl-2*. El *bcl-2* puede proteger a muchos tipos celulares de la apoptosis inducida por la exposición a una amplia variedad de condiciones y estímulos adversos. La fosforilación de proteína RB (retinoblastoma) puede regular la proliferación celular, diferenciación y envejecimiento. Se ha sugerido que los efectos antitumorales de PCA (ácido protocateico de *Hibiscus sabdariffa*) pueden ser atribuidos a su actividad inductora de apoptosis por lo que el PCA de *Hibiscus* induce la apoptosis de células de leucemia humanas (HL-60) y que este proceso está asociado con la reducción de la fosforilación de RB y la expresión de *bcl-2* (Tseng, *et al.*, 2000).

Se ha demostrado además, que la actividad antitumoral se encuentra regulada por la antocianina delphinidina 3-sambubioside (delphinidina-3 sam) la cual va actuar promoviendo la apoptosis, por medio del mecanismo de especies reactivas a oxígeno (ROS) en las mitocondrias, llevando a cabo una regulación por la vía de las caspasas (De-Xing, *et al.*, 2005).

- Inhibe acumulación de grasa

El ácido protocateico (PCA) extraído de las flores de jamaica, exhibe una acción hepatoprotectora. Se demostró *in vivo* en ratas, las cuales fueron tratadas con lipopolisacáridos de bacterias. Donde la síntesis de óxido nítrico inducible (iNOS) muestra cambios patofisiológicos en los lipopolisacáridos (LPS). Se demostró en esta investigación que el PCA inhibe la producción de iNOS, donde los animales tratados por 5 días, disminuyeron la cantidad de marcadores enzimáticos. Y con ello, la disminución de la inflamación hepática (Lin, *et al.*, 2003; Prenesti, *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la jamaica reduce la glicemia, el colesterol y los lípidos, previniendo así la obesidad y la hiperinsulinemia. En un estudio *in vivo* en ratones sanos y obesos, se demostró que disminuye de manera significativa la ganancia corporal en ratones obesos e incrementa la toma de líquidos en ratones sanos y obesos.

Los mecanismos por los cuales la jamaica puede estar provocando la pérdida de peso corporal no se conocen aún. Sin embargo, los mecanismos propuestos incluyen: efectos antihiper glucémicos, reducciones en los niveles de colesterol plasmático, inhibición de lipasas gástricas y pancreáticas, estimulación de la termogénesis, inhibición de acumulación de gotas de grasa en los adipocitos, inhibición de la síntesis de ácidos grasos (que se ha reportado como un blanco terapéutico para el tratamiento de la obesidad) o la inhibición de la diferenciación de los adipocitos (Alarcón, *et al.*, 2007).

- Disminución del colesterol

La jamaica provoca una disminución (*in vivo* e *in vitro*) de un 22 a un 26% de colesterol, de un 28 a un 33% de triglicéridos y de un 22 a un 32% de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que hace constatar que el uso de jamaica, reduce los niveles de colesterol y de compuestos que dañan la salud (Hirunpanich, *et al.*, 2006).

En un estudio clínico se les administró cápsulas de jamaica a un grupo de voluntarios. Observaron una disminución del 12% de colesterol sérico en un 71.4% de los pacientes estudiados, en comparación con el grupo control. La dosis óptima fue de dos cápsulas tres veces al día (Lin, *et al.*, 2007).

Se sabe que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) incrementa la incidencia de arterioesclerosis. El efecto antioxidante del extracto tiene una notable capacidad de reducir la degradación del colesterol y la fragmentación de Apolipoproteína B (ApoB), así como inhibir la producción de LDL oxidados. Proponen que se debe usar para prevenir varios tipos de hiperlipidemias en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa o con dietas altas en colesterol (Chen Ch, *et al.*, 2004).

- Actividad antihipertensiva

Existen numerosos reportes de estudios farmacológicos donde se ha demostrado que los extractos de *H. sabdariffa* L. reduce significativamente la presión arterial en humanos (Badreldin, *et al.*, 2005), teniendo además una acción relajante y cardioprotectora (Ajay, *et al.*, 2007).

Dos estudios clínicos mostraron que el cocimiento del cáliz seco de esta planta posee propiedades hipotensivas, diuréticas y laxantes, pero no mostraron la forma de preparación ni la dosis del producto utilizado (Leclerc, 1938; Perry, 1980). Recientemente se reportó que la administración de una preparación de té de *H. sabdariffa* por 12 días en pacientes hipertensos la presión sistólica (SBP) y presión diastólica (DBP) disminuyó de 150 a 140 y 101 a 90 mmHg respectivamente, sin mostrar efectos secundarios. Este estudio no incluyó la cuantificación de ningún compuesto presente en el producto experimental (Haji-Faraji y Haji-Tarkhani, 1999). En otro estudio clínico el té de jamaica administrado por un año a pacientes hipercolesterolémicos, mostró que no tiene efectos secundarios, lo que confirma la inocuidad de esta especie, aún cuando es utilizada por largos periodos de tiempo (Aquino, *et al.*, 1998).

Recientemente, se comprobó que la ingesta de té de jamaica en ayunas reduce la presión arterial sistólica de 139.05 a 127.75 mmHg y la presión diastólica de 90.81 a 79.52 mmHg en 39 pacientes, lo compararon utilizando un conocido antihipertensivo (captopril), encontrando resultados similares (Herrera, *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que en 14 días se puede normalizar la presión arterial usando como tratamiento extracto de *H. sabdariffa* L. (Odigie, *et al.*, 2003).

Se propone que las antocianinas (flavonoides que dan la coloración roja) pueden ser los compuestos bioactivos que producen los efectos antihipertensivos por medio de la inhibición de las enzimas convertidoras de angiotensina I y angiotensina II y los efectos angioprotectores y cardioprotectores (Menier, *et al.*, 1987, Jonadet, 1990).

## **2.- Lectinas**

Lectina proviene del latín: *légere*, que significa leer o seleccionar (Stryer, *et al.*, 2003). Durante mucho tiempo antes de ser llamadas así, estas proteínas fueron llamados fitohemaglutininas, por haber sido encontradas en plantas y por la hemaglutinación de eritrocitos (Sharon y Lis, 2004).

### **2.1 Definición**

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen de manera específica y reversible a mono- y oligosacáridos, no tienen actividad catalítica y en contraste con anticuerpos no son productos de una respuesta inmune (Barondes, 1988).

### **2.2 Descripción**

Cada lectina contiene normalmente dos o más sitios de unión para los carbohidratos; algunas lectinas incluso forman estructuras oligoméricas con múltiples sitios de unión. Los sitios de unión de lectinas situadas en la

superficie de la célula, interaccionan con un conjunto de carbohidratos desplegados sobre la superficie de otra célula. Las lectinas y los carbohidratos se unen por algunas interacciones relativamente débiles, por ejemplo: puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals, por mencionar algunos (Calvete, *et al.*, 2006, Hernández, *et al.*, 1999, Stryer, *et al.*, 2003, Sharon y Lis, 2004).

## 2.3 Clasificación

Las lectinas pueden clasificarse con base en sus secuencias de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas (Stryer, *et al.*, 2003), y para su estudio se han clasificado en animales y vegetales.

### Lectinas animales

Las lectinas animales por su motivo estructural, el ligando a carbohidrato y arreglo modular se les ha agrupado en cinco familias y se resume en la tabla 2, las lectinas que se muestran están presentes en invertebrados y vertebrados (Calvete, *et al.*, 2006).

**Tabla 2** Clasificación de las lectinas animales (Gabiús, 2001).

<b>Familia</b>	<b>Motivo Estructural</b>	<b>Ligando a carbohidrato</b>	<b>Arreglo Modular</b>
<b>Tipo – C</b>	CRD conservado	Variable (manosa, galactosa, fucosa, tetrasacárido de heparina)	Si
<b>Tipo – I</b>	CRD parecido a Inmunoglobulina	Variable (Man6GlcNAc2, epítoto HNK-1, ácido hialurónico, $\alpha$ 2,3/ $\alpha$ 2,6-sialilactosa)	Si
<b>Galectinas (Tipo S)</b>	CRD conservado	$\beta$ galactósidos	Variable
<b>Pentraxinas</b>	Arreglo de subunidades pentaméricas	4,6 acetal cíclico de $\beta$ -galactosa, monosacáridos sulfatados y fosforilados	Si
<b>Tipo P</b>	CRD similar pero no estrictamente definido	Glicoproteínas con manosa-6-fosfato	Si

CRD.- Dominio de reconocimiento a carbohidrato.

### Lectinas vegetales.

Las lectinas vegetales se descubrieron antes que las animales. La primera lectina vegetal fue encontrada en 1888, por Stillmark y fue *Ricinus communis*, encontrándose en ellas propiedades hemaglutinantes. Poco tiempo después en 1890 Ehrlich encontró que las lectinas vegetales se podían utilizar para estudios inmunológicos. En 1919, J. Sumner fue el primero en obtener una lectina en forma cristalizada, siendo la concavalina A extraída del frijón y que ésta era inhibida por sacarosa. El hallazgo se corroboró con numerosos estudios, concluyendo que la aglutinación estaba dada por la unión específica de Con A con carbohidratos de glóbulos rojos. Fue P. C. Nowell hasta 1960, descubre que la lectina *P. vulgaris* tenían una resistencia en linfocitos mitogénicos. En este mismo año y en 1970, se hace evidente que las lectinas presentaban aglutinación preferentemente sobre células tumorales animales (Varki, *et al.*, 2001).

La mayoría de estas proteínas se agrupan en cuatro grandes familias de proteínas que guardan un parentesco estructural y evolutivo: lectinas de leguminosas lectinas que se unen a quitina, toxinas que inactivan a ribosa y lectinas de monocotiledóneas específicas de manosa. Otros grupos menores, abarcan las proteínas similares a Jacalina lectinas de la familia de la amarantina y lectinas del floema de Cucurbitaceae. Los miembros de cada una de estas familias se caracterizan por la estructura conservada de sus dominios de unión a carbohidratos. Esto no ha impedido la diversidad estructural, la cual resulta de la organización modular terciaria y cuaternaria (Calvete, *et al.*, 2006).

Las lectinas más numerosas y estudiadas son las de leguminosas. Son 100 lectinas conocidas de más de 70 especies se restringe a grupos de leguminosas conocidas y en su mayoría se han aislado de semillas (Calvete, *et al.*, 2006).

En las plantas se han detectado, principalmente en los cotiledones y en los endospermos de las semillas y constituyen del 2 al 10% del total de las proteínas de estas (Hernández, *et al.*, 1999). La tabla 3 muestra la clasificación de lectinas según Varki, 2001 y muestra las 2 clases en las cuales se han agrupado.

**Tabla 3.-** Clasificación de Lectinas Vegetales. Varki, *et al.*, 2001)

Clase	Especificidad monosacaridos	Subunidad m.w.(kD)	Subunidad	Sitios de unión por subunidad	Glicosacarido	-S-S-bonds	Metales
Leguminosas	Diversa	25-30	2 a 4	1	variable	No	Ca, Mn
Cereales	Principal amino azúcar (GlcNac / NeuAc)	~18	2	2	variable	Si	No

## 2.4 Estructura

En cuanto a su estructura, las lectinas contienen al menos dos sitios de unión, de ahí que pueda enlazarse en primer lugar a un carbohidrato específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada (Hernández, *et al.*, 1999). El conocimiento sobre la estructura y las funciones es todavía limitado. Bastan pequeñas variaciones en la composición de aminoácidos, en particular del lugar de unión a carbohidratos, para cambiar la estructura (Calvete, *et al.*, 2006).

## 2.5 Función

La ubicuidad de las lectinas refleja su participación decisiva en actividades celulares muy diversas. Operan en numerosos procesos intracelulares e intercelulares, lo mismo fisiológicos que patológicos. Por ejemplo: reconocimiento entre espermatozoide y ovulo durante la fecundación, adhesión entre células y célula matriz extracelular en la embriogénesis y el desarrollo, y otros. Los procesos patológicos donde intervienen las lectinas son por ejemplo: la unión de bacterias, virus y toxinas a la superficie celular (Fig.2), inflamación, transformación maligna y metástasis, etc., (Calvete, *et al.*, 2006).

