



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Efecto del corte foliar en la expresión de moléculas bioactivas de la planta de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*)

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Biología

Presenta: Bárbara María Cabello Ruíz

SINODALES

Dr. Ricardo Cervantes Jiménez

Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Secretario

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

Sinodal

Dr. Octavio Roldán Padrón

Sinodal

MCH. Francisco Josué Martínez López

Sinodal

Dra. Juana Elizabeth Elton
Puente

Directora de la Facultad de
Ciencias Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Piña

Directora de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo 2021

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO A CARGO DE LA DRA.
TERESA GARCÍA GASCA**

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios primeramente, porque es quien me esfuerza día a día, quien guía mis pasos y me sustenta, gracias por permitirme conocer un poco más de tu infinita y perfecta creación, gracias por abrir mis ojos para conocerte y amarte más cada día, gracias por llamarme y llenarme de gozo; y gracias por permitir que mi mamá estuviera presente en este logro.

Gracias mis padres:

A mi papá Miguel Cabello Morales, por siempre estar a mi lado, por consentirme y cuidarme en cada paso de mi vida, por siempre estar ahí para mí, para ayudarme, por ser ese hombre fuerte, alegre y entregado que ha sido mamá y papá, siempre fuerte e incansable.

A mi mamá Bárbara Leticia Ruiz Barrios, por ser siempre la mujer más fuerte, por siempre ayudarme, aun cuando pareciera que no es así, siempre piensas en mí y estás ahí para mí. Gracias por desde siempre dejar una gran parte de ti en mí, en la educación y hábitos que siempre nos enseñaste y por cada día ser ejemplo de amor y fortaleza.

Gracias a ambos por educarnos con todo el amor, dedicación y entrega, esto es para ustedes porque el esfuerzo de cada día no ha sido en vano. Los amo.

Gracias a mis hermanos; Migue por ser compañero de vida, sufrimientos y alegrías y por siempre creer en mí. Gracias Andy por tu apoyo incondicional siempre, los amo.

Gracias a mi familia que me ha ayudado y apoyado día a día desde hace más de 14 años con el cuidado de mi mamá y directamente a mí; gracias Evita, Gracias tía Güeris, gracias Silvia por ser extensión de mi mamá y sus esposos, mis tíos Víctor y Salvador respectivamente, así como a toda mi familia en general por toda su

ayuda; aun cuando las cosas han sido más difíciles siempre es mejor teniendo un gran equipo.

Gracias a Johnny, mi amor y compañero de vida, gracias por siempre estar a mi lado, por tu apoyo incondicional y complementarme perfectamente. Dios no se equivoca.

Gracias a Ricardo, mi director de tesis, por brindarme esta oportunidad, por creer en mí y ayudarme con entrega y paciencia compartiéndome de su conocimiento. A Octavio, Jos, Ángel, Angie y Dani que me ayudaron con alegría, paciencia y entusiasmo. Gracias porque fueron quienes creyendo en mi estuvieron apoyándome, enseñándome, ayudándome en este trabajo compartiéndome de sus conocimientos y empapándome más y más de la pasión con la que trabajan.

A la doctora Tere Gasca gracias por ser un gran ejemplo de entrega y veracidad ante lo que es educar en la verdad y el honor, gracias por la ayuda dentro de la carrera y por hacerme formar parte de algo tan importante para mí.

Gracias al doctor Jorge Luis Chávez Servín, porque sin conocerme me brindó su apoyo y confianza, haciéndome parte de algo tan importante.

Gracias a Mónica Figueroa por la parte estadística, por plasmar en las gráficas de este trabajo su dedicación, vocación y entrega para con su trabajo.

Gracias a Perla Esmeralda Jiménez Castillo, Alexa Becerra Navarrete, Ricardo Botello Núñez, quienes proporcionaron los eritrocitos A+ para este proyecto.

