



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ANTIBACTERIANA DE
LECTINAS DE CAPITANEJA (*Verbescina crocata*)”**

Presenta:

Q.F.B Anahi Luisa Reyes Virrueta

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIA DE LA SALUD

Directora de tesis:

D. C. BERTHA FENTON NAVARRO

Morelia, Michoacán, Agosto, 2014.

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

COMITÉ TUTORAL:

D. en C. Graciela Letechipía Vallejo

D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos

D. en C. Edgar Vázquez Contreras

M. en C. Víctor Manuel Farías Rodríguez



AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de cumplir uno más de mis sueños.

A mis padres únicamente por el hecho de ser quién son.

A la DC Bertha Fenton Navarro por su dedicación y múltiples consejos. Por haberme brindado un espacio y haber compartido conmigo sus conocimientos.

A mis sinodales, por haber aceptado ser jueces y parte de este trabajo. Por todas sus recomendaciones y enseñanzas, mismas que fueron parte muy importante en mi formación.

A toda mi familia y su incondicional apoyo.

A Marlen Tapia Moreno por haber sido una luz en mi vida y mi mejor amiga.

A mis amigos y compañeros de trabajo.

CONTENIDO

Índice general	iv
Índice de figuras	viii
Índice de gráficas	x
Índice de tablas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Glosario de términos	xv
Resumen	xvi
Abstract	xvii

ÍNDICE GENERAL

I.- INTRODUCCION	1
1.- Historia de las plantas medicinales	1
2.- Lectinas	2
2.1.- Distribución	3
2.1.1.- Lectinas vegetales	4
2.1.2.- Lectinas aisladas de leguminosas	4
2.1.3.- Lectinas con dominio tipo heveína	4
2.1.4.- Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa	5
2.1.5.- Lectinas en forma de β	5
2.1.6.- Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas	5
2.1.7.- Lectinas de tipo amaranto	5
2.2.- Purificación de lectinas vegetales	6
2.2.1.- Pasos a seguir en una purificación	6
2.3.- Funciones de lectinas vegetales	8
2.4.- Mecanismo de acción y aplicaciones	10
2.4.1.- Actividad anticancerígena	10
2.4.2.- Actividad insecticida	11

2.4.3.- Actividad antimicótica	11
2.4.4.- Actividad antibacteriana	11
2.5.- Propiedades antibacterianas de lectinas en plantas	13
3.- Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	14
3.1.- Distribución	14
3.2.- Ubicación geográfica	15
3.3.- Usos en la Medicina Tradicional	16
3.4.- Estudios farmacológicos y componentes de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	17
II.- JUSTIFICACION	18
III.- HIPOTESIS	18
IV.- OBJETIVOS GENERAL	18
V.- OBJETIVOS PARTICULARES	19
VI.- MATERIAL	19
VII.- METODOS	20
7.1.- Obtención del extracto crudo	20
7.2.- Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos	20
7.3.- Obtención de la fracción sin pigmentos	20
7.5.- Centrifugación diferencial	21
7.6.- Diálisis	21
7.7.- Liofilización	21
7.8.- Determinación de Concentración de Proteínas (Método de Bradford)	22
7.9.- Ensayos de Hemaglutinación	22
7.10.- Método de Dubois (Fenol-sulfúrico)	23
7.11.- Reacción de Benedict	23
7.12.- Reacción de Fehling	24
7.13.- Método de Folch	24
7.14.- Cromatografía de exclusión molecular	25
7.15.- Determinación del peso molecular nativo	25
7.16.- Electroforesis-SDS PAGE	26

7.17.- Cromatografía de afinidad	26
7.18.- Caracterización de parámetros bioquímicos	27
7.18.1.- Afinidad a carbohidratos	27
7.18.2.- Dependencia de cationes	27
7.18.3.- Isoelectroenfoque	28
7.19.- Evaluación de la actividad antibacteriana por el método Kirby Bauer	28
7.20.- Análisis estadístico	29
VIII.- RESULTADOS	30
8.1.- Actividad hemaglutinante del extracto crudo de la Capitaneja	30
8.2.- Extracción de Pigmentos	32
8.3.- Actividad hemaglutinante de la fracción sin pigmentos	33
8.4.- Determinación de carbohidratos	35
8.4.1.- Método de Dubois	35
8.4.2.- Reacción de Benedict	36
8.4.3.- Reacción de Fehling	36
8.5.- Extracción de lípidos	38
8.6.- Cromatografía de exclusión molecular	39
8.7.- Peso molecular aparente en condiciones nativas por cromatografía de exclusión molecular	41
8.8.- Electroforesis SDS-PAGE	43
8.9.- Cromatografía de afinidad	44
8.10.- Determinación de la glicosilación de la lectinas de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	47
8.11.- Parámetros Bioquímicos	48
8.11.1.- Afinidad a carbohidratos	48
8.11.1.1.- Afinidad a carbohidratos del extracto crudo	48
8.11.1.2.- Afinidad a carbohidratos de la fracción sin pigmentos	49
8.11.1.3.- Afinidad a carbohidratos de las lectinas purificadas	50
8.11.2.- Dependencia de cationes	52
8.11.3.- Punto isoelectrónico	54

8.12.- Actividad antibacteriana	55
8.12.1.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	55
8.12.2.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	60
8.12.3.- Actividad antibacteriana de VCL-1	65
8.12.4.- Actividad antibacteriana de VCL-2	67
8.12.5.- Actividad antibacteriana de VCL-3	68
8.12.6.- Actividad antibacteriana de pigmentos alcohólicos y acetónicos de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	69
IX.- DISCUSION	71
X.- CONCLUSIONES	81
XI.- PERSPECTIVAS	82
XII.- ANEXO 1. Identificación y clasificación científica de Capitaneja	83
XIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Interacciones celulares entre lectina-carbohidrato que se dan en diferentes tipos de células, entre los que destacan virus, amebas, algunas toxinas y bacterias	9
Figura 2.- Ilustración esquemática de un mecanismo de acción sugerido de las lectinas gracias a su interacción con los compuestos de la membrana celular bacteriana	12
Figura 3.- Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	15
Figura 4.- Distribución geográfica de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	16
Figura 5.- Remoción de pigmentos de las hojas de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	32
Figura 6.- Extracción de lípidos por método Folch	38
Figura 7.- Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular de la fracción sin pigmentos	43
Figura 8.- Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad de la fracción sin pigmentos (F2)	47
Figura 9.- Punto isoeléctrico de lectinas de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	54
Figura 10.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	56
Figura 11.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	57
Figura 12.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	58
Figura 13.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	61

Figura 14.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.	62
Figura 15.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) <i>Shigella sonnei</i>	63
Figura 16.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14578	64
Figura 17.- Actividad antibacteriana de VCL-1 de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	66
Figura 18.- Actividad antibacteriana de VCL-2 de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) a diferentes diluciones contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	67
Figura 19.- Actividad antibacteriana de VCL-3 de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) a diferentes diluciones contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	68

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Actividad hemaglutinante del extracto crudo de Capitaneja	31
Gráfica 2.- Actividad Hemaglutinante de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja	34
Gráfica 3.- Cromatograma representativo de la fracción sin pigmentos.	39
Gráfica 4.- Perfil de elución de proteínas estándar en una columna de Sephadex G-75	41
Gráfica 5.- Interpolación de los pesos moleculares aparentes de las proteínas analizadas	42
Gráfica 6.- Cromatografía de Afinidad realizada a las fracciones de alto peso molecular	44
Gráfica 7.- Cromatografía de Afinidad realizada a la fracción sin pigmentos (F2)	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Sistema ABO en humanos	3
Tabla 2.- Comparación de métodos y pasos utilizados en la purificación de lectinas	7
Tabla 3.- Actividad hemaglutinante del Extracto Crudo de Capitaneja	30
Tabla 4.- Actividad hemaglutinante de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja	33
Tabla 5.- Concentración de pentosas y hexosas en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja con el método de Dubois	35
Tabla 6.- Concentración de carbohidratos reductores en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja. Reactivo de Benedict	36
Tabla 7.- Concentración de carbohidratos reductores en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja. Reactivo de Fehling	37
Tabla 8.- Actividad específica de las fracciones obtenidas del cromatograma de la fracción sin pigmentos	40
Tabla 9.- Pesos moleculares aparentes en condiciones nativas de proteínas presentes en una fracción proteica de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) obtenidos por cromatografía de exclusión molecular	42
Tabla 10.- Unidades de hemaglutinación (fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad realizada a la fracción sin pigmentos (F2))	46
Tabla 11.- Afinidad a carbohidratos del extracto crudo	48
Tabla 12.- Afinidad a carbohidratos de la fracción sin pigmentos	49
Tabla 13.- Afinidad a carbohidratos de las lectinas purificadas	51
Tabla 14.- Dependencia de cationes del extracto crudo, fracción sin pigmentos y lectinas purificadas de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	53
Tabla 15. Cepas ATCC utilizadas en los antibiogramas y medicamentos control	55
Tabla 16.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto Crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	56

25923

Tabla 17.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) del Extracto crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	57
Tabla 18.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extracto crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	58
Tabla 19. Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra diferentes bacterias patógenas ATCC	59
Tabla 20.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60
Tabla 21.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	62
Tabla 22.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Shigella sonnei</i>	63
Tabla 23.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	64
Tabla 24.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VCL-1 de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	65
Tabla 25.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VCL-2 de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	67
Tabla 26.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VCL-3 de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	68
Tabla 27.- Halos de inhibición de pigmentos acetónicos y alcohólicos de Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>)	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Actividad Específica
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Ca²⁺	Calcio
C	Concentración Mínima Inhibitoria
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
CRD	Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos
<i>Et al</i>	Y otros
EC	Extracto Crudo
EE	Error Estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FSP	Fracción sin pigmentos
Fuc	Fucosa
g	Gramos
Gal	Galactosa
GalAcet	Galactosa acetilada
GalNAc	N-acetil-galactosamina
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
Ig	Inmunoglobulina
Da	Kilodaltons
Lac	Lactosa
M	Molar
m	Metros
Man	Manosa
MBL	Lectinas de Unión a Manosa
mg	Miligramos
min	Minutos

mL	Mililitro
Mn	Magnesio
Malt	Maltosa
NANA	Ácido N-Acetil Neuramínico
ng	Nanogramos
NR	No Reductoras
pH	Concentración de iones de hidrogeno
PM	Peso Molecular
PMA	Peso Molecular Aparente
PBS	Buffer Fosfato Salino
R	Reductoras
Rib	Ribosa
Rpm	Revoluciones por minuto
Sac	Sacarosa
UHA	Unidades de Hemaglutinación
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Voltios
Xyl	Xilosa
µg	Microgramos
\bar{X}	Media Aritmética
σ	Desviación Estándar

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aglutinación. Agregado de células o partículas debido a una formación entrelazada, como ocurre cuando el antígeno reacciona con el anticuerpo.

Caquexia. Estado de extrema desnutrición asociado principalmente con el cáncer.

Diaforético: Que induce una abundante sudoración.

Disentería. Es una enfermedad infecciosa aguda o crónica del intestino grueso humano. Asociada a dolor abdominal, fiebre, diarrea, e inflamación y ulceración de la boca.

Glicoconjugado. Compuesto en donde uno o más monosacáridos están unidos de manera covalente a una molécula diferente a un hidrato de carbono. Los ejemplos principales son las glicoproteínas y glicolípidos.

Glicoproteínas. Moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios carbohidratos, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).

Glicosilación. Proceso químico en el que se adiciona un glúcido a otra molécula. Esta molécula se denomina aceptor. La molécula aceptora puede ser de muchos tipos, por ejemplo de naturaleza proteica o lipídica.

Hemaglutinación. Aglutinación de los glóbulos rojos de la sangre (bajo los efectos de anticuerpos o en presencia de ciertas bacterias, por ejemplo).

Precipitación. Fenómeno por el cual un cuerpo sólido que estaba disuelto o contenido en un líquido, se separa de éste y se deposita en forma de cristales, polvo o copos en el fondo del recipiente que lo contiene.

Proteína. Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. El nombre proteína proviene de la palabra griega πρῶτα ("protá"), que significa "lo primero" o del dios Proteo, por la cantidad de formas que pueden tomar.

RESUMEN

La Capitaneja (*Verbesina crocata*) es utilizada en la medicina tradicional contra enfermedades gastrointestinales, problemas ginecológicos, cáncer, cefaleas, como antipirético, antitumoral, antioxidante, etc. Tiene actividad larvícida, hipoglucemiante y, contiene lectinas.

El presente estudio es el primer reporte que realiza la purificación de lectinas y la caracterización bioquímica y antibacteriana *in vitro* de la Capitaneja (*Verbesina crocata*). Los resultados corroboran la presencia y especificidad de las lectinas del extracto crudo y fracción sin pigmentos de esta planta con los cuatro grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) con una mayor afinidad con el grupo B. Posteriormente en la fracción sin pigmentos se identificaron 13 proteínas con pesos moleculares aparentes de 3 000 hasta los 122 000 Da en condiciones nativas y desnaturizantes. Luego 3 lectinas fueron purificadas por cromatografía de afinidad: VCL-1, VCL-2 y VCL-3, con pesos moleculares aparentes de 14 583, 20 290 Da y 12 075 Da. VCL-1 y VCL-2 tienen afinidad a N-acetilgalactosamina, la primera tiene un punto isoeléctrico de 8.1 y no es dependiente de iones, mientras que VCL-2 es dependiente de Ca²⁺ y Mg²⁺ y, tiene un punto isoeléctrico de 7.9. VCL-3 al contrario es afín a galactosa, tiene un punto isoelectrico de 8.5 y es dependiente de Ca²⁺ y K⁺.

En la evaluación antibacteriana: el extracto crudo presento actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La fracción proteica (FP) tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Shigella sonnei*. Las lectinas (VCL-1, VCL-2 y VCL-3) purificadas tienen actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El presente trabajo constituye el primer reporte de la purificación y caracterización completa de una lectina de Capitaneja (*Verbesina crocata*).

Palabras clave: Lectinas, Purificación, Capitaneja (*Verbesina crocata*), Caracterización bioquímica, Actividad Antibacteriana.

ABSTRACT

The Capitaneja (*Verbesina crocata*) is used in traditional medicine for gastrointestinal diseases, gynecological problems, cancer, headaches, as antipyretic, antitumor, antioxidant, etc. It has been proven larvicidal and hypoglycemic activity, and contains lectins.

The present study is the first report that made the purification, biochemical and *in vitro* antibacterial characterization of lectins from Capitaneja (*Verbesina crocata*). The results confirm the presence and lectins specificity of crude extract and fraccion without pigments with the four human blood groups (A₁, A₂, B y O) with a higher affinity with the group B. Later in the fraccion without pigments 13 proteins were identified with apparent molecular weights of 3000 to 122 000 Da in the native and denaturing conditions. Then 3 lectins were purified by affinity chromatography: VCL-1, VCL-2 y VCL-3 with apparent molecular weights of 14 583, 20 290 Da and 12 075 Da. VCL-1 and VCL-2 have affinity by N-acetylgalactosamine The first has an isoelectric point of 8.1 and is not dependent of ion, while VCL-2 is dependent on Ca²⁺, Mg²⁺ and has an isoelectric point of 7.9. Contrary, VCL-3 is specific to galactose, has an isoelectric point of 8.5 and is dependent on Ca²⁺ and K⁺.

In the antibacterial evaluation: the crude extract presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The protein fraction (FP) has activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*. The lectins (VCL-1, VCL-2 and VCL-3) purified have activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

The present work is the first report of the purification and full characterization of a lectin from Capitaneja (*Verbesina crocata*).

Keywords: Lectins, Purification, Capitaneja (*Verbesina crocata*), Biochemical characterization, Antibacterial activity.

I.- Introducción

1.- Historia de las plantas medicinales

De tiempos inmemorables se sabe que el hombre ha empleado diversas plantas medicinales con el fin de sanar sus enfermedades (Albornoz P, 2001; Martínez D, 2010). Estos antecedentes formaron parte integral de sistemas y tradiciones que día con día han inspirado una gran cantidad de descubrimientos científicos que confirman su enorme potencial (Perry LM, 1980) y, a partir de ellos se descubrieron importantes compuestos indispensables para que las plantas medicinales lleven a cabo su actividad farmacológica (Perales C, 2008), dichos compuestos actúan alterando o modificando el metabolismo de órganos y sistemas del cuerpo tanto humano como vegetal y son denominados principios activos, entre lo que se encuentran: alcaloides, flavonoides, fenoles y aceites esenciales (Bermúdez MP, 2009), éstos han sido aislados, purificados y sintetizados para la elaboración de medicamentos (Rojas H, 2004). Sin embargo, las plantas no solo están constituidas por principios activos, también elaboran y almacenan productos durante su crecimiento como ácidos nucleídos, lípidos, proteínas y carbohidratos. Todas estas sustancias de manera individual o combinada desarrollan importantes funciones en los seres vivos (Kögel I, 2002).

Los carbohidratos, por ejemplo, son sustancias que ocurren naturalmente en todas las células vivientes, prominentemente en plantas y son una de las fuentes principales de energía (Licata M, 2012). Algunos carbohidratos como el almidón en los vegetales y el glucógeno en los animales pueden ser utilizados rápidamente para formar glucosa; combustible primario para la síntesis de ATP (nucleótido fundamental que provee energía indispensable para las células lleven a cabo sus funciones) y, para la generación de precursores necesarios en la biosíntesis de ácidos grasos y aminoácidos, por enzimas metabólicas en hígado y músculo principalmente (Laguna J, Piña E, 2009). Además forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos (DNA Y RNA) y sirven como punto de conexión entre diversas células (ya que se encuentran generalmente en la membrana celular unidos a lípidos y proteínas) cumpliendo así, un papel clave en múltiples procesos

biológicos, debido en parte, a la gran diversidad estructural que poseen, pues tienen la posibilidad de formar múltiples combinaciones; a partir de 8 monosacáridos se pueden formar 1.34×10^{18} estructuras ramificadas a diferencia de las proteínas, las cuales a partir de 20 aminoácidos crean solamente 1.28×10^{13} combinaciones estructurales o, de los ácidos nucleicos, que a partir de 4 monómeros forman 1.04×10^6 cadenas lineales de nucleótidos (Gallego del Sol F *et al.*, 2006). Por esta complejidad estructural han sido nombrados como moléculas de reconocimiento celular por excelencia (Sharon N y Lis H, 1993).

En este reconocimiento tienen lugar, interacciones moleculares basadas en uniones específicas entre carbohidratos y unas moléculas llamadas lectinas.

2.- Lectinas

El término lectina proviene del latín “legere” que significa escoger. Este término fue designado por Boyd en 1954 debido a que estas proteínas tienen la capacidad de unirse de manera específica a carbohidratos de forma reversible, precipitando glicoconjugados y aglutinando células que los posean en la superficie. No son enzimas y en contraste con los anticuerpos no son producto de una respuesta inmune (Peumans WJ y Van Damme EJM., 1995).

Las lectinas tienen la capacidad de descifrar la información contenida en los carbohidratos ya que contienen uno o más sitios de combinación por moléculas, característica estructural que las hace ser divalentes o polivalentes y ampliamente estudiadas, se pueden dividir en dos subsitios, uno de ellos es el sitio en donde se da la interacción con el monosacárido mientras el otro permite una interacción con oligosacáridos más complejos y se conoce como sitio extendido (Fenton B, 2009). Estas proteínas presentan un fenómeno llamado: aglutinación celular, que se manifiesta cuando una lectina se une a carbohidratos en la superficie celular, por ejemplo con los eritrocitos, originando la unión cruzada de las células y su posterior precipitación (hemaglutinación) (Rodríguez MV *et al.*, 2004), de ahí que la hemaglutinación sea concebida como el mayor atributo usado para la detección y caracterización rutinaria de las lectinas; con la misma que fue posible la

identificación de la naturaleza química de los determinantes sanguíneos mostrados en la tabla 1.

Tabla 1.- Sistema ABO en humanos

Grupo sanguíneo	Carbohidrato terminal
A	N-Acetil-Galactosamina-D-Galactosa-L-Fucosa
B	D-Galactosa- D-Galactosa -L-Fucosa
AB	N-Acetil-Galactosamina-D-Galactosa-L-Fucosa
O	L-Fucosa-Galactosa

(Roitt I *et al.*, 2008)

2.1.- Distribución

Las lectinas se encuentran de forma ubicua en la naturaleza, siendo todas proteínas de suma importancia ya que se ocupan de diversas funciones celulares:

- Las lectinas microbianas se localizan en la superficie de bacterias, virus, hongos y parásitos; denominadas también adhesinas, debido a que participan en el mecanismo de acción, como patógenos, al actuar y colonizar mucosas produciendo lesiones tisulares durante el proceso de infección (Varki A *et al.*, 2009).
- Las lectinas animales son clave en procesos celulares como el reconocimiento específico de espermatozoides y óvulo en la fecundación, en la adhesión entre célula-matriz extracelular durante la embriogénesis y desarrollo, así como en la diferenciación y proliferación celular, entre otras, estas lectinas se han encontrado en invertebrados, tales como cangrejos, camarones, caracoles, lombrices y moluscos, fundamentalmente en la hemolinfa y órganos sexuales (Sharon y Lis, 2004; Sylvester F y Ravichandran S, 2012).