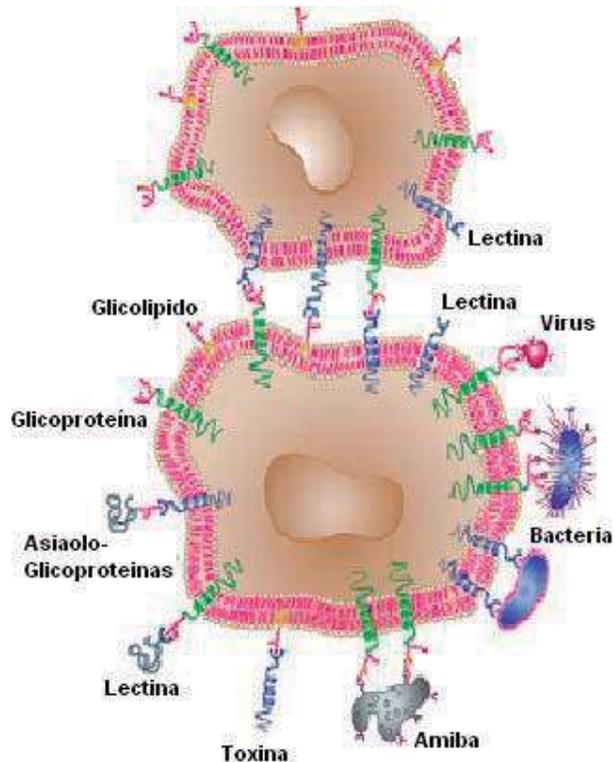


Fig.2 Interacción de la lectina, en los procesos celulares, fisiológicos y patológicos (Sharon y Lis, 2004).

La interacción célula-lectina pueden ser inhibidas en muchos casos por los carbohidratos, y esto es lo que ha proporcionado un gran avance en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica, con el único fin de estudiar a la membrana plasmática, la cual es de gran importancia para la célula (Sharon y Lis, 2004).

## 2.6 Usos

Poseen interesantes propiedades estas proteínas, que las convierten en herramientas invaluable en los laboratorios biológicos, por lo que se utilizan en numerosas investigaciones que incluyen: estudios de la estructura de las membranas, detección de transformaciones malignas, purificación de glicoconjugados, estudios citogenéticos, así también como en ensayos histoquímicos, enzimáticos y en la tipificación de grupos sanguíneos (Hernández, *et al.*, 1999, Sharon y Lis, 2004).

El significado de este tipo de estudio en las proteínas, se incremento cuando se descubre que tienen diferentes funciones dependiendo de los microorganismos en los que se encuentren (tabla 4).

Se les ha llegado a considerar armas muy valiosas a las lectinas en el campo de la genética, biomedicina e inmunología; por mencionar algunas de las aplicaciones que tienen estas proteínas (Hernández, *et al.*, 1999).

**Tabla 4** Funciones de las lectinas (Sharon y Lis, 2004)

LECTINA	FUNCIÓN
Microorganismos	
Amiba	Infección
Bacteria	Infección
Virus Influenza	Infección
Plantas	
Varios	Defensa
Leguminosas	Simbiosis, con bacterias fijadoras de nitrógeno
Animales	
Calnexin, Calreticulin, ERGIC-53	Control de la biosíntesis de glicoproteínas
Colectinas	Inmunidad Innata
Dectina – I	Inmunidad Innata
Galectinas	Regulación del crecimiento celular, la apoptosis, del ciclo celular, modulación de interacciones célula-célula y célula-sustrato.
Macrófagos receptores de manosa	Inmunidad innata, eliminación de hormonas glicoproteicas sulfatadas.
Receptores Man-6P	Dirección para el sustrato de enzimas lisosomales
L-selectinas	Recaptura de los linfocitos
E-y P-selectinas	Transporte de leucocitos al sitio de inflamación
Siglecs	Interacción célula-célula en la inmunidad y en el sistema neural.
Espermadesina	Interacción ovulo-espermatozoide

### 3. Purificación de Proteínas

Una parte importante de la mayoría de las investigaciones de la bioquímica incluye la purificación de los materiales que se están considerando ya que estas sustancias deben hallarse, relativamente libres de contaminantes si se han de caracterizar adecuadamente. Además el material que interesa puede ser inestable y existir en cantidades mínimas (Voet, 2003).

Las proteínas pueden purificarse de acuerdo con su solubilidad, tamaño, carga y capacidad de unión. Cuando se purifica una proteína, se puede determinar su secuencia de aminoácidos. El proceso inicia cuando un investigador separa una proteína del resto de las biomoléculas restantes. Empezando con proteínas puras, podemos precisar las secuencias de aminoácidos y las relaciones evolutivas entre proteínas de diferentes organismos y podemos investigar la función bioquímica de cada proteína (Stryer, *et al.*, 2003).

A continuación se presentan las técnicas empleadas con más frecuencia para el aislamiento, purificación y en cierta extensión, la caracterización de las proteínas.

La primera etapa en el aislamiento de una proteína, es la de reconocer a la proteína que estamos buscando. Este procedimiento se hace con un ensayo, que identifique alguna propiedad especial de esa proteína que permita determinar si está presente. Encontrar un ensayo eficaz es a menudo difícil, pero en tanto sea específico, más eficaz es la purificación.

Para tener claro que nuestro esquema de purificación funciona, necesitamos un elemento adicional de información, que es la cantidad de proteína presente en la mezcla que se ensaya. Con estos dos valores que son la actividad presente de la proteína y la concentración, se puede conseguir la actividad específica. La actividad específica crecerá conforme se produzca la purificación. Esencialmente, para conseguir la purificación hace falta alcanzar un valor máximo en la actividad específica (Stryer, *et al.*, 2003).

Otra de las etapas muy importantes es la de conseguir su disolución; es decir, liberar la proteína que nos interesa de la célula. El método de elección para este procedimiento depende de la procedencia y de las características de la localización de la proteína (Voet, 2003).

En un primer paso, se forma un homogenizado por ruptura de la membrana celular, se fracciona la célula por centrifugación, que da lugar a un precipitado de material pesado en el fondo del tubo de centrifuga y un sobrenadante más ligero encima. El sobrenadante se centrifuga de nuevo con una fuerza mucho mayor obteniendo de nuevo un precipitado y un sobrenadante. Este procedimiento es conocido como centrifugación diferencial, produce varias fracciones de densidad decreciente, cada una de ellas con varios cientos de proteínas distintas, que se ensayan posteriormente para obtener la actividad que se purifica. Normalmente se encontrará con una fracción enriquecida en actividad, y será la fuente de material en la que se aplicarán técnicas de purificación más discriminatorias. El mecanismo habitual consiste en que la mezcla de proteínas se somete a diferentes separaciones, cada una de ellas basada en propiedades diferentes, para obtener la proteína pura (Stryer, *et al.*, 2003).

### **3.1 Precipitación salina (“salting-out”).**

La mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal, un efecto llamado precipitación salina. Las concentraciones de sal en las que precipita una proteína varían de una proteína a otra; de aquí que se puede utilizar para fraccionar proteínas (Stryer, *et al.*, 2003).

Una de las sales de mayor uso en la precipitación salina es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es el reactivo de mayor uso en la bioquímica, y se debe a su gran solubilidad en el agua, permitiendo alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas (Lehninger, 2003).

Es muy importante tener en cuenta que al llevar a cabo una precipitación fraccionada, se requiere de un control cuidadoso de la concentración activa del reactivo a un nivel adecuado y predeterminado. Esto se logra con el control del pH de la solución mediante amortiguadores adecuados (Skoog, *et al.*, 2001). Este método es útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas, incluyendo las fracciones activas obtenidas en otros pasos de la purificación.

Para eliminar la sal, cuando sea necesario, se puede utilizar la diálisis (Stryer, *et al.*, 2003).

### **3.2 Diálisis**

La diálisis es un procedimiento en el que las proteínas se pueden separar de las moléculas pequeñas a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa. Las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retiene dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones, atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado, fuera de la bolsa. Esta técnica es útil para retirar la sal u otras moléculas pequeñas, pero no discriminará de forma efectiva las proteínas entre sí (Stryer, *et al.*, 2003).

No obstante es muy importante que cuando tenemos una muestra, se requiere de la eliminación del solvente, por lo que el siguiente paso es el liofilizado.

### **3.3 Liofilizado**

El procedimiento consiste en la eliminación del solvente mediante el proceso de sublimación, en el cual la muestra es congelada y sometida a una cámara de alto vacío, para favorecer que los solventes pasen del estado sólido a vapor, lo que permite la concentración de la muestra (liofilizado). Eliminando el solvente.

### **3.4 Técnicas de separación de acuerdo a su tamaño, carga y afinidad específica de unión**

En cuanto a su solubilidad, la precipitación fraccionada es una de ellas y las técnicas que a continuación se describen son métodos donde se pueden conseguir separaciones más discriminatorias. La idea aquí es eliminar selectivamente a los demás componentes de la mezcla, de modo que la proteína que se busca permanezca.

#### **3.4.1 Cromatografía de filtración por gel**

La muestra es colocada en lo alto de una columna rellena de bolitas porosas compuestas de un polímero insoluble, pero altamente hidratado, tales como Sephadex, Sepharosa, Dextrano y Biogel. El resultado es que las proteínas grandes no pueden penetrar en el volumen interno de las bolitas y se eluyen antes que las pequeñas.

#### **3.4.2 Cromatografía de intercambio iónico**

Esta técnica depende de la adsorción reversible de moléculas de solutos cargadas a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación consiste en un equilibrio de intercambio iónico. Es importante que el intercambiador iónico tenga las condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica, por lo mismo que esto permitirá la unión de las moléculas de soluto. Es bastante sencilla, los niveles de pureza son buenos y se puede volver a obtener la recuperación de las proteínas si hay una retención de proteínas dentro de la columna (Mathews, *et al.*, 2002).

#### **3.4.3 Cromatografía de afinidad**

Es un método cuyo procedimiento es muy poderoso y aplicable para la purificación de proteínas. Esta técnica se aprovecha de la afinidad de muchas

proteínas por grupos químicos específicos. La muestra se hace pasar por una columna de bolitas que contiene residuos de cierto químico específico, los cuales están unidos covalentemente. La proteína se une a esta columna debido a la afinidad, que no tienen otras proteínas. La proteína se va a liberar de la columna, añadiendo una disolución concentrada del mismo grupo químico. Tal compuesto en disolución, desplaza la proteína de los sitios de unión de los residuos del grupo químico fijados en la columna. En general, esta cromatografía se puede utilizar de modo efectivo en el aislamiento que reconoce a determinado grupo por la unión covalente o un derivado suyo a una columna (Stryer, *et al.*, 2003).

#### **3.4.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

El poder de todas las técnicas que se usan columnas se puede mejorar sustancialmente utilizando una técnica que se conoce como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, "high performance liquid chromatography"). En este tipo de cromatografía los materiales propios de las columnas están divididos mucho más finamente y, como consecuencia, hay más centros de interacción y por lo tanto, mayor poder de resolución. Dado que la columna está construida de material más fino, se debe aplicar presión para obtener las velocidades de flujo adecuadas. Las presiones son muy elevadas de 200 a 300 psi, para que las soluciones pasen rápidamente por la resina. El resultado neto es una elevada resolución y la separación más rápida. Las proteínas se pueden separar y mostrar por la electroforesis. Lo que sería una forma de asegurar que la actividad específica sea mayor con cada paso de purificación (Mathews, *et al.*, 2002, Stryer, *et al.*, 2003).

### **3.5 Electroforesis**

Esta es una técnica de las más sencillas para la separación y cuantificación de proteínas, técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico. Este principio se puede aplicar para separar las fracciones de proteínas, puesto que los aminoácidos son constituyentes de las proteínas y por consiguiente compuestos anfóteros (es decir se comportan como ácidos o bases) dependiendo del medio en el que estén (Mathews, *et al.*, 2002).

Las separaciones electroforéticas se realizan principalmente sobre gel o sobre soportes sólidos como el papel.

#### **3.5.1 Electroforesis en gel**

Este método, realiza la separación con gel, porque sirve como un tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan más fácilmente, mientras que las moléculas mucho mayores, permanecen casi inmóviles en los poros. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. Esta técnica se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical, de poliacrilamida. Las proteínas se pueden separar de acuerdo con sus masas moleculares, en condiciones desnaturalizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio dodecilsulfato sódico (SDS, "Dodecil Sulfato de Sodio"), un detergente aniónico que rompe casi todas interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade mercaptoetanol (2-tioetanol) o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro, finalmente se somete a la electroforesis.

Cuando la electroforesis se acaba, las proteínas en el gel se pueden visualizar tiñéndolas con plata o con un colorante como el azul Coomassie, que manifiesta una serie de bandas. Al teñir con plata, las proteínas que se pueden detectar son incluso menores que las de la tinción con azul Coomassie (~0,02µg) Los marcajes radioactivos se pueden detectar colocando una hoja de película de rayos X sobre el gel, este procedimiento es conocido como autorradiografía. Esta técnica es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución.

## II JUSTIFICACIÓN

- Existe un solo reporte de una lectina de semillas de *Hibiscus sabdariffa*, L que ha sido utilizada para distinguir diferentes tipos de eritrocitos (Yang EK *et al* 1982).
- En la flor de la jamaica no hay reportes de lectinas.
- Por sus propiedades nutricionales y farmacológicas reportadas, el extracto es una fuente potencial de productos terapéuticos útiles.

## III HIPOTESIS

Las flores de jamaica *Hibiscus sabdariffa* L contienen lectinas.

## IV OBJETIVOS

- Objetivo General

Purificar las lectinas en el extracto de flor de Jamaica

- Objetivo Específico

1. Identificar la presencia de lectinas en extractos de flores de Jamaica y sus afinidades para carbohidratos.
2. Caracterizar las propiedades bioquímicas de la (s) proteína (s) purificada (s).

