

6
Fey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLÁN"

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
FITOHEMAGLUTININA AISLADA DE Phaseolus
vulgaris: COMPORTAMIENTO CON
ALGUNOS CATIONES DIVALENTES.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LETICIA CARRETO MACIAS

Director de Tesis:
M. EN C. RICARDO SANTIAGO DIAZ

A s e s o r :
M. V. Z. BENITO LOPEZ BAÑOS

Cuautitlán, Izcalli, Edo. de Méx.

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
1.- Propiedades fisicoquímicas de algunas lectinas	4
2.- Usos de la Fitohemaglutinina	13
3.- Métodos de Purificación	13
4.- Objetivos	22
5.- Hipótesis	23
III.- MATERIAL Y METODOS:	
1.- Extracción	25
2.- Determinación de Proteínas	28
3.- Hemoaglutinación en presencia de cationes	29
4.- Diálisis	30
5.- Cromatografía	31
6.- Modelo matemático y análisis de varianza	33
IV.- RESULTADOS	34
V.- DISCUSION DE RESULTADOS	103
VI.- CONCLUSIONES	106
VII.- BIBLIOGRAFIA	108

R E S U M E N

La existencia de la Fitohemaglutinina en las semillas de muchas especies de plantas particularmente de las leguminosas ha sido conocido por muchos años por sus propiedades mitogénicas, eritroaglutinantes y luecoaglutinantes. La Fitohemaglutinina (PHA) de Phaseolus vulgaris es una glucoproteína tetramérica compuesta de dos diferentes subunidades (E. y L.) las cuales existen en cinco diferentes combinaciones.

El mecanismo por el que induce la mitosis no es conocido exactamente, así como es desconocida también la unión con ciertas proteínas del suero humano. La actividad hemoaglutinante varía dependiendo de la fuente de origen, para algunas Fitohemaglutininas es necesaria la presencia de catio-

nes como Ca^{2+} y Mn^{2+} para llevar a cabo dicha actividad.

En este trabajo se observó que la PHA del frijol negro pierde su actividad hemoaglutinante conforme fué aumentándose la temperatura ($40^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$), probándose por lo tanto la actividad en presencia de diferentes cationes. En donde el Zn^{2+} le confirió estabilidad hasta los 80°C a un pH de 4.0 a excepción del Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} . El comportamiento de la actividad hemoaglutinante es diferente en presencia de cationes aún perteneciendo estos a una misma familia.

Por cromatografía en DEAE celulosa se encontraron cuatro fracciones en la PHA del frijol negro que varían en su actividad hemoaglutinante.

En conclusión un método de extracción puede ser a un pH de 4.0 en presencia de Zn^{2+} o a un pH de 7.4 en presencia de Co^{2+} o Zn^{2+} lográndose una purificación comparable con la PHA comercial.

I N T R O D U C C I O N

Las lectinas o Fitohemaglutininas son glucoproteínas con capacidad de aglutinar células, las que son generalmente extraídas de plantas como leguminosas (36). La estructura primaria de algunas lectinas es similar entre los segmentos de los primeros 24 residuos de aminoácidos (16), mediante pruebas de hemoaglutinación, inmunodifusión y electroforesis hay evidencia de que las lectinas tienen distribución en todas las partes de la planta con diferentes porcentajes (7). Y que tienen algún papel en la asociación que hay entre las raíces de las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* que son fijadoras de Nitrógeno, las cuales se encuentran en las raíces de los vegetales. Estas bacterias son introducidas formando posteriormente nódulos fijadores de Nitrógeno, indispensable para la planta (3).

Las lectinas han tenido interés por sus efectos en una gran -- variedad de sistemas biológicos (35), siendo algunas de las propiedades que se les atribuyen:

- 1).- Propiedades mitogénicas en cultivo de linfocitos (9, 24).
- 2).- Propiedades hemoaglutinantes y leucoaglutinantes (22, 31).
- 3).- Trastornos en ratones cuando se administra por vía peritoneal (34).
- 4).- Precipitación con algunas proteínas del suero de pacientes normales (14, 17 y 33).
- 5).- Aglutinación de células transformadas después de una infección viral (18).
- 6).- Unión de bacterias fijadoras de Nitrógeno en leguminosas y protección contra Fitopatógenos (3 y 18).

Tomando en cuenta la unión de las lectinas a azúcares específicos en forma reversible se han diseñado métodos de purificación, dependiendo de las características de la lectina que se trate; dado que hay una gran variedad (18).

I.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE ALGUNAS LECTINAS.

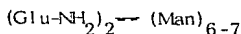
A.- Fitohemaglutinina del frijol rojo (Phaseolus vulgaris).- Rigas (1951) realiza un método para obtener esta Fitohemaglutinina como una gluco-proteína, la que a un pH igual 1.0 se disocia en dos partes; en una proteína hemoaglutinante y en un polisacárido inactivo. En un estudio posterior (1955)

del mismo autor se llevó a cabo un método de purificación considerándola una proteína y se observó que:

La glucoproteína se comporta como una sustancia homogénea en electroforesis arriba del rango de pH de 5.8 - 8.6. Por abajo de un pH de 5.8 se disocia en una proteína aglutinante y un polisacárido inactivo. La glucoproteína es soluble en agua, solución salina al 1%, soluciones buffers a pH de 2.0 y 8.0, termolábil y tiene un pI de 5.8.

La proteína se comporta también como una sustancia homogénea en electroforesis sobre un rango de pH de 2.0 - 8.0. Por electroforesis se encontró un solo componente que a un pH de 2.0 se comporta como catión. La proteína es insoluble en agua, soluble en soluciones salinas al 0.85%, en soluciones buffers a pH de 2.0, 6.4 y 8.0, tiene un pI de 6.5 y es mucho más activa que la glucoproteína.

Debido a las propiedades que se le encontraron de hemoaglutinación y de iniciación de la mitosis (9 y 22), surgió la duda de si éstas eran individuales y si se podrían separar, diseñándose métodos de purificación. Lográndose en un principio separar dos fracciones con diferentes propiedades fisicoquímicas identificadas como Fitohemaglutinina-E (E-PHA) y la Fitohemaglutinina-L (L-PHA) las cuales son idénticas en los aminoácidos del 8 - 24 (32). Ver tabla 1.



Phe-Glu-Arg-Phe-Asn-Glu-Thr-Asn-Leu-Ise-Leu-Gln-Arg-Asp-Ala-Ser-Val

Hay una apreciable diferencia entre las fracciones por su composición de aminoácidos, especialmente glicina, ácido aspártico, serina y por su contenido de carbohidratos (24 y 45).

- 1).- La E-PHA llamada así por ser un tetrámero formado por subunidades idénticas con un peso molecular de 34,000 g/mol c/u por lo que se representa como E_4 , potente eritroaglutinante, poco mitogénica (31).
- 2).- La L-PHA formada también por cuatro subunidades de un peso molecular de 34,000 g/mol c/u representándose L_4 , potente mitógeno con poca actividad hemoaglutinante (24 y 31).

Ambos tetrámeros mostraron habilidad de unión a ciertas proteínas del suero humano como la tiroglobulina humana (17) por lo que Felsted y Leavitt (1975) diseñaron un método de purificación usando la tiroglobulina porcina uniéndola a la Sefarosa (13). Posteriormente Miller (1975) supone que la PHA está compuesta de cinco fracciones que son heterogéneas por sus propiedades fisicoquímicas. Por cromatografía, cada miembro tiene una relación estequiométrica de las subunidades E y L formando tetrámeros llamados isolectinas las cuales están unidos por enlaces no covalentes en proporciones variadas (4L, 3L 1E, 2L 2E, 1L 3E, 4E), las estructuras híbridas sirven para explicar el efecto de aglutinación en mezclas de eritrocitos y leucocitos. Aunque las isolectinas son del mismo peso molecular difieren en su pl y en la secuencia

de aminoácidos (31 y 32). Estos trabajos fueron complementados por Leavitt y Falsted (1981). Ver la tabla 2.

	P.M. g/mol	S _{20W}	pl	Catión	Rf	c.e.	Ref
L ₄	115 000	6.5S	5.0	+	22.5-34.4	3.6	28
	140 000	6.8S	5.25				38
	142 000	7.0S	5.5				42
E ₄	150 000	7.1S	6.5	++	23.5	6.0	38
	142 000	7.2S	5.95				42

P.M. = Peso molecular

S_{20W} = Coeficiente de sedimentación

pl = Punto isoeléctrico.

Rf =

C.E. = Coeficiente de extinción

Ref = Referencia

TABLA N^o 1.- Algunas propiedades fisicoquímicas de los tetrámeros de la PHA obtenidas por diferentes autores.

TABLA 2.- Composición de aminoácidos y carbohidratos de cada una de las isolectinas encontradas en el frijol rojo por Leavitt y Felsted (1981).

ISOLECTINAS	mol/mol* L ₄	mol/mol* L ₃ E ₁	mol/mol* L ₂ E ₂	mol/mol* L ₁ E ₃	mol/mol* E ₄
Acido Aspártico	149 ± 7.8	146 ± 9.8	151 ± 10	141 ± 2.1	145 ± 1.8
Acido Glutámico	59.7 ± 3.0	62 ± 5.6	64.4 ± 1.1	62.0 ± 5.1	58.8 ± 2.4
Treonina	82.9 ± 7.5	88.2 ± 7.3	99.1 ± 3.6	98.3 ± 5.3	105 ± 4.4
Serina	101 ± 10	101 ± 11	109 ± 2.8	99.5 ± 11	103 ± 5.1
Prolina	30.4 ± 3.5	37.3 ± 3.1	36.6 ± 3.6	34.0 ± 1.8	39.3 ± 4.0
Glicina	69.8 ± 3.1	70.6 ± 6.2	71.0 ± 2.3	65.0 ± 5.2	60.9 ± 2.6
Alanina	56.7 ± 3.4	61.0 ± 5.3	64.9 ± 2.4	66.4 ± 3.6	66.2 ± 3.8
Valina	76.2 ± 6.1	76.9 ± 7.5	77.1 ± 0.9	75.6 ± 5.3	75.1 ± 6.1
Isoleucina	46.2 ± 4.2	47.3 ± 3.0	52.7 ± 4.5	51.7 ± 4.3	51.5 ± 3.1
Leucina	91.3 ± 6.4	100 ± 8.3	107 ± 6.0	109 ± 5.4	109 ± 3.0
Fenilalanina	61.6 ± 3.0	63.1 ± 4.9	61.5 ± 3.9	58.2 ± 2.7	57.6 ± 1.4
Triptofano	26.3 ± 1.8	24.9 ± 2.6	23.8 ± 1.3	22.1 ± 0.7	23.1 ± 0.5
Tirosina	20.3 ± 1.1	22.8 ± 1.7	25.4 ± 2.6	25.6 ± 1.3	24.7 ± 1.3
Lisina	36.5 ± 2.4	41.9 ± 4.1	46.4 ± 1.1	51.5 ± 2.6	55.6 ± 2.2
Arginina	34.4 ± 2.7	32.0 ± 4.5	28.5 ± 1.7	24.7 ± 0.7	21.9 ± 0.7
Histidina	9.8 ± 1.8	11.7 ± 3.2	11.5 ± 3.1	12.6 ± 2.3	13.6 ± 3.0
Manosa	30.5	31.7	30.6	32.7	31.9
N-Acetil-D Glucosamida	14.0	12.3	14.2	14.5	13.7

* mol de a.a. o azúcares/12 600 g. de isolectinas.

Se realizaron estudios de las fracciones E_4 y L_4 por su afinidad de unión con glucoproteínas del suero humano para ver la modulación en la transformación linfocítica para inducir la mitosis. Encontrándose que la E_4 tiene afinidad por 14 proteínas mientras que la L_4 solo muestra afinidad por nueve. La IgM, IgA, IgG, α_2 macroglobulina, lipoproteína y la heptaglobina muestra fuerte reactividad con la E_4 y la Heptaglobina, IgG e IgA con la L_4 . Estas reacciones varían cuando se prueban con los sueros de 14 diferentes animales, por lo que se piensa en una especie de competición entre las glucoproteínas del suero y las fracciones de la PHA por el sitio receptor de la membrana linfocítica (17).

Las reacciones de hemoaglutinación y mitogénica de la PHA se piensa que son mediadas por los complejos de carbohidratos los cuales se unen a la membrana celular, las reacciones de precipitación presumiblemente involucran la combinación de la PHA con carbohidratos solubles contenidos en el suero. La naturaleza de la precipitación lectina-glucoproteína no es muy clara así como el tipo de unión (14).

Hay probabilidades de que haya determinantes químicos o estructurales involucrados en la precipitación de las proteínas del suero humano, en el que se vio que no eran específicas ya que involucran: macroglobulinas, lipoproteínas e inmunoglobulinas (33 y 44).

Al principio se decía que la aglutinación de eritrocitos no era específica para algún grupo sanguíneo, viéndose después que algunas lectinas sí mostraban especificidad como la del frijol lima (18). Sin embargo a pesar de que la PHA de frijol rojo aglutina todos los grupos sanguíneos del sistema

ABO se ve que hay preferencia por el grupo A, después el grupo O, y por último el grupo B (12).

Por lo que se llevaron a cabo pruebas de inhibición de la hemoaglutinación por algunos azúcares para examinación del sitio de unión y especificidad de la lectina utilizando el grupo A, resultando ser: 2-acetamido-2 deoxi-D-galactosa (8 - 10 M) y D-galactosa (22 M), los que logran a estas concentraciones inhibir el 50% de la hemoaglutinación (12). En células de conejo la actividad hemoaglutinante varía de mayor a menor en las isolectinas: 4E, 1L 3E, 2L 2E, 3L 1E, 4L y la actividad mitogénica es en forma inversa.

Se cree que la activación de los linfocitos depende de la reacción sobre su membrana que sufre por una gran variedad de agentes transformantes que no tienen especificidad inmunológica entre los que se incluyen los Fitomitógenos como la Fitohemaglutinina, la Concanavalina A, así como productos bacterianos y sales inorgánicas como Cloruro de Mercurio (43).

Los Fitomitógenos pueden clasificarse en dos grupos en base a sus especificidades, como lo muestran los ensayos de inhibición de la actividad mitogénica con azúcares simples. Un grupo, en el que se incluye Phaseolus vulgaris es inhibido por N-acetil-D-galactosamina y el otro en el que incluye la Concanavalina A (Con A) que son inhibidos por D-manosa. Estas observaciones nos indican que por lo menos dos sitios receptores sobre la superficie celular del linfocito están involucrados, ambos Fitomitógenos se unen a la misma región del glucopéptido en la inhibición y puede ser en diferentes proporciones de glucopéptido en el caso de Phaseolus vulgaris y Lens culinaris (39).

La redistribución de enzimas como la beta-glucuronidasa y fosfatasa ácida en linfocitos humanos estimulados por la PHA pueden jugar un papel en los procesos de modificación de las células estimuladas en su superficie y en el metabolismo de la misma (21).

También se plantea que la aglutinación linfocítica por otro lado es necesaria para la transformación del linfocito para llevar a cabo la mitosis (28 y 29). Así como se ha visto que es necesaria la presencia de pequeñas cantidades de eritrocitos para efectuarse la actividad mitogénica (6×10^6 eritrocitos/ml, 1.5×10^6 linfocitos/ml) sin embargo concentraciones más altas son inhibitorias (44).

B.- Concanavalina A (Con A).- Obtenida del frijol judía (Canavalia ensiformis), es la más investigada, consta de cuatro subunidades con un P.M. = 25,500 g/mol c/u, y están compuestas por 238 A.A.; aglutina eritrocitos de varias especies, así como microorganismos, los metales de transición como el Mn^{2+} es necesario para la unión de Ca^{2+} y ambos son necesarios para la unión de los sacáridos (18).

C.- Fitoheماغlutinina de soya (Glycine max).- Su P.M. = 100,000 g/mol determinado por ultracentrifugación, parece estar formada de cuatro subunidades idénticas cuyo P.M. es de 30,000 g/mol c/u, contiene 4.5% de D-manosa y 1.2% de N-acetil-D-glucosamida, aglutina eritrocitos o cultivo de células transformadas después de una infección viral y esta propiedad es inhibida por N-acetil-D-galactosamina (18).

D.- Fitoheماغlutinina de gérmen de trigo (Triticum vulgare).- Su

P.M. es de 23,000 g/mol cada una de sus ocho subunidades formando una figura cíclica, tiene un marcado contenido de Cistina (18%), Glicina (22%) así como de 3 - 4 mol de glucosa, 1 - 2 mol de xilosa y de 1 - 2 mol de hexosamina, aglutina eritrocitos y tiene especificidad por las células transformadas por virus (18).

E.- Fitohemaglutinina de frijol lima (Phaseolus lunatus).- Está compuesta de dos subunidades con un P.M. = 39,000 - 48,000 g/mol cada una respectivamente, es mitogénica, contiene Mn^{2+} y Ca^{2+} que es importante para su actividad hemoaglutinante, tiene especificidad por el grupo sanguíneo A (18).

F.- Fitohemaglutinina de frijol castor (Ricinus communis).- Tiene un P.M. = 46,000 g/mol y contiene 3.7% de azúcares como galactosa, manosa y fucosa, tiene fuerte actividad hemoaglutinante y efectos tóxicos en ratones pero se pueden separar las actividades por cromatografía de intercambio iónico. Ha sido probada en sangre de conejo y una fracción es más fuertemente inhibida por los azúcares unidos a D-galactosa (18).