- Las lectinas vegetales, las cuales son el objeto de este estudio y cuyas funciones se citarán más adelante, se han detectado en flores, frutos, semillas, hojas, tallo y raíces de las plantas y su concentración varía de acuerdo a las requerimientos de defensa y nutricionales de las mismas (Nascimento KS *et al.*, 2012).

De los tres tipos de lectinas mencionadas, las lectinas vegetales han despertado el mayor interés de investigadores, quienes han aislado y caracterizado este tipo de lectinas: por su importancia económica, nutricional y por su facilidad de estudio (Hernandez *et al.*, 2005).

2.1.1.- Lectinas vegetales

Las lectinas vegetales son proteínas o glicoproteínas multiméricas que poseen subunidades idénticas o diferentes (Elola MT y Fink NE, 1995). Suelen clasificarse en base a su estructura molecular, en la que se distinguen 6 familias de lectinas:

2.1.2.- Lectinas aisladas de leguminosas. Las lectinas aisladas de semillas de leguminosas comprenden una gran familia de proteínas con al menos 100 miembros de esta clase. Estas consisten en dos o cuatro subunidades de 25 a 30 kDa, cada una de ellas contiene un sitio de combinación por iones como Ca^{2+} y Mn^{2+} , los cuales son esenciales para la unión a carbohidratos. Tienen también una secuencia similar de aminoácidos con un número de residuos conservados entre los que participan en la unión del ligando y el ion metálico (Loris R y *et al.*, 1998)

2.1.3.- Lectinas con dominio tipo heveína. Es una familia de proteínas homologas a la heveína (lectina aislada del árbol del caucho *Hevea brasiliensis*) como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napis* (nabo) y *Sambucus nigra* (sauco), se encuentran principalmente en lutoides derivados de vacuolas en la célula vegetal. Estas lectinas tienen dos subunidades idénticas, ricas en cisteína contrariamente a las lectinas de leguminosas, cada subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína y cuatro puentes disulfuro, cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, con la ausencia de iones metálicos, se ha visto la

presencia de una hélice α pequeña siendo la única estructura secundaria presente en este tipo de lectina (Días A, Salcedo FG, 2000; Hernandez P *et al.*, 2005)

2.1.4.- Lectinas aisladas de monocotiledóneas específicas de manosa. A este grupo de lectinas pertenecen las de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparalelas interconectados por giros o bucles Ω . En los cuales se producen los cambios de residuos, incluyendo deleciones o inserciones (Barre A *et al.*, 1996).

2.1.5.- Lectinas en forma de β . Presentan estructuras tridimensionales muy similares de la *Artocarpus integrifolia* (Jacalina), son lectinas tetraméricas glicosiladas, cada subunidad contiene una cadena pesada (α) y está constituida por tres hojas antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Hernandez P *et al.*, 2005).

2.1.6.- Lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas. Forman parte de los venenos más tóxicos, como la *Ricinus communis* (Ricina) o *Abrus precatorius* (Abrina). Sus estructuras son complejas. Las constituyen dos cadenas (A y B) diferentes y unidas por dos puentes disulfuro. La primer cadena es responsable de la toxicidad y mientras que la segunda posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios que presentan cuatro subunidades, las cuales contienen α hélices y hojas β (Gallego del Sol F *et al.*, 2006)

2.1.7.- Lectinas de tipo amaranto. Se encuentran formadas por dos monómeros en los que existen dominos N y C, unidos a una pequeña hélice (Hernandez P y *et al* 2005).

2.2.- Purificación de lectinas vegetales

La purificación de las lectinas es esencial para establecer sus propiedades moleculares y sus funciones biológicas ya que son herramientas importantes para su aplicación (Karnchanatat A, 2012).

Según Parisi E (2007), el proceso de purificación es un proceso que cuenta con varias etapas, cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína en estudio donde se evaluará la pureza del producto, el rendimiento y el costo para llevar a cabo su obtención.

2.2.1.- Pasos a seguir en una purificación

1. Definir un ensayo específico que identifique a la lectina. Deberá ser un método, sensible, rápido y económico que aproveche alguna actividad biológica, como es por ejemplo el ensayo de hemaglutinación.
2. Elección de la fuente. Para ello se debe tener en cuenta la accesibilidad, el costo y la concentración de proteínas que tenga la muestra.
3. Extraer la proteína de la fuente. El aislamiento de la proteína se realiza mediante la homogenización del tejido en un mortero para lograr la lisis celular seguido de una filtración y una centrifugación para retirar las partículas insolubles grandes.

*Si la proteína diana está estrechamente asociada con una membrana lipídica puede usarse un detergente o un solvente orgánico para solubilizar los lípidos y recuperar la proteína (Voet JD, 2009).

4. Estabilización de proteínas. Para que la proteína extraída de su entorno natural no sufra daños irreversibles por varios agentes desnaturizantes deben cuidarse factores como: pH, temperatura y la presencia de proteasas para evitar su degradación.

5. Aislamiento y concentración. En esta etapa se siguen una serie de pasos en los cuales se aprovechan propiedades fisicoquímicas o biológicas de la proteína de interés para separarla del resto de los componentes celulares (solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas).

En cada paso se debe monitorear el rendimiento en la purificación, pureza y actividad específica de cada fracción obtenida, para ello es recomendable utilizar técnicas de alta capacidad, entre las que destacan precipitación salina, métodos electroforéticos como la SDS-PAGE y el uso de cromatografías por exclusión molecular, intercambio iónico y afinidad (Karnchanatat A, 2012).

La elección de un buen método y su adecuada aplicación permite obtener altos niveles de rendimiento, por ello es importante que se reduzca el número de pasos en una purificación (Nascimento KS *et al.*, 2012)

A continuación se muestra un análisis de rendimientos obtenidos por diferentes estrategias de aislamiento (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de métodos y pasos utilizados en la purificación de lectinas

Lectina / Especificidad	Estrategia de purificación	Pasos	Peso Molec kDa	pH	Temp	pI	Rendimiento	Referencias
<i>Castanea crenata</i> / Glc/Man	Extracto crudo Cromatografía de afinidad, Intercambio Iónico y Exclusión Molecular	3	62	3-10	25°C, 50°C y 80°C	—	2.5%	Nomura L <i>et al.</i> , 1998
<i>Erythrina indica</i> / Lactosa	Extracto crudo Cromatografía de afinidad	1	58	6-8	25°C y 50°C	—	16%	Konosy P <i>et al.</i> , 2002
<i>Luetzelburgia auriculata</i> / <i>N-acetilgalactosamina</i>	Extracto crudo Precipitación salina (NH ₄ SO ₄) Cromatografía de afinidad	2	123.5	7-10	60- 80°C	5.8	8%	Oliveira J <i>et al.</i> , 2002
<i>Erythrina costaricensis</i> / <i>N-acetilgalactosamina</i>	Extracto crudo Precipitación salina (NH ₄ SO ₄) Cromatografía de Exclusión Molecular	2	58	2-10	Hasta 70°C	5.86-6	12%	Echandi AM y Aragón K. 1991

Se concluye entonces que para la purificación de las lectinas, un proceso debe ser diseñado para reducir al mínimo el número de pasos en la purificación mientras se mantienen altos rendimientos, pureza del producto, la calidad, y la actividad. También existen alternativas no cromatográficas tales como la separación magnética, la tecnología de membranas, la precipitación de afinidad y sistemas acuosos de dos fases (Nascimento KS *et al.*, 2012).

2.3.- Funciones de las lectinas vegetales

Las lectinas vegetales participan en interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de las plantas, ejercen funciones de defensa contra insectos y además tienen efectos protectores en contra de la acción patogénica de diversos microorganismos. En la figura 1 se muestran las diversas señales de reconocimiento que se dan gracias a la interacción lectina-carbohidrato.

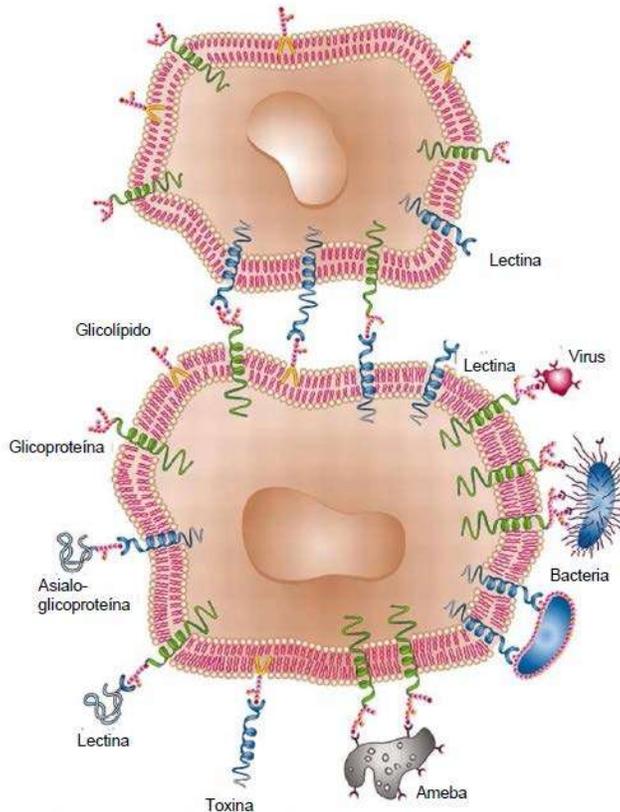


Figura 1.- Interacciones celulares entre lectina-carbohidrato que se dan en diferentes tipos de células, entre los que destacan virus, amebas, algunas toxinas y bacterias. Modificado de Sharon N y Lis H, 2004.

En las especies animales las lectinas vegetales ayudan a la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, de células envejecidas, células tumorales así como de microorganismos mediante un proceso de opsonización (Hernandez P *et al.*, 2005). Se ha encontrado también que las lectinas vegetales poseen propiedades mitogénicas, ya que algunas de ellas se comportan como estimuladores mitogénicas policlonales de linfocitos, mostrando varios grados de especificidad según las especies animales de las que provienen las células, el tipo linfoide de las mismas y las modificaciones a que se someten los receptores glicoconjugados de la membrana plasmática en presencia de enzimas proteolíticas, glicolíticas u oxidantes (Elola MT, 1995). Además participan en procesos que permiten el reconocimiento y la diferenciación celular, como factores

determinantes en la metástasis, la organogénesis y en la migración de linfocitos siendo así importantes efectores del sistema inmune (Gallego del Sol F *et al.*, 2006).

2.4.- Mecanismo de acción y aplicaciones

El mecanismo de acción por el cual actúan las lectinas es aún desconocido, sin embargo, durante las dos últimas décadas se han realizado muchos esfuerzos para tratar de entender cómo es que se llevan a cabo las propiedades de defensa de las lectinas vegetales. Los análisis han demostrado que muchas lectinas reconocen estructuras de azúcar que no están presentes en las plantas, pero se pueden encontrar en otros organismos (Vandenborre G *et al.*, 2009).

2.4.1.- Actividad anticancerígena. Las células cancerígenas comúnmente cambian sus patrones de glicosilación en la superficie celular, razón por la cual pueden ser reconocidas de forma diferencial por lectinas vegetales (Kuwahara I *et al.*, 2003).

Actualmente, diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las lectinas tienen efecto antitumoral (efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor) y actividad anticarcinogénica (efecto inhibitorio en la inducción del cáncer por carcinógenos) y, que el mecanismo de acción depende de factores como; el origen celular, la clase de tumor y la concentración de lectina. Este mecanismo implica la unión de la lectina a linfocitos, la liberación de citocinas en la sangre, la activación y liberación de linfocitos del bazo en la circulación, activación de células NK y macrófagos, la producción de factores antiangiogénicos, la combinación de hiperplasia intestinal y efectos citotóxicos sobre las células tumorales. Por todo lo anterior las lectinas han sido herramientas útiles para el diagnóstico y tratamiento del cáncer y, con propósitos analíticos en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina (Castillo A y Abdullaev F, 2005; Ambrosi M *et al.*, 2005).

2.4.2.- Actividad insecticida.- Actualmente se han reportado efectos insecticidas en diversas familias de lectinas vegetales (Vandenborre G *et al.*, 2009). Estos efectos se deben en gran parte a que las lectinas son capaces de resistir a la acción de proteasas en el intestino del insecto y, al encontrarse activas en el aparato digestivo, se unen a la N-acetilglucosamina (GluNAc); polímero que constituye la quitina en la membrana peritrófica, lo cual produce una absorción anormal de sustancias tóxicas y con ello la muerte del artrópodo (Miyake K *et al.*, 2007). La descripción de diversas lectinas con especificidades de unión a azúcares para GluNAc con actividad insecticida ha promovido su empleo en la agricultura para el control de plagas en los cultivos, situación que genera graves problemas económicos, de comercio y de seguridad alimentaria (FAO, 2001)

2.4.3.- Actividad antimicótica. Diversas investigaciones han reportado actividades antimicóticas en lectinas aisladas de plantas, especialmente de tipo leguminosas. El mecanismo de acción fungicida aún no es claro, sin embargo parece ser que las lectinas inhiben la germinación de esporas así como el crecimiento del micelio; se cree que estas alteraciones en la pared celular son debidas a cambios en la síntesis de quitina, pues las lectinas que se unen a este polímero tienen mayores efectos antimicóticos. Estos hallazgos ofrecen un prometedor campo de investigación para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra infecciones causadas por diversas especies de hongos (Gomes BS *et al.*, 2012).

2.4.4.- Actividad antibacteriana. Otros microorganismos contra los que tienen acción las lectinas vegetales, son las bacterias. Las bacterias miden entre 0,5 y 5 μm , son procariotas (no tienen núcleo) y se encuentran en forma de esferas (cocos), barras (bacilos) o hélices (espirilos). Algunas disponen de flagelos o cilios y, por la composición de la pared celular pueden ser: Gram-positivas y Gram-negativas. La pared celular de las bacterias gram positivas está constituida por ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos anclados a una capa gruesa de peptidoglicano; polímero que está formado a su vez por residuos de N-acetil múramico y N-acetilglucosamina. En las gram negativas, la capa de peptidoglicano

de la pared celular es más delgada, pero contiene además porinas y lipopolisacáridos; conformados por una cola ácidos grasos (lípidos A), un núcleo y un antígeno O, este último tiene como carbohidratos terminales a la ramnosa, abecuesa y galactosa (Pérez MC y Mota M. 2008). El modo de acción de las lectinas sobre las bacterias es aún desconocido, sin embargo se cree que está basado, precisamente en interacciones con los hidratos de carbono presentes tanto en la pared de las gram positivas como de las gram negativas y los glicanos extracelulares (Paiva PMG *et al.*, 2010) dando lugar a la formación de poros por implicaciones mecánicas (Schmidt O *et al.*, 2005).

En la figura 2 se muestra como las lectinas reconocen a los carbohidratos terminales de los componentes de la pared celular bacteriana, se unen a ellos, los rodean y se originan canales que conllevan a la muerte celular.

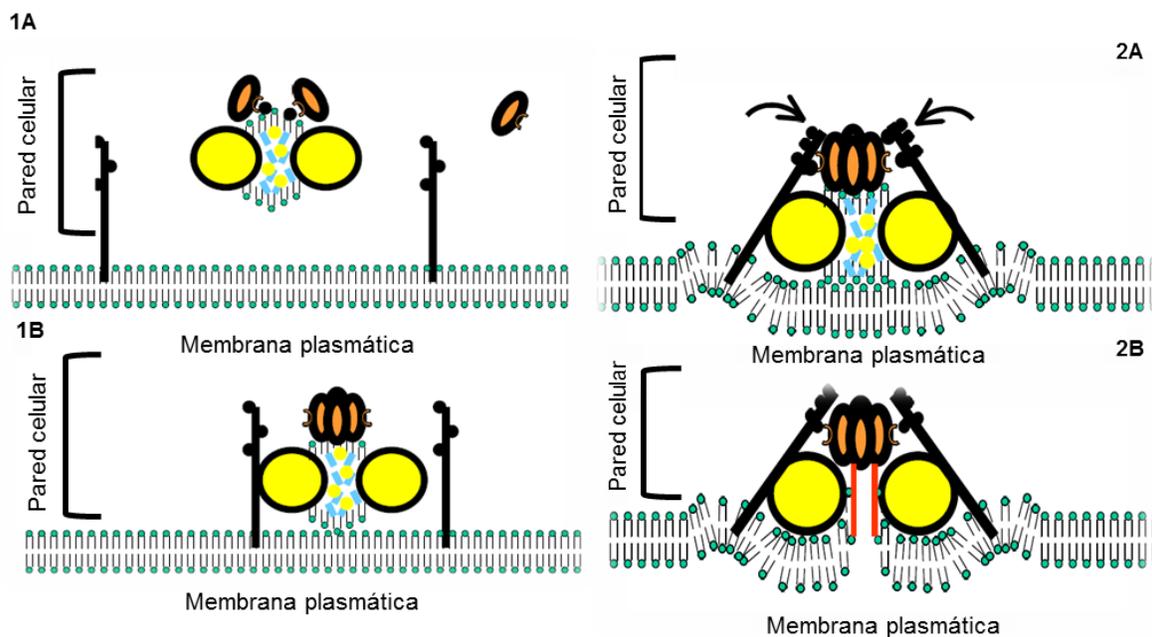


Figura No 2.- Esquema de un mecanismo de acción sugerido para las lectinas gracias a su interacción con los componentes de la membrana celular bacteriana. 1A.- Las lectinas (naranja) se unen a los carbohidratos terminales de lipoporinas (proteínas en forma de anillo lleno de lípidos, incluidos fosfolípidos (verde), colesterol (azul) y diacilgliceroles (amarillo)). 1B.- Los sitios de reconocimiento se exponen en forma de bisagra para unirse con los glicodeterminantes (indicados con puntos negros) y se forma una palanca (2A). 2B.- Las

alfa hélice de las lectinas (rojo) se acomodan de tal manera que abren un canal permitiendo así la entrada de agua y de iones ocasionando una lisis celular. Modificado de Schmidt O *et al.*, 2005.

Un proceso similar ocurre durante la respuesta inmune, donde el sistema del complemento es activado por la vía de las lectinas, que a diferencia de la vía clásica y la alternativa, actúa como primer mecanismo de defensa. Esta cascada se inicia por el reconocimiento entre una lectina de unión a manosa (MBL) y azúcares de superficie de microorganismos lo que origina la activación de proteasas (MASP-1 y MASP-2), la estimulación de la convertasa C5 que escinde C5 en las subunidades C5a y C5b, posteriormente C5b se une a C6, C7, C8 y C9 y se forman poros que originaran una lisis celular (Turner MV, 2003).

A pesar de estos antecedentes y a la complejidad estructural englobada en el reconocimiento lectina-carbohidrato, aún queda información por esclarecer, pues basta con un pequeño cambio conformacional para que estos procesos se reviertan (Gallego del Sol F, 2006).

2.5.- Propiedades antibacterianas de lectinas en plantas

Las plantas medicinales han sido la fuente para la elaboración de medicamentos con la finalidad de controlar la prevalencia de diversas enfermedades (Rangel D *et al.*, 2001). La cantidad de plantas es tal que nadie puede dominar la totalidad del conocimiento en esta materia. En México existe, aproximadamente, una reserva de 30,000 especies, de las cuales 3,000 de ellas son usadas en la medicina tradicional (Bye R *et al.*, 1995). Particularmente en Michoacán, el mayor número de especies de plantas medicinales son utilizadas para tratar enfermedades gastrointestinales en un 51.46% (Hurtado NE *et al.*, 2006), enfermedades con mayor incidencia en el estado (Hernández C *et al.*, 2011).

Diversos estudios se han realizado para comprobar el efecto antibacteriano de las lectinas en algunas de estas plantas por ejemplo; la ortiga (*Urtica dioica*), el Neem

(*Azadirachta indica*), la Ruda (*Ruta graveolens*) (Tello R y Fenton B, 2009; Hernández J y Fenton B. 2011), entre otras.

De ahí el aumento significativo de estudios encaminados a la purificación y caracterización de lectinas de origen vegetal con acción antimicrobiana ya que se han convertido en una alternativa médica económica o complemento en el tratamiento farmacológico de enfermedades de origen microbiano, entre otras (Karnchanatat A, 2012).

Actualmente existe una gran variedad de plantas medicinales que ofrecen estas opciones, pero la mayoría de ellas aún se encuentran sin bases experimentales que avalen sus efectos medicinales (Argueta A *et al*, 2009), como la Capitaneja (*Verbesina crocata*). Como éste trabajo se centra en ésta planta a continuación se describen algunos aspectos.

3.- Capitaneja (*Verbesina crocata*)

3.1.- Distribución

La Capitaneja (*Verbesina crocata*) es un arbusto extendido o trepador de 1.5 a 4 m de altura. Las hojas tienen forma de lanza y algunos picos son de color oscuro o verde claro. Las flores están en cabezuelas y son de color amarillo o naranja (Figura 3) (Vibrans H, 2011).

Es también conocida en la medicina popular como Árnica (Martínez, 1979), Capitaneja anaranjada, palo espino, en Guerrero: cachanquillo, Morelos: chimalacatl y en Yucatán: ki'che, taamkas che' (Argueta A *et al.*, 2009).



Figura 3.- Capitaneja (*Verbesina crocata*). Modificado de Tenorio P, 2012.