## V MATERIAL

- a) Infusión de flores secas de jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. (500g)
- b) Reactivos con grado analítico
- c) Panel de Fenotipo conocido con los cuatro grupos sanguíneos, donado por el Quím. José Luis Alcaráz. Del Banco Central de Sangre, Siglo XXI, IMSS, México.

## VI MÉTODOS

### Obtención del Extracto Puro

Se utilizó una infusión de jamaica que se elaboró utilizando 500g peso seco de las flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) que se hirvieron en 1L de agua desionizada por 15 min a 100°C, se filtró y se conservo en refrigeración a -20°C hasta su uso ulterior. A este sobrenadante se le llamó extracto crudo (EC).

### Precipitación fraccionada

La precipitación fraccionada con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  permite la separación de proteínas en base a su solubilidad y peso molecular.

### Determinación de proteínas

El método por el que se determinaron las proteínas fue el de Bradford MM, 1976, el cual se basa en la unión del colorante Coomassie G-250 azul a la proteína presente en la muestra, la cuantificación de proteínas se obtiene al leer la absorbancia a 595nm, al interpolarla en una curva patrón (0-10mg/mL).

### Diálisis

Para realizar las diálisis se utilizaron membranas Spectra-Por MWCO: 3500 (Spectrum Laboratories, Inc.) y agua tridestilada por lo menos tres lavados.

### Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizó una resina hidrofóbica (Octyl-Sepharose) que se monta en una columna de 9.5 X 1 cm. El amortiguador es PBS 0.1M pH 7.5 con 0.3M de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . El gradiente de 100 a 0% se generó con agua tridestilada.

### Determinación del Peso Molecular

El peso molecular se determinó utilizando electroforesis en microgeles de dodecil sulfato de amonio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1cm de grosor por 6 cm de longitud utilizando un sistema de amortiguadores de Laemmli (1970) en cámaras Mini-Protean II (Bio-Rad Richmond, CA). La concentración de acrilamida fue al 12% en el gel separador y de 4% en el gel concentrador. Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras en la presencia de 5% 2-mercaptoetanol y no reductores. Las muestras se calentaron 10 min a 100°C. Los geles se tiñeron con plata. Los marcadores moleculares (Pharmacia, Sweden) utilizados, fueron los siguientes: fosforilasa b (Mr, 97,400), albumina (67,000), ovalbumina (43,000), anhidrasa carbónica (30,000), inhibidor de tripsina (20,100) y  $\alpha$ -lactalbumina (14,400). La absorción y posición de las bandas se leyeron con un densitómetro. Para construir una curva de calibración se trazó el logaritmo de peso molecular contra el logaritmo de movilidad relativa.

### **Ensayos de Hemaglutinación**

Se realizó utilizando un panel de fenotipo conocido, formado por los siguientes tipos sanguíneos humanos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O), donado por el Banco Central de Sangre, IMSS México. Este ensayo se desarrolló en placas de 96 pozos (Corning Incorporated NY 14831) utilizando el proceso de dilución serial (Debray, et al., 1981). Los resultados se expresan como unidades de hemaglutinación y como actividad específica. Una unidad de hemaglutinación se define como la cantidad de lectina capaz de aglutinar y por lo tanto precipitar el 75% de los eritrocitos en suspensión después de 60 min (Bonay y Fresno, 2000). Las unidades de hemaglutinación se obtienen en la última dilución en la que se observa aglutinación, la actividad específica se expresa como el resultado de las unidades de hemaglutinación/mg proteína. La concentración mínima de proteínas necesaria para producir hemaglutinación se obtiene con la última dilución que conserva la actividad. El ensayo se desarrolló con un control negativo (carente de hemaglutinación) y con uno positivo (con una fuerte hemaglutinación), se utilizó un extracto crudo de esponja (Fenton NB, *et al.*, 2003).

### **Afinidad para carbohidratos**

La especificidad para carbohidratos se obtuvo al comparar la actividad inhibidora de varios carbohidratos en la hemaglutinación inducida por la lectina. Los resultados se expresan como la mínima concentración requerida para inhibir completamente la actividad de la lectina a estudiar (Zenteno et al 1988). Los carbohidratos utilizados fueron: D-galactosa, N-acetil-galactosamina, D-glucosa, N-acetil-glucosamina, D-fucosa, D-manosa, D-lactosa, D-ribosa, galactosa-acetilada.

### **Termoestabilidad**

Se analizó la termoestabilidad utilizando el ensayo de hemaglutinación como se describió anteriormente utilizando diferentes temperaturas que fueron: 4, 17 (temperatura ambiente promedio), 20, 40, 80 y 100°C.

### **Dependencia de Cationes divalentes**

Para analizar la dependencia de cationes la muestra se trató con 75mM de EDTA por 2horas a temperatura ambiente y dializada contra 0.15M de NaCl a 4°C por toda la noche. Posteriormente se probó la dependencia de cationes en presencia de 5 mM de Potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Magnesio (MgCl<sub>2</sub>), Calcio (CaCl<sub>2</sub>) y sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), en 0.15M NaCl.

### **Análisis Estadístico**

A los valores obtenidos en cada parámetro analizado se les realizaron los siguientes cálculos:

Media ( $\bar{X}$ ), Desviación Estándar (DE), varianza ( $\delta$ ), EE= DE/ $\sqrt{n}$ , Coeficiente de variación s/  $\bar{X}$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para cada uno de los parámetros analizados. Con este análisis se obtuvieron media, DE, EE y la fuente de varianza. En las tablas se utilizaron análisis de Bonferroni, las diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron significativas.

## VI RESULTADOS

### Actividad del Extracto Crudo

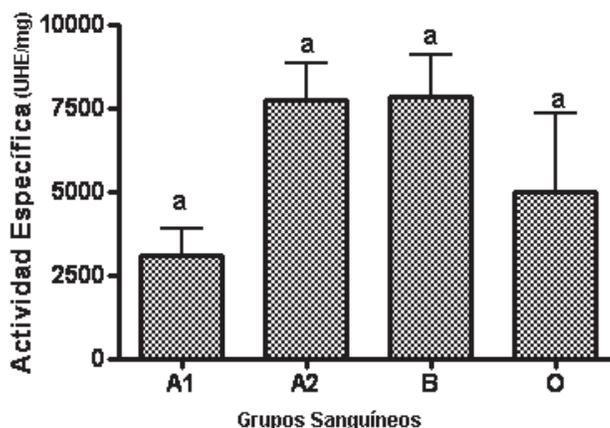
Para explorar la presencia de lectinas en el extracto crudo de flores de jamaica, se le realizó un ensayo de hemaglutinación empleando los cuatro tipos sanguíneos humanos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O), el ensayo tiene un control positivo y uno negativo, con el que se comprueba que la actividad observada se relaciona con la muestra a estudiar. Como se puede observar en la Tabla 5 y Figura 3., se obtuvo actividad con los cuatro grupos sanguíneos, lo que indica la presencia de una mezcla de lectinas en éste extracto crudo.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	1760 ± 480	3142 ± 784	35 ± 12
A <sub>2</sub>	4480 ± 640	8000 ± 1085	12 ± 2
B	4480 ± 640	8000 ± 1232	12 ± 3
O	2800 ± 1341	5000 ± 2377	58 ± 31

**Tabla 5. Actividad del Extracto Crudo.** Los resultados representan la media ± DE (n= 7) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos.

UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.56±0.01 mg/mL.

En la Figura 3, se esquematiza la actividad específica del extracto crudo utilizando los diferentes grupos sanguíneos. Como se puede observar con A<sub>1</sub> aparenta una menor actividad que el resto de los grupos. En el análisis estadístico se utilizaron como medidas de dispersión a la desviación estándar. El ajuste de los resultados se realizó con el método de Bonferroni, las diferencias de p<0.05 se consideraron significativas, los coeficientes de correlación obtenidos fueron: A<sub>1</sub>: 0.064; A<sub>2</sub>: 0.167; B: 0.6 y O: 0.173. Como se puede apreciar, el análisis mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos sanguíneos humanos utilizados.



**Figura 3. Actividad del Extracto Crudo.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. La mayor actividad se observa con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub>, B y O. Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05) entre los grupos sanguíneos, en donde se puede observar, que no hay diferencia significativa.

Como se demostró que el extracto crudo tiene lectinas, se procedió a realizar la purificación.

### Precipitación Fraccionada con Sulfato de Amonio

La precipitación se realizó añadiendo concentraciones crecientes de sulfato de amonio en los intervalos de: 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 y 80-100%. A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de actividad de lectinas en cada una de las concentraciones utilizadas.

#### Concentración 0-20%

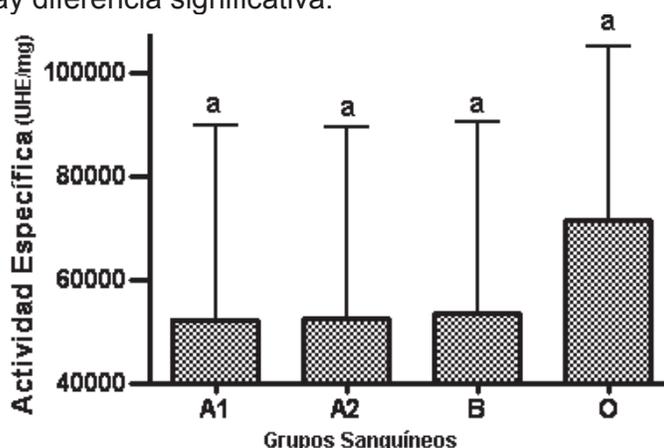
Las lectinas que precipitan en la concentración de 0-20% presentan los siguientes resultados, en la Tabla 6 y en la Figura 4., donde se puede observar que hay mayor actividad hemaglutinante con el grupo O.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	26920 ± 19317	52287 ± 37525	13 ± 7
A <sub>2</sub>	26880 ± 18827	52524 ± 36886	9 ± 4
B	27560 ± 19057	53458 ± 37028	11 ± 7
O	36840 ± 17377	71487 ± 33720	5 ± 4

**Tabla 6. Actividad de la Concentración 0-20% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa actividad hemaglutinante del extracto crudo con los cuatro grupos sanguíneos.

UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.5147±0.000765 mg/mL.

Se utilizó un análisis de Bonferroni, y las diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron significativas, el coeficiente de correlación para cada grupo sanguíneo obtenido (comparándolo con los demás) fueron: A<sub>1</sub> de 0.005, para A<sub>2</sub> de 0.400, B de 0.393 y para O de 0.311. Como podemos ver en la Figura 6, no hay diferencia significativa.



**Figura 4. Actividad concentración 0-20% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos sanguíneos en donde se observa que no existe diferencia significativa con ninguno de los diferentes grupos sanguíneos.

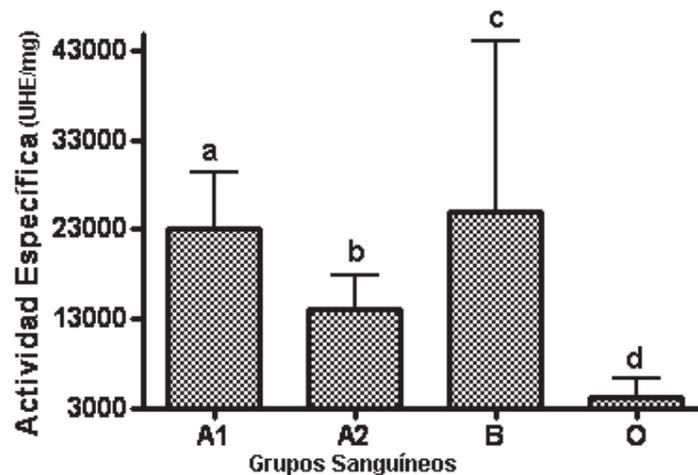
## Concentración 20-40%

En la siguiente concentración de sulfato de amonio utilizada, de 20-40%, se obtuvo una mayor actividad con los grupos sanguíneos A<sub>1</sub> y B, en comparación con los otros dos grupos sanguíneos, esto se puede observar en la tabla 7.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	11520 ± 3221	23040 ± 6443	5 ± 1
A <sub>2</sub>	7040 ± 1920	14080 ± 3840	8 ± 3
B	12480 ± 9527	24960 ± 19054	14 ± 6
O	2080 ± 1024	4160 ± 2049	33 ± 11

**Tabla 7 Actividad de la Concentración 20-40% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un ligero incremento en la actividad hemaglutinante de B comparado con A<sub>1</sub>. Se observa una diferencia significativa de B al compararla con los otros grupos sanguíneos. UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.5±0.001 mg/mL.

En la figura 5, se muestra la diferencia significativa entre los grupos sanguíneos, de este precipitado. Se utilizó un análisis de Bonferroni, y las diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron significativas, el coeficiente de correlación para cada grupo sanguíneo fueron las siguientes: para A<sub>1</sub> de 0.010, para A<sub>2</sub> 0.896, B de 0.047 y para O de, 0.014, y como se puede observar, existen diferencias significativas entre A<sub>2</sub>, B y O.