G.- Fitohemaglutinina de frijol judía (Phaseolus vulgaris).- Tiene un P.M. = 132,000 g/mol, contiene 10% de carbohidratos principalmente manosa, glucosa y en menor cantidad glucosamina, galactosa, arabinosa, xilosa y fructuosa, sus subunidades son de un P.M. = 30,000 g/mol c/u, muestra actividad hemoaglutinante para lo cual requiere de la presencia de iones como Ca^{2+} y Mn^{2+} (18).

2.- USOS DE LA FITOHEMAGLUTININA.

Las Fitoheemaglutininas has sido investigadas por muchos años, para conocer detalladamente sus propiedades y al mismo tiempo buscar aplicaciones. Resultando ser una herramienta para investigaciones a nivel biológico y médico. Siendo algunos de los usos:

- a) Para diferenciar algunas especies de animales (5).
- b) Para el estudio de carbohidratos en solución y sobre superficies celulares (18).
- c) Para el estudio de cromosomas humanos (10).
- d) Para tipificación de grupos sanguíneos (18).
- e) Para identificación de células transformadas después de una infección viral (18).
- f) Para identificación de especies microbianas (18).
- g) Para la identificación de diferentes tipos de células (18).

3.- MÉTODOS DE PURIFICACION.

Para realizar una purificación se parte de fuentes naturales, planteando la posición de la proteína dentro de la célula así lograr una extracción tratando de disminuir los pasos para eliminar contaminantes. Por lo que tenemos que realizar una ruptura de membrana celular que se puede llevar a cabo por los siguientes medios:

- a).- Medios Mecánicos.- Molinos de arena, agitación a altas velocidades con perlas de vidrio y oscilaciones sónicas y ultra-

sónicas.

- b).- Medios Físicos.- Tratamiento térmico y choque osmótico.
- c).- Medios Químicos.- Solventes orgánicos y detergentes.
- d).- Medios Enzimáticos.- Lisoziima, papaína.

En células vegetales la situación de la proteína es importante ya que la ruptura de la membrana libera ácidos fenólicos, los que se unen a proteínas, por lo que hay que controlar el pH para evitarlo; a diferencia de cuando se encuentran en los organelos en que es suficiente una centrifugación (26).

La recolección de la fracción deseada se lleva a cabo de acuerdo a la posición de la proteína después de la ruptura, si es soluble o precipitado con una centrifugación se logra la separación, lo que va a depender de la naturaleza de la proteína, la fuerza y del tiempo de centrifugación (26).

Lo fundamental en una purificación es una serie de pasos por los cuales se separa de la presencia de otras proteínas y ya teniendo la proteína en solución se somete a un fraccionamiento por sus propiedades de:

- 1).- Solubilidad.
- 2).- Carga.
- 3).- Tamaño.
- 4).- Actividad biológica.
- 5).- Combinación.

1).- SOLUBILIDAD.

La separación se logra modificando el pH, la fuerza iónica, las propiedades dieléctricas del solvente y la temperatura.

El pH permite eliminar algunos contaminantes que entorpecerían la purificación. Una proteína es menos soluble a pH isoelectrico ya que la molécula no tiene carga neta por lo que no hay repulsión electrostática y tienden a aglutinar y a precipitar (29 y 30). El pH depende de la fuerza iónica de la solución y más aún de la composición iónica.

La fuerza iónica.- Las sales neutras influyen en la solubilidad a concentraciones bajas, las sales aumentan la solubilidad, esto se debe a cambios en la tendencia de los grupos "R" disociables a ionizarse en la proteína. A medida que la concentración de la sal aumenta la solubilidad disminuye y, cuando la fuerza iónica es suficiente la proteína debe precipitar. La sal captura agua de hidratación de la molécula de proteína reduciendo la solubilidad (29 y 30).

El rango de concentración en el cual precipita depende de la naturaleza de la proteína, de la sal añadida, la temperatura y el pH. El efecto de la temperatura sobre la solubilidad de proteínas en soluciones salinas concentradas es muy variable. Las globulinas de semillas de plantas son más solubles en soluciones salinas a temperaturas más altas que a temperaturas más bajas (30).

Las propiedades dieléctricas del solvente.- La adición de solventes orgánicos como el etanol y la acetona disminuyen la solubilidad en agua de la mayoría de las proteínas globulares, lo que lleva a una precipitación. Manteniendo el pH y la fuerza iónica constantes, nos permite indicar que la solubilidad depende de la constante dieléctrica por ejemplo, cuando se adiciona etanol con una constante más baja que la del agua a una solución acuosa de proteína, aumentan las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y disminuye el grado de ionización de los grupos "R" de la proteína agregándose y precipitando. Con este método es fácil provocar la desnaturalización de la proteína por lo que se realiza a bajas temperaturas (29 y 30).

Temperatura.- El calor de la desnaturalización de las proteínas tiene un gran coeficiente de temperatura en consecuencia, la destrucción de éstas por este factor (que es diferente y característico de cada una) está muy definido (26).

2).- CARGA ELECTRICA.

Se debe considerar la propiedad de ionización de la proteína, en cada molécula hay un número de grupos que pueden disociar o unir protones formando aniones o cationes confiriéndoles propiedades ácido-base características.

Los métodos de separación y análisis de proteínas en base a estas propiedades ácido-base se dividen en: Electroforesis, cromatografía de intercambio y adsorción (26).

Electroforesis.- La conducta de una macromolécula en un campo eléctrico es dada por la movilidad, carga eléctrica y el coeficiente de fricción. Cuando se somete a un campo eléctrico "E" una partícula aislada suspendida en un perfecto aislante, habrá una fuerza QE (donde Q es la carga neta de la partícula) sobre ella y cuando se desplaza habrá una fuerza de fricción $f(dx/dt)$ que actuará en dirección opuesta donde "f" es el coeficiente de fricción y dx/dt es la velocidad de la partícula. Los métodos de electroforesis que más se usan se clasifican en:

- a).- Electroforesis en un medio uniforme de pH, en la que la separación está basada en las diferencias de carga de los componentes individuales a determinado pH.
- b).- Electroenfoque, que se basa en las diferencias de los puntos isoeléctricos de las proteínas y en el que la separación se lleva a cabo en presencia de un gradiente de pH.
- c).- Electroforesis en un medio con tamiz molecular, es usado como soporte en una electroforesis de zona y es de gran ayuda utilizándose en presencia de detergentes amónicos que al anular la carga de las proteínas llevan a cabo la separación sólo por tamaño.
- d).- Isotacoforesis, es la separación de los iones en base a su movilidad neta, ya que todos migran a la misma velocidad.

Un caso especial es la inmunoelectroforesis, que aprovecha la propiedad antigénica de las proteínas que puede ser determinante en la caracterización y la cuantificación de éstas (26).

Cromatografía de intercambio iónico.- La fase estacionaria consiste en un material sintético, polimerizado generalmente de naturaleza orgánica que contiene numerosos grupos ácidos o básicos y depende del tipo de resina. Cuando los grupos fijos son positivos, los iones cambiables son negativos y viceversa. Si los grupos químicos cargados fijos son positivos y los que intercambian son iones negativos la resina es aniónica y lo contrario para la catiónica (35).

La fase móvil está compuesta por un gradiente de elución que puede ser lineal o de otras clases. Este tipo de cromatografía puede combinarse con el de exclusión que resuelve las mezclas de proteínas con base a su carga y tamaño. Como la de CM-Sephadex usada por Lawrens (1969).

Adsorción.- Las proteínas pueden ser adsorbidas con materiales relativamente inertes (carbón, alúmina, gel de sílice, hidroxapatita, etc.) y después eluidas selectivamente. La naturaleza de unión se desconoce pero se supone participación de fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas, en el caso de adsorbentes no polares y atracciones de tipo iónico en el caso de adsorbentes de tipo polar.

3).- TAMAÑO

Por el gran tamaño de las proteínas se diseñaron métodos para separar las moléculas de tamaño pequeño, método como: Dialisis y ultrafiltración, centrifugación y cromatografía de exclusión molecular.

Diálisis y ultrafiltración.- Utilizan membranas semipermeables de poro controlado (26 y 29). La diálisis se emplea para eliminar la sal de una solución protéica es decir, el equilibrio de una solución protéica con una tamponada que dando retenidas las proteínas, saliendo las moléculas de menor peso molecular. Es de importancia cuando se utiliza a continuación de la fase en la cual tuvo lugar la precipitación de la proteína (29).

En la ultracentrifugación se utiliza presión o fuerza centrífuga para obligar a pasar el medio acuoso y las moléculas de menor peso molecular a través de la membrana semipermeable que permite la retención de las proteínas (26).

Centrifugación.- Cuando se somete una partícula a un campo centrífugo experimental su fuerza es directamente proporcional a su masa, a su vez esta fuerza está contrarrestada por la tendencia que tiene la partícula a flotar, causada por el desplazamiento del solvente y por la fuerza de fricción hasta que se alcanza un equilibrio de flujos en que la velocidad de sedimentación es constante, dando un coeficiente de sedimentación el cual en las proteínas está relacionado con su peso (26).

Cromatografía de exclusión molecular.- Comprende una fase móvil (líquida o gaseosa), y otra estacionaria (sólido o líquido que hacen contacto y a través de las cuales son transportados los componentes de una mezcla a diferentes velocidades dependiendo de sus afinidades relativas para las dos fases (26 y 29).

4).- ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El método basado en la propiedad biológica de algunas proteínas de tener una capacidad específica y activarse para unirse a una molécula llamada ligando se denomina cromatografía de afinidad. Para obtener la proteína necesaria, su elección subsecuente para disociar el complejo proteína ligando-soporte, este tipo de purificación lo usaron para la PHA Felsted y Leavitt (1975).

5).- COMBINACION.

Cromatografía líquida en donde la fase móvil es líquida y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que cubra un soporte sólido. Los principios de distribución entre las fases son la adsorción en la superficie, el intercambio iónico, las solubilidades relativas y los efectos estéricos (26).

Debido a las funciones de la PHA en plantas como por sus propiedades en animales y microorganismos ya antes mencionados, las lectinas son de gran interés y utilidad para diferentes estudios.

Trabajos anteriores indican que la actividad hemoaglutinante varía no solamente cuando se prueba con eritrocitos de diferentes especies sino también dicha actividad es diferente dependiendo de la lectina que se trate así como entre las variedades de un mismo género (10), resultando que el frijol negro es más activo mitogénicamente como hemoaglutinante por lo que en este trabajo es utilizado.

A pesar de que se han diseñado varios métodos de purificación, se trató de lograr un método confiable y barato para obtener la PHA con una actividad comparable a la comercial ya que el costo de esta última es muy elevado por intermediarios, incluyendo el tiempo de transporte y satisfacer al mismo tiempo las necesidades del Laboratorio de Citogenética de la F.E.S.C.

O B J E T I V O S

- 1).- Realizar una extracción confiable tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la Fitohemaglutinina.
- 2).- Observar el comportamiento de la PHA en presencia de cationes en la actividad hemoaglutinante a diferentes temperaturas, para diseñar un método de purificación de acuerdo a nuestras necesidades.

H I P O T E S I S

Si la presencia de los cationes confieren cierta estabilidad para efectuar su actividad hemoaglutinante a diferentes temperaturas y concentraciones, entonces se puede aprovechar para diseñar un método de purificación.

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- EXTRACCION DE LA FITOHEMAGLUTININA.

A).- REACTIVOS:

NaCl al 1%

HCl 0.1 N

NaOH 0.1 N

Etanol al 70%

Sales de Cationes:

ZnCl₂, MgCl₂, CaCl₂,

MnCl₂, CoCl₂ a una

concentración de 0.1 M

APARATOS:

Mortero

Agitador magnético

pH neutro

Centrífuga clínica

Termómetro.

B- METODO MODIFICADO.

Se realiza un tamizado del frijol negro a modo de obtener una harina, a continuación se tritura con la mínima cantidad de solución salina hasta lograr una masa homogénea (durante 2 horas aproximadamente), la muestra es resuspendida con más solución salina en una proporción de 20 g de frijol con 200 ml de solución, ajustándose después a un pH de 4.0 y agitar durante 24 horas, a una temperatura de 4°C; el paso siguiente es centrifugar a 655 xg durante 30 min.; por último al sobrenadante se le adiciona el Etanol lentamente sin dejar de agitar, también a una temperatura de 2°C. En cada

uno de los pasos anteriores se realizaron pruebas para observar la actividad hemoaglutinante (42).

Como se mencionó en la introducción, la actividad varía en algunas lectinas cuando se ponen en contacto con cationes como Ca^{2+} y Mn^{2+} , por lo que este procedimiento se repitió en presencia de diferentes cationes.

El efecto de la temperatura sobre la solubilidad de proteínas en soluciones salinas concentradas es muy variable. Las globulinas de semillas de plantas son más solubles en soluciones salinas a temperaturas más altas que a temperaturas más bajas (30), por lo que se probó en un rango de -40-80°C para observar su comportamiento.

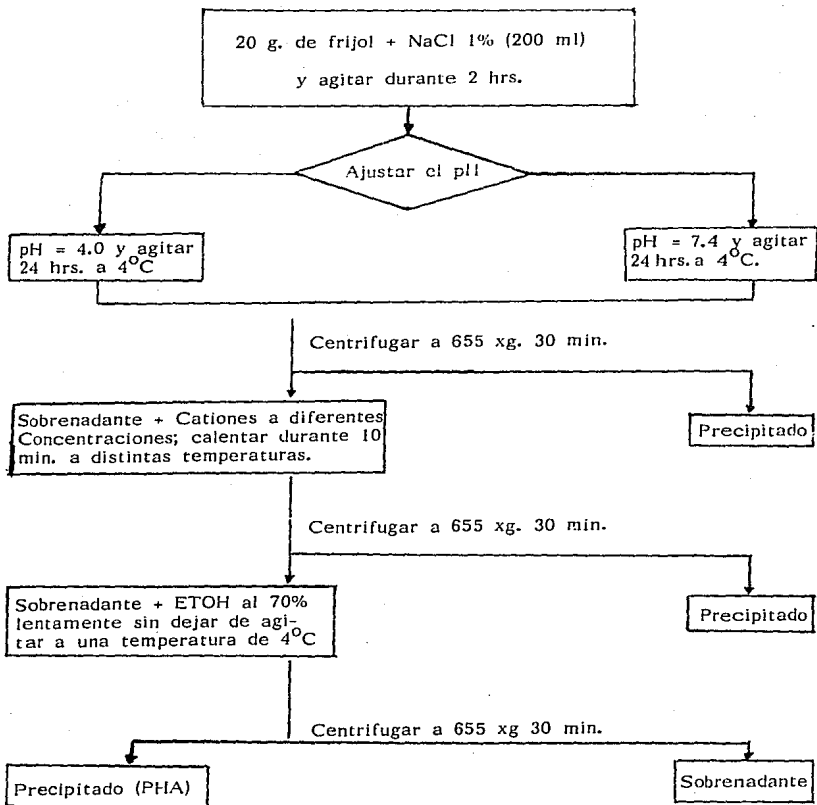


Diagrama de flujo de la extracción de la Fitohemaglutinina (39).

2.- DETERMINACIÓN DE PROTEINAS.

Fundamento.- En medio moderadamente alcalino mas Cu^{2+} se forma un complejo $-\text{C}=\text{O}$ y $=\text{N}-\text{H}$, la reacción ocurre con compuestos que por lo menos contienen dos grupos $\text{NH}_2\text{CO}-$, $\text{NH}_2\text{OS}-$ dando un color que absorbe a 540 nm.

A).- REACTIVOS:

KI al 0,25%

NaOH 0.25 N

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tartrato de sodio potasio.

APARATOS:

Espectrofotómetro

B).- METODO:

Se prepara el reactivo de Biuret para trabajar. Después se hace una curva de calibración para las proteínas con Albumina bovina. La concentración de la albúmina debe ser de 1 mg/l, de esta solución se colocan en un tubo 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, ... ml, mas solución salina hasta obtener un volumen de 2.5 ml y por último se adicionan 2.5 ml del reactivo de Biuret. Dejar reposar 30 min. para tomar la lectura a una absorbancia de 540 nm. Todas las muestras problema se trabajaron en forma semejante.

3.- HEMOAGLUTINACION.

Fundamento.- De acuerdo a las propiedades mencionadas que tienen las lectinas de aglutinar eritrocitos.

A).- REACTIVOS:	APARATOS:
S�ngre heparinizada	Termómetro
tipo "O".	Baño María
Sol. Salina fisiológica	Espectrofotómetro
Sales de cationes:	
Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}	
Co^{2+} .	

B).- METODO:

Se toma la cantidad necesaria de muestra para tener una concentración de 1 mg de proteína llevándose a una volúmen de 1 ml con sol. salina. A continuación se efectúan diluciones dobles. Por último se agregan 0.5 ml de eritrocitos lavados, con una concentración final de 50,000 eritrocitos. Dejándose reposar 2 horas para tomar la lectura hasta la máxima dilución donde hubo hemoaglutinación.

4.- DIALISIS.

Fundamento.- Se emplea para eliminar la sal de una solución protéica, es decir, el equilibrio de una solución protéica con una tamponada mediante una membrana impermeable a la proteína.

A).- REACTIVOS:

Membrana de diálisis

Buffer de Fosfatos a

pH = 4.0

APARATOS:

Agitador magnético

B).- METODO:

Al sobrenadante después de calentado en presencia de Zn^{2+} y antes de adicionar el Etanol, se dializa para eliminar el catión y lograr precipitar toda la proteína posible.

Se coloca en la membrana de diálisis (cerrada por un extremo) el sobrenadante, se cierra e introduce en el buffer de fosfatos de tal manera que quede en la parte central y permita la agitación. Esto se efectúa a bajas temperaturas durante 72 horas con 2 cambios de solución buffer.

5.- CROMATOGRAFIA.