3.2.- Ubicación geográfica

La Capitaneja (*Verbesina crocata*) es originaria de México. Se encuentra en laderas, matorrales, riveras soleadas y en sitios perturbados como las orillas de caminos y parcelas (McVaugh, 1984; Vibrans H, 2011). Habita en climas cálidos, semicálidos y templados desde los 600 hasta los 1000 msnm. Asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino (Argueta A *et al.*, 2009). En la figura 4 se puede observar su distribución en los diferentes estados de la república.

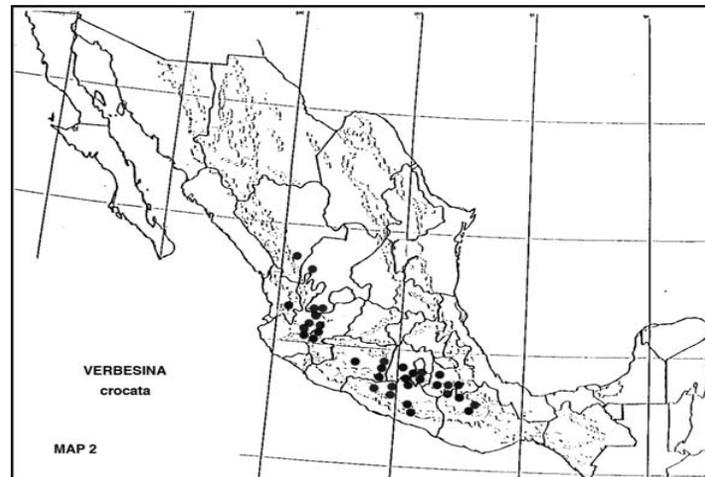


Figura 4.- Distribución geográfica de la Capitaneja (*Verbescina crocata*) (Hersch P, 2009).

3.3.- Usos en la Medicina Tradicional

La Capitaneja (*Verbescina crocata*) es utilizada con fines curativos como antiinflamatorio, antipirético, antitumoral, astringente, diaforético, contra el cólera, problemas ginecológicos, enfermedades gastrointestinales, cutáneas e infecciones de vías urinarias. Para la caquexia (casos de extrema desnutrición), hipertensión arterial, hipoglucemia, cefaleas, heridas, quemaduras leves, inflamaciones de los ojos, etc. (Hersch P, 2009).

Su administración depende de los conocimientos empíricos que se tenga acerca de esta planta y pueden ser de forma oral o tópica: para trastornos digestivos, se ingiere de forma oral; un té de hojas de Capitaneja (*Verbescina crocata*) con brotes de limón (*Citrus aurantifolia*) y de guayabo (*Psidium guajava*), después se añaden hojas soasadas (cocidas) y molidas de la Capitaneja y, se agrega una cucharada de vino. Para limpiar la matriz se administra el cocimiento de la raíz por vía oral y en ayunas, para expulsar la placenta se practican baños con la infusión y en el caso de tumores; las hojas son aplicadas directamente sobre ellos (en caso de que estos sean superficiales) (Argueta A *et al.*, 2009) y para infecciones de vías urinarias las hojas de Capitaneja se licuan con piña y se prepara agua fresca (Reyes A y Fenton B. 2011).

3.4.- Estudios farmacológicos y componentes de la Capitaneja (*Verbesina crocata*)

Investigaciones han demostrado que el extracto acuoso de flores y hojas de Capitaneja (*Verbesina crocata*) ejerce actividad hipoglicémica en ratas, cuando se administra a éstas (por vía oral e intraperitoneal) después de haberles inducido diabetes mellitus con aloxano (Argueta A *et al.*, 2009).

Un estudio hecho por Figueroa Brito en el 2002 registró una actividad larvicida en las hojas trituradas a polvo de *Verbesina crocata* e incorporadas a la dieta artificial de *Spodoptera frugiperda*; un gusano cogollero que ataca distintos cultivos de importancia económica, entre los que se encuentra el maíz.

Por otra parte en el 2011, Reyes AL y Fenton B identificaron la presencia de lectinas tanto en extracto crudo y fracción proteica de Capitaneja. Estas proteínas son afines a los grupos sanguíneos del sistema ABO en humanos, en especial al grupo sanguíneo B. Cuatro de estas lectinas fueron obtenidas por precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 20-40% y mostraron especificidades a galactosa (carbohidrato terminal del grupo tipo B). Estables en un intervalo de 15 a 30°C y pH de 5.8 a 6.

Estos datos son muy relevantes, sin embargo, en este estudio se consideró necesaria la purificación y caracterización de dichas lectinas así como su actividad antibacteriana.

II.- JUSTIFICACIÓN

Debido a la necesidad que existe de tener a la mano alternativas médicas que ofrezcan soluciones a problemas relacionados con la salud y que sean menos agresivas que los medicamentos convencionales y, a la importancia que refiere a las lectinas vegetales como proteínas implicadas en múltiples procesos biológicos, fisiológicos y patológicos con gran especificidad, en este presente trabajo se dispuso a realizar una caracterización completa de parámetros bioquímicos y a determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de lectinas de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) ya que existe un reporte previo que identifica la presencia de lectinas en ésta planta pero no de actividad antibacteriana.

Este proyecto de investigación además de servir como base para la realización de nuevos estudios que fundamenten el uso que se le da a la Capitaneja en la medicina tradicional y su aplicación terapéutica; contribuirá al conocimiento de la proteómica generando información de nuevas lectinas que podrán ser utilizadas en la medicina e investigación como marcadores de líneas celulares, en histología, entre otras.

III.- HIPÓTESIS

Las hojas de Capitaneja (*Verbesina crocata*) contienen lectinas con actividad antibacteriana.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización bioquímica y el análisis antibacteriano de lectinas de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

V.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar parámetros bioquímicos lectinas de Capitaneja (*Verbesina crocata*)
- Analizar la actividad antibacteriana *in vitro* de lectinas de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

VI.- MATERIAL

1. Hojas de Capitaneja (*Verbesina crocata*).
2. Reactivos de grado analítico.
3. Panel de Fenotipo Conocido con los cuatro grupos sanguíneos.
4. Bacterias ATCC

VII.- MÉTODOS

7.1.- Obtención del extracto crudo

Las hojas de Capitaneja se trituraron y homogenizaron con amortiguador PBS (Buffer Fosfato Salino) en un mortero con el fin de romper su membrana celular y con ello, liberar las proteínas de interés. Posteriormente se filtró el homogenizado pasándolo por filtros de diferente diámetro de poro y se centrifugó a 3500 rpm por 15 min, obteniéndose un sobrenadante, al que se llamó extracto crudo.

7.2.- Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos

Para eliminar los pigmentos y otras sustancias a las que se atribuyen diversas funciones biológicas (Toledo T *et al.*, 2004), se realizaron lavados con acetona a 270 g de hojas de Capitaneja (*Verbesina crocata*), con ello, se removieron compuestos poco hidroxilados como: carotenoides, clorofilas (a y b) y catequinas (Monge E *et al.*, 1984). Posteriormente se hicieron lavados con alcohol para excluir sustancias altamente hidroxiladas o glicosiladas como tilirósido, astragalina y quercetina 3-O-glucosa (Avilés A *et al.*, 2008).

Los pigmentos contenidos en los solventes orgánicos se separaran por destilación simple y evaporación para su posterior análisis antibacteriano y discernir; si la presunta actividad antibacteriana es causada por las lectinas de esta planta o por sus pigmentos.

7.3.- Obtención de la fracción sin pigmentos

Después de ser removidos los pigmentos, las hojas se secaron, se homogenizaron, se hidrataron con PBS, se filtraron y centrifugaron; al sobrenadante se la llamó fracción sin pigmentos (punto de partida donde se procedió a realizar los diferentes métodos de separación).

7.5.- Centrifugación diferencial

Para que la precipitación con sulfato de amonio tuviera éxito, fue necesario recurrir a la centrifugación diferencial, ya que el sulfato de amonio es una sustancia que actúa como floculante, es decir, aglutina a las proteínas en suspensión y éstas quedan flotando en la superficie. El protocolo conlleva a una centrifugación de 3500 rpm durante 20 min a 4°C para que las proteínas que estén floculando en el medio precipiten, ya que éste es un método apropiado para separar, de una solución, partículas que difieren en cuanto a su coeficiente de sedimentación, el cual aumenta con la masa de la partícula (Mathews CK, 2002).

7.6.- Diálisis

Esta técnica se utilizó para eliminar el contenido de sulfato de amonio contenido en la disolución proteínica, en este procedimiento se utilizaron membranas de celulosa Spectra-Por MWCO: 3500 (Spectrum Laboratories, Inc.), las cuales contienen poros que permiten el paso de solutos de bajo peso molecular y el agua atraviesen la membrana (Stryer L, 2003). Al precipitado resultante (fracción 20-40%) se le realizó lavados exhaustivos para asegurar que las muestras no presentaran residuos salinos.

7.7.- Liofilización

Para conservar y concentrar las diferentes muestras se procedió a eliminar el agua presente en ellas mediante una liofilización: proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y después se concentra el solvente, reduciéndolo mediante sublimación y desorción (eliminación de materia desde un medio adsorbente, usualmente para recuperar material) a una temperatura de -56° C (niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas). Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria (Ramírez JS, 2006).

7.8.- Determinación de Concentración de Proteínas (Método de Bradford)

Según este método, se utilizó el colorante Coomassie, que en su estado libre es rojo y al reaccionar con las proteínas vira a color azul, cuya tonalidad varía respecto a la concentración de proteína presente en la muestra. Este colorante se une selectivamente a los aminoácidos arginina y lisina de las cadenas polipeptídicas, y posteriormente, se lee en un espectrofotómetro de absorción a 595 nm (Bradford MM, 1976). En el ensayo, se realizó una curva patrón utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina), donde la concentración de las muestras problema se obtuvo al interpolar la absorbancia en la curva.

7.9.- Ensayos de Hemaglutinación

Los ensayos de hemaglutinación se realizaron utilizando un panel de fenotipo conocido, formado por los grupos sanguíneos humanos; A₁, A₂, B y O, y un proceso de dilución serial, donde se obtuvieron las unidades de hemaglutinación, la actividad específica y la concentración mínima para producir hemaglutinación (Debray H *et al.*, 1981; Zenteno E y Ochoa J., 1988). Los resultados se expresaron 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 PM y Fresno M, 2000). Las unidades de hemaglutinación se obtuvieron 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 y con uno positivo (con una fuerte hemaglutinación) utilizando extracto crudo de Jamaica (Martínez R y Fenton B., 2008).

Para analizar el contenido de carbohidratos en extracto crudo y la fracción sin pigmentos se procedió a la aplicación de los siguientes métodos:

7.10.- Método de Dubois (Fenol-sulfúrico)

Método fácil, eficaz y rápido que permite identificar de manera general a oligosacáridos, polisacáridos y monosacáridos (Dubois M *et al.*, 1956). Su fundamento tiene como base la sensibilidad de carbohidratos ante ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas ocurren dando lugar a una deshidratación simple que se continua con un calentamiento y la catálisis ácida, teniendo como productos, derivados del furano, que se condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del glúcido que se desea identificar, por lo que; se utilizaron dos curvas patrón: una glucosa como stock que se leyó a una longitud de onda de 490 nm y otra con fucosa analizada a 480 nm, con el fin de conocer la concentración de carbohidratos de tipo pentosas (ribosa y fucosa) y hexosas (glucosa y fructosa). Las muestras problema serán: extracto crudo, fracción sin pigmentos y la(s) lectina purificada.

7.11.- Reacción de Benedict

Esta es un prueba que identifica la presencia de azúcares reductores y se basa en la oxidación de un carbohidrato con el ion Cu^{2+} generando un grupo carboxilo. El reactivo de Benedict contiene soluciones de carbonato de sodio, sulfato de cobre y citrato de sodio. El Na_2CO_3 confiere a la solución un pH alcalino necesario para que la reacción se lleve a cabo. El citrato de sodio mantiene al ion Cu^{2+} en solución, pues tiene la propiedad de formar complejos coloreados poco ionizados con algunos de los metales pesados. Con el cobre, por ejemplo, produce un complejo de color azul. Al calentarse los electrones de azúcar expuestos, reaccionarán con el Cu^{2+} obteniéndose un azúcar oxidado y dos iones Cu^+ que reaccionaran con los iones OH^- para formar hidróxido de cobre y, con la pérdida de una molécula de agua dará Cu_2O ; un precipitado amarillo, anaranjado o rojo ladrillo que pondrá en evidencia la presencia de un azúcar reductor (Angulo Y, 1999). En esta prueba se realizó una curva patrón y se midió en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 430 nm. Las muestras problema serán: extracto crudo, fracción sin pigmentos y la(s) lectina purificada.

7.12.- Reacción de Fehling

Ensayo que pone de manifiesto el carácter reductor de los monosacáridos mediante una reacción redox en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a un grupo ácido por el Cu^{2+} (de color azul) que se reduce a ion cuproso (Cu^+) en un medio alcalino y posteriormente se precipita en forma de Cu_2O , dando un color rojo-anaranjado. En esta reacción, la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. El reactivo de Fehling consta de: Fehling A; CuSO_4 disuelto en H_2O . Fehling B; NaOH con tartrato de sodio y potasio, disueltos en H_2O (González JM, 2012). Se realizó una curva patrón y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 430 nm. Las muestras problema serán: extracto crudo, fracción sin pigmentos y la(s) lectina purificada.

7.13.- Método de Folch

Los lípidos son compuestos orgánicos que se caracterizan por la presencia de ácidos grasos o sus derivados, y por su solubilidad en solventes como acetona, éter y cloroformo. Por tanto, los lípidos de una muestra biológica se pueden extraer tratándola con mezclas de disolventes orgánicos en proporciones variables (Torres A, 2012). Para extraer el contenido de lípidos del extracto crudo y de la fracción sin pigmentos se empleó el método Folch; una técnica en frío que utiliza una proporción de cloroformo y metanol en proporción 2:1. El cloroformo permite la disolución de los lípidos y el metanol rompe los enlaces que se dan entre los lípidos y las proteínas de las membranas. Durante el proceso se formaron tres fases, a las que llamamos Folch 1 (F1), Folch 2 (F2) y Folch 3 (F3). Los lípidos extraídos se quedaron en la fase inferior (F1) hidrofóbica (cloroformo), en la fase intermedia (F2) se concentraron las proteínas presentes en la muestra y, en la última, una fase metanólica (F3) y agua (Folch J *et al.*, 1956).

7.14.- Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular es un método que permite la separación de una mezcla de moléculas presentes en una muestra en base a su tamaño. Consta de: una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria. La fase estacionaria está conformada por geles (matriz) con un gran número de esferas porosas constituidas por largas cadenas de polímeros unidos entre sí para formar una red tridimensional. Cuando se hace pasar la muestra a través de la columna cargada con la matriz, ésta y el eluyente se mueven a través de ella, entonces; las proteínas pequeñas, capaces de penetrar en el interior de las esferas se verán retrasadas en su descenso, siendo las últimas en salir de la columna. En cambio aquellas proteínas que no logren entrar a las esferas serán eluidas y serán las primeras en salir. Las moléculas de tamaño intermedio, presentarán una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas dependiendo de su dimensión (Stryer L *et al.*, 2003). Para esta técnica se utilizó Sephadex G 75, el cual es útil para separar proteínas en un rango de peso molecular de 3 000 a 80 000 Da (fase estacionaria), que fue hidratado y montado en una columna cilíndrica de 9.5 X 1 cm, utilizándose como amortiguador PBS 0.1M.

7.15.- Determinación del peso molecular nativo

Partiendo del fundamento que sigue la cromatografía de exclusión molecular antes descrito, se puede determinar el peso molecular aparente de proteínas presentes en una muestra problema, comparando el tiempo que les toma atravesar la columna con el perfil de elución de una serie de proteínas estándar (Stoichita A y Scanlon CH, 2012).

Para llevar a cabo esta determinación se procedió a calibrar una columna de Sephadex G 75 hasta obtener fracciones de 2mL/8min y posteriormente se pasó a través de ella una mezcla de proteínas de peso molecular conocido, las cuales son: Gammaglobulina 150 000 Da, BSA (Albumina Sérica Bovina) 66 463 Da, Ovoalbúmina 43 000 Da, Ribonucleasa A 13 700, Leupeptina 465.6 Da, E-64 357.4 y PMSF (Inhibidor de proteasa de serina) 174.10 Da. Obtenido el patrón de

elución de las proteínas estándar se corrió la muestra problema y se determinó su peso molecular aparente graficando el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar contra el coeficiente de distribución (K_{av}) de las proteínas problemas (parámetro que caracteriza la selectividad cromatográfica de una sustancia) (Caballero JL *et al.*, 2006).

7.16.- Electroforesis-SDS PAGE

Este método es útil para separar moléculas en base a su movilidad en un campo eléctrico sobre una superficie hidratada de un soporte sólido (gel de acrilamida y N, N- metilbisacrilamida) en presencia de un agente desnaturizante: dodecilsulfato sódico (SDS). Este soporte tiene un grado diferente de reticulación (distinto diámetro de poro) según la concentración de acrilamida y bisacrilamida y, con ello se logrará la separación de proteínas en base a su tamaño molecular. Se utilizó un gel al 12% con una corriente de 100 y 150 V para cada fase. Se utilizaron marcadores moleculares (ColorBurst marca Sigma) que van desde los 210 a 8 kDa, durante un intervalo de tiempo suficiente para separar los componentes macromoleculares (Laemmli UK, 1970). Las bandas resultantes en el gel se tiñen con azul brillante Coomassie (que permite detectar concentraciones en μg) o con plata (por su sensibilidad en ng). Finalmente, para comprobar el grado de pureza de la preparación y determinar el peso molecular aparente de las proteínas problema, se midió primero el R_f (movilidad electroforética relativa) de los marcadores moleculares; según la distancia de migración y la longitud de corrida total del gel, posteriormente se graficó con el logaritmo de su peso molecular y se interpoló el R_f de las proteínas presentes en la muestra problema.

7.17.- Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión por un ligando (grupos químicos específicos). Las muestras se hacen pasar por una columna con bolas de gel recubiertas de residuos de cierto ligando, los cuales están unidos covalentemente. Entonces, las proteínas se unen a este ligando debido a la afinidad que no tienen otras proteínas

y son retenidas en la matriz de la columna. Las proteínas que no se unen al ligando son eluidas a través de la columna siendo las primeras en salir. Posteriormente la proteína de interés se libera añadiendo una disolución concentrada del mismo grupo químico. Tal compuesto desplaza la proteína de los sitios de unión de los residuos del grupo químico fijado en la columna (Stryer *et al.*, 2003). Para llevar a cabo este método se utilizó una columna de Galactosa. Utilizando como amortiguador PBS con un gradiente de 0-0.1M de Galactosa. Este ligando fue utilizado porque es el carbohidrato al cual, las lectinas de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) presentan su mayor afinidad (Reyes AL y Fenton B. 2011).

7.18.- Caracterización de parámetros bioquímicos

7.18.1.- Afinidad para carbohidratos

Este parámetro nos expresa la mínima concentración de carbohidratos que se necesitan para inhibir la hemaglutinación y por lo tanto, la especificidad tanto de las muestras analizadas con de la lectina purificada hacia un determinado carbohidrato. En este método se utilizó el tipo sanguíneo que obtuvo la mayor actividad específica. Los carbohidratos que se utilizaron fueron: Galactosa (Gal), N-Acetilgalactosamina (GalNAc), Galactosa acetilada (GalAcet), Glucosa (Glc), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), Fucosa (Fuc), Manosa (Man), Fructosa (Fruc), Xilosa (Xyl), Sacarosa (Sac), Ribosa (Rib), Lactosa (Lac) y Ácido N-Acetil Neuramínico (NANA) y Maltosa (Mal). Los resultados fueron expresados en milimoles (mM) ya que se iniciará con dilución de 1:24 de cada carbohidrato a una concentración de 200 mM; lo necesario para bloquear completamente 4 unidades de hemaglutinación (Nagano CS, 2007).

7.18.2.- Dependencia de cationes

Ensayo que nos ayudó a determinar si la lectina purificada es dependiente de algún tipo de catión para ejercer su actividad hemaglutinante en presencia de un agente quelante. Las lectinas tienen necesidad de requerir iones para poder

ligarse a carbohidratos, por ejemplo, las lectinas de leguminosas (Sharon N y Lis H, 1990). Iones divalentes como el calcio y manganeso se encargarían de mantener la estructura tridimensional de estas proteínas con sus sitios reactivos altamente conservados, los cuales están localizados en una de las dos asas del sitio de ligamiento de carbohidratos (Mendoza *et al.*, 2007), por lo que la muestra se trató con EDTA por 2 horas a temperatura ambiente y se dializó con 0.15 M de NaCl a 4°C por toda la noche para, enseguida proceder al análisis los siguientes cationes: K^+ (KH_2PO_4), Mg^{2+} ($MgCl_2$), Ca^{2+} ($CaCl_2$) y Na^+ (Na_2HPO_4) (Alexander SA *et al.*, 1983).