**Figura 5. Actividad concentración 20-40% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa que existen diferencias significativas entre las actividades obtenidas con los diferentes grupos sanguíneos. Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos sanguíneos. Las diferencias se pueden observar en los grupos sanguíneos A<sub>2</sub>, B y O.

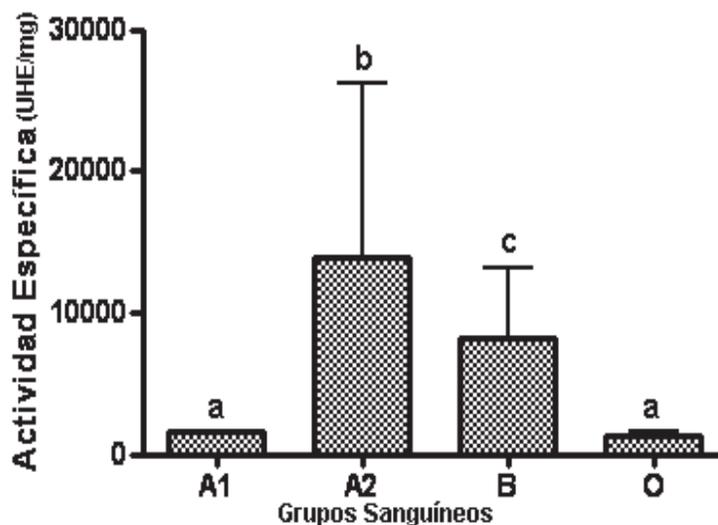
## Concentración 40-60%

Para la concentración de 40-60%, se puede observar que se presenta un incremento en la actividad de las lectinas al utilizar el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>, lo que refleja la separación de proteínas, esto se puede ver en la tabla 8, la cual se muestra a continuación.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	1280 ± 0	1641 ± 0	49 ± 0
A <sub>2</sub>	10880 ± 9600	13949 ± 12308	26 ± 23
B	6400 ± 3840	8205 ± 4923	15 ± 9
O	960 ± 320	1231 ± 410	74 ± 25

**Tabla 8. Actividad de la Concentración 40-60% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>. UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.78±0.001 mg/mL

En la Figura 6, se muestra la diferencia significativa entre los grupos sanguíneos, de este precipitado. Se utilizó un análisis de Bonferroni, y las diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron significativas, el coeficiente de correlación fue para A<sub>1</sub> de 0, para A<sub>2</sub>, B y O fue de 1, mostrando diferencias significativas con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub> y B.



**Figura 6. Actividad concentración 40-60% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub> que es significativamente diferente de B, A<sub>1</sub> y O, no se observan diferencias significativas entre los grupos A<sub>1</sub> y O. Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos sanguíneos.

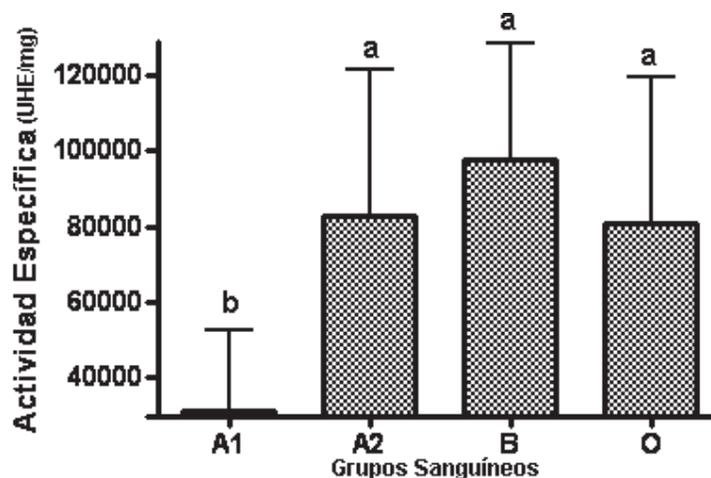
### Concentración 60-80%

En la fracción que corresponde a la concentración de 60-80% se observó una mayor actividad con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub> B y O. Es importante resaltar que en esta fracción se obtuvo la mayor actividad en unidades de hemaglutinación y en actividad específica en comparación con el resto de las fracciones de sulfato de amonio. En la tabla 9, la cual se muestra a continuación, se presentan estos resultados.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	23400 ± 19996	31206 ± 21439	15 ± 8
A <sub>2</sub>	65000 ± 37643	82822 ± 38394	8 ± 7
B	77160 ± 31721	97436 ± 31034	1 ± 0.33
O	68200 ± 36094	81026 ± 38440	3 ± 2

**Tabla 9. Actividad de la Concentración 60-80% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad hemaglutinante con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub>, B y O. UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.64±0.067 mg/mL.

En la Figura 7, se muestra la diferencia significativa entre los grupos sanguíneos, de este precipitado. El análisis estadístico mostró que el coeficiente de correlación obtenido fue para A<sub>1</sub>:0.375, A<sub>2</sub>: 0.008, B: 0.904 y para O: 0.9454, y como se puede observar, existen diferencias significativas con el grupo sanguíneo A<sub>1</sub>.



**Figura 7. Actividad concentración 60-80% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>, B y O. Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05) entre los grupos sanguíneos.

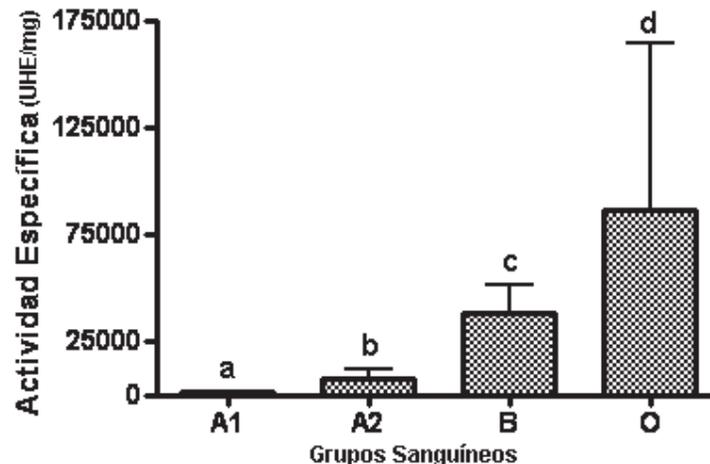
### Concentración 80-100%

La última concentración para llegar a la saturación fue de 80-100 % los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10 y Figura 8. Como se observa en la tabla 8, claramente se puede ver un incremento en la actividad al utilizar el grupo sanguíneo O. La actividad observada con el grupo sanguíneo A<sub>1</sub> es despreciable.

Grupo Sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	853 ± 213	1263 ± 316	71 ± 14
A <sub>2</sub>	5333 ± 2773	7890 ± 4103	34 ± 26
B	23893 ± 9031	38349 ± 13128	3 ± 1
O	58240 ± 52873	86163 ± 78222	30 ± 27

**Tabla 10. Actividad de la Concentración 60-80% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub>, B y O UHE.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad específica (UHE/Concentración de proteína mg/mL) y C es la Concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Proteína: 0.68±0 mg/mL.

En la figura 8, se muestra la diferencia significativa entre los grupos sanguíneos, del precipitado 80-100%. Se utilizó un análisis de Bonferroni, y las diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron significativas, el coeficiente de correlación para cada grupo sanguíneo que se obtuvo fueron: para A<sub>1</sub> de 0, para A<sub>2</sub> de 0.998, B de 0.998 y para O de, 0.793, y como se puede observar, existen diferencias significativas con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>, B y O.



**Figura 8. Actividad de la concentración 80-100% de Sulfato de Amonio.** Los resultados representan la media ± DE (n= 4) de ensayos independientes por duplicado. Se observa un incremento en la actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo O. Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos sanguíneos.

## Especificidad para carbohidratos

### Extracto Crudo

Para determinar la especificidad por carbohidratos en el extracto crudo se realizó el ensayo utilizando el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>. Se probó contra los carbohidratos presentados en la tabla 11. La afinidad del extracto crudo para carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente: GalNAc >Galactosa >Galactosa acetilada >Ribosa >Glucosa >GluNAc >Lactosa >Manosa >Fucosa >Sacarosa >Xilosa.

Carbohidrato	Extracto Crudo
( $\mu$ mol)	A <sub>2</sub>
GalNAc	0.097
Gal	0.097
Gal acet	0.097
Rib	0.097
Glu	1.56
GluNAc	1.56
Lac	3.125
Man	25
Fuc	25
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 11 Especificidad de carbohidratos extracto crudo.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en  $\mu$ mol) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>. La afinidad por los carbohidratos fue la siguiente: GalNAc>Gal> Gal acetilada >Rib >Glu >GluNAc >Lac>Man>Fuc>Sac >Xyl.

### Sulfato de amonio 0-20%

Para la siguiente concentración de sulfato de amonio 0-20%, el grupo sanguíneo que se escogió fue el O como se puede ver en la Tabla 6, fue con el que se obtuvo la mayor actividad. En la tabla 12 se presentan los resultados del análisis realizado, como se puede apreciar, no se logra distinguir una diferencia entre las especificidades para los siguientes carbohidratos: Gal, GalNAc, Gal Acetilada, Glu, GluNAc, Fuc, Man, Lac y Rib.

Es notable esta alta sensibilidad ya que utilizando alrededor de 250 ng de proteína y alrededor de 0.01nmol de carbohidratos no se observan diferencias con estos carbohidratos. Por lo que podemos concluir que con esta concentración salina, las lectinas presentes no se han separado y por lo tanto tampoco se aprecia una diferencia en la sensibilidad, con la mayoría de los carbohidratos listados en la tabla. Sorprendentemente no muestran afinidad con los carbohidratos sacarosa y xilosa.

Carbohidrato	O ( $\mu\text{mol}$ )
Gal	0.097
GalNAC	0.097
Glu	0.097
GluNAC	0.097
Fuc	0.097
Man	0.097
Lac	0.097
Rib	0.097
Gal Acet	0.097
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 12. Especificidad de carbohidratos 0-20%.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en  $\mu\text{mol}$ ) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo O. La afinidad por los carbohidratos fue la misma para todos los carbohidratos con excepción de Sacarosa y Xilosa.

### Sulfato de amonio 20-40%

En la concentración 20-40% de sulfato de amonio, se utilizó el grupo sanguíneo A<sub>1</sub>. Los resultados que se pueden observar en la tabla 13, la mayor afinidad fue para Galactosa, N-acetil-galactosamina y Glucosa, que coincide totalmente con los carbohidratos de los grupos sanguíneo con los que se obtuvo la mayor actividad (Tabla 7). La afinidad del precipitado de 20-40% para carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente: Gal>GalNAC>Glu > GluNAC, Fuc, Ribosa, GalAcetilada > Man, Lac, Sacarosa, Xilosa.

Carbohidrato	A <sub>1</sub> ( $\mu\text{mol}$ )
Gal	0.097
GalNAC	0.097
Glu	0.097
GluNAC	100
Fuc	100
Rib	100
Gal Acet	100
Man	200
Lac	200
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 13 Especificidad de carbohidratos 20-40%.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en  $\mu\text{mol}$ ) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo A<sub>1</sub>. La afinidad por los carbohidratos fue la siguiente: Gal>GalNAC>Glu > GluNAC, Fuc, Ribosa, GalAcetilada > Man, Lac, Sacarosa, Xilosa.

### Sulfato de amonio 40-60%

La fracción 40-60% presenta la afinidad por carbohidratos que se observan en la tabla 14. Se utilizó el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>. Y la afinidad encontrada fue la siguiente: Ribosa, Gal Acetilada,>GalNAC, Glu> Gal, Man, Lac> GluNAC, Fuc> Sac, Xyl.

40-60%	A <sub>2</sub>
Rib	1.5625
Gal Acet	1.5625
GalNAC	3.125
Glu	3.125
Gal	6.25
Man	6.25
Lac	6.25
GluNAC	12.5
Fuc	12.5
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 14 Especificidad de carbohidratos 40-60%.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en  $\mu\text{mol}$ ) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>. La afinidad por los carbohidratos fue la siguiente: Rib, Gal Acetilada,>GalNAC, Glu> Gal, Man, Lac> GluNAC, Fuc> Sac, Xyl.

### Sulfato de amonio 60-80%

En el precipitado 60-80%, se utilizó el grupo sanguíneo B, uno de los cuales se obtuvo la mayor actividad. En la tabla 15 se resumen los resultados. La afinidad obtenida fue la siguiente: Gal, GalNAC> Gal Acetilada, Glu > GluNAC, Fuc> Rib, Man, Lac > Sac, Xyl.