A Chio, mi amiga de siempre, por ayudarme en la carrera aunque tuvieras que desvelarte a mi lado.

A todos ustedes gracias.

RESUMEN

Las plantas han desarrollado muchas estrategias de defensa ante situaciones de estrés de carácter físico, biológico y químico, al ser organismos sésiles que no pueden huir de situaciones de estrés ya sea por amenazas o situaciones climáticas adversas. Algunas de las formas de protección que presentan las plantas es la producción de biomoléculas como proteínas de resistencia o compuestos fenólicos, respondiendo contra diversos tipos de daño o situaciones de estrés biótico y abiótico. En el presente trabajo se dividieron tres grupos de plantas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), se realizaron diversos cortes foliares en la etapa de llenado de vainas de la planta. Al primer grupo se le hizo un corte foliar al 50% de las hojas, al segundo grupo se le realizó un corte foliar al 80% de las hojas, mientras que al grupo control no se le realizó daño mecánico. Posterior a esto se colectaron hojas y las semillas de los tratamientos y se realizó la determinación de proteínas tipo lectina e inhibidor de proteasa en un precipitado al 70%. Se determinaron compuestos fenólicos en hoja, donde se pudo determinar una disminución de varios compuestos en el tratamiento con 50% de corte foliar y un aumento en el tratamiento a 80% de corte foliar. Para las proteínas de semilla se pudo determinar un incremento en la actividad aglutinante con el daño mecánico al 80% de las hojas, y no se presentaron diferencias significativas en la actividad inhibitoria contra enzimas. Los resultados indican que el daño mecánico en la planta no demuestra un cambio en el incremento en los valores medidos en hoja y en las proteínas de la semilla.

Palabras clave: Frijol Tépari, Lectinas, Inhibidores de proteasa, Proteínas de resistencia, Compuestos fenólicos

ABSTRACT

Plants have developed many defense strategies in the face of physical, biological and chemical stress situations, as they are sessile organisms that cannot flee from stressful situations either due to threats or adverse climatic situations.

Among the types of protection that plants present is the production of biomolecules such as resistance proteins or phenolic compounds, which respond against various types of damage or situations of biotic and abiotic stress.

In this work, Tepary bean plants (*Phaseolus acutifolius*) were divided in three groups, the first group had a 50% mechanical leaf cut, the second group had a leaf cut of 80%, while the control group remained unharmed.

The seeds of the plants of the different treatments were collected and the determination of lectin-type proteins and protease inhibitors was carried out. The phenolic compounds of the leaves were determined, where a decrease of several compounds could be observed in the treatment with 50% of foliar cutting, and an increase in the treatment to 80% of foliar cutting. In the case of the seed proteins, there was an increase in the binding activity, and there were no significant differences in the inhibitory activity of trypsin and chymotrypsin.

The results did not show statistically significant changes in the expression of biomolecules with respect to the control plants.

Keywords: Tepary beans, Lectins, Protease inhibitors, resistance proteins, Phenolic compounds

Tabla de contenido

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Leguminosas	13
2.1.1. Características biológicas de las leguminosas	15
2.1.2. Semilla de frijol Tépari	15
2.2. Proteínas	17
2.2.1. Proteínas de resistencia	18
2.2.1.1. Lectinas	19
2.2.1.1.1 Clasificación de las lectinas	22
2.2.1.1.2. Lectinas de frijol Tépari	23
2.2.1.2. Inhibidores de proteasas	24
2.2.1.2.1. Clasificación de los Inhibidores de proteasas	25
2.2.1.2.2. Inhibidores de proteasas vegetales	25
2.3. Metabolitos secundarios	27
2.3.1. Compuestos fenólicos.....	28
2.3.1.1. Flavonoides	30
2.3.1.2. Taninos	31
2.3.1.3. Antocianinas	32
2.3.1.4. Capacidad antioxidante	33
2.4. Nitratos y nitritos	33
3. Justificación	35
4. Hipótesis	35
5. Objetivo general	36
5.1 Objetivos específicos	36
6. Materiales y Métodos	37
6.1 Obtención de semillas de frijol Tépari	37
6.1 Preparación de parcela y germinación de plantas	37
6.2 Caracterización de compuestos de hoja	39
6.2.1 Preparación del extracto foliar	39