7.18.3.- Isoelectroenfoque

Por este método, se separaron moléculas electroforéticamente en base a sus contenidos de aminoácidos ácidos o básicos. El punto isoeléctrico de una proteína es el pH en el que la carga neta es cero, propiedad en la que se fundamenta este método, ya que las moléculas anfotéricas se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH, la región del ánodo es ácida y la del cátodo es alcalina. Las sustancias que inicialmente se encuentran en regiones de pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras aquellas que se encuentran en medios con pH más altos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. La migración las conducirá a una región donde el pH coincidirá con su punto isoeléctrico, tendrán una carga neta nula y se detendrán (Stryer L *et al.*, 2003). Con esto se pueden distinguir proteínas que difieren en sus puntos isoeléctricos en una sola carga neta. Para ello se utilizó un kit de marcadores Phast-Gel IEF 5-8 con un equipo de separación y control de unidades Phast System.

7.19.- Evaluación de la actividad antibacteriana por el método Kirby Bauer

Con esta técnica se determinó la sensibilidad que tienen 10 cepas de bacterias patógenas tipo ATCC, tanto Gram negativas como Gram positivas, ante muestras de Capitaneja: extracto crudo, pigmentos alcohólicos y acetónicos, fracción sin pigmentos y, las lectinas purificadas con el fin de realizar una comparación entre

ellas. Para llevar a cabo esto; se creció en caldo selectivo (Muller-Hinton) cada organismo hasta obtener un patrón de turbidez McFarland de 0,5 el cual representa 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL (Tello R, 2009) y después, en una caja de Petri, se realizó una siembra masiva en la superficie de Agar Muller-Hinton con un hisopo estéril para evitar la contaminación del medio. Posteriormente se colocaron en la superficie del agar; discos con papel filtro de 6 mm aproximadamente con 25 μ l de diluciones (1:1, 1:2, 1:4 y 1:8) de cada una de las muestras (Cona E, 2002) así como un control negativo y uno positivo (antibiótico). Para obtener una mejor escala cuantitativa de actividad del antibiótico también se realizaron diluciones del mismo, con una muestra inicial de 500 μ l/2mL; soluciones inyectables de gentamicina, ampicilina y ciprofloxacino según la sensibilidad de la bacteria utilizada, esto; para que existiera una distribución homogénea del halo de inhibición en el medio de cultivo y fuera comparable al halo de las muestras analizadas. Por último se midieron los halos de inhibición y partiendo de una concentración conocida de cada muestra de obtuvo la CIM (concentración mínima inhibitoria), que se requiere para evitar el crecimiento bacteriano (Bauer AW *et al.*, 1966.)

7.20.- Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico; se usaron las medidas de tendencia central: media (\bar{x}), desviación estándar (σ) y error estándar (E.E) así como un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de contraste Tukey para establecer una correlación estadística entre la actividad específica de los cuatro grupos sanguíneos humano y, así; determinar su nivel de significancia. Un valor de $p \leq 0.05$, considera una diferencia significativa entre los grupos sanguíneos humanos. En el análisis se utilizará el programa GraphPad Prisma 5.0.

En la lectura de los halos de inhibición en el análisis antibacteriano se medirá el radio del halo partiendo desde donde está el disco con la muestra hasta donde se inhibió el crecimiento. La longitud obtenida será comparada el halo del medicamento control positivo y se determinará la (\bar{x}) y error estándar (E.E) (Tenorio A *et al.*, 2010).

VIII.- Resultados

8.1.- Actividad hemaglutinante del extracto crudo de la Capitaneja.

Para corroborar la presencia de lectinas en esta planta, se procedió al análisis de su extracto crudo, mediante un ensayo de hemaglutinación utilizando 10 g de hojas de Capitaneja.

La actividad específica del extracto con los diferentes grupos sanguíneos se puede observar en tabla 3. Estos resultados demuestran la presencia de una mezcla de lectinas que reconocen de manera específica a los carbohidratos terminales de los cuatro grupos sanguíneos, siendo la más alta para grupo B.

Tabla 3.- Actividad hemaglutinante del Extracto Crudo de Capitaneja.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A ₁	112,640 ± 41,840	41,718 ± 15,482	3.97 ± 1.63
A ₂	95,573 ± 29494	35,397 ± 10,923	1.52 ± 0.46
B	122,880 ± 33443	45,510 ± 12,386	1.3 ± 0.7
O	116,053± 39,017	42,982 ± 14,150	1.9 ± 1.05

Los resultados representan: la media ± E.E. (error estándar) de n=6 ensayos independientes del Extracto crudo de la Capitaneja. UHA= Unidades de Hemaglutinación. AE=Actividad Específica. C=Concentración mínima de proteína para producir Hemaglutinación (µg/mL). Concentración de proteína utilizada fue de 1.02 ± 0.27 mg/mL.

El análisis de varianza (ANOVA; p= 0.386) que se muestra en la gráfica 1, indica que no existe diferencia significativa en los resultados obtenidos de la especificidad del extracto crudo respecto a los cuatro grupos sanguíneos.

Actividad específica (UHA/mg)

Gráfica 1.- Actividad hemaglutinante del extracto crudo de Capitaneja. Los resultados representan la actividad específica (AE) y la media \pm EE (error estándar) de n=5 ensayos independientes por duplicado, con una $p > 0.05$ entre los grupos sanguíneos.

Una vez realizado este análisis se procedió a la extracción de pigmentos para seguir con la purificación de las lectinas y los objetivos planteados en ése trabajo.

8.2.- Extracción de Pigmentos

Como lo indica la metodología, la remoción de pigmentos se llevó a cabo un lote de hojas de 270 g de Capitaneja (*Verbesina crocata*) con acetona y alcohol (Figura 5). Las hojas fueron recolectadas en la localidad de Gabriel Zamora, Michoacán e identificadas en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH (ANEXO 1).



Figuras 5. Remoción de pigmentos de las hojas de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

8.3.- Actividad hemaglutinante de la fracción sin pigmentos

En la fracción sin pigmentos de la Capitaneja, también se muestran actividades específicas para los cuatro grupos sanguíneos, sin embargo, esta actividad se ve incrementada en los grupos sanguíneos B y O respecto a los grupos A₁ y A₂ en los cuales disminuye y se acentúa una diferencia significativa respectivamente (Tabla 4 y Gráfica 2).

Con estos resultados se comprueba que el uso de acetona y alcohol es apropiado para la remoción de pigmentos, ya que la actividad específica se mantuvo después de su empleo.

Tabla 4.- Actividad hemaglutinante de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja.

Grupo sanguíneo	UHA	AE	C
A ₁	17 066 ± 2,786	62 635 ± 1412	17.1 ± 2.54
A ₂	23 893 ± 7,373	76 800 ± 11,448	0.56 ± 0.05
B	163 840 ± 17,947	198 453 ± 27,890	0.2 ± 0.03
O	136 533 ± 22,295	104 619 ± 35,453	0.24 ± 0.08

Los resultados representan: la media ± E.E. (error estándar) de n=6 ensayos independientes de la Fracción sin pigmentos de la Capitaneja. UHA= Unidades de Hemaglutinación. AE=Actividad Especifica C=Concentración mínima de proteína para producir Hemaglutinación (µg/mL). Concentración de proteína utilizada fue de 0.66 ± 0.12 mg/mL.

Actividad específica (UHA/mg)

Gráfica 2.- Actividad hemaglutinante de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja. Los resultados representan la actividad específica (AE) y la media \pm EE (error estándar) de n=5 ensayos independientes por duplicado, con una diferencia significativa de $p < 0.05$ entre los grupos sanguíneos.

En base a la literatura, las lectinas pueden o no estar glicosiladas (Gabiús HJ, 2002) por ello y para su purificación, es necesario saber si las proteínas presentes en los extractos presentan algún grado de glicosilación. Para saber esto se determinó la presencia de carbohidratos en el extracto crudo y fracción sin pigmentos por los métodos Dubios, Benedict y Fehling.

8.4.- Determinación de carbohidratos.

8.4.1.- Método de Dubois

Los resultados obtenidos de este análisis (Tabla 5) muestran la cantidad de pentosas (ribosa y fucosa) y hexosas (glucosa y fructosa) que hay en el extracto crudo y la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*).

Como se puede observar, estos glúcidos están presentes en mayor cantidad en el extracto crudo en comparación con la fracción sin pigmentos pero, lo que permite deducir que el extracto crudo contiene carbohidratos que fueron removidos con el alcohol y que algunas de las proteínas presentes en la fracción sin pigmentos están glicosiladas.

Tabla 5.- Concentración de pentosas y hexosas en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja con el método de Dubois

Muestra	Pentosas (mg/mL)	Hexosas (mg/mL)
Extracto crudo	1.50 ± 0.205	2.065 ± 0.434
Fracción sin pigmentos	0.59 ± 0.048	1.16 ± 0.360

Los resultados representan: la media ± E.E. (error estándar) de n=2 ensayos independientes por duplicado.

Otro tipo de carbohidratos que se identificaron fueron los carbohidratos reductores, para lo cual se utilizaron dos métodos: Benedict y Fehling. Con ambos métodos se puede determinar la presencia este tipo de azúcares, sin embargo el ensayo según Fehling, detecta la forma aldehído fácilmente aunque exista en pequeña cantidad, siendo así el método más sensible. Como se puede apreciar a continuación:

8.4.2.- Reacción de Benedict

En la tabla 6, se muestran las concentraciones de carbohidratos con poder reductor y son más altas en el extracto crudo que en la fracción sin pigmentos.

Tabla 6.- Concentración de carbohidratos reductores en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja. Reactivo de Benedict.

Muestra	Concentración (mg/ml)
Extracto crudo	9.86 ± 0.53
Fracción sin pigmentos	1.068 ± 0.015

Los resultados representan: la media ± E.E. (error estándar) de n=2 ensayos independientes por duplicado

8.4.3.- Reacción de Fehling

Los resultados anteriores se verificaron con el reactivo Fehling (Tabla 7) donde se comprobó, en efecto, que este método es más sensible, es decir, la cantidad de carbohidratos con poder reductor fueron detectadas en cantidades mayores tanto para el extracto crudo como para la fracción sin pigmentos, aunque la concentración de estos glúcidos sigue siendo más elevada en el extracto que en la fracción lo que indica nuevamente que la fracción sin pigmentos posee carbohidratos y proteínas glicosiladas.

Tabla 7.- Concentración de carbohidratos reductores en extracto crudo y fracción sin pigmentos de la Capitaneja. Reactivo de Fehling.

Muestra	Concentración (mg/ml)
Extracto crudo	22.12 ± 3.45
Fracción sin pigmentos	1.78 ± 0.296

Los resultados representan: la media ± E.E. (error estándar) de n=2 ensayos independientes por duplicado

8.5.- Extracción de lípidos

Tal como se ha estado mencionando, con el alcohol se removieron del extracto crudo compuestos como carbohidratos, taninos o algunos fenoles, sin embargo esto no es suficiente para remover los lípidos que pueden estar presentes en él y que además intervienen en la purificación de las lectinas. Por eso fue necesario emplear el método Folch y al hacerlo, evidentemente, la muestra contenía este tipo de sustancias (Figura 2).

Debido a ello. También fue necesario aplicar este método a la fracción sin pigmentos, donde la fase intermedia (F2), que es la que contiene las proteínas; fue recuperada para hacerla pasar por una cromatografía de exclusión molecular y de afinidad, y así continuar con el proceso de purificación

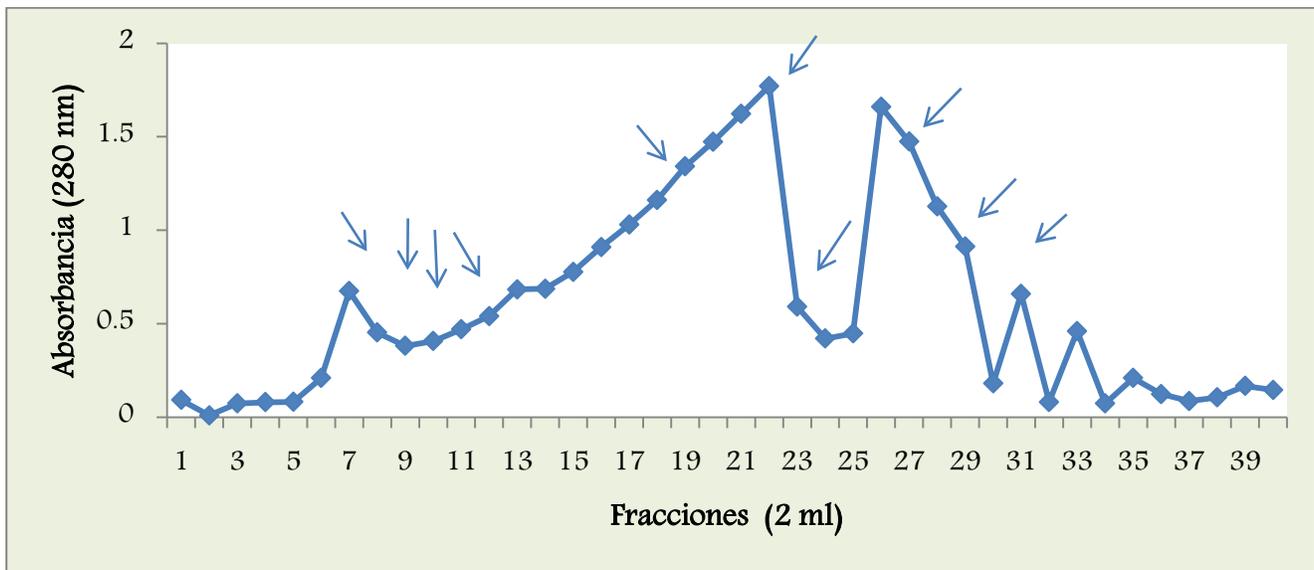


Figura 6. Extracción de lípidos por método Folch. F1= Metanol-Agua, F2= Proteínas-Metanol y F3= Cloroformo-Lípidos.

8.6.- Cromatografía de exclusión molecular

Una vez que se identificaron las lectinas en el extracto crudo y fracción sin pigmentos, y se removieron pigmentos, carbohidratos, lípidos y otros compuestos, las proteínas se separaron según su peso molecular.

La gráfica 1 muestra un cromatograma representativo donde se puede observar 39 de 60 fracciones obtenidas de la cromatografía. Las flechas indican la mayor actividad hemaglutinante. Las fracciones 13, 21 y 28, tuvieron actividad con los grupos sanguíneos A₁ y A₂, y las demás fueron específicas para los grupos sanguíneos B y O, esto se muestra en la tabla 8. Claramente se puede apreciar que en cada fracción se están separando lectinas con diferentes afinidades.



Gráfica 3.- Cromatograma representativo de la fracción sin pigmentos. Las flechas señalan las fracciones con mayor concentración de proteínas y con actividad hemaglutinante.

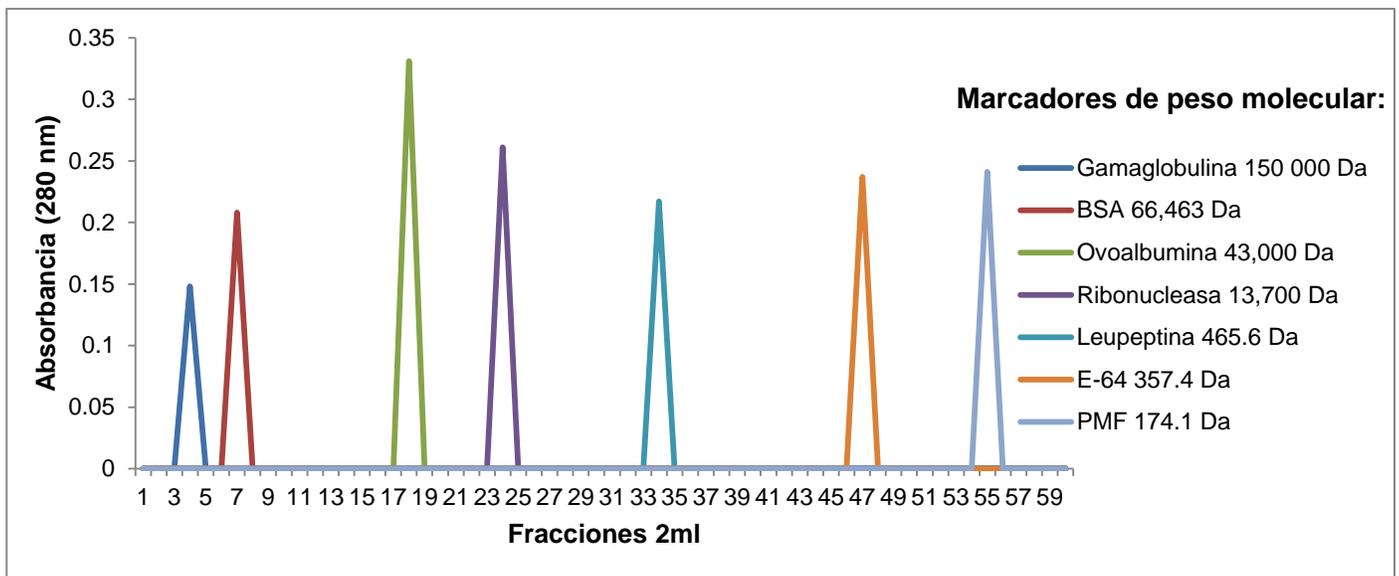
Tabla 8.- Actividad específica de las fracciones obtenidas del cromatograma de la fracción sin pigmentos (gráfica No 1).

Fracciones	Tipos sanguíneos			
	A ₁	A ₂	B	O
7	0	0	630153	1260307
8	2666	1333	1365333	341333
10	0	0	1820444	910222
11	0	3555	910222	227555
13	1503119	751559	1503119	1503119
14	0	606,814	530153	309132
15	0	0	81920	81920
17	0	20480	655360	163840
18	0	0	154566	309132
19	0	0	963764	481882
21	2560000	2560000	2560000	0
22	0	21333	1365333	0
28	1365333	2730666	2730666	682666
29	1170285	2340571	0	0
31	1170285	2340571	2340571	585142

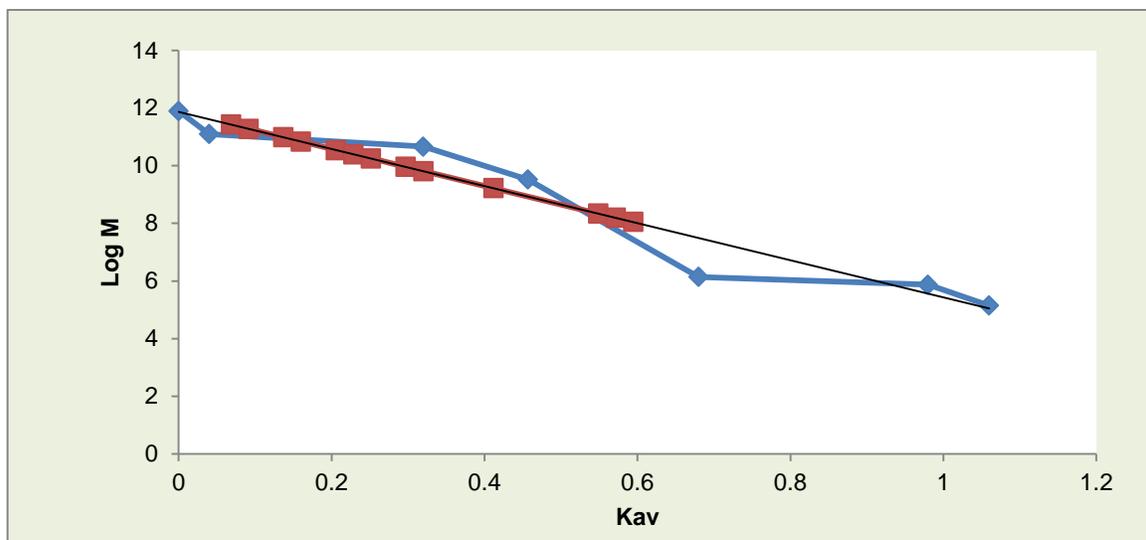
Los resultados representan la actividad específica de las fracciones tomadas durante la cromatografía de exclusión molecular a la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) en UHE/mg.

8.7.- Peso molecular aparente en condiciones nativas por cromatografía de exclusión molecular

En la tabla 9 se muestran los pesos moleculares aparentes en condiciones nativas de 13 proteínas presentes en la fracción sin pigmentos (F2) de la Capitaneja (los picos que se muestran en la gráfica 1; que tienen la mayor concentración proteica y una elevada actividad hemaglutinante) estos pesos van desde los 3,310 hasta los 91,858 Da. En las gráficas 4 y 5 se muestra el patrón de elución de los marcadores utilizados y la interpolación de los datos obtenidos.



Gráfica 4. Perfil de elución de proteínas estándar en una columna de Sephadex G-75.



Gráfica 5. Interpolación de los pesos moleculares aparentes de las proteínas analizadas.
 Log M= Logaritmo de la masa de las proteínas estándar. Kav= Coeficiente de distribución

Tabla 9. Pesos moleculares aparentes en condiciones nativas de proteínas presentes en una fracción proteica de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) obtenidos por cromatografía de exclusión molecular.

Fracción	PMA (Da)
7	91 858
8	89 332
10	59 113
11	51 036
13	38 029
14	32 823
15	28 324
17	21 141
18	18 218
22	10 113
28	4 183
29	3 611
31	3 118

8.8.- Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico es un método que sirve también para determinar el peso molecular aparente de las proteínas, sin embargo, el uso de detergentes provoca la desnaturalización de las mismas (Voet JD, 2006), es por ello que pueden existir variaciones de peso en comparación con los antes obtenidos en condiciones nativas (cromatografía de exclusión molecular).