Fundamento.- Columna de intercambio catiónico la cual contiene grupos ácidos, los cuales son substituídos por otros iones positivos. Si la mezcla contiene un número determinado de solutos, cada uno con carga neta diferente, se intercambiarán en distintos grados con la resina.

A).- REACTIVOS:

HCl 0.1 N

NaOH 0.1 N

DEAE Celulosa

Buffer de Fosfatos:

5 mM pH = 6.8

0.2 M pH = 6.8

0.2 M pH = 6.1 + NaCl 0.5 M

APARATOS:

Agitador magnético.

Filtro Buchner

B).- METODO:

Activación de la columna de acuerdo a Magni (24).

Cromatografía.- La capacidad total de intercambio determina el tamaño máximo de la muestra, teniendo la DEAE celulosa la capacidad de 0.5 mEq/g de resina seca. Se disolvieron 500 mg de proteína del precipitado obtenido en 20 ml del buffer de fosfatos (5 mM pH = 6.8) y aplicado a la

columna (3 cm X 20 cm) equilibrada con el mismo buffer. El gradiente de elución se inicia por el paso del buffer 0.2 M de fosfatos pH = 6.8. Por último se adiciona el buffer de fosfatos 0.2 M pH = 6.1 conteniendo NaCl 0.5 M. Se recolectan fracciones de 10 ml, esto se lleva a cabo a temperatura ambiente, ya que la proteína recuperada se ha visto que tiene después de un 90 - 85% de su actividad (35). A cada una de las fracciones se les determinó proteínas y actividad hemoaglutinante.

6.- MODELO MATEMATICO Y ANALISIS ESTADISTICO

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + P_k + E_l$$

Siendo en estos casos el significado de las variables:

T_i = Temperaturas

D_j = Diluciones

P_k = pHs

E_l = Error

TABLA DE ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre Temperaturas	$i - 1$	$\sum_{i=1}^5 \frac{Y^2_{...} - Y^2_{...}}{ljk}$	S.C./G.L.	C.M./D.E.
Entre Diluciones	$j - 1$	$\sum_{j=1}^6 \frac{Y^2_{...} - Y^2_{...}}{ikl}$	S.C./G.L.	C.M./D.E.
Entre pHs	$k - 1$	$\sum_{k=1}^2 \frac{Y^2_{...} - Y^2_{...}}{ijl}$	S.C./G.L.	C.M./D.E.
Dentro del error	$i+j+k-1$	Total Corregido - Σ S.C.		
Total corregido	$i+j+k$	$Y^2_{ijkl} - \frac{Y^2_{...}}{ijkl}$		

Simbología utilizada:

G.L. = Grados de Libertad.

S.C. = Suma de Cuadrados.

C.M. = Cuadrados de las Medias.

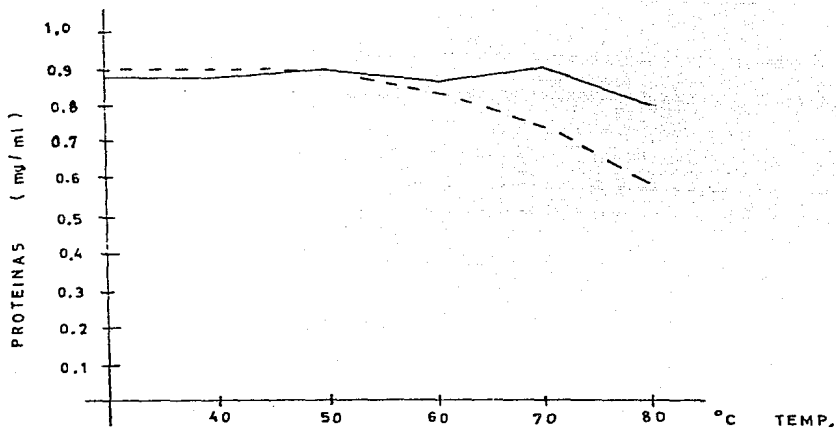
D.E. = Dentro del Error

F =

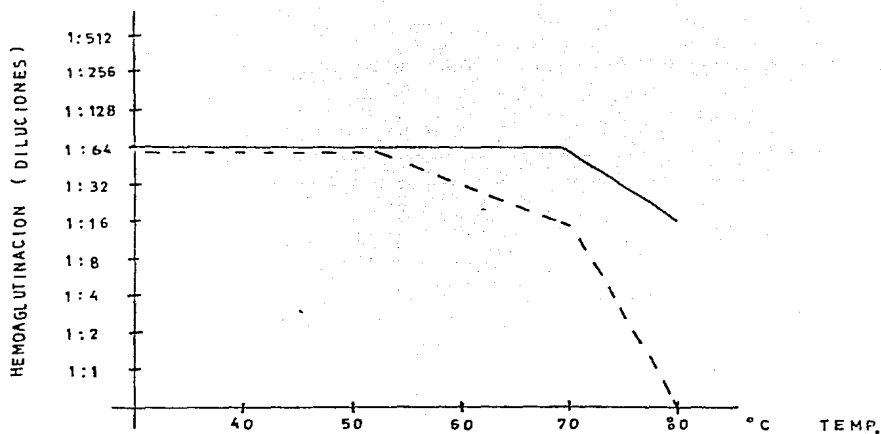
IV.- RESULTADOS

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO

Gráfica 1 y 2.- El extracto de Frijol Negro en ausencia de cationes, en donde se observó que la actividad hemoaglutinante se pierde al llegar a los 80°C a un $\text{pH} = 4.0$, y a un $\text{pH} = 7.0$ decae ligeramente. Sin embargo no se desnaturaliza toda la proteína presente.



GRAFICA 1. — CONCENTRACION PROMEDIO DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO SIN CATIONES EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH .DE 7,4 (—) Y 4.0 (- - -)



GRAFICA 2. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO SIN CATIONES EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (——) Y 4.0 (---)

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO MAS Mn^{2+}

El extracto de frijol negro en presencia de este catión mostr6 que la actividad se va perdiendo a un pH = 4.0 conforme aumenta la temperatura (Tabla 3) a diferencia de lo que sucede a un pH = 7.4 en donde s6lo decae ligeramente (gr6fica 3).

HEMOAGLUTINACION DE (PHA) DE FRIJOL NEGRO

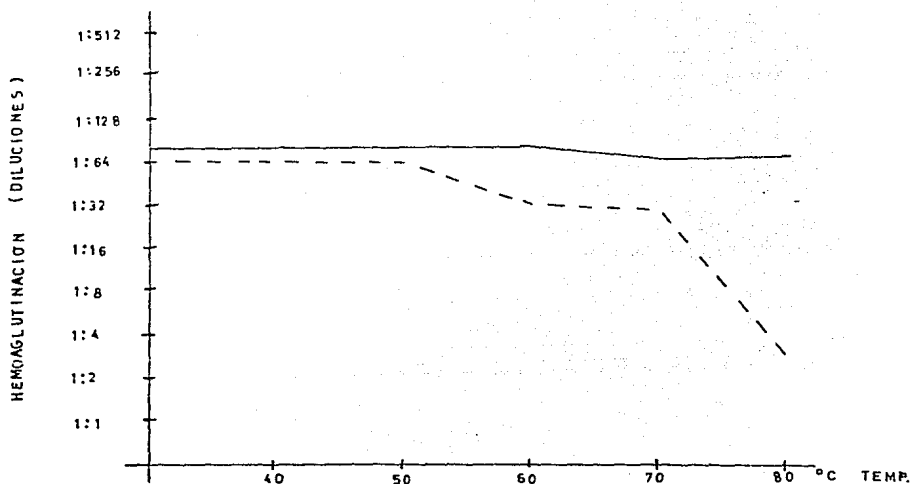
ION	pH	CONC. mmol.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Mn ²⁺	7.4	0.0	1:64	1:64	1:64	1:64	1:16	1:54	$\bar{X}_1 = 1:77$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	
		0.2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	
		0.3	1:64	1:64	1:128	1:64	1:64	1:77	
		0.4	1:128	1:128	1:128	1:64	1:64	1:102	
		0.5	1:128	1:128	1:64	1:64	1:128	1:102	
	\bar{X}	1:85	1:85	1:85	1:64	1:67			
	4.0	0.0	1:64	1:64	1:32	1:16	0:0	1:35	$\bar{X}_2 = 1:37$
		0.1	1:64	1:64	1:32	1:16	1:8	1:37	
		0.2	1:64	1:64	1:32	1:32	1:2	1:39	
		0.3	1:64	1:64	1:32	1:32	1:2	1:39	
		0.4	1:64	1:64	1:32	1:32	1:2	1:39	
0.5		1:64	1:32	1:32	1:32	1:2	1:32		
\bar{X}	1:64	1:59	1:32	1:27	1:3				

A N D E V A

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	14097.06	3524.26	7.64*
Entre diluciones	5	5274.93	1034.98	2.24
Entre pH	1	24644.26	24644.26	53.43*
Dentro de error	49	22599.48	461.21	
Total corregido	59	66515.73	1127.38	

ANDEVA : Análisis de varianza
 G.L. : Grados de Libertad
 S.C. : Suma de cuadrados
 F : Cociente de Fisher
 * : Significancia $\alpha = 0.05$
 C.M.: Cuadrado de las medias.

TABLA 3.- Títulos de Hemoaglutinación del extracto de frijol negro en presencia de Mn²⁺ con un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas



GRAFICA 3. — TITULOS PROMEDIO DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN PRESENCIA DE M_2^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (---)

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO MAS Co^{2+}

La concentración de proteína varía a las diferentes concentraciones del catión (tabla 4) y conforme aumenta la temperatura, siendo más bajas a los $80^{\circ}C$ a un pH = 4.0 (gráficas 4 y 5), lo cual se refleja en una diferencia significativa (tabla 5) en la actividad hemoaglutinante a un pH = 4.0 en donde se pierde, a diferencia de la actividad mostrada a un pH = 7.4

PROTEINAS (PHA) DE FRIJOL NEGRO

ION	pH	CONC. mmol.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Co ²⁺	7.4	0.0	0.88	0.90	0.85	0.90	0.80	0.87	$\bar{X}_1 = 0.80$
		0.1	0.68	0.70	0.65	0.76	0.76	0.71	
		0.2	0.75	0.77	0.83	0.80	0.76	0.78	
		0.3	0.78	0.83	0.83	0.90	0.68	0.80	
		0.4	0.80	0.80	0.85	0.85	0.83	0.83	
		0.5	0.80	0.80	0.76	0.86	0.86	0.82	
	\bar{X}	0.78	0.80	0.79	0.84	0.78			
	4.0	0.0	0.90	0.90	0.85	0.75	0.60	0.80	$\bar{X}_2 = 0.798$
		0.1	0.73	0.78	0.79	0.76	0.65	0.74	
		0.2	0.77	0.78	0.82	0.78	0.67	0.76	
0.3		0.80	0.82	0.87	0.81	0.71	0.80		
0.4		0.87	0.86	0.87	0.85	0.74	0.84		
0.5		0.87	0.90	0.89	0.85	0.75	0.85		
\bar{X}	0.82	0.84	0.85	0.80	0.69				

A N D E V A

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.0696	0.0171	6.125*
Entre diluciones	5	0.0948	0.0190	6.77
Entre pH	1	0.000015	0.000015	0.0053
Dentro de error	49	0.1373	0.0028	
Total corregido	59	0.3007	0.0051	

ANDEVA: Análisis de varianza.

G.L.: Grados de Libertad

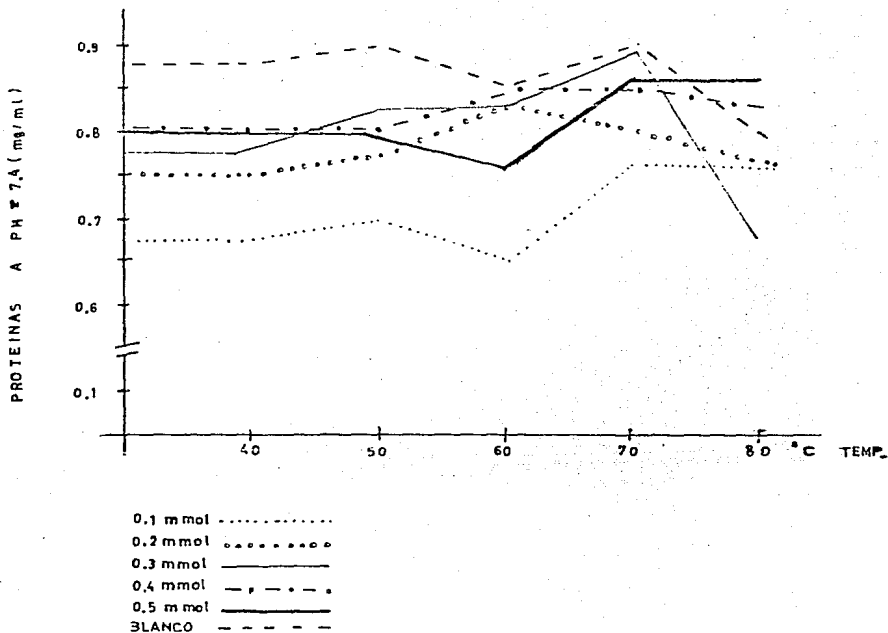
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

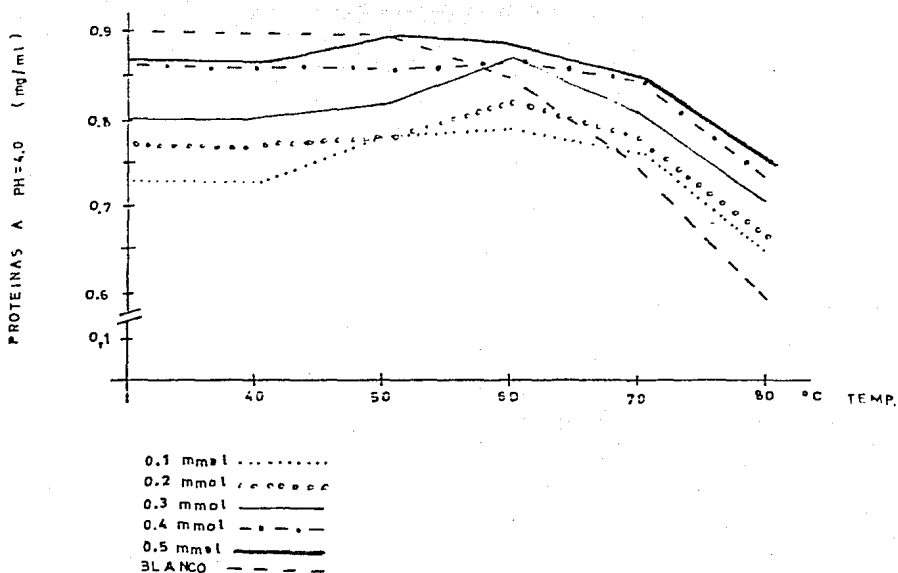
F: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha = 0.05$

TABLA 4.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 - min. a diferentes temperaturas el extracto de frijol negro, en presencia de Co²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4.



GRAFICA 4. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Co^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN UN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7,4



GRAFICA 5. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Co^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 4,0

HEMOAGLUTINACION EN PHA DE FRIJOL NEGRO

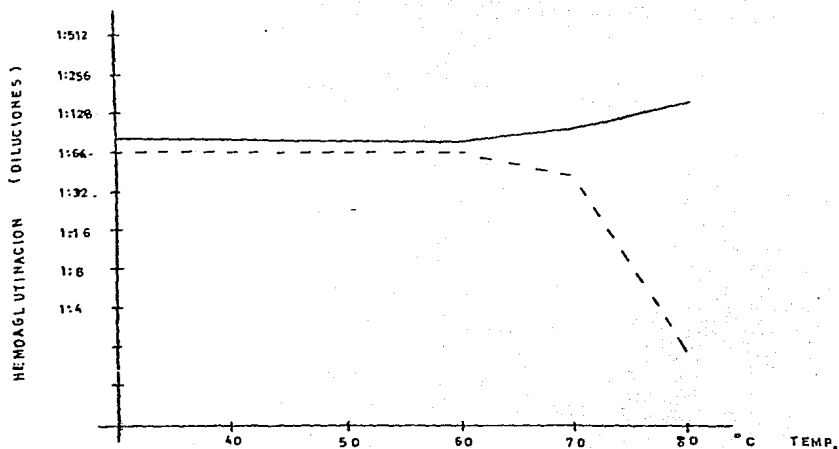
ION	pH	CONC. mmol.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{x}	
Co ²⁺	7.4	0.0	1:64	1:64	1:64	1:64	1:16	1:54	$\bar{X}_1=1:102$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.2	1:128	1:128	1:128	1:128	1:256	1:154	
		0.3	1:128	1:128	1:128	1:128	1:64	1:115	
		0.4	1:64	1:64	1:64	1:128	1:256	1:115	
		0.5	1:64	1:64	1:64	1:32	1:256	1:96	
		\bar{X}	1:85	1:85	1:85	1:101	1:152		
	4.0	0.0	1:64	1:64	1:32	1:16	0:0	1:35	$\bar{X}_2=1:47$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:32	1:2	1:45	
		0.2	1:64	1:64	1:64	1:32	1:2	1:45	
		0.3	1:64	1:64	1:64	1:64	1:2	1:52	
		0.4	1:64	1:64	1:64	1:64	1:2	1:52	
		0.5	1:64	1:64	1:64	1:64	1:2	1:52	
	\bar{X}	1:64	1:64	1:59	1:45	1:2			

ANDEVA :

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	154.93	38.73	0.017
Entre diluciones	5	18430.2	3686.04	1.6
Entre pH	1	46037.4	037.4	20.04*
Dentro de error	49	112584.07	2297.63	
Total corregido	59	177206.6	3003.5	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia $\alpha=0.05$

TABLA 5.- Títulos de hemoaglutinación del extracto de frijol negro en presencia de Co²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 6. - TITULOS PROMEDIO DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN PRESENCIA DE Co^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (---)

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO MAS Zn^{2+}

Hubo diferencia significativa en la concentración de proteínas con respecto al pH utilizado (tabla 6). Los títulos de hemoaglutinación varían según la concentración del catión usado (tabla 7), obteniéndose títulos más altos a un pH = 7.4, aunque la concentración de proteínas fué más alta a un pH = 4.0 (gráfica 7). La proteína es más estable en presencia de este catión a pesar de las variaciones de temperatura de 40 - 80°C (gráficas 8 y 9).