6.2.2. Determinación de compuestos fenólicos totales	39
6.2.3. Determinación de flavonoides	40
6.2.4 Taninos condensados.....	40
6.2.5. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial	40
6.2.6. Nitratos y Nitritos	41
6.3. Capacidad antioxidante	42
6.3.1. DPPH.....	42
6.3.2. TEAC o ABTS.....	42
6.4. Extracción de lectinas e IPs de semilla de frijol	43
6.5. Caracterización fisicoquímica del extracto LIP-70	44
6.4.1. Perfil electroforético SDS PAGE	44
6.4.2. Identificación de glicoproteínas	44
6.4.3. Actividad aglutinante.....	44
6.4.4. Actividad inhibitoria	45
6.4.5. Zimograma de inhibición	46
6.4.6. Análisis estadísticos.....	46
7. Resultados y Discusión	47
8. Conclusión.....	60
9. Referencias bibliográficas	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Ejemplo de daño mecánico realizado a las hojas	40
2. Determinación de compuestos fenólicos totales	46
3. Determinación de flavonoides totales	46
4. Determinación de taninos condensados	47
5. Determinación de antocianinas	48
6. Determinación de nitritos y nitratos	49
7. Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH)	49
8. Determinación de la capacidad antioxidante (ABTS)	50
9. Análisis de correlación	51
10. Perfil electroforético tinción de coumassie	52
11. Perfil electroforético tinción de schiff (PASS)	53
12. Actividad aglutinante	54
13. Aglutinación presente en cada tratamiento	55
14. Zimograma de inhibición	56
15. Unidades de actividad enzimática	56

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las plantas están sujetas a múltiples tensiones bióticas y abióticas que generan estrés y pueden afectar su productividad. Han ido desarrollando a través del tiempo varias adaptaciones específicas ante y para enfrentar dichas condiciones ambientales; entre las cuales se encuentran la regulación de un mecanismo complejo tanto celular como molecular (Rehman y col., 2017), incluyendo mecanismos morfológicos, características estructurales, así como compuestos químicos que son sintetizados ante dichas situaciones adversas. Los mecanismos de defensa química pueden variar desde compuestos pequeños de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios a péptidos y proteínas que pueden hacer frente a plagas de insectos (Van den borre y col., 2011).

Las proteínas son biomoléculas que están conformadas por cadenas de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos, lo cuales adquieren una estructura tridimensional al plegarse y de esta manera llevan a cabo miles de distintas funciones. En el material genético de cada organismo es donde se verá especificada cada secuencia de aminoácidos para determinar el tipo de proteína que será sintetizada por los ribosomas. De esta manera se convierten en las biomoléculas más versátiles y diversas, encargadas de realizar una gran cantidad de distintas funciones que conforman a los Seres vivos, por mencionar algunas, las funciones transportadora, enzimática, estructural y de resistencia (Luque-Guillén, 2009). Las proteínas relacionadas con la resistencia son inducidas por las plantas en defensa ante el ataque de herbívoros. Entre las proteínas clave en la defensa y resistencia vegetal se encuentran los inhibidores de proteasas (IPs) y las lectinas. Los IPs tienen efectos negativos en la digestión inhibiendo las proteasas digestivas del intestino de los insectos atacantes, o en el caso de ser secretadas por microorganismos; reduciendo así la disponibilidad de aminoácidos indispensables para su crecimiento y desarrollo (Kuwar y col., 2015; Blanco-Labra y col. 2002; Habib y Fazili, 2007). Las lectinas a su vez tienen la capacidad de reconocer y de unirse reversiblemente a carbohidratos de membrana (Van Damme y col., 2008). Y al ser ingeridas por los insectos, interaccionan con proteínas