Para implementar este método se concentraron las proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular de la fracción sin pigmentos obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular (resultados antes descritos).

Como podemos ver en la figura 7, aparecieron de 7 bandas (proteínas) cuyos pesos moleculares aparentes van desde los 11,490 hasta los 123,012 Da.

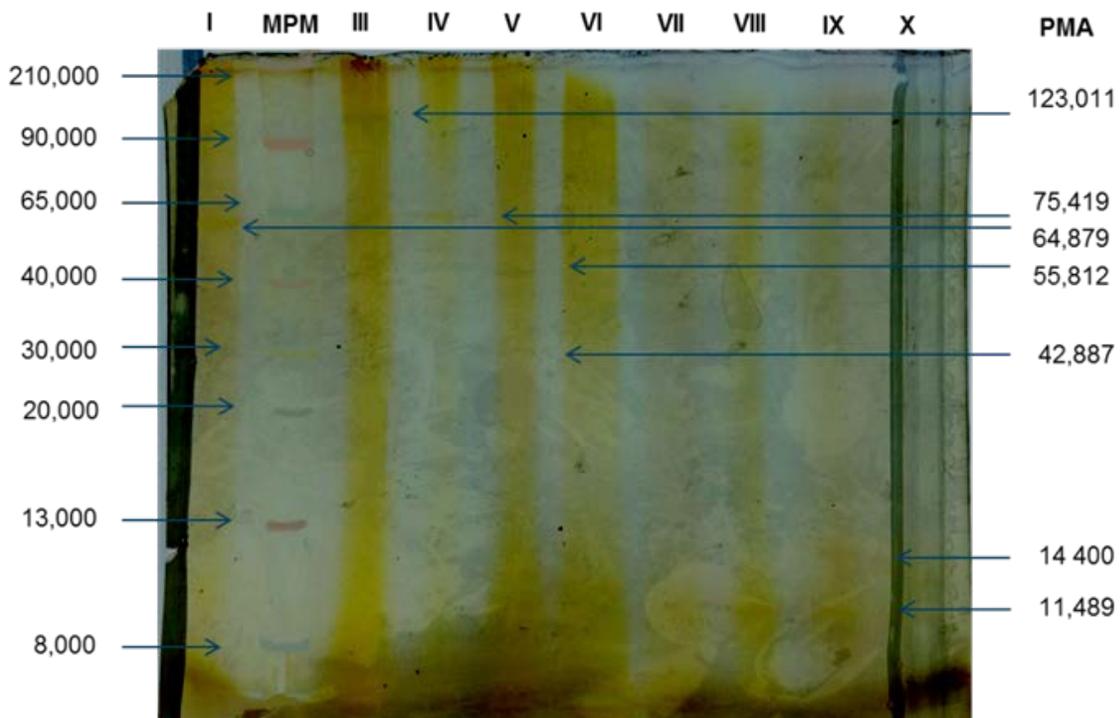
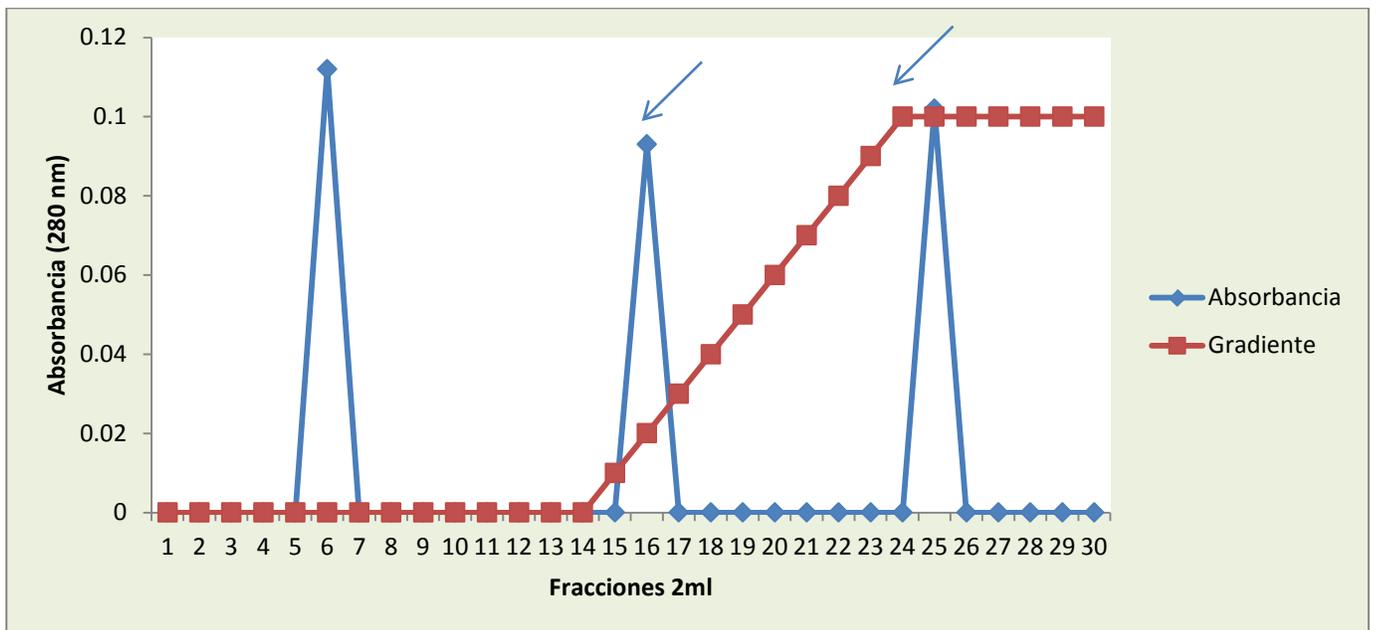


Figura 7.- Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular de la fracción sin pigmentos. Carril I, III y IV: Fracciones 1-30. Carril V, VI y VII: Fracción 31-60, Carril VIII, IX y X: Fracción 60-91. Carril II (MPM); Marcadores de Peso Molecular.

8.9.- Cromatografía de afinidad

La gráfica 6 muestra un cromatograma representativo realizado a las fracciones de alto peso molecular obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular de la fracción sin pigmentos, en el cual se obtuvieron 3 picos, dos de ellos indican la presencia de lectinas afines a galactosa.

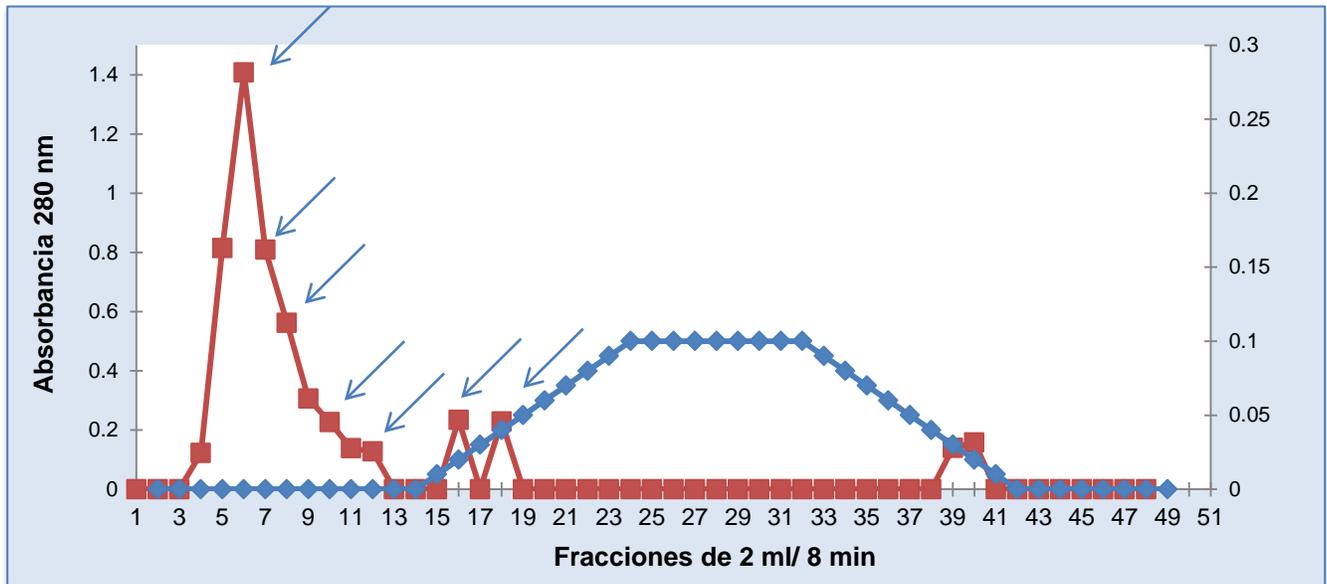


Gráfica 6.- Cromatografía de Afinidad realizada a las fracciones de alto peso molecular. Gradiente (0-0.1M Galactosa).

Estas fracciones fueron analizadas en una electroforesis SDS-PAGE y se tiñeron con plata (sensible a μg), sin embargo, no se pudieron apreciar las bandas debido a que se tenía muy poca proteína, como se puede apreciar en la absorbancia. Así que lo siguiente fue: realizar una cromatografía de afinidad directa a la fracción sin pigmentos, con el fin de recuperar una mayor cantidad de proteína.

En la gráfica 7 se observan los resultados de una cromatografía de afinidad realizada a la fracción sin pigmentos (F2), en ella se exponen 13 picos, que son las fracciones con mayor concentración proteica, de las cuales 7 presentaron

hemaglutinación con diferentes grupos sanguíneos (tabla 10), lo cual nos indica la separación de diferentes lectinas con distintas especificidades.



Gráfica 7.- Cromatografía de Afinidad realizada a la fracción sin pigmentos (F2). Gradiente (0-0.1M Galactosa).

Tabla 10.- Unidades de hemaglutinación (fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad realizada a la fracción sin pigmentos (F2)).

Fracciones	Tipos sanguíneos			
	A ₁	A ₂	B	O
4	10240	0	0	0
6	0	163840	0	0
7	2560	0	0	0
8	0	0	0	5120
9	40960	0	0	0
16	0	0	10240	0
18	0	0	620	0

Los resultados representan la actividad específica de las fracciones tomadas durante la cromatografía de afinidad molecular a la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) en UHE/mg.

A continuación se procedió al análisis de las muestras por Electroforesis SDS-PAGE para determinar la pureza y el peso molecular aparente de las lectinas identificadas.

En el gel la cual se observaron 3 lectinas; de las fracciones 4, 7 y 16. Con pesos moleculares aparentes de 14 583, 20 290 y 12 075 Da respectivamente (Figura 8).

Estas lectinas se nombraron: VCL-1, VCL-2 y VCL-3 (por Lectinas de *Verbesina crocata*)

Las dos primeras específicas al grupo sanguíneo A₁ y la tercera al grupo sanguíneo B.

El resto de las proteínas no se pudo observar debido a que probablemente se encuentren unidas a algún carbohidrato y a que la cantidad de proteína de los últimos picos no sea suficiente para poder apreciarla.

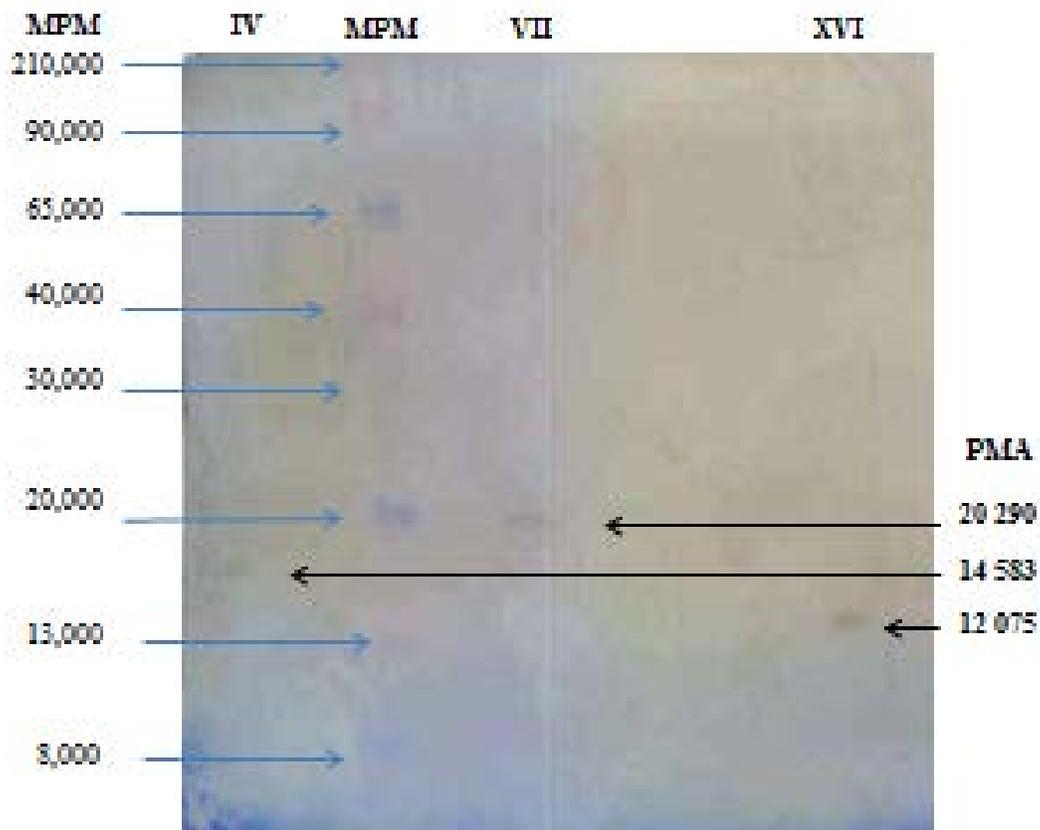


Figura 8.- Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad de la fracción sin pigmentos. Carril IV: fracción 4, carril VII: fracción 7 y carril XVI: fracción 16.

8.10.- Determinación de la glicosilación de la lectinas de *Capitaneja (Verbesina crocata)*

La concentración de carbohidratos en este ensayo fue determinada por el método Dubois, como se había mencionado antes, este método identifica de manera general los carbohidratos presentes en una muestra. Sin embargo al llevarla a cabo no se encontró la presencia de ningún tipo de carbohidrato (pentosas y hexosas) por lo que se concluye que ninguna de las tres lectinas está glicosilada.

8.11.- Parámetros Bioquímicos

8.11.1 Afinidad de carbohidratos

8.11.1.1.- Afinidad a carbohidratos del extracto crudo

La inhibición de hemaglutinación se realizó con el grupo sanguíneo B, ya que es el grupo sanguíneo donde, del extracto crudo, se obtuvo mayor especificidad.

La tabla 11 demuestra que el extracto crudo de la Capitaneja tiene mayor afinidad para galactosa, N-acetilgalactosamina, glucosa, N-acetilglucosamina y Galactosa Acetilada, mientras que con los demás no se obtuvo afinidad.

Tabla 11.- Afinidad a carbohidratos del extracto crudo

Carbohidratos	Afinidad (mM)
Gal	2.38 ^{E-05}
GalNAc	2.38 ^{E-05}
Glc	2.38 ^{E-05}
GlcNAc	9.53 ^{E-05}
GalAcet	6.25
Fuc	200
Man	200
Fruc	200
Xyl	200
Sac	200
Rib	200
Lac	200
NANA	200
Mal	200

8.11.1.2.- Afinidad a carbohidratos de la fracción sin pigmentos

En la tabla 12 se puede apreciar que la fracción sin pigmentos al igual que el extracto crudo, es afín a galactosa y N-acetilgalactosamina, sin embargo se necesita mayor cantidad de estos carbohidratos para inhibir su hemaglutinación a diferencia del extracto. Esta fracción también es afín a N-acetilglucosamina, ácido N-acetil neuramínico y la Xilosa, mientras que con los carbohidratos restantes no lo es. Para este ensayo se utilizó también el tipo sanguíneo B que fue con el que se obtuvo mayor actividad específica (Tabla 4)

Tabla 12.- Afinidad a carbohidratos de la fracción sin pigmentos

Carbohidratos	Afinidad (mM)
Gal	0.0001
GalNAc	0.003
GlcNAc	0.003
NANA	25
Xyl	50
Fuc	100
GalAcet	200
Glc	200
Man	200
Fruc	200
Sac	200
Rib	200
Lac	200
Mal	200

8.11.1.3.- Afinidad a carbohidratos de las lectinas purificadas

Los carbohidratos con los que tuvieron mayor afinidad las lectinas purificadas se pueden ver en la tabla 12.

Las lectinas VCL-1 y VCL-2 presentaron mayor afinidad a la N-acetilgalactosamina; azúcar terminal de los eritrocitos del grupo sanguíneo A₁ (grupo que se utilizó en este ensayo por tener mayor afinidad con estas proteínas (tabla 9)).

La lectina 1 resulto afín también a la glucosa, la N-acetil-glucosamina, la galactosa acetilada, así como la fucosa. Con otros carbohidratos no se observó.

Por otro lado la VCL-2 comparte poca afinidad con ácido N-acetil neuramínico, mientras con los demás carbohidratos no tuvo afinidad.

En el caso de la VCL-3, la inhibición de hemaglutinación se realizó con el grupo sanguíneo B por la especificidad que tiene hacia ese grupo (tabla 10) y, los resultados demuestran que es afín a galactosa.

La hemaglutinación de esta lectina también se inhibió con la N-acetilgalactosamina, la glucosa y el ácido N-acetilmúramico pero con un requerimiento mayor de estos glúcidos.

Tabla 13.- Afinidad a carbohidratos de las lectinas purificadas

Carbohidratos	Afinidad (mM)		
	VCL-1	VCL-2	VCL-3
Gal	100	200	2.38 ^{E-05}
GalNAc	9.53 ^{E-05}	0.024	50
GalAcet	50	200	200
Glc	12.5	200	50
GlcNAc	25	200	100
Fuc	50	200	200
Man	100	200	200
Fruc	100	200	200
Xyl	100	200	200
Sac	200	200	200
Rib	200	200	200
Lac	200	200	200
NANA	100	25	100
Mal	200	200	200

8.11.2.- Dependencia de cationes

Para analizar la dependencia de cationes en cada una de las muestras se usó: cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de magnesio (MgCl_2), fosfato de potasio (KH_2PO_4) y fosfato de sodio (NaHPO_4).

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos, después de realizar un ensayo de hemaglutinación de las muestras tratadas con EDTA en comparación a muestras que no fueron expuestas a este quelante.

Con el extracto crudo se puede ver claramente como al tratar la muestra con EDTA la actividad específica se encuentra disminuida, sin embargo, al estar en contacto con los cuatro complejo iónicos esta actividad se ve aumentada, por lo que podemos concluir que en el extracto crudo existen lectinas que son dependientes de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ .

Podemos observar de la misma manera, que la fracción sin pigmentos es dependiente también a los mismos cuatro iones: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ para conservar su especificidad.

Por otro lado, la VCL-1 presenta la misma actividad sin ser tratada con EDTA y con la presencia de éste; aun cuando se le adicionan los cuatro iones, esto es debido a que esta lectina no es dependiente de ningún ion para mantener su actividad específica. La segunda lectina (VCL-2) es dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} y, la última a Ca^{2+} y K^+ .

Tabla 14.- Dependencia de cationes del extracto crudo, fracción sin pigmentos y lectinas purificadas de Capitaneja (*Verbesina crocata*).

Extracto crudo	Control		Cationes							
			CaCl ₂		MgCl ₂		KH ₂ PO ₄		Na ₂ PO ₄	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EDTA	313	127	40155	0.99	2509	15.93	31383	127	627	63.7
S/EDTA	80313	0.49	80313	0.49	80113	0.49	80113	0.24	80113	0.49
Fracción sin pigmentos	Control		Cationes							
			CaCl ₂		MgCl ₂		KH ₂ PO ₄		Na ₂ PO ₄	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EDTA	7757	5.1	31030	1.28	15515	2.57	3878	10.31	3878	10.31
S/EDTA	248242	0.16	248242	0.16	248242	0.16	248242	0.16	248242	0.16
VCL-1	Control		Cationes							
			CaCl ₂		MgCl ₂		KH ₂ PO ₄		Na ₂ PO ₄	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EDTA	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17
S/EDTA	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17	224438	0.17
VCL-2	Control		Cationes							
			CaCl ₂		MgCl ₂		KH ₂ PO ₄		Na ₂ PO ₄	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EDTA	37236	1.07	297890	0.13	148945	0.26	37236	1.07	37236	1.07
S/EDTA	297890	0.13	297890	0.13	297890	0.13	297890	0.13	297890	0.13
VCL-3	Control		Cationes							
			CaCl ₂		MgCl ₂		KH ₂ PO ₄		Na ₂ PO ₄	
	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C	AE	C
EDTA	113777	0.35	455111	0.087	113777	0.35	227555	0.17	113777	0.35
S/EDTA	910222	0.04	910222	0.04	910222	0.04	910222	0.04	910222	0.04

Los resultados representan la actividad específica (AE) y la Concentración mínima de proteína para producir Hemaglutinación en µg/mL (C) de las muestras tratadas con EDTA y sin EDTA frente a los diferentes cationes.