Carbohidrato	B ( $\mu\text{mol}$ )
Gal	0.3906
GalNAC	0.3906
Gal Acet	0.78125
Glu	0.78125
GluNAC	1.5625
Fuc	1.5625
Rib	6.25
Man	6.25
Lac	6.25
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 15 Especificidad de carbohidratos 60-80%.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en  $\mu\text{mol}$ ) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo B. La afinidad por los carbohidratos fue la siguiente: Gal, GalNAC> Gal Acetilada, Glu > GluNAC, Fuc> Rib, Man, Lac > Sac, Xyl

### Sulfato de amonio 80-100%

Por último, en la concentración que llega a la saturación (80-100%) presento los resultados que se observan en la tabla 16 al utilizar el grupo sanguíneo O (Tabla 16). La afinidad para carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente: Gal Acetilada >Rib >Glu, Gal >Lac >GalNAC >Fuc >Man >GluNAC >Sac >Xyl.

Carbohidrato	O (μmol)
Gal Acet	0.3906
Rib	0.7812
Gal	3.125
Glu	3.125
Lac	6.25
GalNAC	12.5
Fuc	25
GluNAC	50
Man	50
Sac	200
Xyl	200

**Tabla 16 Especificidad de carbohidratos para 80-100%.** Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (en μmol) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante. Se utilizó el grupo sanguíneo B. La afinidad por los carbohidratos fue la siguiente: Gal Acetilada >Ribosa >Glu, Gal >Lac >GalNAC >Fuc >Man >GluNAC >Sac >Xyl.

En tabla 17 podemos observar una comparación del extracto crudo y los pasos de purificación al final se encuentra la lectina pura. La especificidad varió de acuerdo a la separación y purificación de componentes. La afinidad de la lectina pura (HLS) muestra una mayor especificidad en comparación con los pasos anteriores.

<b>Carbohidrato</b>	<b>Extracto Crudo</b>	<b>0-20%</b>	<b>20-40%</b>	<b>40-60%</b>	<b>60-80%</b>	<b>80-100%</b>	<b>Lectina Pura</b>
( $\mu$ mol)	A <sub>2</sub>	O	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	O	B
Gal	0.097	0.097	0.097	6.25	0.097	3.125	0.097
GalNAc	0.097	0.097	0.097	3.125	0.097	12.5	0.097
Gal acet	0.097	0.097	100	1.56	0.78	0.39	0.097
Glu	0.097	0.097	0.097	3.125	0.78	3.125	1.56
GluNAc	1.56	0.097	100	12.5	1.56	50	12.5
Rib	1.56	0.097	100	1.56	6.25	0.78	200
Fuc	25	0.097	100	12.5	1.56	25	6.25
Man	25	0.097	200	6.25	6.25	50	200
Lac	3.125	0.097	200	6.25	6.25	6.25	100
Sac	200	200	200	200	200	200	200
Xyl	200	200	200	200	200	200	200

**Tabla 17 Tabla comparativa de la especificidad para carbohidratos.**

Se muestra la especificidad para carbohidratos en los distintos pasos de purificación. Se observan diferentes especificidades en cada grupo, lo que indica la separación de las lectinas. La afinidad para carbohidratos de mayor a menor fue la siguiente para el extracto crudo: GalNAc >Gal >Gal acetilada >Rib >Glu >GluNAc >Lac >Man >Fuc >Sac >Xyl, para la lectina HLS: Gal >GalNAc > Gal acetilada >Glu >GluNAc >Lac>Rib >Fuc >Man >Sac >Xyl.

## Termoestabilidad

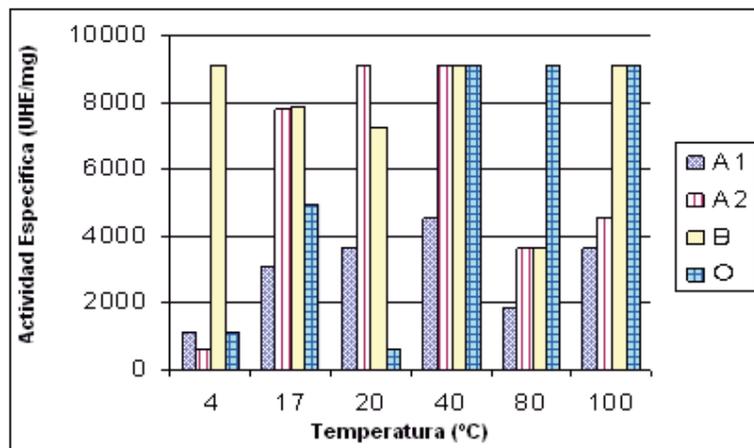
### Extracto Crudo

Para evaluar la dependencia a la temperatura se desarrollo el ensayo utilizando diferentes temperaturas de incubación. La temperatura ambiente fue de 17°C. En la tabla 18, se muestran los resultados en la actividad específica, con los cuatro grupos sanguíneos humanos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O).

Temperatura (°C)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	O
4	1134	567	9075	1134
17	3081	7746	7843	4963
20	3629	9075	7259	567
40	4537	9075	9075	9075
80	1814	3629	3629	9075
100	3629	4537	9075	9075

**Tabla 18 Termoestabilidad Extracto Crudo.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas analizadas utilizando los cuatro grupos sanguíneos.

En la Figura 9, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas del extracto crudo son termoestables al utilizar diferentes temperaturas. Esto es evidente, ya que con el grupo sanguíneo B se mantiene con muy pocas diferencias en las diferentes temperaturas. Incluso se observa un ligero incremento con las temperaturas más elevadas (80 y 100 °C).



**Figura 9. Termoestabilidad del Extracto Crudo.** Se observa que con las diferentes temperaturas se mantiene la actividad específica con los cuatro grupos sanguíneos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O utilizados.

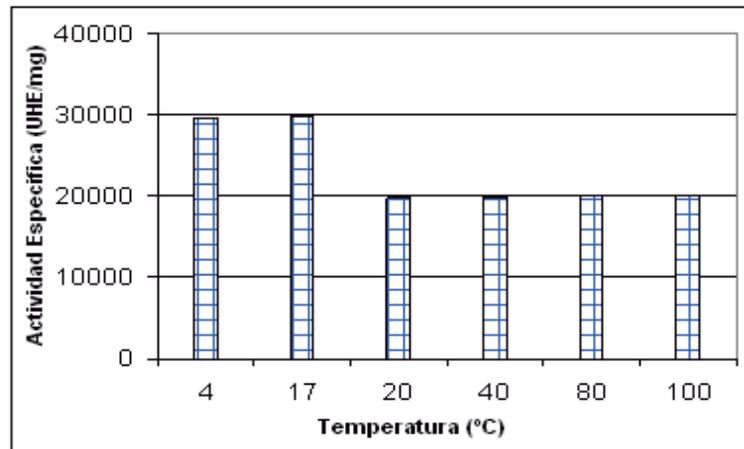
### Sulfato de amonio 0-20%

En la tabla 19, se muestran los resultados en la actividad específica, con el grupo sanguíneo O.

Temperatura (°C)	O
4	29565
17	29782
20	19891
40	19891
80	19946
100	19946

**Tabla 19 Termoestabilidad concentración 0-20%.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas analizadas utilizando el grupo sanguíneo O.

En la Figura 10, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas de la concentración 0-20% son termoestables al utilizar diferentes temperaturas. Esto es evidente, ya que con el grupo sanguíneo O se observó una diferencia mínima con el resto de las temperaturas empleadas.



**Figura 10 Termoestabilidad Concentración 0-20%.** Se observa que con las diferentes temperaturas se mantiene la actividad específica con el grupo sanguíneo O utilizado.

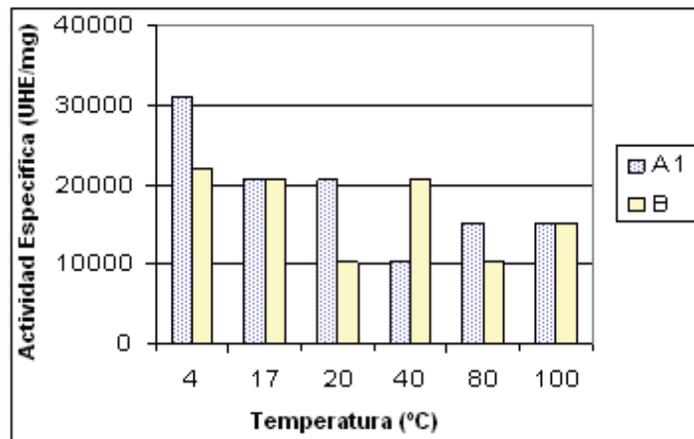
## Sulfato de amonio 20-40%

En la tabla 20, se muestran los resultados en la actividad específica, con los grupos sanguíneos A<sub>1</sub> y B.

Temperatura (°C)	A <sub>1</sub>	B
4	30960	21920
17	20480	20480
20	20480	10240
40	10240	20480
80	15120	10240
100	15120	15120

**Tabla 20 Termoestabilidad 20-40%.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas analizadas utilizando los grupos sanguíneos A<sub>1</sub> y B.

En la Figura 11, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas de la concentración 20-40% son termoestables al utilizar diferentes temperaturas. Con excepción de la temperatura menor (4°C) el resto no muestra diferencias entre los grupos sanguíneos y las temperaturas.



**Figura 11 Termoestabilidad Concentración 20-40%.** Se observa que con las diferentes temperaturas se mantiene la actividad específica con los grupos sanguíneos A<sub>1</sub> y B utilizados.

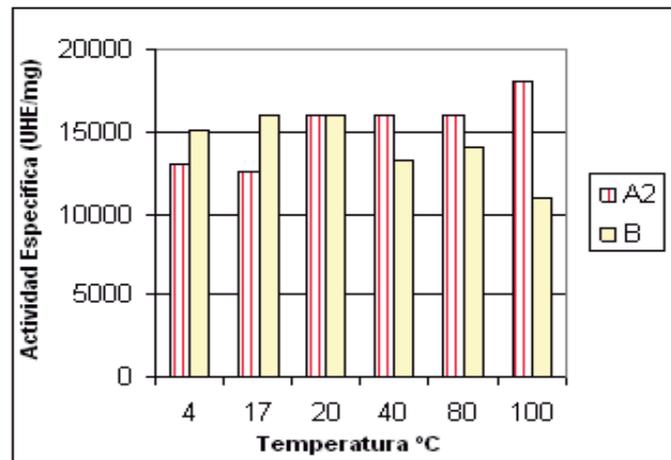
### Sulfato de amonio 40-60%

En la tabla 21, se muestran los resultados en la actividad específica, con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub> y B.

Temperatura(°C)	A <sub>2</sub>	B
4	13028	15064
17	12564	16041
20	16041	16041
40	16041	13282
80	16021	14010
100	18021	11003

**Tabla 21 Termoestabilidad Concentración 40-60%.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas analizadas utilizando el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>.

En la Figura 12, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas de la concentración 40-60% son termoestables al utilizar diferentes temperaturas. Esto es evidente, ya que con los grupos sanguíneos A<sub>2</sub> y B, se mantiene con muy pocas diferencias en las diferentes temperaturas. Incluso se observa una estabilidad en las temperaturas más elevadas (80 y 100 °C).



**Figura 12 Termoestabilidad Concentración 40-60%.** Se observa que con las diferentes temperaturas se mantiene la actividad específica con el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>.

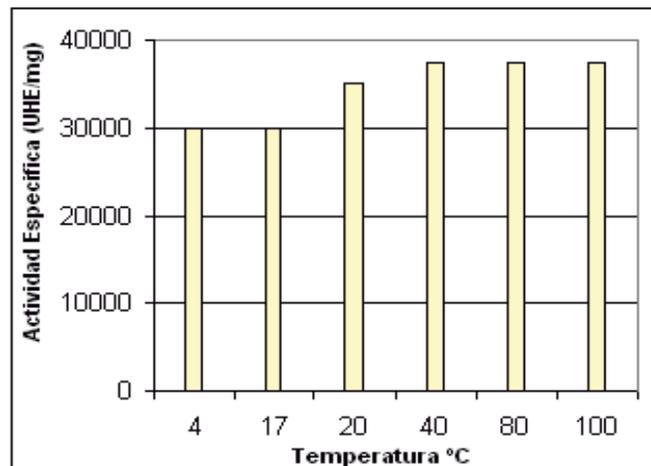
## Sulfato de amonio 60-80%

En la tabla 22, se muestran los resultados en la actividad específica, con el grupo sanguíneo B.

Temperatura (°C)	B
4°	30073
17	30073
20	35018
40	37509
80	37509
100	37509

**Tabla 22 Termoestabilidad Concentración 60-80%.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas analizadas utilizando el grupo sanguíneo B.

En la Figura 13, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas de la concentración 60-80% son termoestables al utilizar diferentes temperaturas. Se utilizó el grupo sanguíneo B.



**Figura 13 Termoestabilidad Concentración 60-80%.** Se observa que con las diferentes temperaturas se mantiene la actividad específica con el grupo sanguíneo B.