PROTEINAS DE LA PHA DE FRIJOL NEGRO

ION	pH	CONC. mmol.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Zn ²⁺	7.4	0.0	0.88	0.90	0.85	0.90	0.80	0.87	$\bar{X}_1=0.74$
		0.1	0.67	0.65	0.62	0.55	0.55	0.61	
		0.2	0.70	0.70	0.69	0.72	0.62	0.69	
		0.3	0.72	0.74	0.76	0.76	0.80	0.76	
		0.4	0.75	0.74	0.73	0.68	0.83	0.75	
		0.5	0.75	0.74	0.73	0.80	0.79	0.76	
		\bar{X}	0.74	0.74	0.73	0.73	0.73		
	4.0	0.0	0.90	0.90	0.85	0.75	0.60	0.80	$\bar{X}_2=0.87$
		0.1	0.90	1.00	0.80	0.75	0.95	0.88	
		0.2	0.84	0.90	0.85	0.85	0.95	0.88	
		0.3	0.86	0.90	0.85	0.80	0.92	0.87	
		0.4	0.86	0.85	1.00	0.85	1.00	0.91	
		0.5	0.85	0.85	0.95	0.92	0.90	0.89	
\bar{X}		0.87	0.90	0.88	0.82	0.89			

A N D E V A :

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.013	0.0032	0.45
Entre diluciones	5	0.0617	0.0125	1.72
Entre pH	1	0.2707	0.2707	37.8*
Dentro de error	49	0.3507	0.0071	
Total corregido	59	0.6961	0.0118	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

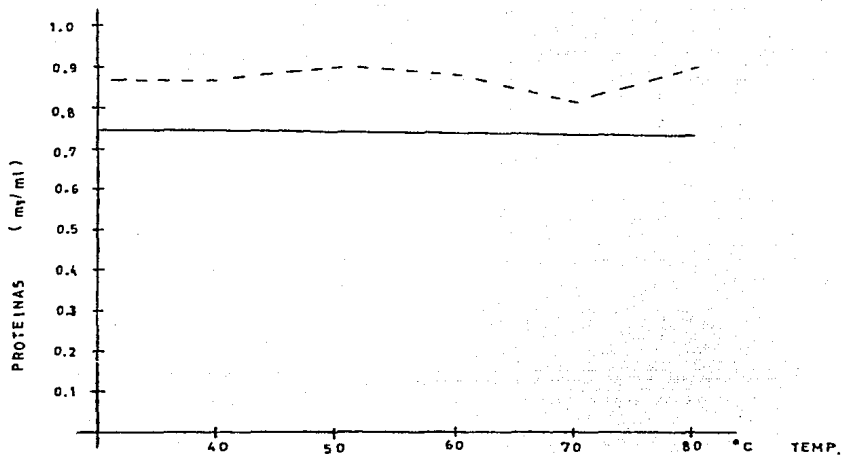
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

F.: cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha = 0.05$

TABLA 6.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 min. a diferentes temperaturas, el extracto de frijol, en presencia de Zn²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4.



GRAFICA 7. — CONCENTRACIONES PROMEDIO DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN PRESENCIA DE Zn^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (- - -)

HEMOAGLUTINACION EN (PHA) DE FRIJOL NEGRO

ION	pH	CONC. µmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Zn ²⁺	7.4	0.0	1:64	1:64	1:64	1:64	1:16	1:54	$\bar{X}_1 = 1:130$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:128	1:256	1:115	
		0.2	1:64	1:64	1:128	1:128	1:256	1:128	
		0.3	1:64	1:128	1:64	1:128	1:256	1:128	
		0.4	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	1:230	
		0.5	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	
	\bar{X}	1:128	1:139	1:139	1:160	1:195			
	4.0	0.0	1:64	1:64	1:32	1:16	0:00	1:35	$\bar{X}_2 = 1:72$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:32	1:32	1:51	
		0.2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	
		0.3	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.4	1:128	1:64	1:64	1:128	1:128	1:102	
0.5		1:128	1:64	1:64	1:128	1:128	1:102		
\bar{X}	1:85	1:64	1:59	1:83	1:69				

A N D E V A :

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	9685.33	2421.33	0.9
Entre diluciones	5	131686.4	26337.28	9.8*
Entre pH	1	96000.00	96000.00	35.7*
Dentro de error	49	131780.27	2689.4	
Total corregido	59	369152.00	6256.81	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

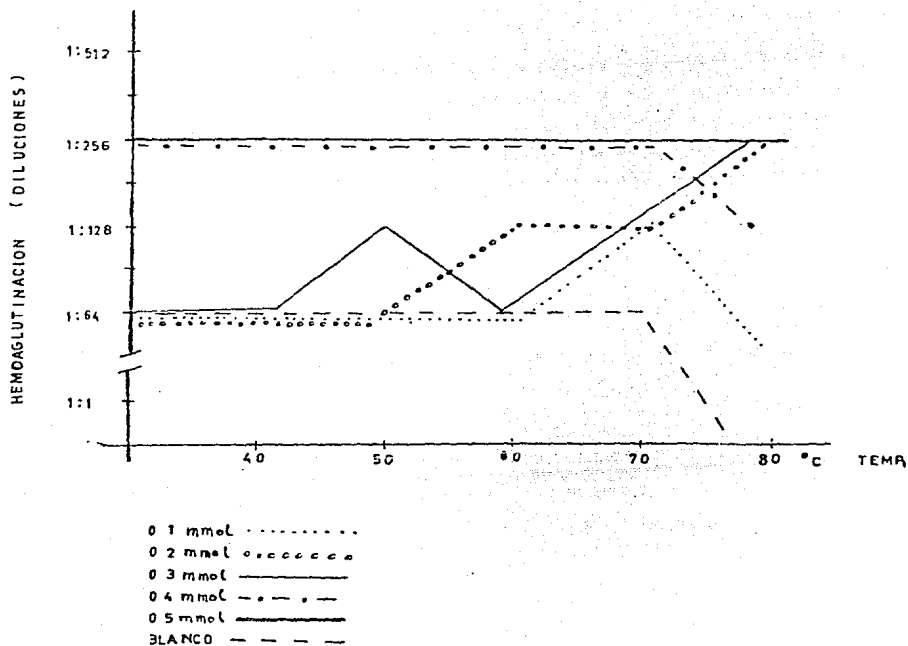
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

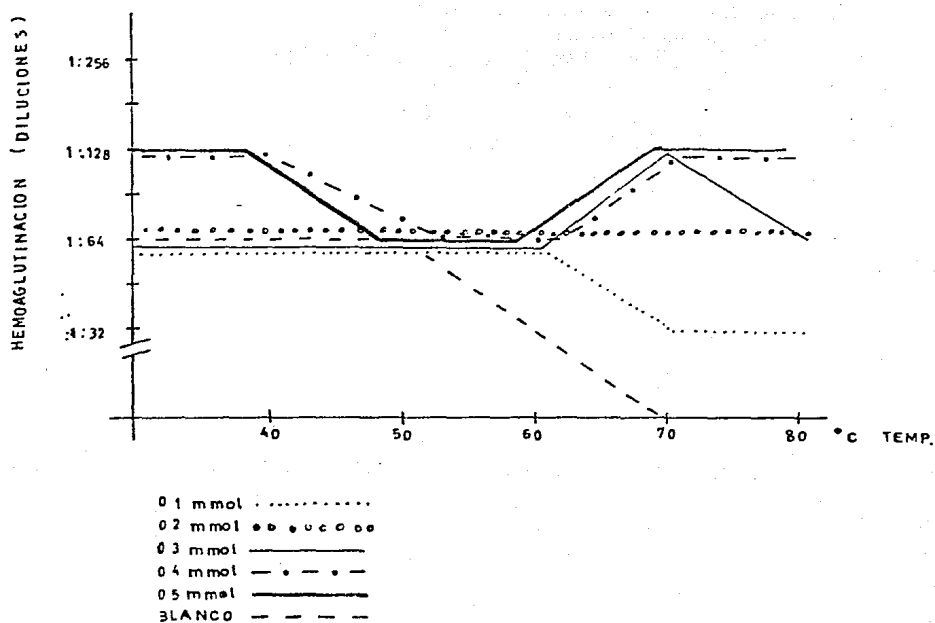
F.: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha = 0.05$

TABLA 7.- Títulos de hemoaglutinación del extracto de frijol negro en presencia de Zn²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 8. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADAS EN EL
EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Zn^{2+}
A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4



GRAFICA 9. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Zn^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 4.0

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO MAS Mg^{2+}

Hubo una diferencia significativa conforme aumenta la temperatura (tabla 8) en la concentración de proteínas, esta diferencia se notó también al variar la concentración del catión (gráficas 10 y 11). Sin embargo esto último no influyó en la actividad, pero sí hubo pérdida de la actividad hemaglutinante conforme se aumenta la temperatura (tabla 9), a diferencia de cuando se determinó a un pH = 7.4, en donde permaneció estable (gráfica 12).

PROTEINAS DE (PHA) DE FRIJOL NEGRO

ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Mg ²⁺	7.4	0.0	.88	.90	.85	.90	.80	.87	$\bar{X}_1 = 0.775$
		0.1	.80	.79	.76	.60	.55	.70	
		0.2	.80	.79	.80	.68	.55	.72	
		0.3	.85	.82	.76	.72	.58	.75	
		0.4	.83	.85	.80	.83	.60	.78	
		0.5	.85	.85	.85	.90	.68	.83	
	\bar{X}	.83	.83	.80	.77	.63			
	4.0	0.0	.90	.90	.85	.75	.60	.80	$\bar{X}_2 = 0.768$
		0.1	.68	.64	.60	.64	.65	.64	
		0.2	.70	.65	.67	.74	.69	.69	
		0.3	.82	.74	.75	.75	.75	.76	
0.4		.86	.87	.82	.80	.80	.83		
0.5		.86	.86	.86	1.00	.86	.89		
\bar{X}	.80	.78	.76	.78	.72				

ANDEVA :

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.1518	0.0379	4.08*
Entre diluciones	5	0.2685	0.0537	5.78*
Entre pH	1	0.00043	0.00043	0.046
Dentro de error	49	0.4548	0.0093	
Total corregido	59	0.8757	0.0148	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

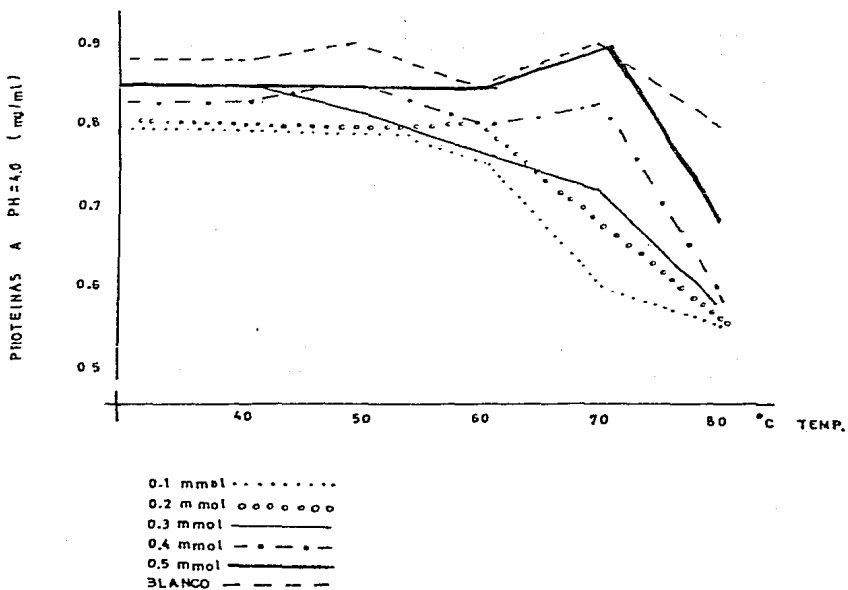
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

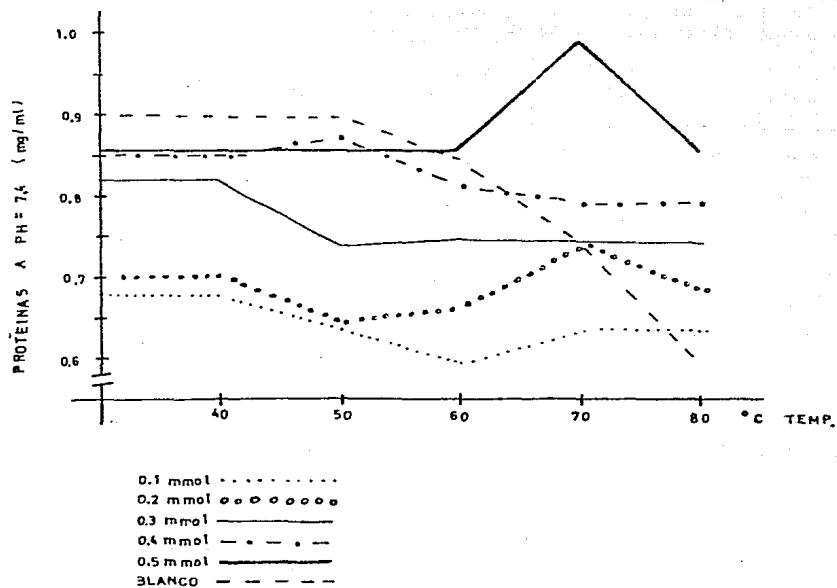
F.: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha = 0.05$

TABLA 8.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 min. a diferentes temperaturas el extracto de frijol negro en presencia de Mg²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4



GRAFICA 10. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Mg^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 4.0.



GRAFICA 11 — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Mg^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4

HEMOAGLUTINACION EN (PHA) DE FRIJOL NEGRO

ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Mg ²⁺	7.4	0.0	1:64	1:64	1:64	1:64	1:16	1:54	$\bar{X}_1 = 1:70$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.2	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	1:70	
		0.3	1:64	1:64	1:128	1:64	1:16	1:67	
		0.4	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.5	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:77	
	\bar{X}	1:64	1:64	1:75	1:96	1:53			
	4.0	0.0	1:64	1:64	1:32	1:16	0:00	1:35	$\bar{X}_2 = 1:36$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:16	0:00	1:42	
		0.2	1:64	1:64	1:32	1:16	0:00	1:35	
		0.3	1:64	1:64	1:32	1:16	0:00	1:35	
		0.4	1:64	1:64	1:32	1:8	0:00	1:34	
0.5		1:64	1:64	1:32	1:8	0:00	1:34		
\bar{X}	1:64	1:64	1:37	1:13	0:00				

A N D E V A :

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	11366.4	2841.6	4.15*
Entre diluciones	5	1186.13	237.22	0.35
Entre pH	1	18026.67	18026.67	26.33*
Dentro de error	49	33544.53	684.58	
Total corregido	59	64123.73	1086.84	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

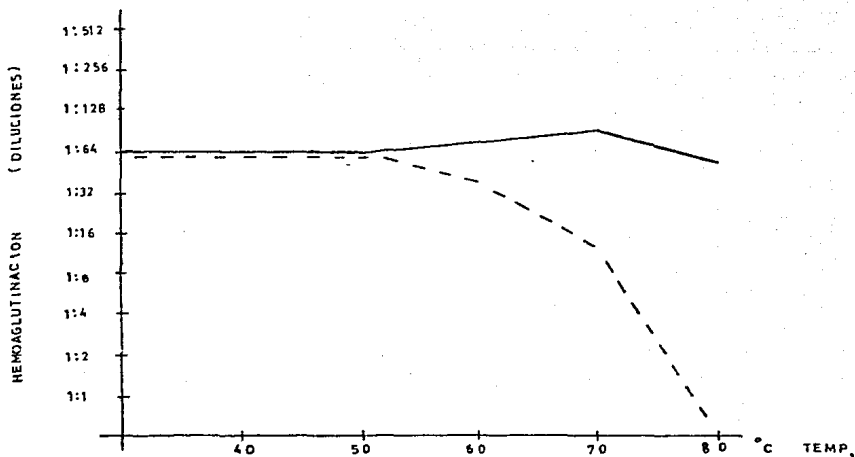
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

F.: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha < 0.05$

TABLA 9.- Titulos de hemaglutinación del extracto de frijol negro en presencia de Mg²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 12. — TITULOS PROMEDIO DE HEMOAGLUTINACION
 DETERMINADOS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO
 EN PRESENCIA DE Mg^{2+} A DIFERENTES TEM-
 PERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH
 DE 7.4 (—) Y 4.0 (- - -)

EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO MAS Ca^{2+}

La concentración de proteínas varió dependiendo del pH utilizado sin influir la concentración del carión usado (tabla 10). En cuanto a la actividad hemoaglutinante, permaneció estable en un título de 1:79 (tabla 11) a un pH = 7.4, pero se perdió la actividad a un pH = 4.0 conforme se aumentó la temperatura.