8.11.3.- Punto isoeléctrico

Continuando con la caracterización bioquímica de las lectinas purificadas se determinaron sus puntos isoeléctricos (pI). En la figura 9 se puede apreciar que la VCL-1 tiene un pI de 8.1, mientras la VCL-2 tiene uno de 7.8 y finalmente la VCL-3 un pI de 8.5. En esta figura también se puede corroborar la pureza de cada una de las lectinas.

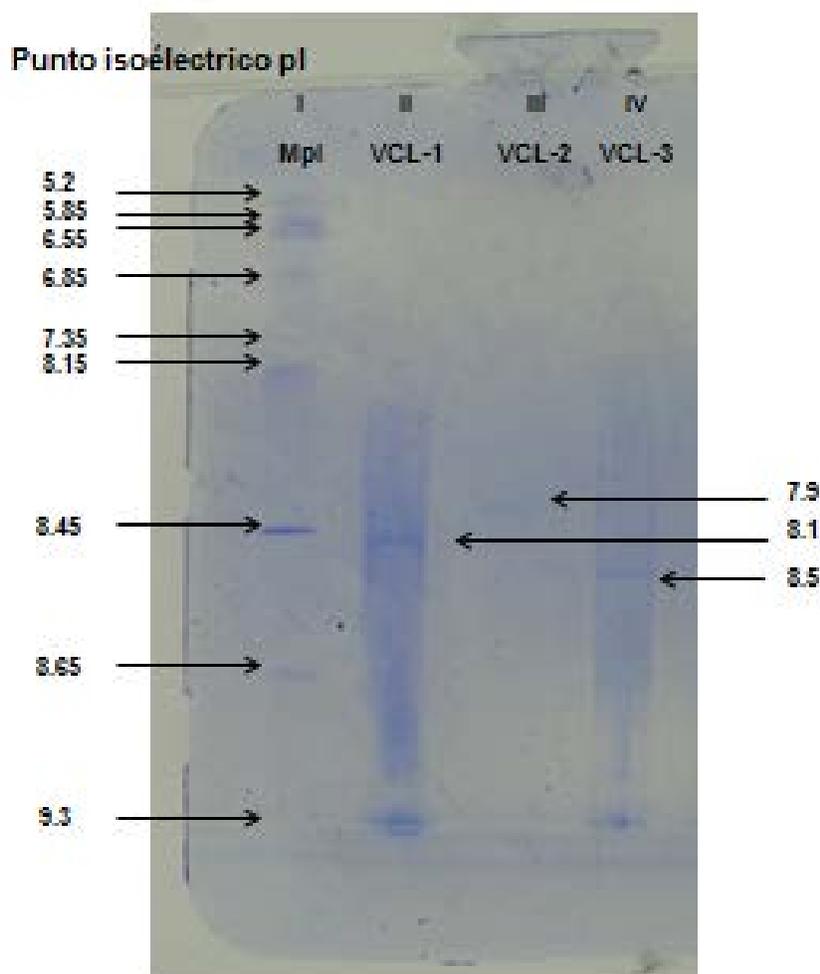


Figura 9.- Punto isoeléctrico de lectinas de Capitaneja (*Verbesina crocata*). Carril I: Marcadores de punto isoeléctrico. Carril II: VCL-1, carril III: VCL-2 y carril IV: VCL-3.

8.12.- Actividad antibacteriana

Las cepas ATCC utilizadas para evaluar la actividad biológica de los extractos y lectinas de Capitaneja así como los medicamentos (controles positivos) a los que estos microorganismos son sensibles se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Cepas ATCC utilizadas en los antibiogramas y medicamentos control

Cepa ATCC	Medicamento control	Concentración	Dilución
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 27943	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gentamicina	80 mg/2mL	1:128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ampicilina	500 mg/2mL	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	Ampicilina	500 mg/2mL	1:256
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Ciprofloxacino	750 mg/5mL	1:8196
<i>Shigella Sonnei</i> LESP-de 1308-1	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256
ETEC LESP-1110-7	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256
<i>Listeria Monocytogenes</i> ATCC 7644	Gentamicina	80 mg/2mL	1:256

8.12.1.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

El primer paso fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto crudo de Capitaneja. En la tabla 16 y figura 10 se observa la actividad antibacteriana que ejerce el extracto crudo de Capitaneja contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En la tabla expone la CIM necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano y en la figura se puede observar dicha inhibición hasta una dilución de 1:8.

Tabla 16.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto Crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Extracto crudo 1.02 mg/mL	1:1	12 mm	255 µg/mL
	1:2	8 mm	
	1:4	8 mm	
	1:8	0 mm	0 µg/mL
Ampicilina 500 mg/mL (control positivo)	1:256	18 mm	1953 µg/mL

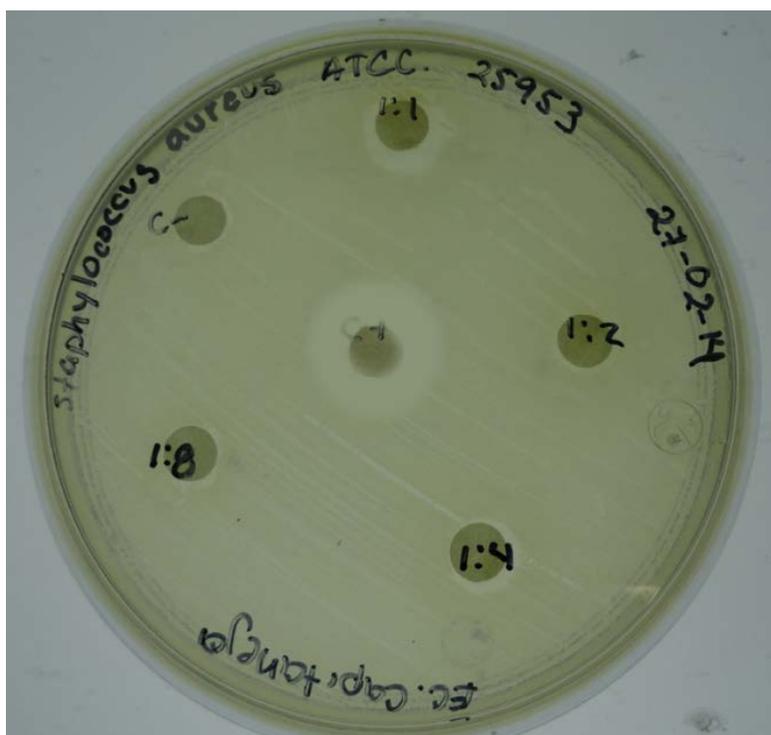


Figura 10.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

El extracto crudo también inhibió el crecimiento de *Escherichia Coli* ATCC 25922 a una concentración de 127.5 µg/mL (Tabla 17 y Figura 11).

Tabla 17.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) del Extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Extracto crudo 1.02 mg/mL	1:1	8 mm	127.5 µg/mL
	1:2	8 mm	
	1:4	8 mm	
	1:8	8 mm	
Gentamicina 80 mg/2mL (control positivo)	1:256	20 mm	312.5 µg/mL

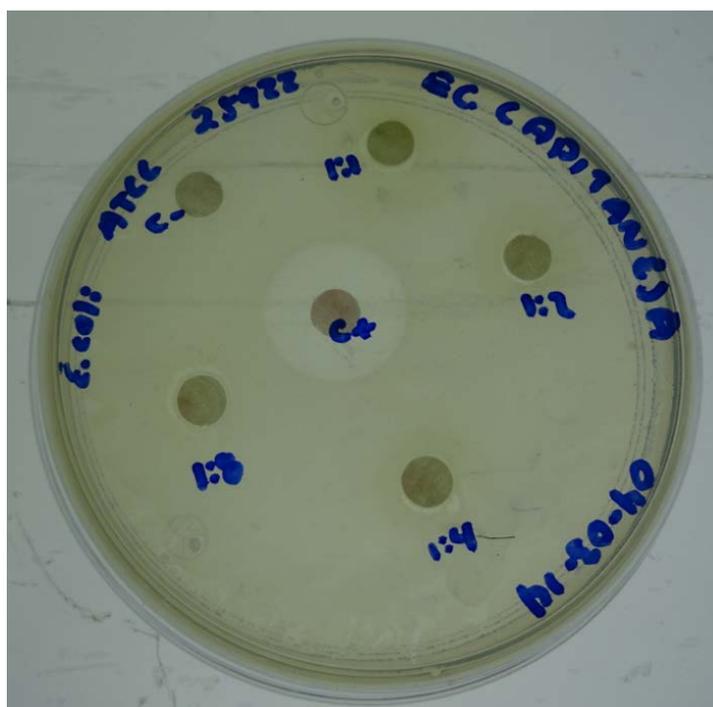


Figura 11.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Escherichia Coli* ATCC 25922

Y finalmente se encontró que el extracto crudo también tiene actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, con una concentración de 127.5 µg/mL (Tabla 18) y una dilución 1:8 (Figura 12).

Tabla 18.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Extracto crudo 1.02 mg/mL	1:1	12 mm	127.5 µg/mL
	1:2	12 mm	
	1:4	12 mm	
	1:8	10 mm	
Gentamicina 80 mg/2mL (control positivo)	1:128	22 mm	1953 µg/mL



Figura 12.- Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la tabla 19 se muestra que con otras bacterias ATCC no mostraron actividad antibacteriana.

Tabla 19. Actividad antibacteriana del extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra diferentes bacterias patógenas ATCC.

Cepas ATCC	Halos de inhibición (mm)				
	Control (+)	Diluciones EC			
		1:1	1:2	1:4	1:8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 27943	12	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	20	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Bacillus cereus</i> ACTT 14579	22	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
ETEC LESP-1110-7	20	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Listeria Monocytogenes</i> ATCC 7644	12	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	20	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Shigella Sonnei</i> LESP-de 1308-1	18	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

8.12.2 Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

Luego de haber encontrado actividad antibacteriana en el extracto crudo se procedió al análisis de la fracción sin pigmentos y, esta muestra resultó tener propiedades antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una CIM de 5.1 µg/mL (Tabla 20) y además con *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Shigella sonnei* con una CIM de 165 µg/mL (Tablas: 21, 22 y 23).

Tabla 20.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Fracción sin Pigmentos 0.66 mg/mL	1:1	20 mm	
	1:2	16 mm	
	1:4	14 mm	
	1:8	12 mm	
	1:16	10 mm	
	1:32	10 mm	
	1:64	8 mm	
	1:128	8 mm	5.1 µg/mL
Ampicilina 500 mg/mL (control positivo)	1:256	32 mm	1953 µg/mL

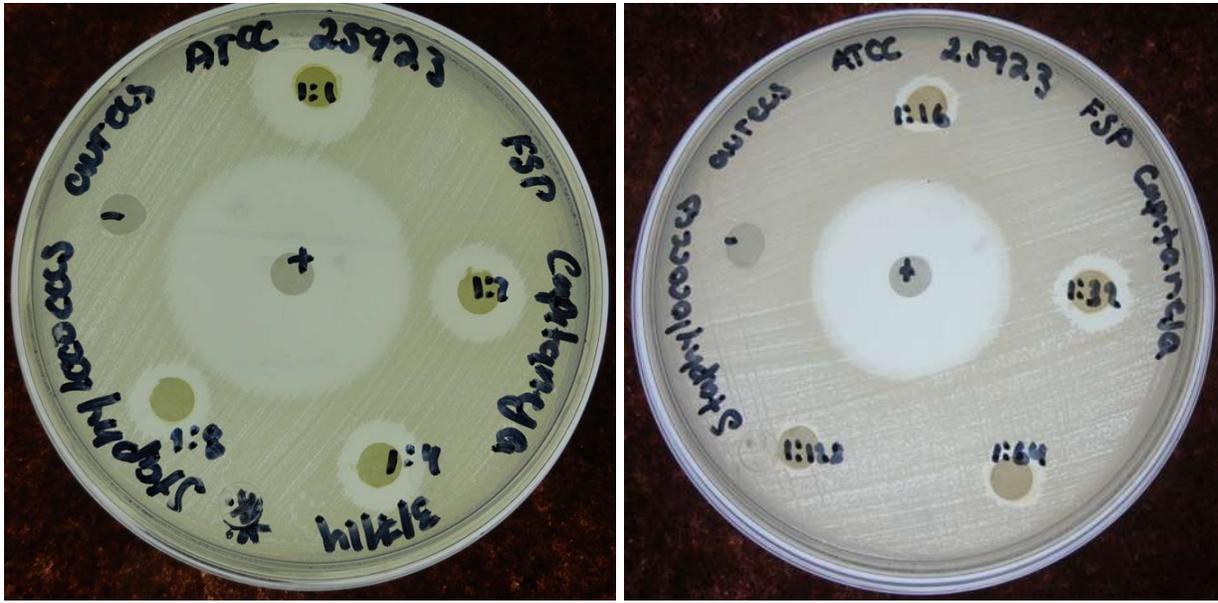


Figura 13.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitanaja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla 21.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Fracción sin Pigmentos 0.66 mg/mL	1:1	12 mm	82.5 µg/mL
	1:2	12 mm	
	1:4	10 mm	
	1:8	8 mm	
Gentamicina 80 mg/2mL (control positivo)	1:128	18 mm	1953 µg/mL



Figura 14.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Escherichia coli* enterotoxigénica.

Tabla 22.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Shigella sonnei*

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Fracción sin Pigmentos 0.66 mg/mL	1:1	10 mm	165 µg/mL
	1:2	10 mm	
	1:4	10 mm	
	1:8	0 mm	0 µg/mL
Gentamicina 80 mg/2mL (control positivo)	1:128	10 mm	1953 µg/mL

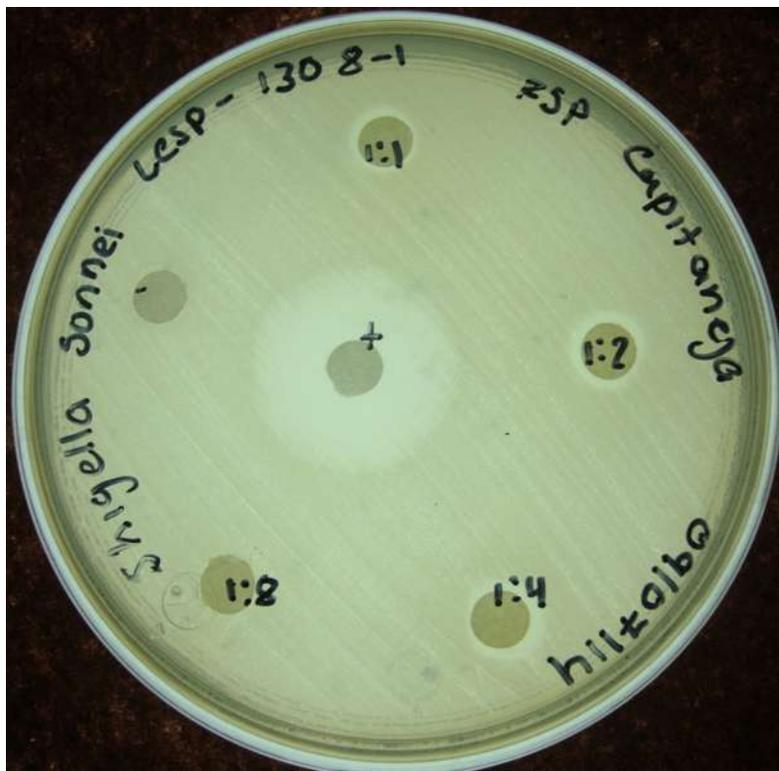


Figura 15.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Shigella sonnei*.

Tabla 23.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14579

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
Fracción sin Pigmentos 0.66 mg/mL	1:1	12 mm	
	1:2	12 mm	
	1:4	8 mm	165 µg/mL
	1:8	0 mm	0 µg/mL
Gentamicina 80 mg/2mL (control positivo)	1:128	18 mm	1953 µg/mL



Figura 16.- Actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Bacillus cereus* ATCC 14578.

8.12.3.- Actividad antibacteriana de VCL- 1

La lectina VCL-1 inhibió el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, al igual que la fracción sin pigmentos y el extracto crudo. Esta lectina actúa a una CIM de 91.5 µg/mL (Tabla 24 y Figura 17) y, no tuvo actividad con el resto de las bacterias.

Tabla 24.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VCL-1 de Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
VCL-1 0.55 mg/mL	1:1	12 mm	
	1:2	10 mm	
	1:4	10 mm	
	1:8	8 mm	91.5 µg/mL
Ampicilina 500 mg/mL (control positivo)	1:256	38 mm	1953 µg/mL

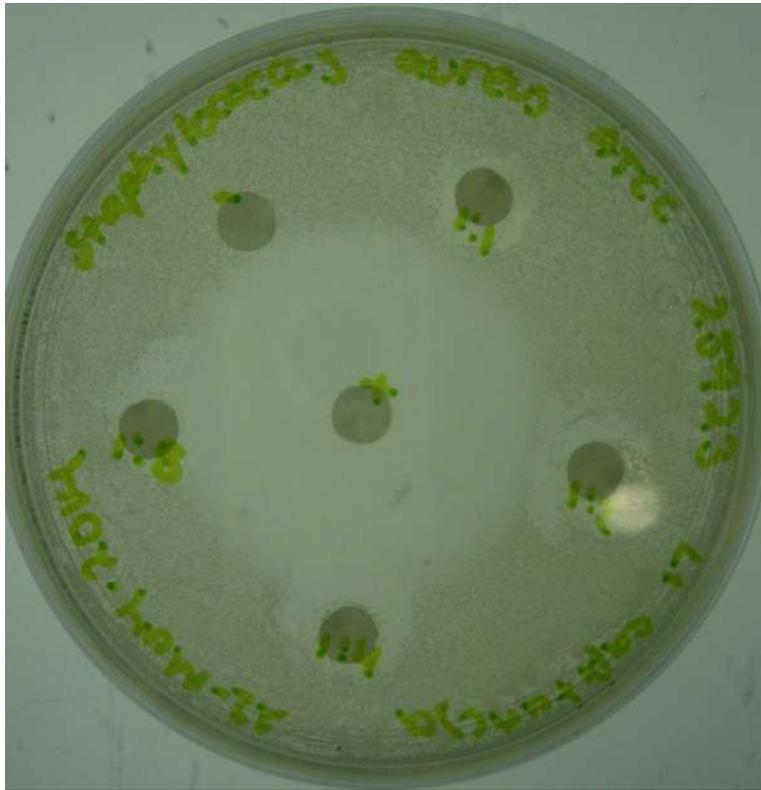


Figura 17.- Actividad antibacteriana de VCL-1 de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

8.12.4.- Actividad antibacteriana de VCL-2

La actividad de VCL-2 fue contra la misma bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pero con una CIM de 68.7 µg/mL como se puede ver en la tabla 25.

La figura 18 muestra la última dilución en que inhibió el crecimiento bacteriano.

Tabla 25.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) de VCL-2 de Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
VCL-1 0.4 mg/mL	1:1	16 mm	68.7 µg/mL
	1:2	12 mm	
	1:4	10 mm	
	1:8	8 mm	
Ampicilina 500 mg/mL (control positivo)	1:256	36 mm	1953 µg/mL

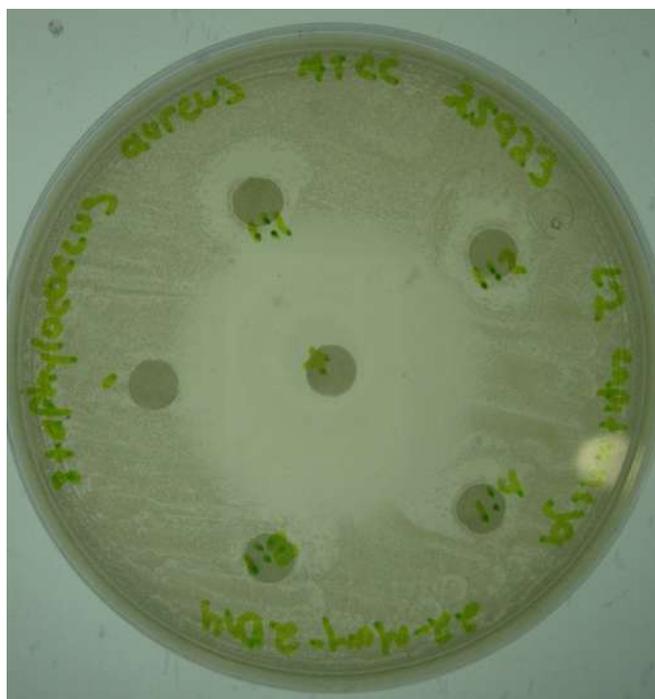


Figura 18.- Actividad antibacteriana de VCL-2 de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) a diferentes diluciones contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

8.12.5 Actividad antibacteriana de VCL-3

Por último el análisis con de VCL-3 (Tabla 26), revela una CIM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 22.5 µg/mL a una dilución 1.8 (Figura 19)

Tabla 26.- Concentración inhibitoria mínima (CIM) la VCL-3 de Capitaneja (*Verbesina crocata*) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestra/Concentración	Dilución	Halo de inhibición	CIM
VCL-1 0.18 mg/mL	1:1	12 mm	22.5 µg/mL
	1:2	10 mm	
	1:4	10 mm	
	1:8	10 mm	
Ampicilina 500 mg/mL (control positivo)	1:256	36 mm	1953 µg/mL



Figura 19.- Actividad antibacteriana de VCL-3 de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) a diferentes diluciones contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

8.12.6.- Actividad antibacteriana de pigmentos acetónicos y alcohólicos de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

Como se mencionó en un principio el objetivo de realizar el análisis antibacteriano a los pigmentos que fueron separados del extracto crudo, fue para discernir, si la actividad es causada por componentes de los mismos o por las lectinas.