### Sulfato de amonio 80-100%

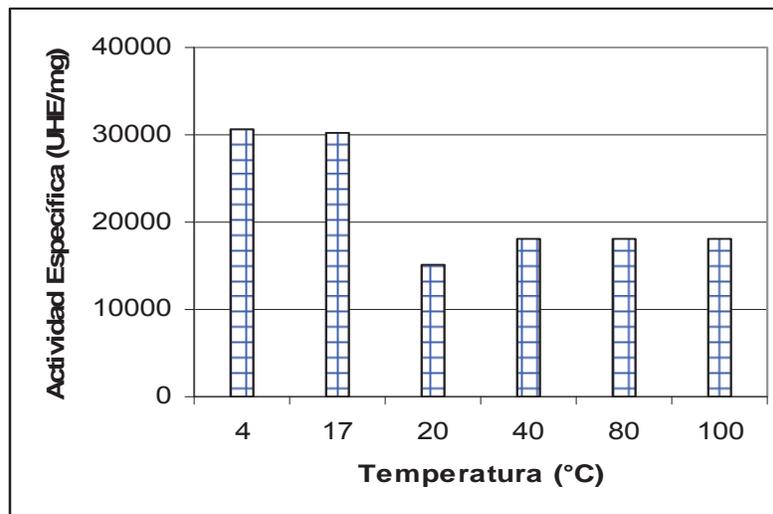
En la tabla 23, se muestran los resultados en la actividad específica, con el grupo sanguíneo O.

Temperatura(°C)	O
4	30598
17	30299
20	15150
40	18093
80	18093
100	18093

**Tabla 23 Termoestabilidad 80-100%.** Se analizó la dependencia a la temperatura. Como se puede observar se mantiene la actividad específica en las temperaturas empleadas. Se utilizó el grupo sanguíneo O.

En la Figura 14, se aprecia que la actividad hemaglutinante de las lectinas de la concentración 80-100% son termoestables.

En todas las diferentes concentraciones de sulfato de amonio utilizadas se mantiene la actividad específica con mínimas diferencias. Por lo que se puede afirmar que la jamaica posee lectinas termoestables.



**Figura 14 Termoestabilidad Concentración 80-100%.** Se observa que con las temperaturas 40 y 80 °C se mantiene la actividad específica con las diferentes temperaturas. Se utilizó el el grupo sanguíneo O.

## **Dependencia de cationes**

Para comprobar la dependencia a cationes se utilizaron los siguientes cationes divalentes que son K ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Mg ( $\text{MgCl}_2$ ), Ca ( $\text{CaCl}_2$ ) y Na ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

Después de tratarlos con un agente quelante por toda la noche, se probó la actividad. En la tabla 24 se muestran las actividades obtenidas en el extracto crudo y en las distintas concentraciones de sulfato de amonio. Como se puede apreciar, no se observan diferencias en las actividades con y sin el tratamiento con EDTA, de la misma manera no se observan diferencias entre los cationes utilizados.

Por lo que podemos afirmar que las lectinas contenidas en el extracto de flor de jamaica no son dependientes de cationes.

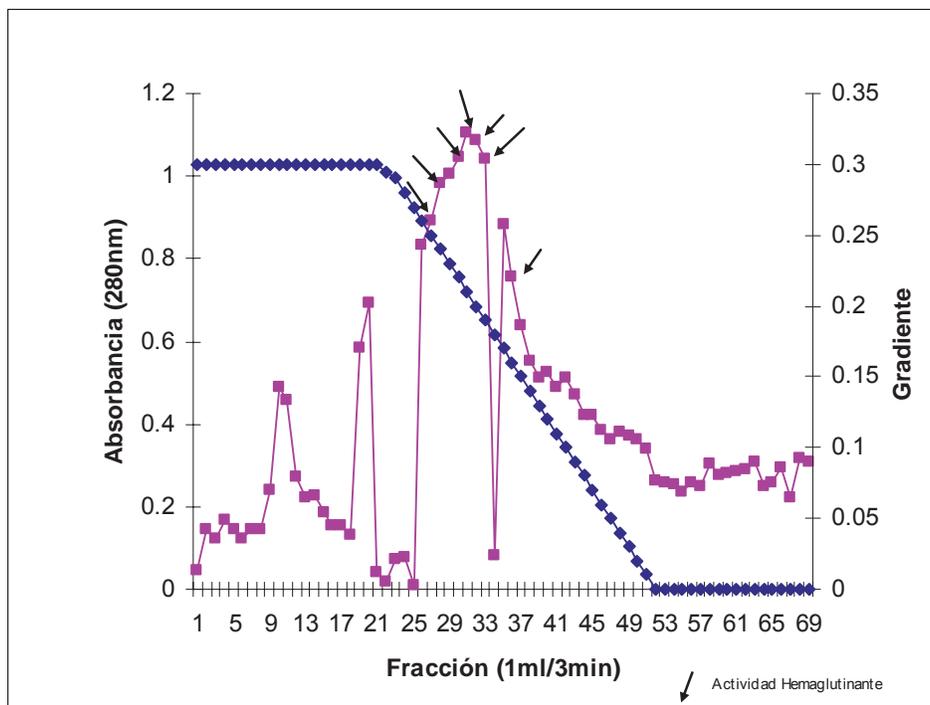
Cación	EXTRACTO CRUDO		0-20%		20-40%		40-60%		60-80%		80-100%	
	A <sub>2</sub> +EDTA	A <sub>2</sub>	O+EDTA	O	A <sub>1</sub> +EDTA	A <sub>1</sub>	B+EDTA	B	B+EDTA	B	O+EDTA	O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	290388	290388	318260	318260	327680	327680	210051	210051	30073	30073	242393	242393
MgCl <sub>2</sub>	290388	290388	318260	318260	327680	327680	210051	210051	30073	30073	242393	242393
CaCl <sub>2</sub>	290388	290388	318260	318260	327680	327680	210051	210051	30073	30073	242393	242393
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	290388	290388	318260	318260	327680	327680	210051	210051	30073	30073	242393	242393

**Tabla 24 Tabla Comparativa de la Dependencia de cationes.** Se muestra la dependencia de cationes en el extracto crudo y en las concentraciones crecientes de sulfato de amonio. Como se puede observar, las actividades obtenidas en cada grupo no varían al utilizar los cationes descritos en la tabla.

## Cromatografía de intercambio iónico

La fracción con la que se obtuvo la mayor actividad hemaglutinante, fue la de 60-80% (Tabla 9). Por esta razón se escogió para continuar la purificación de lectinas. Se utilizó una resina de interacción hidrofóbica (Octyl-Sepharosa). El amortiguador utilizado fue PBS (0.1M pH 7.5) con 0.3M Sulfato de amonio. El gradiente se formó al añadir concentraciones crecientes de agua tridestilada.

A cada una de las fracciones colectadas se les analizó la actividad hemaglutinante. Como se puede apreciar en la Figura 15 se muestra un patrón representativo de las cromatografías de intercambio iónico realizadas., en esta figura y en la Tabla 30., se aprecian los picos (fracciones) obtenidos en condiciones hidrofóbica (PBS+ 0.3M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) que carecen de actividad, mientras que los obtenidos en condiciones hidrofílica, presentan actividad (marcados con una flecha).



**Figura 15. Cromatografía de intercambio iónico hidrofóbica.** Patrón representativo obtenido con una resina de Intercambio iónico, se utilizó como amortiguador PBS (0.1M pH 7.5) adicionado con 0.3M de sulfato de amonio, el gradiente se obtuvo utilizando agua tridestilada. Se muestra la separación de los componentes de la fracción 60-80% de sulfato de amonio. En la fracción hidrofóbica los componentes carecen de actividad, mientras que los picos hidrofílicos contienen a las lectinas debido a que presentan actividad hemaglutinante.

En la Tabla 25. Se muestran los resultados del análisis de la actividad hemaglutinante de cada fracción con actividad obtenida en esta cromatografía. Las fracciones 27 a la 30 y 36 presentan actividad con los grupos sanguíneos B y O, mientras que la 31 y 32 tienen actividad con los cuatro grupos sanguíneos, esto indica claramente una separación de lectinas.

	UHE	AE	C
<b>Fracción 27</b>			
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
<b>B</b>	<b>81920</b>	<b>2409411.76</b>	<b>0.033</b>
<b>O</b>	<b>1280</b>	<b>37647.0588</b>	<b>2.14</b>
<b>Fracción 28</b>			
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
<b>B</b>	<b>81920</b>	<b>2560000</b>	<b>0.03</b>
<b>O</b>	<b>40960</b>	<b>1280000</b>	<b>0.06</b>
<b>Fracción 29</b>			
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
<b>B</b>	<b>163840</b>	<b>5285161.29</b>	<b>0.000015</b>
<b>O</b>	<b>20480</b>	<b>660645.161</b>	<b>0.00012</b>
<b>Fracción 30</b>			
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
<b>B</b>	<b>20480</b>	<b>386415.094</b>	<b>0.2</b>
<b>O</b>	<b>10240</b>	<b>193207.547</b>	<b>0.418</b>
<b>Fracción 31</b>			
A <sub>1</sub>	80	1509.43396	53.53
A <sub>2</sub>	80	1509.43396	53.53
<b>B</b>	<b>81920</b>	<b>1545660.38</b>	<b>0.05</b>
O			
<b>Fracción 32</b>			
A <sub>1</sub>	1280	49230.7692	1.66
A <sub>2</sub>	640	24615.3846	6.65
<b>B</b>	<b>163840</b>	<b>6301538.46</b>	<b>0.012</b>
O	10240	393846.154	0.2
<b>Fracción 36</b>			
A <sub>1</sub>			
A <sub>2</sub>			
<b>B</b>	<b>81920</b>	<b>3723636.36</b>	<b>0.02</b>
<b>O</b>	<b>40960</b>	<b>1861818.18</b>	<b>0.04</b>

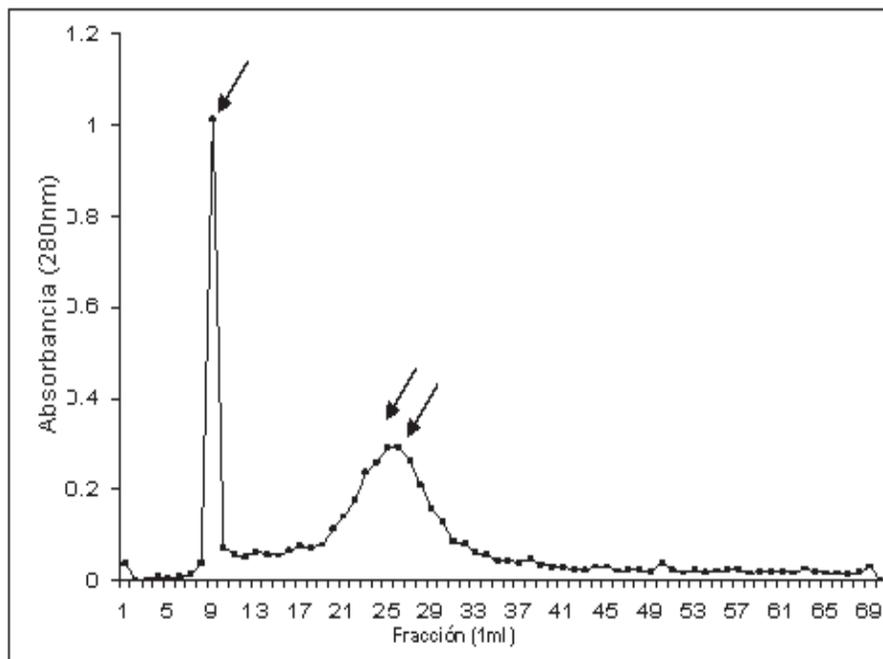
**Tabla 25. Análisis de la actividad de cada una de las Fracciones de la Cromatografía de Intercambio iónico.** En esta tabla se puede observar que la mayor actividad hemaglutinante se lleva a cabo con los grupos sanguíneos B y O, y donde los grupos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> no tienen actividad.

Se decidió tomar a las fracciones 29 y 30 para continuar con la purificación, esto es porque los resultados del ensayo de aglutinación muestran proteínas con una muy alta afinidad con los grupos sanguíneos B y O, ya que se requiere una mínima concentración de proteínas para obtener actividad. Además son las fracciones con mayor concentración de proteínas.