glicosiladas de células del intestino, teniendo efectos negativos en su reproducción, antinutricionales y tóxicos en siguientes generaciones de los insectos que las consumen (Casas-Corredor y col., 2016). Algunos de los efectos que presentan en los insectos son el estrés oxidativo, la inducción de apoptosis, la rotura de la matriz peritrófica, el borde y la capa secretora celular, así como también interferencia en la absorción de nutrimentos, hasta incluso cruzar la barrera intestinal y llegar a la hemolinfa (Van Damme y col., 2008).

Aunado a las proteínas de resistencia, los metabolitos secundarios son parte de la amplia gama y diversa de compuestos orgánicos que producen las plantas y que no participan directamente en el crecimiento y el desarrollo de la planta, distribuyéndose limitadamente entre ciertos grupos taxonómicos del reino vegetal y han tenido gran importancia adaptativa en la defensa contra ataques de insectos y microorganismos, como atrayentes para polinizadores, atrayente para animales dispersores de semillas, así como agentes alelopáticos, es decir aleloquímicos que influyen en la competencia entre las plantas (Croteau y col., 2000).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios con múltiples propiedades biológicas ampliamente distribuidos en una gran variedad de plantas (Godínez-Santillán, 2018), dichos compuestos son principalmente taninos, antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides (Katoch, 2020). Generalmente las plantas que se encuentran sometidas a estrés ya sea biótico y/o abiótico producen metabolitos secundarios y de esta manera juegan un papel importante en la adaptación de las plantas a su medio superando dichas situaciones de estrés; entre ellas se encuentran las altas o muy bajas temperaturas a las que se ven expuestas, la humedad, la intensidad de luz, la escasez de agua, alta salinidad, entre otras. Todas estas condiciones influyen en el crecimiento de la planta y la productividad de los cultivos (Akula & Ravishankar, 2011). Una de sus múltiples propiedades biológicas es la actividad antioxidante, la cual, los ha convertido en posibles candidatos para explicar la asociación que existe entre el consumo de algunos productos de origen vegetal y la disminución de riesgo a presentar enfermedades crónicas (Godínez-Santillán, 2018), ya que las plantas han sido fuente de

diferentes compuestos con capacidad medicinal, entre ellas, se encuentran las leguminosas, las cuales representan una fuente importante de compuestos bioactivos (Mojica y Mejía., 2015) como lo son IPs en las semillas y lectinas también en mayor forma en granos y semillas de leguminosas (Cervantes-Jimenez, 2015). La mayoría de las legumbres, que incluyen a las habas, alfalfa, trébol, altramuces, judías verdes y guisantes, maní, soja, judías secas, guisantes secos, garbanzos y lentejas contienen compuestos bioactivos: inhibidores de enzimas (IPs), lectinas, fitoestrógenos, oligosacáridos, saponinas y compuestos fenólicos, los cuales desempeñan funciones metabólicas en los seres humanos que las consumen (Bouchenak & Lamri-Senhadji, 2013).