Lo que se pudo observar (Tabla 27) es que con los pigmentos acetónicos tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que los pigmentos alcohólicos tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 27.- Halos de inhibición de pigmentos acetónicos y alcohólicos de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

Cepas ATCC	Halos de inhibición (mm)					Halos de inhibición (mm)							
	Control (+)	DMSO	Diluciones de pigmentos acetónicos			Control (+)	DMSO	Diluciones de pigmentos alcohólicos					
			1:1	1:2	1:4			1:8	1:1	1:2	1:4	1:8	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	24	0	0	0	0	22	0	0	0	6	6	6	6
<i>Bacillus cereus</i> ACIT 14579	16	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
ETEC LESP-1110-7	16	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria Monocytogenes</i> ATCC 7644	16	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	24	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella Sonnei</i> LESP-de 1308-1	18	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	0	16	14	12	24	0	0	10	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	0	0	0	0	16	0	0	0	10	10	6	0

DMSO (dimetil sulfoxido): control negativo utilizado para la disolver los pigmentos

IX.- DISCUSION

La Capitaneja (*Verbesina crocata*) es un arbusto mexicano utilizado ampliamente en la medicina tradicional contra enfermedades gastrointestinales, cáncer, cefaleas, como antipirético, antitumoral, antioxidante, etc. Estudios farmacológicos han demostrado que tiene actividad larvicida, hipoglucemiante y, además contiene lectinas; proteínas que se unen selectiva y específicamente a carbohidratos de manera reversible, lo que les permite participar en diversos procesos relacionados con el reconocimiento celular, por lo que se dispuso a su purificación y caracterización bioquímica y antibacteriana, siendo este, el primer reporte donde se realizó un análisis completo de las lectinas presentes en esta planta ya que no existen antecedentes de actividad antibacteriana *in vitro* de la Capitaneja (*Verbesina crocata*).

Para poder iniciar con el estudio, primero se corroboró la presencia de lectinas en la planta. En la tabla 3 se puede ver que el extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) presento actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos utilizados: A₁, A₂, B y O. Lo cual indica que, efectivamente, esta planta tiene una mezcla de lectinas que reconocen de manera específica a los carbohidratos terminales de cada grupo, de los cuales en el grupo B se observó la mayor actividad. Este grupo sanguíneo tiene como carbohidratos terminales; Galactosa-Galactosa-Fucosa (Roitt *et al.*, 2008). Los carbohidratos terminales de los grupos A₁, A₂ y O son: N-Acetilgalactosamina-Galactosa-Fucosa para los dos primeros y Fucosa-Galactosa para el grupo O; para el que la actividad específica fue mayor respecto a A₁ y A₂, sin embargo, al realizar el análisis estadístico resultaron no ser significativas las diferencias entre los cuatro grupos sanguíneos (Grafica 1).

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Reyes AL y Fenton B en el 2011, donde se identificaron por primera vez las lectinas presentes también en un extracto crudo Capitaneja (*Verbesina crocata*), podemos notar que estas proteínas presentaron elevadas especificidades con los grupos sanguíneos B y O, respecto

a los grupos A₁ y A₂ (al igual que en el actual estudio), sin embargo, estas diferencias si resultaron significativas. Esto se debe a que la planta utilizada en los ensayos fue recolectada en el municipio de Gabriel Zamora, Michoacán y en el estudio previo se tomaron de Uruapan (en el mismo estado).

Según la literatura, la actividad hemaglutinante y concentraciones de las lectinas presentes en una planta varían de acuerdo a las condiciones de suelo, tamaño, grado de madurez de las hojas, a los requerimientos de defensa y nutricionales de la planta (Cammue B *et al.*, 1985; Harada *et al.*, 1990). Se expresan de distinta manera durante el desarrollo y contribuyen en la diferenciación y determinación celular (Sharon y Lis, 2004, Shet y Madiah 1987).

Las hojas recolectadas en las dos localidades presentaron distintos tamaños. Esto concuerda con un estudio realizado por Gil P y Fenton B en el 2012, en donde se evaluó la hemaglutinación con los cuatro grupos sanguíneos de sistema ABO de lectinas presentes en extractos de hojas de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) de diferentes tamaños y recolectadas de diversas localidades de Michoacán, dando como resultado variaciones en las actividades específicas de los extractos.

Cabe destacar que, aunque existan variaciones en cuanto a la actividad específica se refiere, una misma lectina siempre será expresada en la misma planta independientemente del lugar de procedencia (Varki A, 2009) y, para asegurar que se estuviera trabajando con la misma planta, a las hojas recolectadas de ambas localidades se les realizó una identificación taxonómica de Género y Especie en el herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH (en el anexo 1).

Ya que se comprobó la presencia de lectinas en el extracto crudo de la Capitaneja (*Verbesina crocata*), se removieron pigmentos y otros compontes presentes en un lote de 268 g de hojas de esta planta, para lo cual se hicieron lavados con acetona con el fin de extraer compuestos poco hidroxilados como: carotenoides, clorofilas (a y b) y catequinas (Monge E *et al.*, 1984) y, con alcohol para excluir sustancias altamente hidroxiladas o glicosiladas como tirilosido, astragalina y quercetina 3-O-

glucosa (Avilés A et al., 2008). De los pigmentos obtenidos se analizó la actividad antibacteriana de manera comparativa a la fracción sin pigmentos.

Para comprobar la existencia de lectinas y su actividad hemaglutinante en esta última muestra, se realizaron ensayos de hemaglutinación, los cuales indicaron que dicha fracción posee un conjunto de este tipo de proteínas específicas a los cuatro grupos sanguíneos, teniendo la actividad más alta en el grupo sanguíneo B, seguida del O y, con una diferencia significativa, los grupos A₁ y A₂ obtuvieron la menor (Tabla 3 y Grafica 2). Con esto se pueden deducir dos cosas: la primera, que la utilización de acetona y alcohol es apropiada para la remoción de pigmentos, ya que, aunque estas sustancias ocasionan efectos desnaturalizantes en las lectinas, estas no sufren daño en su configuración (la desnaturalización fue reversible); las lectinas tienen sus sitios reactivos de reconocimiento a carbohidratos altamente conservados y un cambio en su conformación basta para que la especificidad se pierda, por tanto, si la desnaturalización hubiera sido irreversible no se apreciaría actividad hemaglutinante después de emplear estos solventes (Paiva PMG et al., 2010; Schmidt O et al., 2005) y, la segunda se refiere a las diferencias en la afinidades que tuvieron las lectinas con los grupos sanguíneos antes y después de quitarle los pigmentos a las hojas. Lo que ocurre, es que entre los componentes presentes en el extracto crudo se encuentran glúcidos, sustancias catiónicas, lípidos y taninos que interactúan con oligosacáridos y aglutinan células, lo cual interfiere con la hemaglutinación y por ende con los resultados (Cruz S, Rodríguez AJ, 2013).

Como se describió anteriormente con los lavados de alcohol fueron removidos los glúcidos, las sustancias catiónicas y los taninos, sin embargo se sabe que existen proteínas que pueden estar glicosiladas (Terry D, 2001), por ello se procedió a la cuantificación de carbohidratos en el extracto crudo y la fracción sin pigmentos de Capitaneja (*Verbesina crocata*) por tres métodos diferentes. El primer método fue el de Dubois (1956), y se implementó con la finalidad de conocer el contenido de carbohidratos totales en las muestras y cuyos resultados se pueden ver en la tabla 5. Las concentraciones demuestran que el extracto crudo contiene mayor

contenido tanto de hexosas (glucosa y fructosa) y pentosas (fucosa y ribosa) respecto a la fracción sin pigmentos, sin embargo, siguen estando presentes en esta última, lo que indica, que efectivamente en esta fracción existen proteínas con cierto grado de glicosilación. Existen otros métodos que ayudan a conocer el contenido de carbohidratos totales presentes en una muestra como el descrito por Winzler RJ en 1961 o el Antrona (Dreywood R, 1946), los cuales siguen el mismo fundamento que el método Dubois, sin embargo para llevarlos a cabo se requieren 4.5 ml de muestra a diferencia del Dubois, en el que se pueden utilizar cantidades de hasta 500 µl, además de ser un método fácil, rápido y recurrente en estudios de purificación de lectinas (Oliveira JTA *et al.*, 2002; Konozy E *et al.*, 2002; Zuo Z *et al.*, 2012). Los otros dos métodos fueron el de Benedict y Fehling, con los cuales se identificaron carbohidratos con poder reductor. Estos datos son de suma importancia pues existen muchas lectinas glicosiladas en plantas, por ejemplo la EsL; una lectina aislada de *Phaseolus acutifolius* la cual contiene un 10% de carbohidratos en peso (Castillo A, 2007) o AM; una lectina aislada del *Amaranthus hypochondriacus* que contiene un 3.6 % de azúcares, ambas plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas las cuales han demostrado tener de un 6 a un 20% de carbohidratos totales (Salgado JD y Valadez MC, 2006).

Otros compuestos que pudieron estar glicosilados y no fueron removidos con los lavados; son los lípidos, estos compuestos a pesar de ser solubles en acetona, no pueden extraerse fácilmente por ser la acetona un solvente débil (Beltrán Y *et al.*, 2013). Así que, los lípidos fueron retirados tanto del extracto crudo, como de la fracción sin pigmentos por el método Folch. Este es un método ampliamente utilizado en el tratamiento base de muestras que contengan grasas y se deseen aislar, incluyendo la purificación de lectinas (Simon RH, 1986; Kannan VM, 1993; Sohaimy AL *et al.*, 2007). En este ensayo se utiliza una proporción de cloroformo y metanol (2:1); el primer solvente disuelve los lípidos y el segundo rompe los enlaces que se dan entre los lípidos y las proteínas de las membranas, formándose tres fases: Folch 1 (F1), Folch 2 (F2) y Folch 3 (F3), siendo de especial interés “F2” ya que en esa fase es donde concentrarán las proteínas presentes en la muestra (Folch J *et al.*, 1956).

Para continuar con la purificación de las lectinas se realizó una cromatografía de exclusión molecular a la fracción sin pigmentos con el fin de determinar el peso molecular aparente de las proteínas presentes en la muestra en condiciones nativas y hacer una comparación de los pesos aparentes con los obtenidos por electroforesis SDS-PAGE, en condiciones desnaturalizantes. Comprobándose que los pesos sí varían. En la tabla 9 se pueden ver los pesos moleculares aparentes en condiciones nativas obtenidos por cromatografía de exclusión y en la figura 7 por Electroforesis SDS-PAGE. Por el primer método se identificaron 13 proteínas que van desde los 3,310 hasta los 91,858 Da y por el segundo 7, que van desde los 11,490 hasta los 123,012 Da. Es evidente que por el último método fueron identificadas una menor cantidad de proteínas. Esto se debe a que algunas de ellas están glicosiladas y no se pudieron ver porque la tinción se realizó con plata y esta resulta débil o fracasa por una interferencia estructural que se da entre los carbohidratos y los iones de plata (Kierdorf H *et al.*, 1993) y, a la acción del dodecilsulfato sódico, detergente utilizado en la electroforesis, que tiene efectos desnaturalizante en las proteínas, las cuales pierden su configuración nativa al romperse las interacciones débiles que mantienen estable su estructura (Porto A, 2013).

Previo a esta determinación se realizaron ensayos de hemaglutinación a las fracciones obtenidas de la cromatografía (para identificar las lectinas presentes en cada una de ellas). De las trece proteínas identificadas, las contenidas en las fracciones 13, 21 y 28 tuvieron actividad con los grupos sanguíneos A₁ y A₂ y las demás fueron específicas para los grupos sanguíneos B y O (Tabla 8). Lo que demuestra que en cada fracción se separaron lectinas con diferentes afinidades.

Continuando con el estudio, las proteínas presentes en las fracciones antes descritas; de alto, mediano y bajo peso molecular, se juntaron y liofilizaron con el fin de concentrar la cantidad de proteína. En primer instancia las proteínas de mayor peso se hicieron pasar por una columna de afinidad, que tiene como ligando; galactosa y con ello se logró la purificación de 2 lectinas, siendo una de ellas afín a este carbohidrato, ver gráfica 6. Sin embargo al ser analizadas

mediante una electroforesis SDS-PAGE las bandas no se pudieron apreciar debido a que se tenía muy poca cantidad de proteína. Por lo que se tuvo que cambiar la estrategia de purificación, haciendo pasar ahora la fracción sin pigmentos (F2) por la cromatografía de afinidad directamente.

Con este procedimiento fue posible tener una mayor cantidad de proteína en cada una de las 13 fracciones obtenidas (Gráfica 7) así como la purificación de tres lectinas, de las fracciones 4, 7 y 16. Las primeras dos son específicas al grupo sanguíneo A₁ y tienen un peso molecular aparente de 14 583 y 20 290 Da y, la última es afín al grupo sanguíneo B y tiene un peso de 12 075 Da.

Los datos que existen en la literatura sugieren que es de suma importancia la elección y el número de métodos empleados para la purificación de lectinas, pues de eso depende lograr o no un alto rendimiento debido a que cada paso de purificación implica pérdida de proteína (Nascimento KS *et al.*, 2012) y esto ha quedado demostrado con los siguientes antecedentes: en un estudio realizado por Nomura L *et al.* (1998), se obtuvo un rendimiento de 2.5% de la lectina *Castanea crenata* utilizando cromatografías de intercambio iónico, exclusión molecular y de afinidad (3 pasos de purificación), en otro hecho por Echandi Am y Aragón K en 1991, donde se purificó la lectina *Erythrina costaricensis* se alcanzó un rendimiento del 12% utilizando la precipitación por sulfato de amonio y cromatografía de exclusión molecular, mientras Konosy P *et al.*, en el 2002 lograron un rendimiento del 16% de la lectina *Erythrina indica* aplicando una cromatografía de afinidad directa.

Ahora bien, en comparación con estos estudios se encontró que la aplicación de una cromatografía directa en el presente trabajo, en cuanto a la primer lectina purificada se refiere (VCL-1), ésta resulto tener una eficacia similar a la obtenida por Konosy P *et al.*, en el 2002 de la lectina *Erythrina indica*, como se muestra en la tabla 24, lo que indica que con éste procedimiento es posible obtener rendimientos óptimos. Sin embargo siempre hay que tener en cuenta que las

concentraciones de lectinas varían según el tipo y los requerimientos de cada planta (Van Damme EJM *et al*, 1998).

Tabla 24.- Eficacia del método de purificación de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

Cantidades de proteína obtenida de la Capitaneja (<i>Verbesina crocata</i>) (µg/mL)		
Muestra	Cantidad proteica	Porcentaje de recuperación
Extracto crudo	1200	100%
Fracción sin pigmentos	660	55%
F2	650	54.16%
VCL-1	180	15%
VCL-2	132	11%
VCL-3	33	2.75%

Al determinar la afinidad a carbohidratos del extracto crudo se observó una mayor afinidad para Galactosa, N-acetilgalactosamina, Glucosa, N-acetilglucosamina y Galactosa Acetilada (Tabla 11). La fracción sin pigmentos tuvo afinidades parecidas (Tabla 12), sin embargo las concentraciones mínimas requerías para inhibir la hemaglutinación fueron distintas. Esto se explica por cantidad de componentes activos del extracto crudo entre ellos los glúcidos (que interfieren con la hemaglutinación) (Bermúdez MP, 2009).

La afinidad de las lectinas purificadas son: para las lectina 1 y 2; N-acetilgalactosamina y para la lectina 3; Galactosa, lo cual corresponde a los resultados esperados, ya que las primeras lectinas son específicas al grupo sanguíneo A₁ cuyo carbohidrato terminal es la N-acetil-galactosamina y la tercera al grupo B que tiene como carbohidrato terminal a la Galactosa.

Otra caracterización importante es la dependencia de cationes pues se algunas de las lectinas, especialmente las leguminosas dependen de iones metálicos para

ejercer su función (Sharon N y Lis H, 1990) esto es debido a que a que los iones se encargan de mantener la estructura tridimensional de las lectinas con sus sitios reactivos localizados en una de las asas del sitio del reconocimiento a carbohidratos (Hernandez P *et al.*, 2005). En la tabla 13, podemos ver la dependencia que tiene en el extracto crudo y la fracción sin pigmentos con los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , esto indica que, de la mezcla de proteínas presentes en ambas muestras, existen algunas lectinas que son dependientes de iones para ejercer su actividad hemaglutinante. En el caso de las lectinas purificadas, la VCL-1 es totalmente independiente de cationes como *Luetzelburgia auriculata*, una lectina de la familia de las leguminosas aislada por Oliveira et al., en el 2002, lo que indica que no todas las lectinas que pertenecen a esta familia depende de iones para ejercer su actividad. Mientras las otras dos lectinas si dependen de iones: la VCL-2 de Ca^{2+} y Mg^{2+} y, la VCL-3 que es dependiente de Ca^{2+} y K^+ . Esto concuerda con los reportes que existen de lectinas dependientes de cationes, como es el caso de la lectinas *Erythrina costaricensis* o *Canavalina dictyota*, que dependen de los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} (Echandi CIN y Aragón F, 1991; Almeida et al., 2005). En el caso de las lectinas purificadas, la VCL-1 es total mente independiente de cationes como *Luetzelburgia auriculata*, una lectina de la familia de las leguminosas aislada por Oliveira et al., en el 2002, lo que indica que no todas las lectinas que pertenecen a esta familia depende de iones para ejercer su actividad.

Otro de los parámetros que se determinó fue el punto isoeléctrico de las tres lectinas purificadas (Figura 9), siendo este de 8.1, 7.9 y 8.5, lo cual indica que se trata de proteínas básicas y que en este intervalo de pH tendrán una carga neta de cero (Stryer L *et al.*, 2003). Este análisis también contribuyó a confirmar la pureza de las lectinas ya que este método permite distinguir proteínas que difieren en sus pl en intervalos de 0.01 unidades de pH, y por lo tanto, es posible separar proteínas que difieren en una sola carga neta (Fernández J, 2004).

En relación a la actividad antibacteriana se comprobó que la Capitaneja (*Verbesina crocata*) tiene actividad antibacteriana. Para llegar a esta conclusión se

realizaron antibiogramas por difusión en disco, donde los resultados evidenciaron que el extracto crudo tiene acción contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una CIM de 255 µg/mL y, para *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con una CIM 127.5 µg/mL. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con extractos acuosos de plantas del género *Verbesina* como *Verbesina encelioides* (Jain SC et al., 2008) y *Verbesina nodiflora* (Sharmin RC et al., 2013) las cuales tiene actividad antibacteriana contra estos microorganismos. En la medicina tradicional mexicana la Capitaneja (*Verbesina crocata*) es usada para tratar enfermedades gastrointestinales, cutáneas e infección de vías urinarias (Hersch P, 2009), afecciones originadas por *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Faleiro PL y Soriano F, 2010; Mamani E et al., 2006; Ochoa SA et al., 2013) por lo que estos datos pueden justificar el uso que se le dé a esta planta en la medicina tradicional. La fracción sin pigmentos también tuvo actividad antibacteriana, sin embargo en comparación con el extracto crudo, de las tres bacterias antes mencionadas, está solo tuvo actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pero a diferencia del extracto, está tuvo también contra *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Shigella sonnei*. Las diferencias radican en los componentes que están presentes en las muestras; el extracto crudo además de contener una mezcla de lectinas tiene un conjunto de compuestos responsables de su pigmentación (Monge E et al, 1984) y carbohidratos, sustancias que pueden estar interaccionando con las lectinas e interviniendo en el reconocimiento de estas proteínas con los carbohidratos presentes en la pared celular de las bacterias, reconocimiento que fundamenta la actividad antibacteriana de la fracción sin pigmentos ante las bacterias antes mencionadas, pues se ha propuesto que las lectinas interaccionan con los azúcares de la pared celular de las bacterias, tanto gram negativas como gram positivas y por medio de un mecanismo de palanca origina su lisis celular (Schmidt O et al., 2005), las bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* tienen en su pared celular GluNAc o GalNAc- MurNAc (L-alanina-D-isoglutamina-L-lisina-D-alanina) (Perry AM et al., 2002) y, de las gram negativas; *Escherichia coli* tiene Neu5Aca3Galβ4-

Glc β Cer o Glc y GalNAc (Varki A, 2009) y, *Bacillus cereus* GlcNAc y Glc (Leoff Ch *et al*, 2008), azúcares a los cuales las lectinas presentes en la fracción sin pigmentos tienen afinidad.

Las lectinas: VCL-1, VCL-2 y VCL-3 mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una CIM de 91.5 μ g/mL, 68.7 μ g/mL y 22.5 μ g/mL, lo que sugiere que estas lectinas reconocen al carbohidrato terminal de esta bacteria (GluNAc o GalNAc- MurNAc) e inhiben su crecimiento. En consecuencia; se demuestra que las lectinas de la Capitaneja (*Verbesina crocata*) tienen actividad antibacteriana. Como es el caso de diversas lectinas aisladas de plantas, por ejemplo: *Phthirusa pyrifolia*, *Eugenia nodiflora*, *Myracrodruon urundeuva*, entre otras (Costa *et al.*, 2010; Oliveira MDI *et al.*, 2008; Sá RA *et al.*, 2009).