ION	pH	CONC.	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Ca ²⁺	7.4	0.0	.88	.90	.85	.90	.80	.87	$\bar{X}_1=0.81$
		0.1	.75	.79	.72	.73	.60	.72	
		0.2	.78	.82	.80	.76	.76	.78	
		0.3	.80	.84	.83	.73	.80	.80	
		0.4	.83	.84	.76	.83	.83	.82	
		0.5	.83	.84	.83	.90	.85	.85	
	\bar{X}	.81	.84	.80	.81	.77			
	4.0	0.0	.90	.90	.85	.75	.60	.80	$\bar{X}_2=0.73$
		0.1	.74	.75	.50	.60	.60	.64	
		0.2	.77	.85	.60	.62	.62	.69	
		0.3	.79	.82	.62	.68	.69	.72	
		0.4	.82	.85	.65	.82	.75	.78	
		0.5	.82	.82	.60	.76	.80	.76	
	\bar{X}	.81	.83	.64	.70	.68			

A N D E V A

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.1285	0.0321	1.87
Entre diluciones	5	0.1555	0.0311	1.8
Entre pH	1	0.0836	0.0836	4.9*
Dentro de error	49	0.8412	0.172	
Total corregido	59	1.2089	0.0205	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

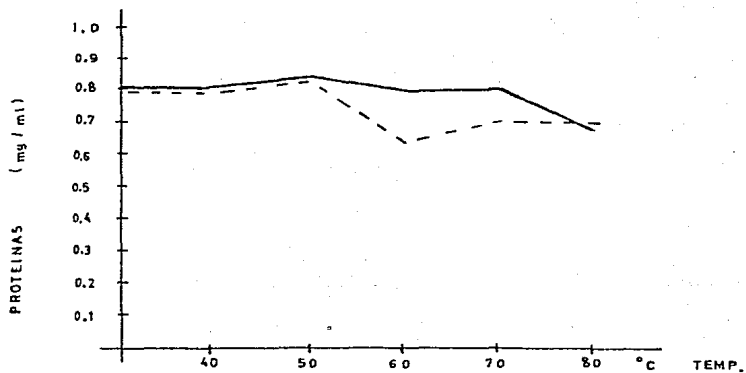
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrado

F.: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha < 0.05$

TABLA 10.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 min. a diferentes temperaturas, el extracto de frijol negro, en presencia de Ca²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4



GRAFICA 13.—CONCENTRACION PROMEDIO DE PROTEINAS DETERMINADAS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN PRESENCIA DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (- - -)

HEMOAGLUTINACION EN (PHA) DE FRIJOL
NEGRO

ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Ca ²⁺	7.4	0.0	1:64	1:64	1:64	1:64	1:16	1:54	$\bar{X}_1 = 1:79$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.2	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:77	
		0.3	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	1:70	
		0.4	1:64	1:64	1:128	1:128	1:16	1:80	
		0.5	1:64	1:64	1:64	1:128	1:256	1:115	
	\bar{X}	1:64	1:64	1:75	1:117	1:75			
	4.0	0.0	1:64	1:64	1:32	1:16	0:00	1:35	$\bar{X}_2 = 1:39$
		0.1	1:32	1:64	1:32	1:32	0:00	1:32	
		0.2	1:32	1:64	1:32	1:32	0:00	1:32	
		0.3	1:64	1:64	1:32	1:64	0:00	1:45	
		0.4	1:64	1:32	1:64	1:32	0:00	1:38	
0.5		1:64	1:64	1:64	1:32	0:00	1:45		
\bar{X}	1:53	1:59	1:43	1:35	0:00				

A N D E V A

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	9147.73	2286.93	1.8
Entre diluciones	5	6848.00	1369.60	1.08
Entre pH	1	25297.07	25297.07	19.98*
Dentro de error	49	62041.60	1266.15	
Total corregido	59	10333.44	1751.43	

ANDEVA: Análisis de varianza

G.L.: Grados de libertad

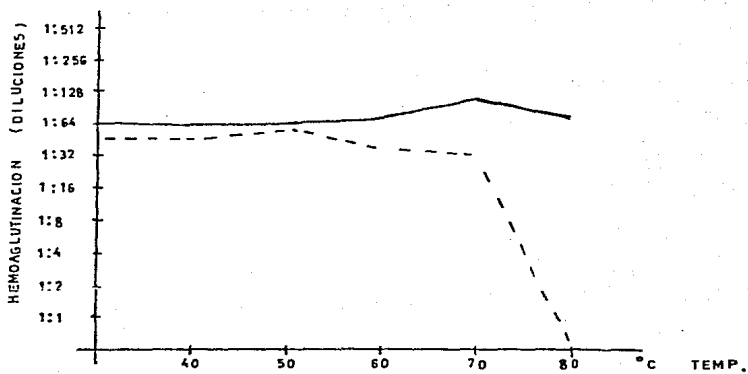
S.C.: Suma de cuadrados

C.M.: Media de cuadrados

F.: Cociente de Fisher

*: Significancia $\alpha = 0.05$

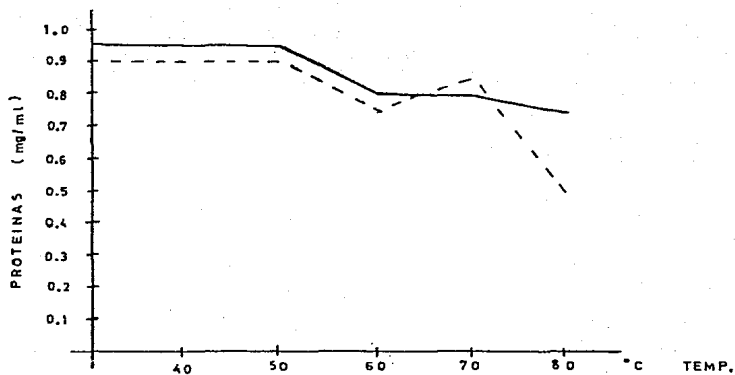
TABLA 11.- Títulos de hemaglutinación del extracto de frijol negro, en presencia de Ca²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4; a diferentes temperaturas.



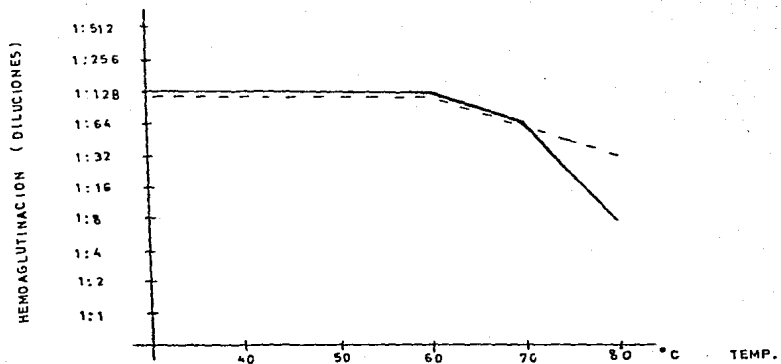
GRAFICA 14 .-- TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN EL EXTRACTO DE FRIJOL NEGRO EN PRESENCIA DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (---)

PHA - TESTIGO

La PHA comercial (Difco) en ausencia de cationes, tanto la concentración de proteínas como la actividad hemoaglutinante no se pierde totalmente al aumentar la temperatura, sólo a un pH = 7.4 bajan los títulos hasta 1:8 al llegar a los 80°C (gráficas 15 y 16).



GRAFICA 15. — CONCENTRACION PROMEDIO DE PROTEINAS DE LA PHA TESTIGO EN AUSENCIA DE CATIONES A UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (---) CON BUFFER DE FOSFATOS.



GRAFICA 16. — TITULOS PROMEDIO DE HEMOAGLUTINACION EN LA PHA TESTIGO EN AUSENCIA DE CATIONES A UN PH DE 7.4 () Y 4.0 () CON BUFEER DE FOSFATOS.

PHA - TESTIGO MAS Mn^{2+}

Hay una ligera variación en la actividad hemoaglutinante dependiendo de las distintas concentraciones de Mn^{2+} (ver tabla 12) y un cambio significativo conforme se varía la temperatura, viéndose al mismo tiempo un aumento a los $70^{\circ}C$ independientemente del pH utilizado (gráficas 17 y 18).

HEMOAGLUTINACION EN PHA-TESTIGO

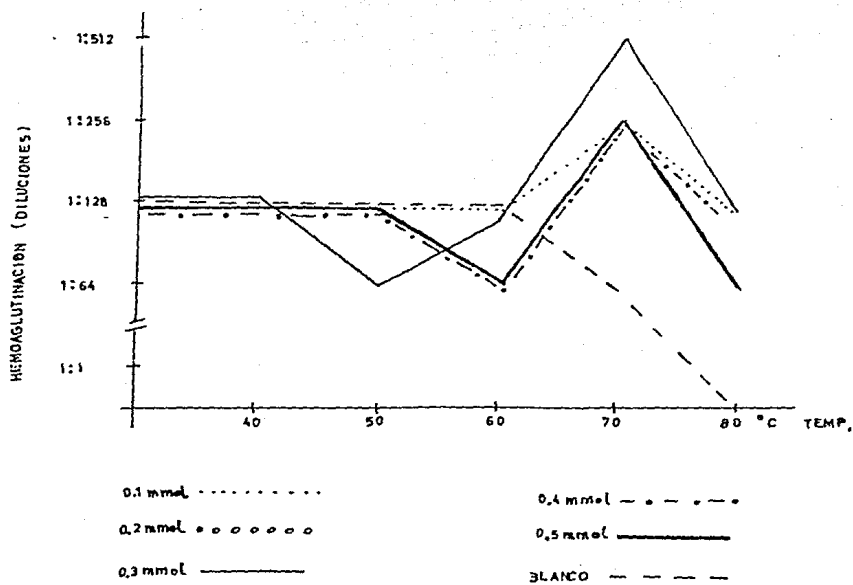
ION	pH	CONC mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Mn	7.4	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:8	1.91	$\bar{X}_1 = 1:143$
		0.1	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
		0.2	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
		0.3	1:128	1:64	1:128	1:512	1:128	1:192	
		0.4	1:128	1:128	1:64	1:256	1:128	1:141	
		0.5	1:128	1:128	1:64	1:256	1:64	1:128	
		\bar{X}	1:128	1:117	1:107	1:267	1:97		
	4.0	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:32	1:96	$\bar{X}_2 = 1:210$
		0.1	1:128	1:256	1:256	1:512	1:128	1:256	
		0.2	1:256	1:128	1:256	1:512	1:128	1:256	
		0.3	1:128	1:256	1:128	1:512	1:64	1:218	
		0.4	1:256	1:256	1:256	1:512	1:128	1:282	
		0.5	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
		\bar{X}	1:171	1:192	1:192	1:395	1:101		

A N D E V A

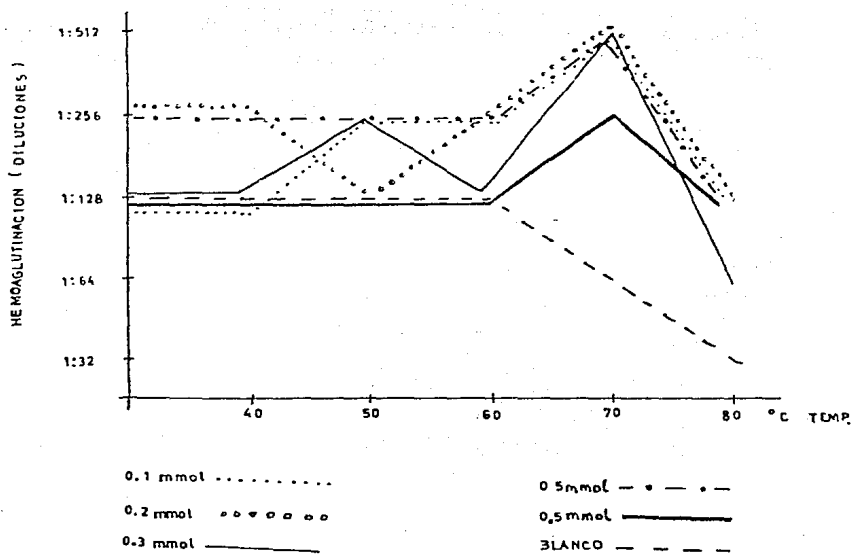
FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	380096.00	95024.000	15.75*
Entre diluciones	5	117534.93	23506.986	3.9*
Entre pH	1	67201.067	67201.067	11.15*
Dentro de error	49	295621.33	6033.088	
Total corregido	59	860453.33	14583.95	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia $\alpha = 0.05$

TABLA 12.- Títulos de hemoaglutinación de la PHA-testigo en presencia de Mn a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 17. TITULOS DE HEMOAGLUTINACION EN LA PHA TESTIGO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Mn^{2+} EN BUFFER DE FOSFATOS A PH DE 7,4



GRAFICA 18. - TITULOS DE HEMOAGLUTINACION EN LA PHA TESTIGO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Mn^{2+} EN BUFFER DE FOSFATOS A PH DE 4.0

PHA - TESTIGO MAS Co^{2+}

La proteína es más estable a concentraciones más altas del catión y su actividad se mantiene aún hasta los 80°C independientemente del pH, dando títulos más altos a un pH = 4.0, destacando que a éste pH la concentración de proteínas es más baja que a un pH = 7.4

PROTEINAS (PHA) TESTIGO

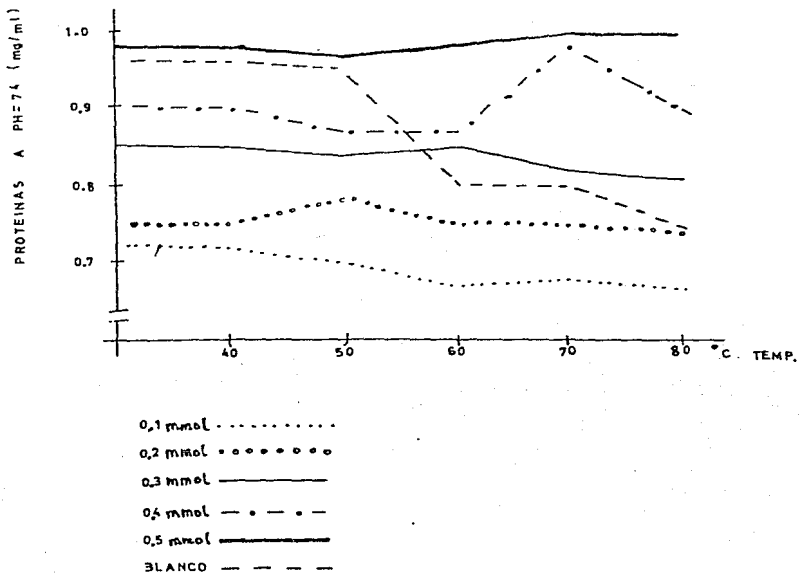
ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Co ²⁺	7.4	0.0	.96	.95	.80	.80	.75	.85	$\bar{X}_1=0.83$
		0.1	.72	.70	.67	.68	.67	.68	
		0.2	.75	.78	.75	.75	.74	.75	
		0.3	.85	.84	.85	.82	.81	.83	
		0.4	.90	.87	.87	.98	.90	.90	
		0.5	.98	.97	.98	1	1	.98	
	\bar{X}	.86	.85	.82	.84	.81			
	4.0	0.0	.90	.90	.75	.85	.50	.78	$\bar{X}_2=0.81$
		0.1	.80	.75	.77	.85	.62	.76	
		0.2	.80	.82	.80	.85	.65	.78	
0.3		.83	.85	.83	.88	.70	.82		
0.4		.86	.89	.86	.91	.75	.85		
0.5		.89	.89	.89	.94	.75	.87		
\bar{X}	.85	.85	.82	.88	.66				

ANDEVA

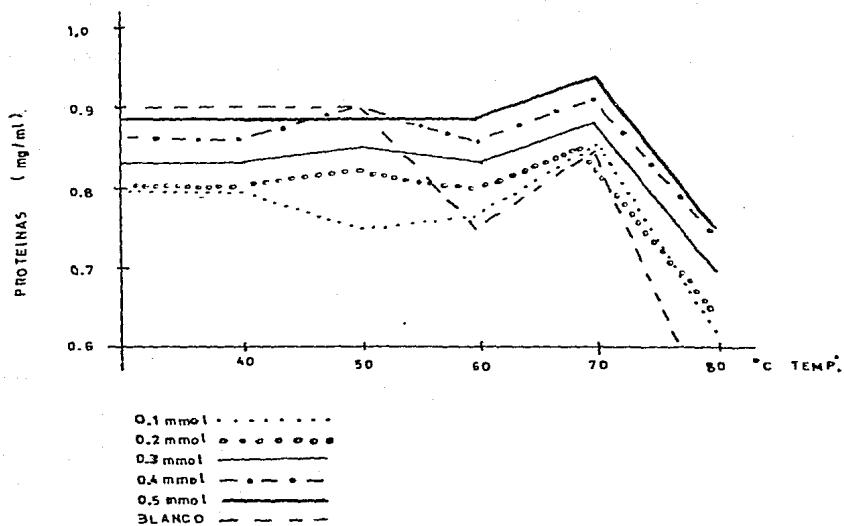
FUENDE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	1.84	0.4605	26.16*
Entre diluciones	5	0.27	0.055	3.125*
Entre pH	1	0.0094	0.0094	0.534
Dentro de error	49	0.8614	0.0176	
Total corregido	59	2.99	0.0505	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *.: Significancia $\alpha=0.05$

TABLA 13.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 -- min. a diferentes temperaturas la PHA-testigo en presencia de --- Co²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4



GRAFICA 19 . - CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LA PHA TESTIGO
 EN PRESENCIA DE Co^{2+} A DIFERENTES CONCENTRA-
 CIONES EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7,4