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae) y es una especie poco común, es decir poco utilizada. Es una planta anual que alcanza su madurez entre 60 y 80 días después de su germinación, por lo que es de ciclo corto. Presenta una gran resistencia a la sequía, climas cálidos, adaptabilidad a concentraciones altas de sal y resistencia a muchas enfermedades (Martínez-Alarcón, 2017) (Soto-López y col., 2005). El frijol Tépari es una leguminosa rica en compuestos fenólicos y péptidos que inhiben a las enzimas encargadas de la digestión de carbohidratos como lo son las α -amilasa y α -glucosidasa, además de las lipasas, que son responsables de la degradación de triglicéridos (Valencia-Mejía y col., 2019). En la actualidad el frijol Tépari ha recibido una atención especial por las propiedades vegetales importantes antes mencionadas y como posible tratamiento alternativo ante patologías como el cáncer y/o como mejora en la productividad de las plantas ante patógenos utilizando los genes de resistencia para estudiar en cultivos transgénicos (García-Gasca y col, 2001; Moreno-Celis, 2018; Rehman y col., 2017) En diversos estudios, las lectinas han mostrado tener efecto antiproliferativo sobre células cancerosas, además de inducción a la apoptosis; esto se debe gracias a la capacidad de reconocer glicoproteínas específicas encontradas en la membrana celular, las cuales se ven alteradas en células cancerosas, de esta manera las lectinas interactúan específicamente con dichas células evitando su supervivencia y proliferación (García-Gasca y col, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Leguminosas

Las leguminosas o legumbres que incluyen a la alfalfa, trébol, altramuces, judías verdes y guisantes, maní, soja, habas, judías secas, garbanzos, guisantes secos y lentejas, son representativos de la dieta humana distribuidos en todo el mundo, incluso algunos países en desarrollo las semillas de leguminosas son la única fuente de proteínas de su dieta. Las leguminosas han recibido un creciente interés por parte de los investigadores gracias a sus múltiples beneficios para la salud que tiene su consumo, de esta manera su producción y consumo se ha ido extendiendo por el mundo (Bouchenak & Lamri-Senhadji, 2013).

En todo el mundo la conservación de los recursos fitogenéticos es considerada una prioridad, debido a las significativas implicaciones que tiene la diversidad genética sobre el desarrollo de nuevas variedades de plantas para la agricultura y la alimentación. México es considerado uno de los centros más importantes de origen de la agricultura y existe una diversidad biológica muy extensa, pues es aquí donde se han domesticado más de cien especies importantes en la alimentación de hoy en día como lo son el chile (*Capsicum ssp.*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), maíz (*Zea mays L.*), calabaza (*Cucurbita spp.*) y frijol (*Phaseolus spp.*) (Vavilov, 1931; Soto-López y col, 2005).

La composición de polisacáridos, cantidad y variedad de fibras dietéticas, almidón, la composición de proteínas y la variabilidad del contenido de fitoquímicos hacen que haya una variabilidad en los efectos fisiológicos de las leguminosas.

Los fitoquímicos, son compuestos bioactivos que tienen la mayoría de las leguminosas, dichos compuestos bioactivos son los inhibidores de enzimas, fitoestrógenos, fitohemaglutinas (lectinas), saponinas, oligosacáridos y compuestos fenólicos, los cuales desempeñan actividades metabólicas en los humanos que los consumen, proporcionando beneficios para la salud contra numerosas enfermedades como por ejemplo: diabetes, hipertensión,

enfermedades coronarias, prevención del riesgo cardiometabólico e inflamación (Bouchenak & Lamri-Senhadji, 2013).

El género *Phaseolus*, es de origen americano, está conformado por cinco especies cultivadas (*P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. polyanthus* Greenm y *P. acutifolius*). *P. acutifolius* es nativo de México y de la región sudoeste de los Estados Unidos. Variaciones silvestres y domesticadas de esta especie han sido utilizadas por miles de años como alimento en zonas desérticas o en largas temporadas de sequía en Mesoamérica (Beebe y col., 2013). Además de su gran resistencia a la sequía, el frijol Tépari tolera altas concentraciones de sal y boro presentes en el suelo, así como a patógenos importantes de leguminosas como hongos (*Macrophomina phaseolina*) conocido como el carbón del frijol, al añublo (*Xanthomonas campestris*), insectos como el salta hojas (*Empoasca kramer*) y (*Acanthoscelides obtectus*) una de las principales plagas del frijol almacenado, conocido comúnmente como el gorgojo del frijol (Flórez y col., 1997), otros estudios más recientes mostraron también características de adaptación y resistencia a condiciones estresantes como salinidad, sequía y plagas (Shisanya, 2002) como el carbón del frijol *Macrophomina phaseolina*, añublo o tizon; *Xanthomona campestris*, y *Fusarium oxysporum* f sp. *Phaseoli* (Fop) (Jiménez y col., 2010).