Finalmente se realizó en análisis antibacteriano con los pigmentos alcohólicos y acetónicos, en los cuales se encontraron efectos antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 y *Escherichia Coli* ATCC 25922, por lo que se puede concluir que la actividad antibacteriana encontrada en el extracto crudo es causada tanto por las lectinas como por los componentes presentes en los pigmentos en esta planta, que pueden ser carotenoides, terpenoides o flavonoides, estos últimos son sustancias naturales que se encuentran ligados, la mayoría de las veces, a carbohidratos y se les atribuye actividad antibacteriana (Monge E *et al*, 1984; Avilés A *et al.*, 2008; Tereschuk ML *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que este es el primer estudio de pigmentos alcohólicos y acetónicos con actividad antibacteriana de la Capitaneja (*Verbesina crocata*), de tal manera que, este análisis junto con la purificación de las lectinas, su caracterización bioquímica y la determinación de su actividad frente a una cepa bacteriana patógena, representan los primeros reportes que se tienen de esta planta a nivel mundial y con ello, queda cumplido el objetivo de este trabajo.

X.- CONCLUSIONES

- La Capitaneja (*Verbesina crocata*) tiene una mezcla de lectinas en el extracto crudo y fracción sin pigmentos afines a los cuatro grupos sanguíneos humanos (A₁, A₂, B y O) principalmente para el grupo sanguíneo B.
- La fracción sin pigmentos contiene 13 proteínas con pesos moleculares aparentes de 3 000 hasta 122 000 Da.

De las lectinas purificadas:

- VCL-1 tiene un peso molecular aparente de 14 583 Da, es afín a N-acetilgalactosamina, no es dependiente de cationes y tiene un punto isoeléctrico de 8.1
- VCL-2 tiene un peso molecular aparente 20 290 Da, es afín a N-acetilgalactosamina, tiene dependencia con los iones: Ca²⁺ y Mg²⁺ y, un punto isoeléctrico de 7.9.
- VCL-3 tiene un peso molecular aparente de 12 075 Da, es afín a galactosa dependiente de Ca²⁺ y K⁺ y, un punto isoeléctrico de 8.5.
- El extracto crudo, fracción sin pigmentos, las lectinas purificadas así como pigmentos alcohólicos y acetónicos tienen actividad antibacteriana contra las cepas bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 27943, *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Bacillus cereus* ATCC 14579.

XI.- PERSPECTIVAS

- Determinar la estructura secundaria de VCL-1, VCL-2 y VCL-3 por dicroísmo circular.
- Determinar la secuencia de aminoácidos de VCL-1, VCL-2 y VCL-3
- Realizar de curvas de crecimiento bacteriano, con el fin de reforzar y evidenciar el efecto antibacteriano de las lectinas y extractos de Capitaneja (*Verbesina crocata*)

XII.- ANEXO 1. IDENTIFICACION Y CLASIFICACIÓN CIENTIFICA DE CAPITANEJA



Morelia, Michoacán a 11 de julio de 2011.

A quien corresponda

Por medio de la presente, se informa que el ejemplar botánico entregado al Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Colectado en la calle Durazno S/N de la colonia Valle Verde en la ciudad de Uruapan, Michoacán., el día 3 de diciembre del 2010. La clasificación taxonómica se realizó en base a McVaugh, R., 1984. Compositae. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 12. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan. El nombre científico al que se llegó del espécimen de hojas y flores fue a *Verbesina crocata* (Cav.) Less. Su Clasificación Taxonómica es:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae o Compositae
Tribu: Heliantheae
Género: *Verbesina*
Especie: *Verbesina crocata*

Sin otro en particular.

ATENTAMENTE


M. en C. Ma. Alma Chávez Carbajal.

Curadora de la Colección de Angiospermas del
Herbario de la Facultad de Biología.



Correo electrónico: tagetes7@hotmail.com.

XIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz P, Peñaloza ME y Correa N. **2001**. Prácticas medicinales caseras con principios activos de vegetales. Cátedra de toxicología. UNT. Pág. 1
- Alemán JA, Fenton B. **2011**. Lectinas de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) purificación y su función vasorelajadora. Tesis de Maestría. UMSNH. Pág. 33.
- Alexander SA, Cibulsky AM, Lerner RA. 1983. Ion dependence of the discoidin I lectin from *Dictyostelium discoideum*. Differentiation. 2 (3): 209-212.
- Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. **2005**. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. Org Biomol Chem. 3(9): 1593-1608.
- Angulo Y. **1999**. Bioquímica. Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. Pág. 25-27
- Argueta A, Cano LM, Rodarte ME. **2009**. Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana. Introducción. ISBN: 968-29-7323-6. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- Avilés A, Bermúdez K, Herrera ML. **2008**. Efecto antidepresivo y caracterización química de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*. Tesis de Maestría. IPN. Pág.
- Barre A, Van Damme EJM, Peumans WJ, Rouge P. **1996**. Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding Lectins. J. Plant Physiol. 112(4): 1531-1540
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45(4): 493-496.
- Beltrán Y, Morris HJ, De la Cruz E, Quevedo Y, Bermúdez RC. **2013**. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. Rev Cubana Invest Bioméd. 32 (2): 121-129.

- Bermúdez MP. **2009**. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. Los principios activos de las plantas medicinales y aromáticas. UPM. Pág. 56. Curso online. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales>.
- Bonay PM, Fresno M. **2000**. Lectins from tropical sponges. J. Biol. Chem. 275; 29283-29289.
- Bradford MM. **1976**. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Bye R, Estrada LE, Linares M.E. **1995**. Recursos genéticos en plantas medicinales de México en Ortega, P.R. *et al.*, (eds). Avances en el estudio de los recursos fotogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Pag. 341-359
- Caballero JL, Muñoz J, Moyano E. **2006**. Cromatografía de filtración en gel. UNC. Disponible en URL: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/>
- Cammue B, Stinissen HM, Peumans WJ. **1985**. Lectin in Vegetative Tissues of Adult Barley Plants Grown under Field Conditions. J Plant Physiol. 78(2): 384-387.
- Caramelo JJ. **2009**. La dulce vita: el papel de los azúcares en la biosíntesis de glicoproteínas. Química viva. 8 (2): 80-105
- Castillo A *et al.* **2007**. Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *escumite*: Chemical Characterization, Sugar Specificity, and Effect on Human T-Lymphocytes. J. Agric. Food. Chem. 55: 5781-5787.
- Castillo A, Abdullaev F. **2005**. Lectinas vegetales y sus efectos sobre el cáncer. Rev Invest Clin. 57 (1); 55-64.
- Cona E. **2002**. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev. Chil. Infectol. 19:77-81.
- Cruz A, Rodríguez AJ. **2013**. Efecto de la fracción Concentrada en lectina de frijol térapí (*Phaseolus acutifolius*) en médula ósea de ratas. Tesis de Licenciatura. UAQ. Pág 5.

- 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.
- Días A, Salcedo FG. 2000. Proteínas de defensa como potenciales panalergenos vegetales: Quitinasas de clase I y Proteínas de Trasferencia de Lípidos. Tesis Doctoral. UPM. Pág. 12-14.
- Dreywood R. **1946**. Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chem. Anal. 18 Ed. Pág. 449.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. **1956**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Echandi CIN, Aragón F. **1991**. Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina del poró *Erythrina costaricensis* (Leguminosae). Rev. Biol. Trop. 39 (1): 15-21.
- Elola, MT, Fink N. E. **1995**. Lectinas. I. Plantas Vasculares y Celulares. Acta Farm. Bonaer. 14 (1): 49-61.
- Faleiro PL, Soriano F. **2010**. Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis Doctoral. UCM. Pág. 28-29. ISBN: 978-84-692-8575-6
- Fenton B. **2009**. Glicobiología una ciencia dulce. Revista "DESDE las Ciencias de la Salud". Disponible en: <http://dieumsnh.qfb.umich.mx/glicobiologia.htm/>
- Fernández J. **2004**. De la tesis doctoral de Tiselius a la proteómica: setenta y cinco años de electroforesis de proteínas. Arbor. 698: 259-284.
- Figueroa R. **2002**. Evaluación de extractos vegetales contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. Pág. 14-24
- FAO. **2001**. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. ISBN 92-5-304600-7. Disponible en URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/x9800s/x9800s.pdf>

- Folch J, Lees M, Sloane GJ. **1956**. A simple method for the insolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226: 497-509.
- Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert H-Ch. **2002**. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572: 165-177.
- Gallego del Sol F, Nagano C.S, Cavada BS, Sampaio AH, Sanz L, Calvete JJ. **2006**. Lectinas. *Investigación y ciencia*. 361: 58-67.
- Gil PA, Fenton B. **2011**. Purificación y caracterización bioquímica y antibacteriana de lectinas de hojas de chaya (*Cnidioscolus chayamansa*). Tesis de Maestría. UMSNH. Pág. 44
- Gomes BS *et al.* **2012**. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. *Brazilian Journal of Microbiology*. Pág. 770-778. ISSB. 1517-8382.
- González JM. **2012**. Reacciones químicas de los hidratos de carbono. Disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar4.htm#r5>
- Harada H, Kondo M, Yanagisawa M, Sunada M. **1990**. Mucin-specific bark lectin from elderberry *Sambucus sieboldiana* and its applications to the affinity chromatography of mucin. *Analytical Biochemistry*. 189: 262-266.
- Hersch P. **2009**. La flora medicinal en comunidades indígenas. En: México Nación Multicultural. Instituto Nacional de Antropología e Historia. SIPIG-UNAM. Disponible en URL: <http://www.nacionmulticultural.unam>.
- Hernández C, Aguilera MG, Castro G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol*. 31(4): 137-151.
- Hernandez J y Fenton B. **2011**. Lectinas en hojas de ruda (*Ruta graveolens*). Purificación y caracterización. Tesis de Licenciatura. UMSNH. Pág. 38, 41.
- Hernández P, Pérez E, Martínez L, Ortiz B y Martínez G. **2005**. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Rev de Educ Bioq. UNAM. México*. 24 (1): 21-27.
- Hoogerteger C. **1994**. Uso de las plantas medicinales. Editorial Árbol. Quinta edición. Pág. 10. ISBN: 968-461-088-2.

- Hurtado NE, Rodríguez C, Aguilar. **2006**. Estudio cualitativo y cuantitativo de la flora medicinal del municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México. *Polibotanica*. 22: 21-50.
- Jain SC, Singh R, Jain R. **2008**. Antimicrobial and Antioxidant Potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. And Hook. Fil ex Gray. *Research Journal of Medicinal Plant* 2 (2): 61-65.
- Jehan B, Amjad I, Mohammad S. **2011**. Antimicrobial potentials of *Eclipta alba* by well diffusion method. *Med Plants. Pak. J. Bot.*, (43): 169-174.
- Kannan VW, Appukuttan PS. **1993**. Sugar-specific interaction of bovine brain galactoside-binding lectin with endogenous gangliosides. *J Biochem Biophys*. 30(2): 111-6
- Karnchanatat A. **2012**. Antimicrobial Activity of lectins from plants. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Antimicrobial Agents*. Dr. Varaprasad Bobbarala (Ed). ISBN: 978-953-51-0723-1. DOI: 10.5772-33456
- Kierdorf H, Melzer H, Mann H, Sieberth HG. **1993**. Differentiation of proteins in polyacrylamide gels by a modification of silver staining for the PhastSystem and a laser densitometer. *Electrophoresis*. 14 (8): 820-2
- Kögel I. **2002**. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil. Biology & Biochemistry*. 34: 139-162.
- Konozy EHE et al. **2002**. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. *Biochimie*. 84: 1035-1043.
- Kuwahara I, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y, Miyazawa K, Furukawa K. **2003**. Changes in N-glycosylation of human stromal cells by telomerase expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 301: 293–297
- Laemmli UK., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-683
- Laguna J. Piña E. **2009**. *Bioquímica de Laguna*. 5a. Edición. Editorial el Manual Moderno. Pág. 261.

- Leoff Ch, Saile E, Sue D, Wilkins P, Quinn CP, Carloson RW, Kannenberg EL. **2008**. Cell Wall Carbohydrate Compositions of Strains from the *Bacillus cereus* Group of Species Correlate with Phylogenetic Relatedness. *J. Bacteriol.* 190 (1): 112.
- Licata M. **2012**. Carbohidratos, hidratos de carbono o glúcidos. Nutrición. Disponible en: <http://www.zonadiet.com/nutricion/hidratos.htm>.
- Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. **1998**. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1383 (1): 9–36
- Mamani E, Luján D, Pajuelo G. **2006**. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *An. Fac. Med.* 67 (2): 120-124.
- Martínez D. **2010**. Historia de las plantas Medicinales. Disponible en URL: <http://www.botanical-online.com/funcionesplantas.htm>.
- Martínez M. **1979**. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. ISBN: 9681600118. Pág. 356
- Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. **2002**. Bioquímica. 3^{ra} Edición. Editorial Pearson. Pág. 141-224.
- McVaugh, R. **1984**. Compositae. Flora Novo-Galiciana. Ann Arbor. The University of Michigan Press. 12: 1984-1157. ISBN 0-472-04812-0.
- Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. **2007**. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara). *IDESIA.* 25 (2): 49-58.
- Miyake K, Tanaka T, McNeil PL. **2007**. Lectin-Based Food Poisoning: A New Mechanism of Protein Toxicity. 2 (8): e687.
- Monge E, Val J, Heras L. **1984**. Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores por HPLC. *An. Estac. Exp. Aula Dei.* 17(1-2): 60-66
- Mora FD, Alpan L, Tommasi N, McCracken VJ, Nieto M. **2013**. New Antibacterial Germacrene from *Verbesina negrensis*. *Planta Med.* 79(8): 707-10.
- Nagano CS. **2007**. Estudios Estructurales de Lectinas de Algas Marinas y de Vegetales Superiores. Tesis Doctoral. UPV. Pág.5-9

- Nascimento KS, Cunha AI, Nascimento KS, Cavada BS, Azevedo AM, Aires MR. **2012**. An overview of lectins purification strategies. *J. Mol. Recognit.* 25: 527-541.
- Nomura K, Ashida H, Uemura N, Kushibe S, Ozaki T, Yoshida M. **1998**. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry.* 49(3): 667-673.
- Ochoa SA *et al.* **2013**. Caracterización patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociados con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 70 (2): 138-150.
- Oliveira JTA *et al.* **2002**. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry.* 61:301-310.
- Paiva PMG, Gomes FS, Napoleao TH, Correia RA, Coelho LCBB. **2010**. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 1: 396-406
- Paris G. **2007**. Purificación de proteínas. *Bioquímica I.* Disponible en: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/Bioquimical/>
- Perales C. **2008**. Aproximación a la fitoterapia. Granada Farmacéutica. Disponible en URL: [http://www.granafarmaceutica.com/pdf/formacion%202\(1\).pdf](http://www.granafarmaceutica.com/pdf/formacion%202(1).pdf).
- Perry LM. **1980**. *Medicinal plants of East and Southeast Asia* MIT Press. Cambridge MA. Pp. 620
- Perry AM, Ton-That H, Mazmanian SK, Schneewind O. **2004**. Anchoring of surface proteins to the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol Chem.* 277 (18): 16241-16248.
- Peumans WJ, Van Damme EJM. **1995**. Lectins as plant defense proteins. *J. Plant Physiol.* 109(2): 347-352.
- Pérez M, Mota M. **2008**. Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* Disponible: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>

- Porto A. 2013. Curso de biología. Proteínas. Departamento de biología-geología. Disponible en URL: <http://www.bionova.org.es/biocast/tema08.htm>
- Ramírez JS. **2006**. Liofilización de alimentos. Universidad del Valle. Recitela. 6(2): 8-11.
- Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D, Velazco E. **2001**. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, acetónicos y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon). Revista de la Facultad de Farmacia. 42: 43.
- Reyes AL, Fenton B. **2011**. Purificación y Caracterización de Lectinas de Capitaneja (*Verbesina crocata*). Laboratorio de Glicobiología. UMSNH.
- Rodríguez M.V, Riquelme B, Valverde J, Gattuso S. **2004**. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Univ Nac Ros. ANALES AFA 16 (247). ISSN: 0327-358 X
- Rojas H, Matos M, Romeu B. **2004**. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav. Rev Cubana Plant Med. 9 (2). ISSN 1028-4796
- Roitt I, Delves P, Martín S y Burton D. **2008**. Inmunología. Fundamentos. 11^a Ed. Editorial Médica Panamericana. Pág. 387.
- Salgado JD y Valadez MC. **2006**. Purificación y caracterización bioquímica y fisicoquímica de lectinas de frijol y amaranto cultivados en el estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. UAH. Pág. 54-55.
- Schmidt O, Rahman MM, Ma G, Sun Y, Sarjan M, Fabbri M, Roberts H. **2005**. Mode of action of antimicrobial proteins, pore-forming toxins and biologically active peptides (Hypothesis). Rev. Faculty of Sciences, Univ of Adel, Glen Osmond. ISJ 2: 82-90.
- Sharmin RC, Shahana A, Tasnuva S, Farhana I. Tasdique MQ. **2013**. Antimicrobial Activity of five medicinal plants of Bangladesh. Dep of Phar, Univ of Bangladesh. IC Journal. ISSN 2278- 4136 (2): 2668735-5
- Sharon N, Lis H. **1990**. Legume lectins: a large family of homologous proteins. The FASE Journal. 4(14): 3198-3208.

- Sharon N, Lis H. **1993**. Carbohydrates in Cell Recognition. Scientific American. 268(1):82-89
- Sharon N, Lis H. **2004**. History of lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. Glycobiology 14 (11): 53R-62R.
- Shet MS, Madaiah M. **1987**. Distribution of lectin activity at different stages in the tissues of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.). Plant Science. 53(2): 161-165.
- Simon RH, McCoy JP, Chu AE, Dehart PD, Goldstein IJ. **1986**. Binding of *Griffonia simplicifolia* I lectin to rat pulmonary alveolar macrophages and its use in purifying type II alveolar epithelial cells. Bioquímica et Biophysica. 885: 34-42.
- Stoichita A, Scanlon Ch. **2012**. Determination of the Molecular Weight of an Unknown Protein Using Size Exclusion Chromatography. University of South Carolina. Disponible en URL: <http://biomed.engr.sc.edu/>
- Sohaimy AL, Hafez EE, Abdelwahab AE, Saadani MA. **2007**. Anti-Hcv Lectin from Egyptian Pisum sativum. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 1 (3): 213-219.
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. **2003**. Bioquímica. 5^{ta} edición. Reverte. Barcelona. Pág. 312-318.
- Sylvester W, Ravichandran S. **2012**. Hemolymph proteins in marine crustaceans. Asian Pac J Trop Biomed 2(6): 496-502.
- Tello R, Fenton B. **2009**. Actividad antibacteriana de plantas con actividad hemaglutinante. Tesis de licenciatura. UMSNH. Pág. 33.
- Tenorio A. *et al.*, **2010**. Variabilidad en la sensibilidad de tigeciclina frente a *Acinetobacter baumannii* en diferentes medios de cultivos. Hosp Clin Univ Vall. Rev Esp Quimioter. 23(2):73-80.
- Tenorio P. **2012**. Malezas de México. Asteraceae Compositae. Verbesina crocata (Cav.) Less. Capitaneja. Disponible en URL: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/verbesina-crocata/fichas/pagina1.htm>.

- Tereschuk ML, Quarenghi MV, Gonzáles M, Baigori MD. **2007**. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de Tagetes del NOA. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat. 6 (6): 364-366.
- Toledo T, Nagem TJ, Rocha M, Marciano L, Magalhaes N. **2004**. Propiedades biológicas de los tintes naturales. Dep de Bioq e Biol Molec. Univ Fed Vic. 45(1):5-20.
- Torres A, Hernández IL, Barreyro A. **2014**. Implementación de la técnica de Folch para la extracción de grasas en frío. UAQ. Disponible en URL: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/>
- Turner MV. **2003**. The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol. 40(7):423-9.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Rouge P. **1998**. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related with diverse biological roles. Crit rev Plant Sci. 17(6):575-692.
- Vandendorre G, Van Damme EJM, Smagghe G. **2009**. Natural Products: Plant Lectins as Important Tools in Controlling Pest Insect. Biorational Control of Arthropod Pests. Pág. 163-187 ISBN 978-90-481-2315-5.
- Varki A., Cummings R, Esko L., Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G, Etzler M. **2009**. Essentials of Glycobiology. 2ª Ed. CSH. PRESS. E.U.S.
- Vibrans H. **2011**. Asteraceae. Compositae. *Verbesina crocata* (Cav.) Less. Capitaneja. Malezas de México. Disponible en URL: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/verbesina-crocata/fichas/ficha.htm>
- Voet JD. **2003**. Bioquímica. Wiley and Sons. USA. 3º Ed. Pág. 79-114
- Winzler RJ. **1961**. Determination of serum glycoproteins. Methods of Biochemical Analysis. Interscience. Nueva York. Pág. 290.
- Zenteno E, Ochoa J. **1988**. Insolation and purification of Amaranthus leucocarpus lectin on stroma column. Phytochem. 27:313-317.
- Zuo Z, Fan H, Wang X, Zhou W, Li L. **2012**. Purification and characterization of a novel plant from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. Springerplus. 1:13.