GRAFICA 20. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN LA
 PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Co^{2+}
 A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS
 A UN PH=4.0

HEMOAGLUTINACION EN (PHA) TESTIGO

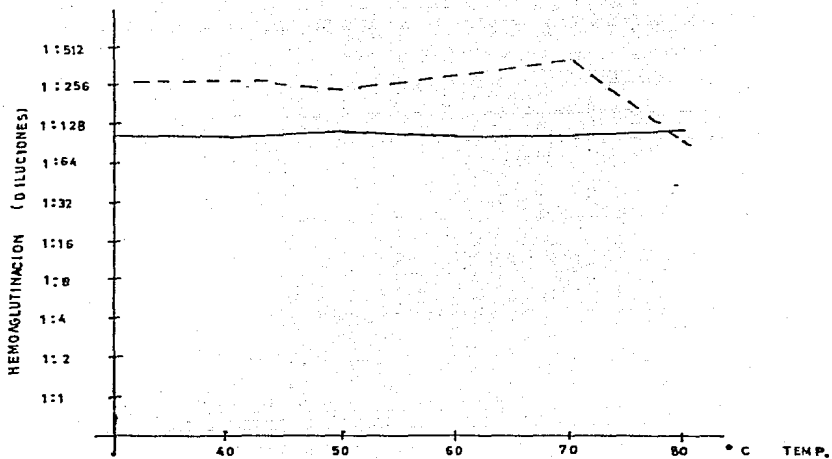
ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Co ²⁺	7.4	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:8	1:91	$\bar{X}_1=1:111$
		0.1	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:77	
		0.2	1:64	1:128	1:64	1:128	1:256	1:128	
		0.3	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	
		0.4	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	
		0.5	1:128	1:128	1:128	1:128	1:64	1:115	
	\bar{X}	1:107	1:117	1:107	1:107	1:119			
	4.0	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:32	1:96	$\bar{X}_2=1:276$
		0.1	1:256	1:256	1:512	1:512	1:128	1:333	
		0.2	1:256	1:256	1:512	1:512	1:128	1:333	
		0.3	1:512	1:256	1:256	1:512	1:128	1:333	
		0.4	1:256	1:256	1:256	1:512	1:128	1:282	
0.5		1:256	1:256	1:256	1:512	1:128	1:282		
\bar{X}	1:277	1:235	1:320	1:437	1:112				

ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	155686.36	38921.60	1.71
Entre diluciones	5	129822.9	25964.58	1.14
Entre pH	1	408705.00	408705.00	17.98*
Dentro de error	49	1114053.4	22735.78	
Total corregido	59	1806267.7	30648.605	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *.: Significancia $\alpha=0.05$

TABLA 14.- Títulos de hemoaglutinación de la PHA-testigo en presencia de Co²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4 a diferentes temperaturas.



GRAFICA 21. — TITULOS PROMEDIO DE HEMOAGLUTINACION DE LA
 PHA TESTIGO EN PRESENCIA DE Co^{2+} A DIFEREN
 TES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A
 UN PH DE 7.4 (—) Y 4.0 (---)

PHA - TESTIGO MAS Zn^{2+}

La concentración de proteínas varía ligeramente (tabla 15) a las distintas concentraciones de Zn^{2+} , dando valores más a un pH = 4.0 (gráficos 22 y 23). La actividad es más estable a más altas concentraciones del catión (tabla 16) manteniéndose en 1:256 a un pH = 4.0, dando más alto (1:512) a un pH de 7.4 a 70°C, bajando después al aumentar hasta los 80°C pero no se pierde totalmente (gráficas 24 y 25).

PROTEINAS (PHA) TESTIGO

ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}
Zn ²⁺	7.4	0.0	.96	.95	.80	.80	.75	.85
		0.1	.81	.77	.80	.76	.74	.78
		0.2	.81	.78	.80	.79	.74	.78
		0.3	.79	.80	.83	.86	.78	.81
		0.4	.84	.83	.86	.87	.78	.84
		0.5	.84	.85	.86	.89	.82	.85
		\bar{X}	.84	.83	.82	.83	.77	
	4.0	0.0	.90	.90	.75	.85	.50	.78
		0.1	.90	.87	.85	.86	.85	.87
		0.2	.91	.89	.85	.86	.88	.88
		0.3	.95	.92	.90	.92	.89	.92
		0.4	.95	.95	.92	.95	.92	.94
		0.5	.95	.95	.95	.95	.95	.95
		\bar{X}	.93	.91	.87	.88	.83	.89

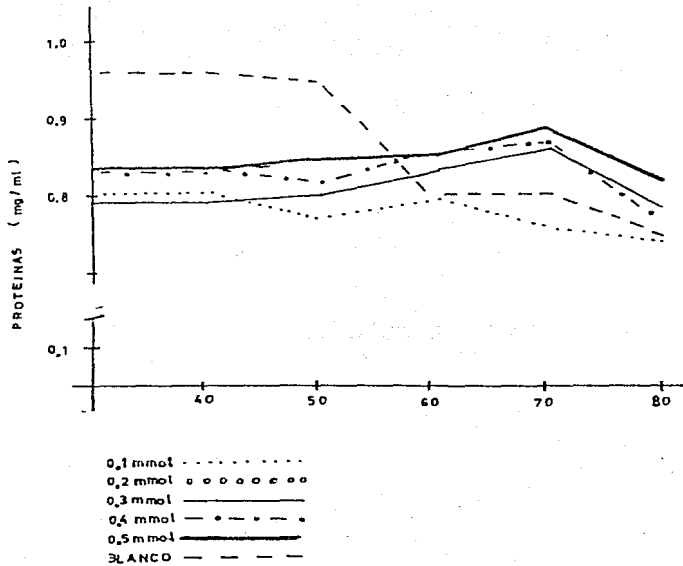
 $\bar{X}_1 = 0.82$ $\bar{X}_2 = 0.89$

ANDEVA

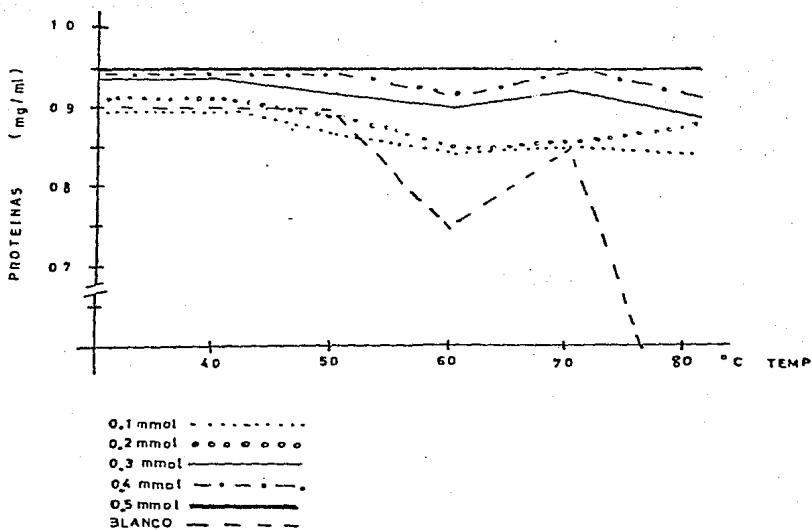
FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.0512	0.0128	3.42*
Entre diluciones	5	0.0646	0.0129	3.45*
Entre pH	1	0.0721	0.0721	19.28*
Dentro de error	49	0.1835	0.0037	
Total corregido	59	0.3714	0.0063	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia $\alpha=0.05$

TABLA 15.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 - minutos a diferentes temperaturas la PHA-testigo en presencia de Zn²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4



GRAFICA 22, — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN LA
PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Zn^{2+}
A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS
A UN PH=7,4



GRAFICA 23. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Zn^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN pH=4.0

HEMOAGLUTINACION EN PHA-TESTIGO

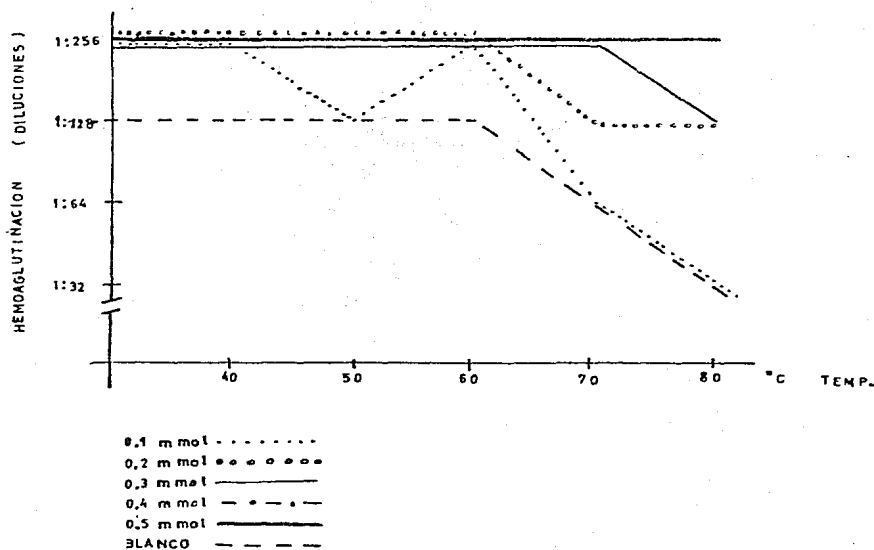
ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	X	
Zn ²⁺	7.4	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:8	1:91	$\bar{X}_1 = 1:197$
		0.1	1:128	1:128	1:128	1:256	1:64	1:141	
		0.2	1:128	1:128	1:128	1:256	1:64	1:141	
		0.3	1:256	1:256	1:256	1:512	1:64	1:269	
		0.4	1:128	1:256	1:256	1:512	1:128	1:256	
		0.5	1:256	1:256	1:256	1:512	1:128	1:282	
		\bar{X}	1:171	1:192	1:192	1:352	1:76		
	4.0	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:32	1:96	$\bar{X}_2 = 1:194$
		0.1	1:256	1:128	1:256	1:64	1:32	1:147	
		0.2	1:256	1:256	1:256	1:128	1:128	1:205	
		0.3	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	1:230	
		0.4	1:256	1:256	1:256	1:128	1:256	1:230	
		0.5	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	
		\bar{X}	1:235	1:213	1:235	1:149	1:137		

ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	134848.03	33712.00	5.32*
Entre diluciones	5	241259.7	48251.94	7.62*
Entre pH	1	86.33	86.33	0.0136
Dentro de error	49	310307.24	6332.8	
Total corregido	59	686501.3	11635.615	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia = 0.05

TABLA 16.- Títulos de hemaglutinación de PHA-testigo en presencia de Zn²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4 a diferentes temperaturas.



GRAFICA 25. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Zn^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH=4,0

PHA - TESTIGC MAS Mg^{2+}

La presencia de las diferentes concentraciones de Magnesio no varía la concentración de proteínas (tabla 17), manteniéndose estable al cambio de temperatura (gráfica 26). Pero la actividad sí varía de acuerdo a la concentración del Mg^{2+} dando valores de 1:256 hasta los $60^{\circ}C$ a $pH=0.4$ decayendo ligeramente al aumentar la temperatura.

Sin embargo a $pH = 7.4$ los valores son de 1:128 aumentando a los $70^{\circ}C$ regresando al valor anterior a los $80^{\circ}C$ (gráficas 27 y 28).

PROTEINAS EN PHA-TESTIGO

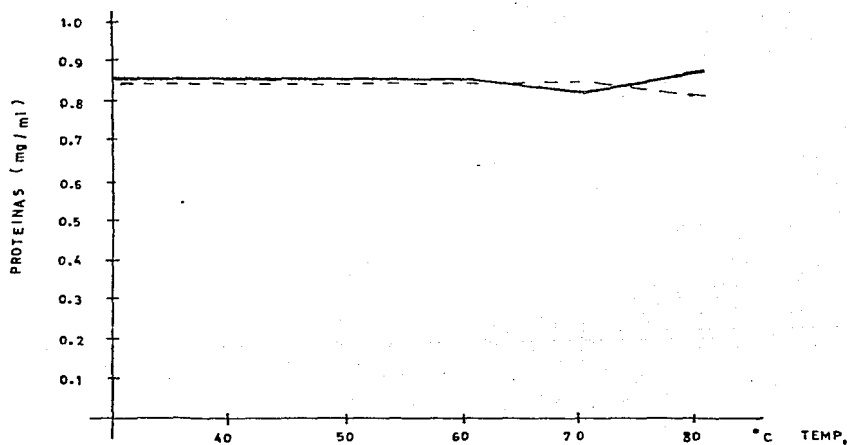
ION	pH	CONC. mmol	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Mg ²⁺	7.4	0.0	.96	.95	.80	.60	.75	.85	$\bar{X}_1 = 0.85$
		0.1	.78	.80	.83	.76	.93	.82	
		0.2	.81	.80	.83	.78	.93	.83	
		0.3	.87	.86	.86	.87	.88	.87	
		0.4	.87	.83	.80	.85	.86	.86	
		0.5	.85	.86	.89	.89	.86	.87	
		\bar{X}	.86	.85	.85	.82	.87		
	4.0	0.0	.90	.90	.75	.85	.50	.78	$\bar{X}_2 = 0.84$
		0.1	.75	.79	.80	.76	.91	.80	
		0.2	.85	.82	.84	.81	.86	.84	
0.3		.85	.85	.88	.88	.86	.86		
0.4		.89	.89	.90	.84	.90	.88		
0.5		.89	.89	.91	.90	.84	.89		
	\bar{X}	.85	.86	.85	.84	.81			

ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.0045	0.0011	0.0514
Entre diluciones	5	0.0439	0.0088	0.4037
Entre pH	1	0.00096	0.00096	0.0440
Dentro de error	49	1.0698	0.0218	
Total corregido	59	1.1191	0.0190	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia = 0.05

TABLA 17.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar durante 10 min. a diferentes temperaturas la PHA-testigo en presencia de Mg²⁺ a un pli de 4.0 y 7.4



GRAFICA 26.-CONCENTRACION PROMEDIO DE PROTEINAS EN LA PHA
TESTIGO EN PRESENCIA DE Mg^{2+} A DIFERENTES TEMPERA-
TURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7.4
(—) Y DE 4.0 (---)

HEMOAGLUTINACION EN PHA-TESTIGO

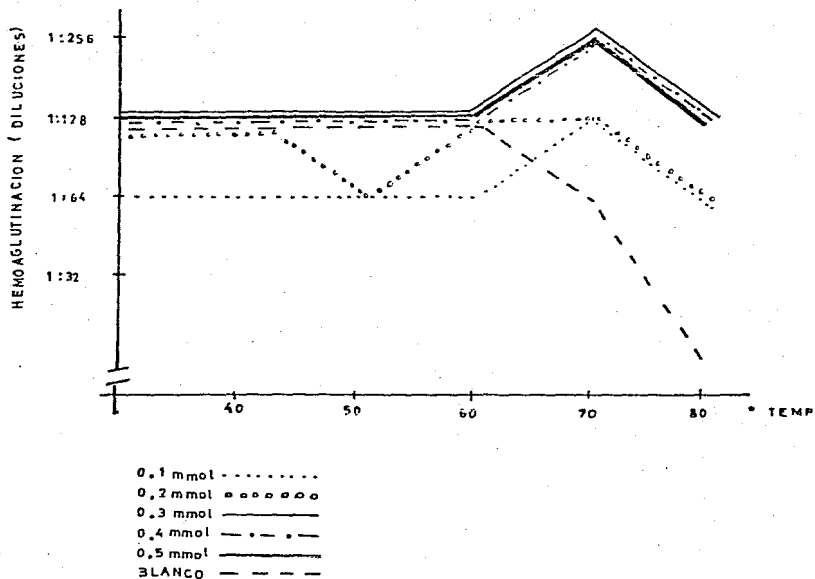
ION	pH	CONC. mmol	400C	500C	600C	700C	800C	\bar{X}	
Mg ²⁺	7.4	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:8	1:91	$\bar{X}_1=1:99$
		0.1	1:128	1:64	1:64	1:128	1:64	1:90	
		0.2	1:128	1:64	1:128	1:128	1:64	1:104	
		0.3	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
		0.4	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
		0.5	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	1:154	
	\bar{X}	1:128	1:107	1:117	1:143	1:87			
	4.0	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:32	1:91	$\bar{X}_2=1:156$
		0.1	1:128	1:128	1:128	1:256	1:64	1:141	
		0.2	1:128	1:128	1:128	1:128	1:64	1:115	
		0.3	1:128	1:256	1:128	1:256	1:64	1:166	
		0.4	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	1:230	
0.5		1:256	1:256	1:256	1:128	1:64	1:192		
\bar{X}	1:171	1:192	1:171	1:181	1:69				

ANDEVA

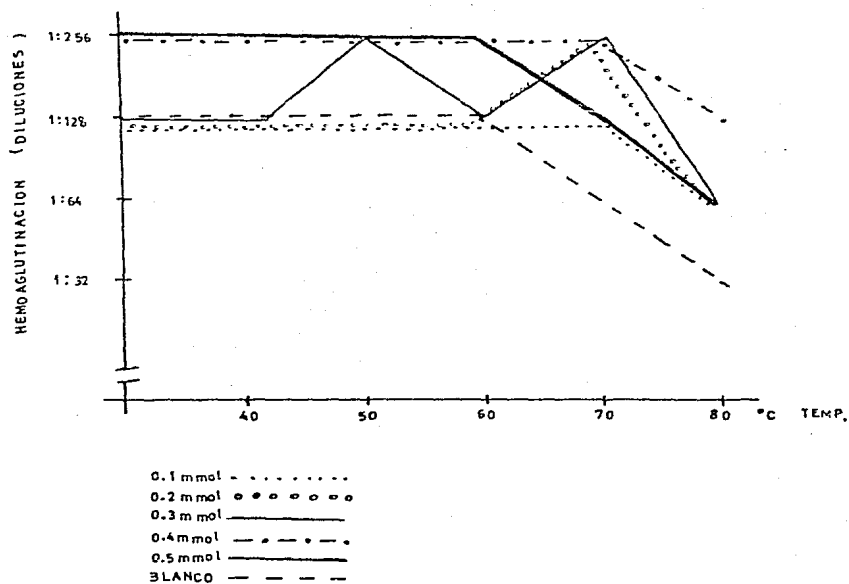
FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	83504.0	20876.00	10.93*
Entre diluciones	5	79203.2	15840.64	8.29*
Entre pH	1	16137.6	16137.6	8.45*
Dentro de error	49	93593.6	1910.7	
Total corregido	59	272438.4	4617.6	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F: Cociente de Fisher
 *: Significancia =0.05

TABLA 18.- Títulos de hemoaglutinación en la PHA-testigo en presencia de Mg²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 27. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Mg^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7,4



GRAFICA 28. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE M_4^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A PH DE 4,0

PHA - TESTIGO MAS Ca^{2+}

La concentración de proteínas no tiene diferencia significativa (tabla 19) con respecto a la concentración del Ca^{2+} a un pH = 7.4 pero a un pH = 4.0 sí hay diferencia, dando en ambos casos valores más bajos que el blanco (gráficas 29 y 30). La actividad muestra una diferencia con respecto al pH (tabla 20), ya que son más altos los títulos a un pH = 4.0 que a un pH = 7.4 variando al mismo tiempo de acuerdo a la concentración (gráficas 31 y 32).