Las fracciones que mostraron las mismas características se unieron y posteriormente se separaron utilizando ahora una separación en base a su peso molecular.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

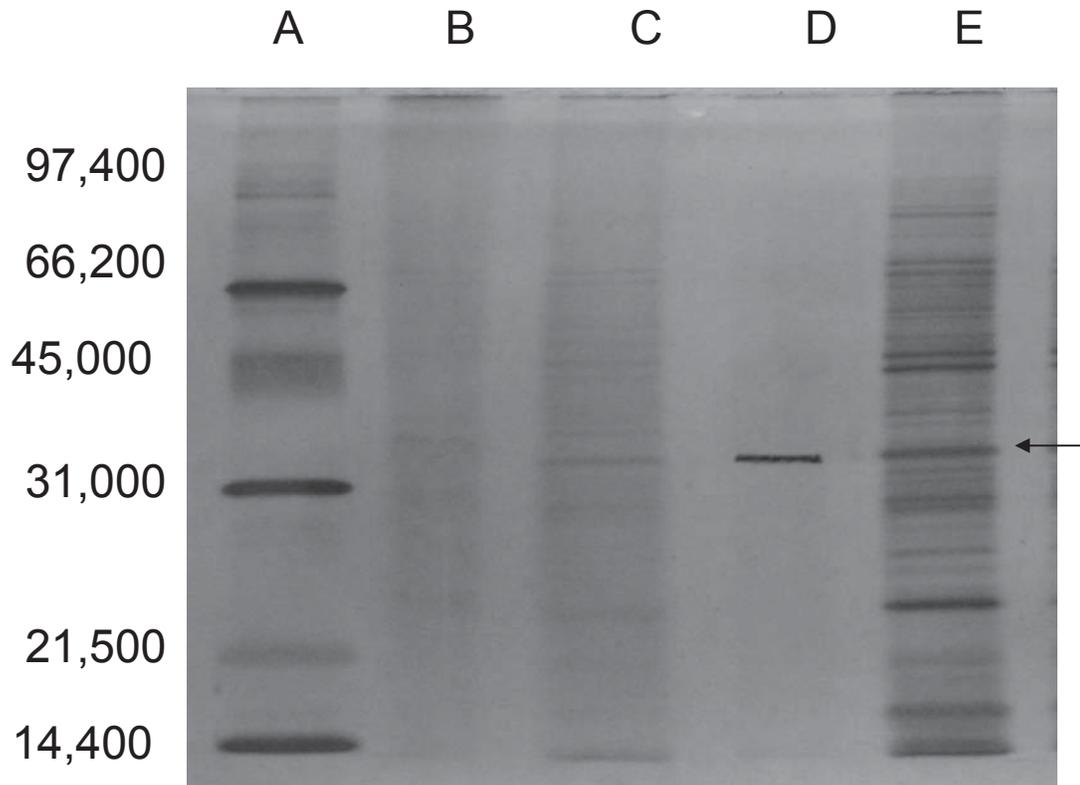
Las fracciones con actividad aglutinante se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular. En la Figura 16, se puede observar un patrón representativo de las cromatografías que se realizaron. En esta figura, se puede observar dos fracciones (picos) donde las señaladas con una flecha son las que tuvieron actividad hemaglutinante.



**Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular.** Se utilizó amortiguador PBS 0.1M pH 7.5. Las flechas muestran las fracciones con actividad hemaglutinante.

### Electroforesis SDS-PAGE

A la fracción # 9 obtenida en la cromatografía de exclusión molecular, se analizó su grado de pureza y el peso molecular, mediante una electroforesis SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 17, se obtuvo una fracción mayoritaria en esta fracción lo que indica que la lectina esta pura.



**Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE.** Geles con una concentración del 12% en condiciones nativas. Carril A.- Marcadores Moleculares, B.- Fracción #·9 de Cromatografía de Exclusión Molecular, D.- Lectina de *Hibiscus sabdariffa* (HSL) PM 32,500 Da., E.- Extracto Crudo (1:100)

A la lectina pura se le llamó lectina de *Hibiscus sabdariffa* o HSL (*Hibiscus sabdariffa* lectin). Tiene un peso molecular de 32,500 Da. A esta lectina se le analizaron sus propiedades fisicoquímicas que se explican a continuación:

## **Propiedades Fisicoquímicas de HSL**

### **Peso Molecular:**

La lectina pura se le llamó "**Lectina de *Hibiscus sabdariffa*" HLS** tiene un peso molecular aparente de 32,500 Da

### **Dependencia a Cationes**

La actividad hemaglutinante no se vio afectada por tratamientos con EDTA o la adición de cationes divalentes (%mM). Lo que indica que HLS no requiere iones metálicos.

### **Temperatura**

Presenta una termoestabilidad con las diferentes temperaturas de incubación utilizadas.

### **pH**

La actividad hemaglutinante se mantuvo estable en el intervalo de pH de 6-8.

### **Especificidad de Grupo Sanguíneo**

Tanto la fracción 60-80% como la lectina HLS presentaron la mayor actividad con los grupos sanguíneos humanos B y O

### **Especificidad por Carbohidratos**

La especificidad por carbohidratos de la lectina pura fue la siguiente:  
Gal>GalNAc>Glu>GalAcet>GluNAc>Lac>Rib>Fuc>Man>Sac >Xyl

## VII DISCUSION

Este trabajo de tesis se enfocó a la purificación de una lectina a partir de una infusión de flores de jamaica. La metodología utilizada es la reportada comúnmente en éste tipo de proteínas. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en donde además de identificarlas por primera vez se realiza una purificación y caracterización parcial.

Al realizar el ensayo de hemaglutinación se observó actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos, este ensayo se realizó utilizando primero una concentración pequeña de flores, este resultado indica por un lado la presencia inequívoca de lectinas y por otro lado se tiene una mezcla de lectinas ya que los resultados son con los cuatro grupos sanguíneos.

Habiendo identificado la presencia de lectinas en infusiones de flores de jamaica y cubriendo con el primer objetivo, se procedió a realizar la purificación, el extracto crudo, presentó afinidad con los cuatro grupos sanguíneos mostrando lectinas con afinidades para A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>: GalNAc-Gal-Fuc, B: Gal-Gal-Fuc y O: Fuc-Gal (Tabla 5, Figura 3). El análisis estadístico entre los grupos mostró que no existen diferencias significativas.

A continuación se inició la purificación utilizando una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Con esta técnica se consigue la separación de moléculas de mayor a menor peso molecular.

En la primer concentración de sulfato de amonio (0-20%) se observó prácticamente los mismos resultados obtenidos con el extracto crudo, esto es a pesar de que se separaron proteínas con alto peso molecular. Continúa presente una mezcla de lectinas.

A partir de la concentración de 20-40% de sulfato de amonio se observó diferentes afinidades para los grupos sanguíneos, así, en esta concentración se observó una mayor actividad en B. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre todos los grupos. Lo que indica la separación de compuestos.

En el intervalo de 40-60% de sulfato de amonio, se observó una mayor actividad en el grupo sanguíneo A<sub>2</sub>, estadísticamente diferente del resto de las actividades específicas obtenidas.

Utilizando las concentraciones de 60 a 80% se observaron las mayores actividades con A<sub>2</sub>, B y O, no presentaron diferencias significativas entre estos grupos. En esta fracción se obtuvo la mayor actividad específica con un incremento de 15 veces en comparación con el extracto crudo.

En el mayor intervalo de concentraciones de 80 a 100% la mayor actividad se obtuvo utilizando el grupo sanguíneo O.

Como se puede observar, se logro obtener una separación de las proteínas contenidas en el extracto crudo. Las diferentes actividades encontradas indican que en cada una de estas fracciones con diferentes concentraciones de sulfato de amonio contienen diferentes lectinas.

Para obtener la especificidad para carbohidratos en las muestras obtenidas, se analizaron utilizando los carbohidratos habituales encontrados en lectinas de plantas (Hernández, *et al.*, 2005). En el extracto crudo (Tabla 11) se obtuvieron las siguientes afinidades: GalNAc >Gal >Gal acetilada >Ribosa >Glu >GluNAc >Lac >Man >Fuc >Sacarosa >Xilosa. Las mayores afinidades se observaron con las primeras cuatro, que representa otro criterio con el que podemos asegurar que este extracto crudo posee una mezcla de lectinas. En las fracciones obtenidas con los diversos intervalos de sulfato de amonio se

obtuvieron diferentes afinidades que se resumen en la Tabla 17, como se aprecia se van separando las proteínas que se visualizan en las diversas especificidades. La lectina pura muestra también una mayor especificidad para Gal, GalNAc, Glu y GluNAc.

En cuanto a la termoestabilidad, como se muestra en los ensayos realizados tanto al extracto crudo como en los diversos pasos de purificación se observó que las lectinas de la flor de jamaica son termoestables. Así como se aprecia en las figuras, 9 a la 14, la actividad específica se mantiene incluso con temperaturas de incubación de 80 y 100°C observando en algunas una pequeña disminución que no es significativa con el resto de las temperaturas probadas, este mismo comportamiento lo mostró la lectina pura.

Al llevar a cabo el ensayo de los cationes para el extracto crudo, se puede observar en la tabla 22, que la actividad hemaglutinante no se ve afectada por el tratamiento con EDTA y tampoco al añadirle los cationes, este mismo resultado se observó hasta el precipitado de 80-100% y por lo consiguiente la lectina pura HSL. Se puede afirmar que no muestran dependencia de los siguientes cationes: potasio, magnesio, calcio y sodio.

Se analizó además la dependencia al cambio de pH, los resultados mostraron que tanto el extracto crudo, las fracciones correspondientes a la purificación y la lectina pura mostraron una estabilidad en el intervalo de pH 6.0 a 8.0.

La separación de los componentes de la fracción 60-80% que fue la que presentó la mayor actividad (Tabla 9) se realizó utilizando primero cromatografías de interacción hidrofóbica seguidas de cromatografías de exclusión molecular (Figuras 15 y 16). Las fracciones con mayor actividad se analizaron para evaluar la purificación así como el peso molecular aparente, como se aprecia en la Figura 17 se obtiene una sola banda de 32,500 Da. A esta fracción se le denominó lectina de *Hibiscus sabdariffa* (HSL). En esta misma figura se puede apreciar la diferencia entre el extracto crudo y esta lectina purificada.

Como se menciona anteriormente se inició con una mezcla de lectinas de las cuales no se tenía información, por lo que el método utilizado en éste trabajo de investigación ofrece la ventaja en comparación con las cromatografías de afinidad, en el que por un lado no se pierden proteínas y por otro permite analizar todos los componentes.

Este método ha sido utilizado ampliamente en la purificación de lectinas (Varki A, et al., 1999), la recuperación de proteínas es baja (alrededor de 200 µg/mL), debido a que se trabajó con infusiones de flores, partiendo inicialmente de una concentración de 0.5 mg/mL. Sin embargo, cuando lo comparamos con la literatura, los valores reportados en las purificaciones son similares, por ejemplo la recuperación de las lectinas de semillas de *Artocarpus blancoi* y *Barrington asiatica* fue de 402 µg/mL (Merca FE. 2004). La concentración de proteínas en las semillas de plantas es superior a la encontrada en las flores (<http://monografias.com/trabajarlo/compo/compo.shtml>), por lo que la recuperación lograda en este trabajo, claramente indica que la metodología y recuperación de lectinas de infusiones fue la óptima.

En cuanto a las propiedades de la lectina purificada (HSL) mostró afinidad para β-galactósidos, como se aprecia en la Tabla 17., esto es congruente con lo previamente reportado para lectinas de plantas, en particular en leguminosas (Varki, A., et al., 1999, Sharon & Lis, 1990). Por ejemplo, la

lectina de *Glycine max*, tiene especificidad por los carbohidratos  $\beta$ -Galactosa, N-Acetil- $\alpha$ -D-galactosamina, en el caso de la lectina de *Triticum vulgare*, es específica para N-Acetil- $\beta$ -D-glucosamina y en el caso de *Phaseolus vulgaris* reconoce GalNAc, todas estas pertenecen a leguminosas (Varki A., et al., 1999, Hernández, et al., 2005).

Para poderla clasificar correctamente se requiere tener la secuencia de la proteína, esto se realizará posteriormente ya que se requiere una mayor concentración de lectina pura.

Es importante recalcar que en este trabajo se está reportando una lectina con sus propiedades, pero como se expuso con detalle en los resultados, la infusión de jamaica se encuentra constituida por diferentes lectinas, que comparten propiedades como es la afinidad para carbohidratos, y que posteriormente podrían ser purificadas en el laboratorio.

El único reporte de la presencia de lectinas en semillas de jamaica, las identificaron con un extracto que posteriormente se utilizó para evaluar la aglutinación de células T, T<sub>n</sub> y T<sub>h</sub>. Por lo que concluyen que se puede utilizar como medio para distinguir diferentes tipos de eritrocitos (Yang et al., 1982). Es importante resaltar que no purificaron a las lectinas, no las identificaron ni aportan información con respecto a valores o concentraciones iniciales. Por lo que este trabajo es el primer reporte de purificación.

Como se mencionó en la introducción, la mayor parte de las funciones de la jamaica se encuentran relacionadas con las antocianinas. Se han utilizado extractos (acuosos o etanólicos) de jamaica, sin separar sus componentes, en particular estas funciones no se han relacionado con proteínas, ya que no estaban reportadas, siendo este el primer estudio a nivel mundial que se enfocó a la identificación y purificación de lectinas.

Aunque este interesante aspecto no se ha estudiado, las funciones en las que podrían estar participando las lectinas de la jamaica son como antihipertensivo, como anticancerígeno y contra microorganismos patógenos. Esto se debe a que existen amplias investigaciones donde se sabe que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células tumorales y microorganismos (bacterias, virus y hongos), mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica, identificando y destruyendo a células patogénicas, así (Sharon y Lis, 2001; Hernández, et al., 2005; Muzquiz, 2005).

Respecto a la actividad de la jamaica como agente antitumoral y anticancerígeno ha sido probado utilizando el extracto, sin definir que compuesto es el que participa en estos procesos, en este aspecto es posible que estén actuando las lectinas de la jamaica ya que previamente se ha demostrado que otras lectinas de plantas tienen estas actividades, por ejemplo: *Phaseolus vulgaris*, *Concavalina A*, *Griffonia simplicifolia I-A*, *Triticum vulgare*, *Datura stramonium*, *Viscum álbium L coloratum*, *Viscum álbium*, *Agaricus bisporus I*, *Vicia faba*, *Agrocybe aegerita*, *Glycine max*, *Triholoma mongolicum* y *Korean mistletoe*. Cada una de estas lectinas tienen un mecanismo de acción inhibitorio sobre un tipo de cáncer o de tumores (Castillo, et al., 2005). Algunas de estas lectinas comparten la afinidad por carbohidratos que tienen las lectinas de la jamaica.

Las lectinas pertenecientes a la familia de las leguminosas, son consideradas como factores que no tienen una función nutricional claramente

definida, pero que son benéficas para la salud, ya que contribuyen a prevenir o curar enfermedades anticancerígenos, hipocolesterolémicos o hipoglucémicos. Se les ha identificado como componente biológicamente activos, porque proporcionan un beneficio para la salud incrementando el bienestar o disminuyendo el riesgo de adquirir enfermedades (Muzquiz, 2005).

## IX CONCLUSIONES

- Se comprobó la presencia de lectinas en el extracto de flor de jamaica.
- El extracto crudo presenta actividad hemaglutinante con los tipos sanguíneos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (GalNAc-Gal-Fuc), B (Gal-Gal-Fuc) y O (Fuc-Gal).
- La afinidad para los diferentes carbohidratos analizados, así como el análisis de los componentes en las electroforesis, indican la diversidad de componentes, en el extracto crudo, esto es, la presencia de más de una lectina.
- La lectina purificada se le denominó "Lectina de *Hibiscus sabdariffa*" (HLS) que presentó un peso molecular aparente de 32,500 Da.
- HLS .presentó una independencia de cationes divalentes.
- HLS es termoestable cuando se incubó 60 min., utilizando las siguientes temperaturas: 4, 17, 20, 40, 80 y 100°C.
- HLS tiene la mayor actividad con el grupo sanguíneo B (Gal-Gal-Fuc).
- HLS es estable en el intervalo de pH de 6 a 8.
- HLS tiene la siguiente especificidad para carbohidratos Gal>GalNAc>Glu>GalAcet>GluNAc>Lactosa>Ribosa>Fuc>Man>Sacarosa >Xilosa
- Hasta donde sabemos, este trabajo constituye el primer estudio de lectinas en infusiones de jamaica.

## **X PERSPECTIVAS**

- Analizar el comportamiento de la lectina en solución utilizando difracción circular, así como barrido dinámico de luz (DLS).
- Realizar la secuenciación de HSL
- Analizar la secuencia y establecer el grado de homología y de identidad con secuencias de lectinas que se encuentran en los bancos de secuencias.
- Estudiar las funciones de HLS.
- Purificar y caracterizar las otras lectinas identificadas en el extracto crudo y realizar el análisis correspondiente a cada una

## IX BIBLIOGRAFIA

- Ajay, M., Chai, H, J., Mustafa, A, M., Gilani, A, H., Mustafa, M, R. 2007. Mechanisms of the Anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Calyces. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 388-393.
- Aquino, D.Y., Nesme, A.J., Alvarado, G.R., Gatica, V.R. 1998. Efecto protector de la *Hibiscus sabdariffa* (Jamaica) en hiperlipidemias. *Memorias de la VII reunión nacional de investigación médica*, Instituto Mexicano del Seguro Social, México: 262.
- Alarcon, A, F. ,Zamilpan, A., Perez, G, M,D., Almanza, P,J,C., Romero, N, E., Campos, S,E,A., Vazquez, C, L, I., Roman R,R. 2007. Effect of *Hibiscus Sabdariffa* on Obesity in MSG mice. *Journal ethnopharmacology*. 114: 66-71.
- Badreldin, H., Ali, Naser, A, W., Gerald, B. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. *Phytotherapy Research*, Issue 5. 19: 369-375.
- Bahr, R.F. 1988. Plantas medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas. *Selecciones Reader's Digest*. Mexico, D.F., Nueva York: 5-23, 63-87.
- Bonay, P.M., Fresno, M. 2000. Lectins from tropical sponges. *J. Biol. Chem.* 275, 29283-29289.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Calvete, J, J., Gallego, S, F., Shiniti, N, C., Cavada, S, B., Sampaio, H, A., Sanz, L. 2006. Lectinas. *Investigación y ciencia*. 9: 58-67.
- Castillo, V, A. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación Clínica*. 57: 55-64.
- Chen Chang-Che; Chou Fen-Pi; Ho Yung-Chyan; Lin Wea-Lung; Wang Chin-Pin; Kao Erl-Shyh; Huang An-Chung; Wang Chau-Jong. 2004. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (15): 1989-1996(8).
- Debray, H., Decourt, D., Strecker, G., Spick, G., Montreuil, J. 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117, 41-55.
- De-Xing, H., Xuhui, T., Norihiko, T., Dong, L., Makoto, F. 2005. Delphinidin 3-sambobioside, a *Hibiscus* anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 440: 101-109.
- Dollemore, D., Giulivacci, M., Haigh, J., Kirchheimer, S., Callahan, J. 1998. Nuevas alternativas para curarse naturalmente. *Rodale*. Estados Unidos de America: 3-11, 105-116.
- El-Merzabani, M.M., El-Aaser AA, Attia MA, El-Duweini AK., Ghazal AM. 1979. Screening system for Egyptian plants with potencial anti-tumors activity. *Planta Med.* 36, 150-155.

- Fenton NB., Arreguín LB, García HE, Heimer E, Aguilar MB, Rodríguez CA, Arreguín ER. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. *Toxicon* 42: 525-532.
- Figueroa, H, J, L., Sandoval, G, G., Jayme, A, V., Figueroa, E, J, L., Fernandez, S, G. 2005. Plant products with anti-cancer properties employed in the treatment of bowel cancer: Literatura review 1985 and 2004. *Proc.west.pharmacol.soc.* 48:77-83.
- Gabius, H, J. 2001. Eukaryotic Glycosylation and lectins: Hardware of the Sugar Code (Glycocode). In *Biological Information Transfer*. Eureka.com. pp: 1-10.
- Haji-Faraji M., Haji-Tarjhani A. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *J. Ethnopharmacol.* 65:231-236.
- Hernandez, C., Perez, C, E., Martínez, M, L., Ortiz, B., Martínez, G. 2005. Las lectinas Vegetales como Modelo de estudio de las Interacciones Proteína-Carbohidrato. *REB* 24 (1): 21-27.
- Hernández, D, P., Martin, G, O., Rodriguez, P, V, Y., Ganem, B, F, A. 1999. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmuno.I.* 15(2): 91-5.
- Hernandez, T, G. 1999. Hierbas mexicanas. Secretos de curanderos mexicanos y plantas conocidas.8va ed. Editores mexicanos unidos:7
- Herrera A A., Flores RS, Chávez S MA, Tortoriello J. 2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hipertensión: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicind* 11: 375-382.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Phumala, M, N., Bunyaphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthisang, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried Calyx of *Hibiscus Sabdariffa L.* in hypercholesterolemic rats. *Journal of ethnopharmacology.* 103: 252-260.
- Kim, S-M, H.Youn, M. Kim, H. Kim, Y. Park, C. Kim, S-J. Ha, Y. Chai, K. Kim, J. So Kim, K. Park, R. 2007. *Hibiscus Sabdariffa L.* water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-Kand MARPK pathway. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol.114:260-267.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-683.
- Leclerc, H. 1938. Sida sabdariffa (*Hibiscus sabdariffa*). *Press Med* 46: 1060.
- Lehninger, A. L. 2003. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2da ed. Omega.Barcelona:166-167.
- Lin, T., Lin, H., Chen, C., Lin, M., Chou, M., Wang. C. 2007. *Hibiscus Sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and woman. *Nutrition Research.* 27: 140-145.
- Lin, W, L., Hsieh, Y, J., Chou, F, P., Wang, C, J., Cheng, M, T., Tseng, T, H. 2003. *Hibiscus* protocatechuic acid in inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. organ toxicity and mechanisms. *arch toxicol.* 77: 42-47.
- Jonadet, M., Bastide J., Bastide P., Boyer B., Carnal AP., Lamaison JL. 1990. *In vitro* enzyme inhibitory and *In vivo* cardioprotective activities of *Hibiscus (Hibiscus sabdariffa L)*. *Pharm Belg.* 45:120-124.

- Marja, P. K., Heinonen, M. 2003. Antioxidant Activity of Anthocyanins and their Aglycons. *J. Agric. Food. Chem.* vol 51:628-633.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. 2002. *Bioquímica*. 3ra ed. Pearson. Madrid: 141-224.
- Meunier, MT; Villie F, Jonadet M, Batisde J, Batisde P. 1987. Inhibition of angiotensine I converging entume by flavonolic compounds: *in vitro* and *in vivo* studies. *Planta Med.* 53: 12-15.
- Muzquiz, M. 2005. Positive impact of pulse consumption on human heart. GLIP dissemination event, Madrid
- Odigie, J, P., Ettarh, S, A., Adigun. 2003. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus Sabdariffa* Attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2k-1c hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 86: 181-185.
- Omobuwajo, T, O., Sanni, L, A., Balami. Y, A. 2000. Physical properties of (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Seeds. *Journal of Food Engineering.* 45:37-41.
- Perry, LM. 1980. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*. MIT Press, Cambridge.
- Prenesti, E., Berto, S., Daniele, P, G., Toso, S. 2005. Antioxidant Power Quantification of Decoction and Cold Infusions of *Hibiscus Sabdariffa* Flower. *Food chemistry.* 100: 433-438.
- Reader's Digest. 2007. *Medicina de la naturaleza. Selecciones Reader's Digest.* Buenos Aires, Madrid, Mexico, Nueva York: 5-11,116.
- Salama, R.B. 1979. Ergosterol in *Hibiscus sabdariffa* seed oil. *Planta Med.* 36: 221-223.
- Sharon, N., Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *glycobiology.* 14: 53-62.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. 2001. *Química Analítica*. 7ma ed. Mc Graw Hill. México: 240-246.
- Stryer, L., Berg, J, M., Tymoczco, J, L. 2003. *Bioquímica*. 5ta ed. Reverte. Barcelona: 312-318.
- Dawson, D.C., Elliot, W.H., Elliot and K.J. Jones. 1969. *Data for Biochemical Research* 2nd edition. Edited by R.M.C.. Oxford University Press.
- Tsai, P., McIntouch, J., Pearse, P., Camden, B., Jordan, B, R. 2002. Anthocyanin and Antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Extract. 35:351-356.
- Tseng, T., Kao, T., Chu, C., Chou, F., Lin, W., Wang, C. 2000. Induction of Apoptosis by *Hibiscus Sabdariffa* Protocatechuic Acid in Human Leukemia cell via Reduction of Retino Blastoma (RB) and Bcl-2 Expression. *Biochemical Pharmacology:* 307-315.
- Ush, I, F., Akpan, E, J., Farombi, E, O. 2005. Antioxidant Actions of Dried Flower Extracts of *Hibiscus Sabdariffa L.* On Sodium Arsenite – Induced Oxidative Stress in Rats. *Pakistan Journal of nutrition.* 4 (3): 135-141.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Editors. 2001. *Plant Lectins In: Essentials of Glycobiology.* Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Chapter 30. Pp: 455-467.
- Voet, J, D., Voet, J, G. 2003. *Bioquímica*. 3a ed. Wiley & Sons. USA: 79-114.

- Wantana, R., Arunporn, I. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. in experimental animals. Songklanakarin.J. Sai.Technol. 29:29-38.
- Went, T, W. 2001. Las plantas. Colección de la naturaleza de time life. 2da ed. Ediciones culturales internacionales. Amsterdam: 9-12.
- Zenteno E., Debray, H., Montreuil J. 1988. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. FEBS Lett. 238: 95-100.
- <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num2/articulos/jamaica/index.html>
- [http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus\\_sabdariffa](http://es.wikipedia.org/wiki/Hibiscus_sabdariffa)
- <http://www.molecularstation.com/es/protein/Bradford-protein-assay>.
- [http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi\\_biosfera/flora/jamaica/jamaica.htm](http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_biosfera/flora/jamaica/jamaica.htm).
- [http://es.wikipedia.org/wiki/Sulfato\\_de\\_amonio](http://es.wikipedia.org/wiki/Sulfato_de_amonio)
- <http://www.cuerpamente.com/planta.jsp?ID=20513>
- <http://eljardin.info/Flores/gamakiya.htm>