PROTEÍNAS EN PHA-TESTIGO

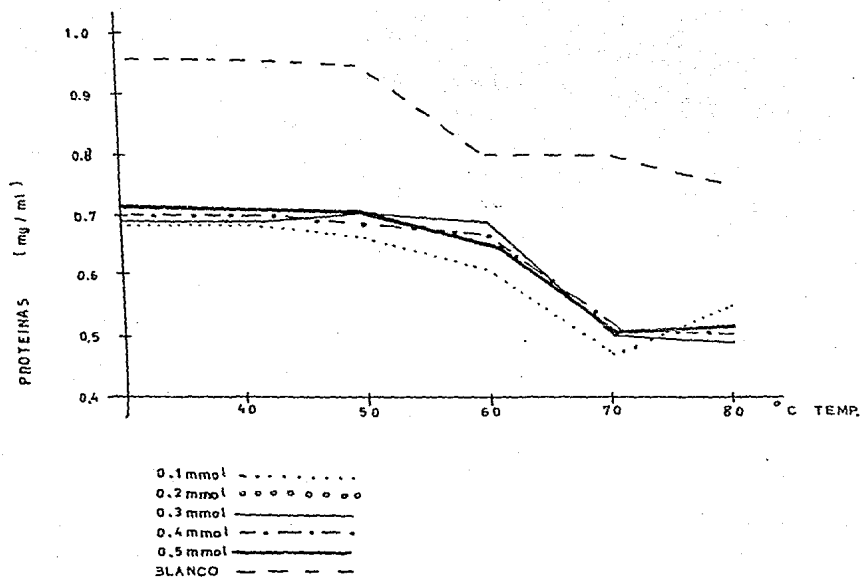
IO:	pH	CONC. mmol	400C	500C	600C	700C	800C	\bar{X}	
Ca ²⁺	7.4	0.0	.96	.95	.80	.80	.75	.85	$\bar{X}_1=0.65$
		0.1	.68	.66	.62	.47	.54	.59	
		0.2	.68	.66	.65	.48	.53	.60	
		0.3	.68	.70	.69	.50	.48	.61	
		0.4	.70	.68	.67	.50	.50	.61	
		0.5	.70	.70	.65	.52	.52	.62	
		\bar{X}	.73	.72	.68	.68	.55		
	4.0	0.0	.90	.90	.75	.85	.50	.78	$\bar{X}_2=0.75$
		0.1	.70	.65	.70	.61	.60	.65	
		0.2	.74	.68	.76	.65	.64	.69	
		0.3	.78	.75	.79	.69	.84	.77	
		0.4	.81	.78	.75	.96	.74	.81	
		0.5	.80	.81	.79	.86	.71	.79	
		\bar{X}	.79	.74	.76	.77	.67		

ANDEVA

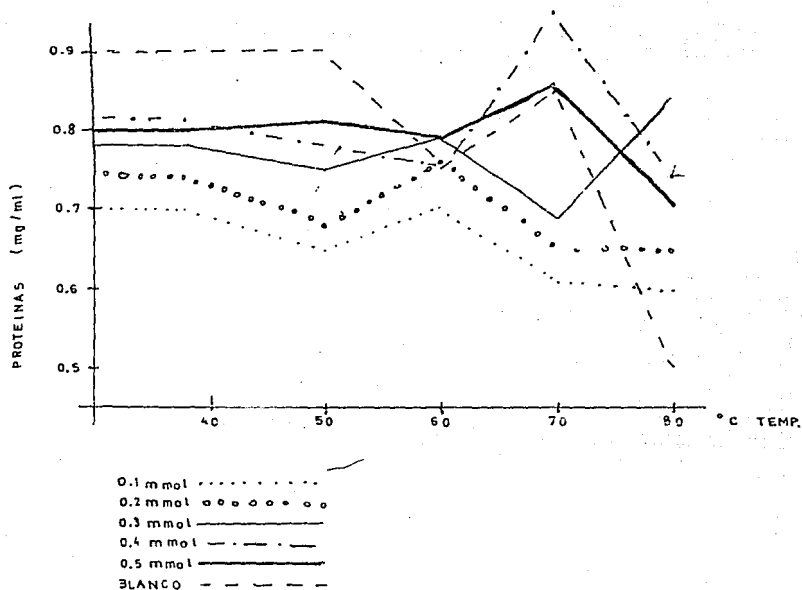
FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Entre temperaturas	4	0.1844	0.0461	6.4*
Entre diluciones	5	0.2240	0.0448	6.22*
Entre pH	1	0.157	0.157	21.8*
Dentro de error	49	0.3528	0.0072	
Total corregido	59	0.9182	0.0156	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 C.M.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia =0.05

TABLA 19.- Concentración de proteínas determinadas después de calentar 10 min. a diferentes temperaturas de la PHA-testigo en presencia de Ca²⁺, a un pH de 4.0 y 7.4



GRAFICA 29. — CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACION DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH = 7,4



GRAFICA 30. CONCENTRACION DE PROTEINAS DETERMINADAS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 4.0

HEMOAGLUTINACION EN PHA-TESTIGO

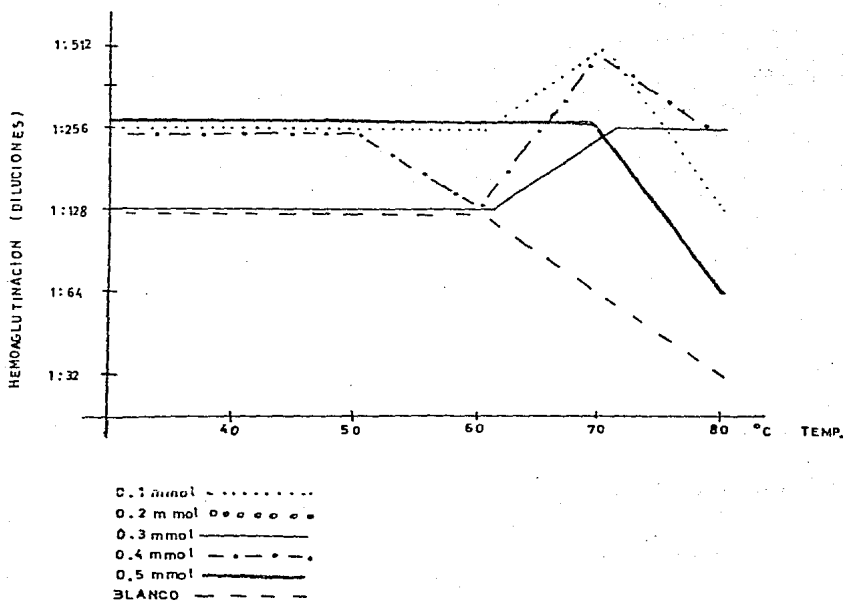
ION	pH	CONF. inicial	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	\bar{X}	
Ca ²⁺	7.4	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:8	1:91	$\bar{X}_1 = 1:124$
		0.1	1:64	1:128	1:128	1:64	1:128	1:102	
		0.2	1:64	1:128	1:128	1:128	1:128	1:115	
		0.3	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	
		0.4	1:128	1:128	1:64	1:128	1:128	1:115	
		0.5	1:128	1:128	1:64	1:128	1:64	1:192	
	\bar{X}	1:107	1:128	1:107	1:107	1:97	1:124		
	4.0	0.0	1:128	1:128	1:128	1:64	1:32	1:96	$\bar{X}_2 = 1:202$
		0.1	1:256	1:256	1:256	1:512	1:128	1:282	
		0.2	1:128	1:256	1:256	1:256	1:128	1:205	
0.3		1:128	1:128	1:128	1:256	1:256	1:179		
0.4		1:256	1:256	1:128	1:512	1:128	1:256		
0.5		1:256	1:256	1:128	1:256	1:64	1:192		
\bar{X}	1:192	1:213	1:171	1:299	1:315				

ANDEVA

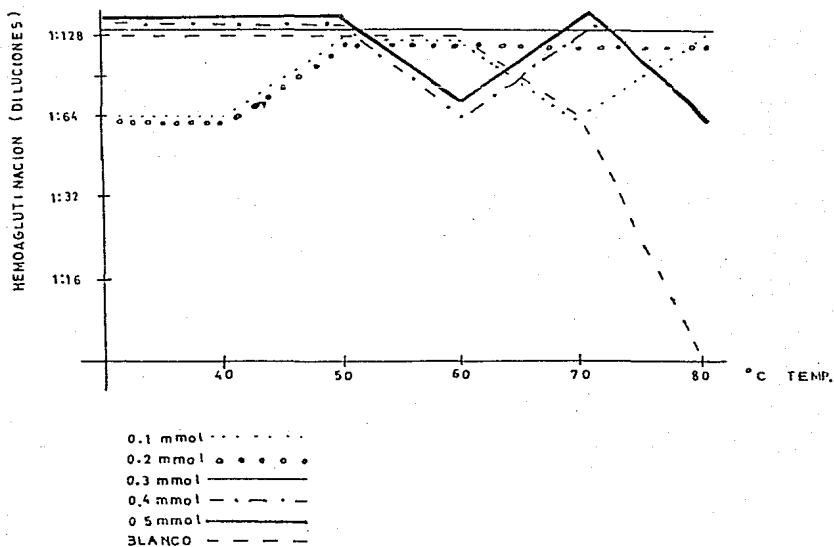
FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	M.C.	F
Entre temperaturas	4	64533.3	16133.32	10.27*
Entre diluciones	5	253624.5	50724.9	32.29*
Entre pH	1	128436.23	128436.23	81.77*
Dentro de error	49	76963.17	1570.68	
Total corregido	59	523557.3	8873.85	

ANDEVA: Análisis de varianza
 G.L.: Grados de libertad
 S.C.: Suma de cuadrados
 M.C.: Media de cuadrados
 F.: Cociente de Fisher
 *: Significancia = 0.05

TABLA 20.- Títulos de homoaglutinación en la PHA-testigo en presencia de Ca²⁺ a un pH de 4.0 y 7.4, a diferentes temperaturas.



GRAFICA 31. TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS EN BUFFER DE FOSFATOS A UN PH=4.0



GRAFICA 32. — TITULOS DE HEMOAGLUTINACION DETERMINADOS EN LA PHA TESTIGO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} A DIFERENTES TEMPERATURAS CON BUFFER DE FOSFATOS A UN PH DE 7,4

CATION	PHA-FRIJOL NEGRO						PHA-TESTIGO					
	pH 4.0			pH 7.4			pH 4.0			pH 7.4		
	Prot.	Hemoag.		Prot.	Hemoag.		Prot.	Hemoag.		Prot.	Hemoag.	
Mn ²⁺	----	1:3		----	1:67		----	1:101		----	1:97	
Co ²⁺	0.69	1:2		0.78	1:152		0.66	1:112		0.81	1:119	
Mg ²⁺	0.72	0		0.63	1:53		0.81	1:69		0.87	1:87	
Zn ²⁺	0.89	1:69		0.73	1:195		0.83	1:137		0.77	1:76	
Ca ²⁺	0.68	0		0.77	1:75		0.67	1:123		0.55	1:97	

TABLE 21.- Comportamiento promedio de la PHA problema y testigo en presencia de cationes diferentes sometidos a pH diferentes de 4.0 a 7.4, e incubados a 80°C durante 10 minutos.

PREPARACION	PROTEINA mg/ml	PROTEINA TOTAL mg/vol total	ACTIVIDAD ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	PURIF.	RECUPERAC.
1) Homogenado (200 ml)	30.5	6100	16×10^5	9.76×10^9	-----	-----
2) Precipitado pH 4 (80 ml)	33.1	2648	40×10^4	1.06×10^9	0.25	0.1639
3) Sobrenadante pH 4 (260 ml)	13.1	3406	32×10^5	1.69×10^{10}	2	1.1168
4) Precipitado 80°C 10 min. (54 ml)	47.5	2565	5×10^4	1.28×10^8	0.031	0.0131
5) Sobrenadante 80°C 10 min. (203 ml)	3.5	712.25	40×10^4	2.85×10^8	2	0.0292
6) Precipitado ETOH (42.3 ml)	8.5	359.55	10×10^4	3.59×10^7	0.062	0.0037
7) Sobrenadante ETOH (226.7)	1.5	340.05	-----	-----	-----	-----

TABLA 22.- Concentración de proteínas y actividad hemoaglutinación en cada uno de los pasos de la extracción de la PHA a partir de frijol negro (39) a un pH de 4.0 y en ausencia de cationes.

PREPARACION	PROTEINA mg/ml	PROTEINA TOTAL mg/vol total	ACTIVIDAD ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	PURIF.	RECUPERACION.
1) Homogenado (200 ml)	30.0	6000	16×10^5	9.6×10^9	-----	-----
2) Precipitado pH 4.0 (80 ml)	27.2	2176	40×10^4	8.7×10^8	0.25	0.090
3) Sobrenadante pH 4.0 (260 ml)	14.5	3770	32×10^5	1.2×10^{10}	2	1.25
4) Precipitado 80°C 10 min. (50 ml)	52.5	2625	64×10^5	1.68×10^{10}	4	1.75
5) Sobrenadante 80°C 10 min. (209.8 ml)	5.2	1090.96	256×10^5	2.79×10^{10}	16	2.9062
6) Precipitado ETOH (6.3 ml)	36.5	229.95	32×10^5	7.36×10^8	2	0.0766
7) Sobrenadante ETOH (259 ml)	3.3	854.7	256×10^5	2.18×10^{10}	16	2.2708

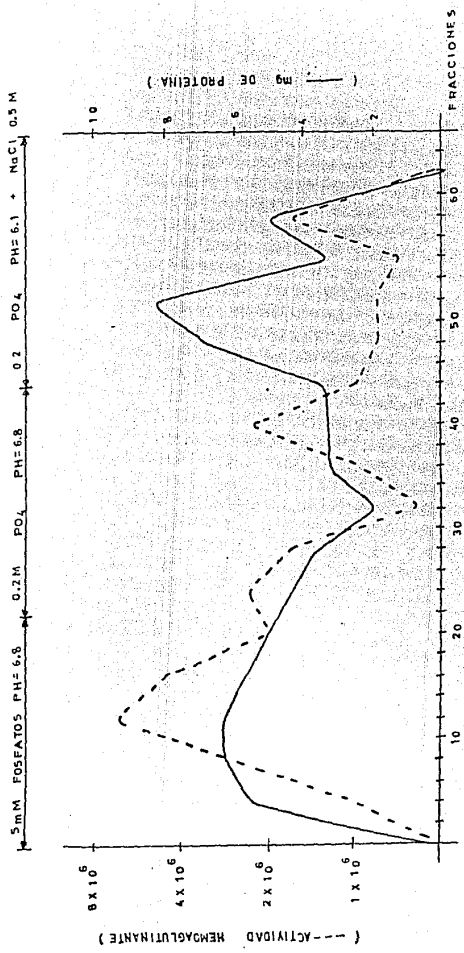
TABLA 23.- Concentración de proteínas y actividad hemaglutinante en cada uno de los pasos de la extracción de la PHA a partir de frijol negro (39) a un pH de 4.0 en presencia de Zinc.

PREPARACION	PROLINA mg/ml	PROTEINA TOTAL mg/vol total	ACTIVIDAD ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	PURIF.	MUCUP.
1) Homogenado (200 ml)	31.7	6340	16×10^5	1.014×10^{10}	-----	-----
2) Precipitado pH 7.4 (40 ml)	85.57	3422.8	20×10^4	1.84×10^8	0.125	0.0674
3) Sobrenadante pH 7.4 (170 ml)	16.5	2805	64×10^5	1.79×10^{10}	4	1.7653
4) Precipitado 80°C 10 min. (56.6 ml)	17.8	1007.48	20×10^4	2.015×10^8	0.125	0.0198
5) Sobrenadante 80°C 10 min. (113.3 ml)	15.5	1756.15	10×10^4	1.75×10^8	0.062	0.0172
6) Precipitado ETOH (11.4 ml)	85.05	969.57	40×10^4	3.87×10^8	0.25	0.0382
7) Sobrenadante ETOH (130.6 ml)	6.0	783.0	-----	-----	-----	-----

TABLA 24.-- Concentración de proteínas y actividad hemaglutinante en cada uno de los de la extracción de la PHA a partir de frijol negro (39) a un pH de 7.4 en ausencia de cationes.

PREPARACION	PROTEINA mg/ml	PROTEINA TOTAL mg/vol. total	ACTIVIDAD ESPECIFICA	ACTIVIDAD TOTAL	PURIF.	RECUPERAC.
1) Homogenado (200 ml)	31.0	6200	16×10^5	9.92×10^9	=====	=====
2) Precipitado pH 7.4 (40 ml)	85.8	3432	20×10^4	6.86×10^8	0.125	0.0691
3) Sobrenadante pH 7.4 (170 ml)	16.0	2720	64×10^5	1.74×10^{10}	4	1.754
4) Precipitado 80°C 10 min. (55 ml)	11.5	632.5	25.6×10^6	1.619×10^{10}	16	1.6249
5) Sobrenadante 80°C 10 min. (115 ml)	18.0	2070	25.6×10^6	5.29×10^{10}	16	5.3226
6) Precipitado ETOH (5.5 ml)	100.0	550	32×10^5	1.76×10^9	2	0.1774
7) Sobrenadante ETOH (150 ml)	10.0	1500	12.8×10^6	1.92×10^{10}	8	1.9355

TABLA 25.- Concentración de proteínas y actividad hemaglutinante en cada uno de los pasos de la extracción de la PHA a partir de frijol negro (39) a un pH de 7.4 en presencia de zinc.



GRAFICA 33. — CROMATOGRAFIA EN DEAE CELULOSA DE LA PHA EXTRAIDA DEL FRUOL NEGRO

DISCUSION DE RESULTADOS

Los métodos utilizados para la extracción de Fitoheماغلutininas fueron hechos considerando las propiedades fisicoquímicas de éstas como proteínas.

Una de las técnicas más utilizadas es la de Jaffé (1974) en donde trata de obtenerlas en forma selectiva. Por lo que en este trabajo se siguió esta metodología.

Reportó un trabajo con 21 variedades de frijol a los cuales -- determinó su actividad hemoaglutinante y mitogénica. Se confirma en este trabajo que no hay actividad hemoaglutinante sobre eritrocitos de humano,

puesto que la actividad se va perdiendo con el aumento de la temperatura, aunque este autor reportó actividad en otro tipo de eritrocitos como son los de conejo, vaca y hamster (38) que aquí no se probaron.

De acuerdo a los antecedentes de que la actividad hemoaglutinante varía en algunas fitohemaglutininas en presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} (17), se probó la actividad con estos dos cationes y otros como el Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} pertenecientes a la misma familia (en forma de cloruros), buscando las condiciones adecuadas para la proteína y sea más estable a los aumentos de temperatura sin perder su actividad, basándonos en la propiedad de que las globulinas son más solubles a altas temperaturas, lográndose obtener la mayor cantidad posible (29).

Al mismo tiempo se varió el pH, ya que lo anterior fué observado a un pH = 4.0, probándose a pH = 7.0 también, notándose que en ausencia de cationes la proteína es más estable a este último pH en donde la actividad hemoaglutinante decae ligeramente a los 80°C.

Notándose sin embargo a los dos diferentes pHs que no se desnaturaliza toda la proteína existente en la muestra, indicándonos la presencia de otras proteínas más estables a las condiciones empleadas de incubación a diferentes temperaturas por 10 min., que en este trabajo no se comprobó su actividad mitogénica.

La concentración de proteínas en el extracto de frijol negro varía con respecto a la concentración del catión utilizado en los casos de Co^{2+} ,

Mg^{2+} , Zn^{2+} , y no influye significativamente cuando se trata de Ca^{2+} , Mn^{2+} . Pero la variación observada no influye en la actividad hemoaglutinante de la Fitohemaglutinina ya que aún en presencia de los cationes la actividad se pierde al llegar a los $80^{\circ}C$ hasta la dilución 1:2 a un pH de 4.0, excepto cuando se prueba con el Zn^{2+} .

A un pH = 7.4, se mantiene la actividad aunque en algunos casos decae ligeramente al llegar a los $80^{\circ}C$, pero dando títulos un poco más altos que el blanco, demostrando también una estabilidad en presencia de los diferentes cationes. Esta estabilidad es explicable si consideramos la carga negativa neta de la proteína a un pH = 7.4, con lo que facilitaría la unión con los cationes. El tipo de unión anterior no sería aplicable a un pH de 4.0, sin embargo, los resultados nos indican un tipo de unión entre la Fitohemaglutinina y el Zn^{2+} , el cual estabiliza independientemente del pH utilizado. El comportamiento de este catión a comparación del Mn^{2+} y Co^{2+} de la misma familia es una excepción, lo cual es sabido también para sus propiedades fisicoquímicas, las cuales son explicadas debido a que tienen sus orbitales "d" completamente llenos por los que se piensa que son los orbitales "s" los que participan en la unión con otros compuestos (8), mostrando títulos más altos de hemoaglutinación a concentraciones más altas de éste.

Para una mejor comparación se probó la actividad hemoaglutinante en presencia de los mismos cationes en la PHA de Difco, que es obtenida de frijol rojo, lográndose los siguientes resultados: En ausencia de cationes la PHA es más estable a un pH = 4.0 al aumentar la temperatura, con respecto a un pH = 7.4. La tabla 21 es una comparación de la concentración

de proteínas, así como sus títulos de hemoaglutinación a una temperatura de 80°C , resaltando la estabilidad por el Zn^{2+} sobre la PHA del frijol negro independientemente del pH. En la PHA testigo es vista una estabilidad a un pH = 4.0 a diferencia de un pH = 7.4, en donde la estabilidad es dada por el Cu^{2+} .

La extracción fué efectuada en presencia y ausencia de Zn^{2+} a pHs de 4.0 y 7.4, lográndose una mayor actividad en los sobrenadantes de cada uno de los pasos debido a la solubilidad de la PHA, obteniéndose un índice de purificación igual para ambos pHs. Pero al tratar de precipitar con Etanol la proteína, se observa que ésta permanece en el sobrenadante (tablas 23 y 25), ya que el Zinc de alguna forma impide la precipitación, una hipótesis es que el Etanol no puede desplazar al Zn^{2+} , en base a esto se dializó la muestra para la eliminación del catión.

En la cromatografía, se notaron cuatro fracciones, las que varían en su actividad hemoaglutinante en una forma proporcional a su carga positiva, esto es deducido por el tipo de cromatografía aniónica utilizada, en cuanto al número de fracciones y la variación de actividad es semejante al frijol rojo que ha sido mencionado en varios trabajos, sin embargo en las propiedades fisicoquímicas de ambas PHAs, no podemos asegurar una igualdad.

C O N C L U S I O N E S :

- La extracción empleada en este trabajo es confiable por la cantidad de proteínas determinadas en el extracto, que coinciden con el porcentaje reportado en las semillas de un 25 - 35% en el caso del frijol, lo anterior se logró debido a la solubilidad de las proteínas en solución salina. Además de que el método es más económico que los que emplean sulfato de amonio, ya que se precipita con Etanol.

- El extracto de frijol negro tiene un comportamiento variado con cada uno de los diferentes cationes. No se puede relacionar este comportamiento con las propiedades fisicoquímicas de los cationes.

- La actividad hemoaglutinante decae a un pH de 4.0 en presencia de los cationes (excepto con el Zinc), esto se va haciendo visible desde los 60°C.

- Los títulos de hemoaglutinación son más altos a un pH = 7.4 en comparación con los determinados a un pH = 4.0, destacando que la actividad se mantiene aún a los 80°C.

- La presencia de Zinc de alguna forma impide la precipitación de la PHA del extracto de frijol negro, ya que en ausencia de este catión la precipitación se lleva a cabo.

En la cromatografía se notaron cuatro fracciones, las cuales difieren en su actividad hemoaglutinante.

Finalmente, para realizar una extracción de la PHA a partir de frijol negro, se tiene que tratar de mantener estable la proteína, lo que se puede lograr a un pH de 7.4 en presencia de Co^{2+} o Zn^{2+} , las cuales le confieren estabilidad en su actividad hemoaglutinante, aún a los 80°C , donde se esperaría una desnaturalización.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) ALLAN D. y Crompton M.J.
"Fractionation of the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris by Poliacrilamide gel electroforesis in Sodium Dodecyl Sulphate". Bioch. and Bioph. Research. Comm. Vol. 44. No. 5, 1971. Pags. 1143-48.
- 2) ARANEO Antonio e Iriarte Tomás
"Química Analítica Cualitativa".
Ed. Mc. Graw Hill, 1984. Pags. 546, 551.
- 3) BARONDES S.H.
"Lectins: their multiple endogenous cellular functions"
Ann. Rev. Biochem. Vol. 50, 1981. Pags. 207-31.
- 4) BHAGAVAN N.V.
Bioquímica
Ed. Interamericana, 1984. Pags. 56, 57
- 5) BHALLA V. y Gaur V.
"Lectin Studies: A survey of Phytohemagglutinin. Interaction of lectins with Erythrocytes of ten vertebrate Species". Vox. Sang. Vol. 35, 1978. Pags. 241-47.
- 6) BOHINSKI, Robert.
Bioquímica
Fondo Educativo Interamericano, 1978. Pág. 19.
- 7) BORREBAECH y A.K. Carl.
"Detection and Characterization of Lectin from Nonseed Tissues of Phaseolus vulgaris". Planta. Vol. 161, 1984. Pags. 223-28
- 8) BURRIEL Martí, Fernando y Conde Lucena.
Química Analítica Cualitativa.
Ed. Paraninfo Magallanes, Madrid, 1972. Pág. 246.
- 9) COOPER E.H. y Barkhan P.
"Mitogenic Activity of Phytohemagglutinin".
Lacet II, July 22, 1961. Pág. 210.
- 10) CORDOVA Osnaya, Lucía
"Contribución al Estudio de la Actividad Mitogénica de la Fitohemaglutinina Aislada de algunas variedades de Phaseolus vulgaris más comunes en México"
Tesis de Licenciatura Q.F.B; U.N.A.M., F.E.S.C.

- 11) DAVIDSOHN Israel y Bernard John.
"Diagnóstico Clínico por el Laboratorio"
Cap. 29. "Citogenética". Pág. 1355-89
6a. Edición, 1979. Editorial Salvat.
- 12) DUPUIS Gilles y Leclair Benoit.
"Studies on Phaseolus vulgaris. Phytomagglutinin. Structural Requieriments for Simple sugar to inhibit the agglutination of human group A erythrocytes". Febs Letters.
Vol. 144. No. 1, 1982. Págs. 29-32
- 13) FELSTED L. Ronald y Leavitt D. Richard
"Purification of the Phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (Phaseolus vulgaris) by affinity chromatography" Bio. Biop. Acta. Vol. 405, 1075; 1975. Págs. 72-81
- 14) FELSTED L. Ronald y Leavitt D. Richard.
"Precipitation reactions of red kidney bean (Phaseolus vulgaris) Phytohemagglutinin isolectinas". Comp. Bioch. Physiol. Vol. 55 B, 1976. Págs. 417-21
- 15) FELSTED L. Ronald y Leavitt D. Richard.
"Phytohemagglutinin isolectin. Subunit composition".
Bio. Biop. Acta vol. 668, 1981. Págs. 132-40
- 16) FORIERS Andre y Wuilmart Christian.
"Extensive sequence homologies among Lectins from Leguminous Plants".
Bioch. and Bioph. Res. Comm. Vol. 75, No. 4, 1977. Págs. 980-86
- 17) GLAD Cristina y Borreback Carl A.
"Affinity of Phytohemagglutinin (PHA) Isolectins for serum proteins and regulation of the lectin-induced Lymfocite transformation".
The Journal of Immunology. Vol. 33, No. 4, 1984. Págs. 2126-32
- 18) HALINA Lis and Nathan Sharon.
"The Biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinin)".
Ann. Rev. Biochem. Vol. 42, 1973. Págs. 541-65
- 19) HALINA Lis y Nathan Sharon.
"Lectins as molecules and as Tools".
Ann. Rev. Biochem. Vol. 55, 1986. Págs. 35-67.
- 20) HABER Audrey y Runyon Richard.
"Estadística"
Cap. 16, "Introducción al Análisis de Varianza".
Ed. Fondo Educativo Interamericano, 1984. Págs. 246-58
- 21) HIRSCHHORN Rochelle y Brittinger Günter.
"Studies on Lisosomes: Redistribution of Acid Hidrolases in Human Lymphocytes Stimulated by Phytohemagglutinin".
The Journal of Cell Biology. Vol. 37, 1968. Págs. 412-22

- 22) KOLODKY Roselun y Hirschhorn Kurt.
"Hematology: Parties of Phytohemagglutinin".
Nature, February 15, 1964, Págs. 715-16
- 23) LAEMMLI U.K.
"Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4".
Nature, Vol. 227, August 15, 1970. Págs. 680-85
- 24) LAWRENCE W. Allen y Svenson Robert H.
"Purif of Mitogenic Proteins Derived from Phaseolus vulgaris Isolation of Potent and weak phytohemagglutinin possessing mitogenic activity".
Medical Science. Vol. 63, 1969. Págs. 334-41
- 25) LEAVITT D. Richard y Felsted L. Ronald.
"Biological and Biochemical Poperties of Phaseolus vulgaris Isolectinas".
The Journal of Biological Chemistry. Vol. 252, No. 9, 1977.
Págs. 2961-66.
- 26) LOPEZ Munguía Agustín y Quintero Ramírez Rodolfo.
"Tecnología Enzimática".
Ed. U.N.A.M., 1987. Págs. 61-78
- 27) MAGNI Anibal Ricardo.
"Inmunología e Inmunoquímica".
3a. Edición, 1982. Ed. Médica Panamericana. Págs. 462-64.
- 28) MAHAN H. Bruce
"Química, Curso Universitario".
Ed. Fondo Educativo Interamericano, 1966. Pág. 569.
- 29) MAHLER R. Henry y Cordes H. Eugene.
"Química Biológica".
Cap. 2 "Proteínas: Clasificación, propiedades, purificación".
Ed. Omega, 1971. Págs. 67-69
- 30) MASON S. Howard y West Staund Edward.
"Bioquímica Médica".
4a. Edición, 1969. Ed. Interamericana. Págs. 253-54.
- 31) MILLER Bruce y Nores Claudia.
"Phytohemagglutinin mitogenic proteins".
The Journal of Experimental Medicine. Vol. 138, 1973. Págs. 939-51.
- 32) MILLER J. Bruce y Hsu Robert.
"Extensive Homology between the Subunits of the Phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from Phaseolus vulgaris".
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 72, 1975. Págs. 1388-91.

- 33) MORSE H. Jane.
"Immunological Studies of Phytohemagglutinin. Reaction between Phytohemagglutinin and Normal Sera".
Immunology. Vol. 14, 1968. Págs. 713-24.
- 34) MUELENAERE H. J. H.
"Toxicity and Hemagglutinin Activity of Legumes".
Nature. Vol. 22, 1965. Págs. 827-28.
- 35) PECKSOK L. y Shields Donald.
"Métodos Modernos de Análisis Químicos".
Cap. 6: "Cromatografía en Columna de Líquidos".
Ed. Limusa, 1983. Págs. 103-113.
- 36) RIGAS A. Demetrios and Edwin E. Osgood.
"Purification and Properties of the Phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris".
J. Biol. Chem. Vol. 212, 1955. Págs. 607-15.
- 37) SKOOG Douglas y West Donald
"Análisis Instrumental". Ed. Interamericana 1975. Págs. 697, 729.
- 38) TAKAHASHI.
"Some Physical and Chemical Properties of a Phytohemagglutinin Isolated from Phaseolus vulgaris".
Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 133, 1967. Págs. 123-33
- 39) TOYOSHIMA Satoshi, Minoru Fukuda.
"Chemical Nature of the Receptor Site for Various Phytomitogens".
Biochemistry. Vol. 11, No. 21, 1972. Págs. 123-133
- 40) WEBER Klaus and Mary Osborn.
"The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis".
The Journal of Biological Chemistry. Vol. 244, No. 16, 1969.
Págs. 4406-4412.
- 41) WEBER Theodor, Heikki Haro Norman.
"Characterization of Lymphocyte-Stimulating blood cell agglutinating glycoproteins from red kidney beans (Phaseolus vulgaris)".
Biochimica et Biophysica. Acta. Vol. 263, (1972). Págs. 94-105.
- 42) WERNER G. Jaffé, Abraham Levy and Dolores I. González.
"Insolation and Partial Characterization of Bean Phytohemagglutinin".
Phytochemistry, 1974. Vol. 13. Págs. 2685-93.
- 43) YACHININ Stanley, Lawrence W. Allen.
"The Potentiation of Phytohemagglutinin-Induced Lymphocyte Transformation by cell-cell Interaction: A Matrix Hypothesis".
Cell Immunology. Vol. 3, 1972. Págs. 569-89.

- 44) YACHNIN S., R. H. Svenson.
"The Immunological and Physicochemical Properties of Mitogenic Proteins Derived from Phaseolus vulgaris".
Immunology. Vol. 22, 1972. Págs. 871-83.
- 45) YANG, H. and Robert A. Conard.
"Some Properties of Mitogenic Components Isolated from Phytohemagglutinin by a Preparative gel Electroforesis".
Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 146, 1971. Págs. 525-30.