En 2005 Soto-López y col. mostraron un estudio acerca de la distribución de 25 especies silvestres del género *phaseolus* en México mostraron que *P. acutifolius* se encuentra entre las especies que requieren menos humedad, además de tener una alta adaptación al calor, estando en lugares cálidos, ya que es el desierto sonorense la principal área de distribución y muy probablemente de origen de *P. acutifolius*. Es una planta que tiene un ciclo corto, produce grano de alto grado proteico y calidad para consumo humano (Jiménez y col., 2012).

2.1.1. Características biológicas de las leguminosas

Las leguminosas contienen compuestos benéficos para la salud humana, como por ejemplo proteínas, saponinas, glucósidos, taninos, alcaloides, entre otros, teniendo variaciones en su bioquímica y en la distribución en las legumbres, así como en los efectos fisiológicos (Muzquiz y col; 2012). Algunos de estos son importantes en los mecanismos de defensa contra depredadores y las condiciones ambientales a los que se pueda ser expuesta la planta, también poseen algunos compuestos antinutricios como los inhibidores de proteasa y las lectinas (Sánchez de Jesús, 2014) ácido fítico, taninos condensados, polifenoles, inhibidores de la amilasa reduciendo la calidad nutricional de la proteína (Arteaga y col., 2016). Algunos factores antinutricionales son termolábiles, es decir susceptibles a un tratamiento térmico, por lo cual pueden también clasificarse (Chaparro, y col., 2009). Se ha visto como a través de diversas características como la aglutinación o los factores antinutricios pueden contrarrestar a los depredadores (Chrispeels, 1991).

Dentro de las leguminosas existen aproximadamente 150 especies conocidas de frijoles en todo el mundo. Únicamente en México hay 65 especies aproximadamente, de las cuales 52 son pertenecientes al género *Phaseolus* y 31 de estas especies son endémicas de México (Alcázar-Valle y col, 2020).

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ha sido de gran interés al contar con una gran cantidad de moléculas por su resistencia a climas áridos, así como defensa ante agentes patógenos. Diversos estudios han mostrado capacidad citotóxica diferencial de células cancerígenas, haciéndolo un blanco de estudio muy alentador en la actualidad (García-Gasca y col, 2001).

2.1.2. Semilla de frijol Tépari

Phaseolus acutifolius es conocido como frijol Tépari en México de donde es originario y se encuentra distribuido en las zonas áridas del país por su capacidad de tolerancia a la sequía, además de resistir a enfermedades que afectan a otras

variedades de su mismo género *P. vulgaris*; por ejemplo, infección por xantomonas (Ortega de Santiago, 2012)

Esta especie de frijol es menos común que otras, es una planta anual de ciclo corto y alcanza su madurez entre 60 y 80 días después de su germinación. El cultivo de este frijol se hace mayormente en áreas desérticas por su resistencia a climas áridos, altas temperaturas y gran adaptabilidad a concentraciones salinidad alta (Martínez-Alarcón, 2017).

El frijol Tépari es una de las cinco especies que han sido domesticadas del género *Phaseolus* (Mhlaba, 2018). Tiene un gran contenido proteico del 13% al 34% de la materia seca, haciendo comparación con otras leguminosas de grano que tienen entre el 15% y el 40% de proteína, otras variedades de frijol común contienen del 20% al 30% (Flórez y col., 1997) mostrando cualidades nutricionales y contenido proteico alto y de alta calidad adecuados para el consumo humano (Micheletto y col., 2007). Asimismo, se han observado genes que han sido novedosos para la tolerancia ante el estrés abiótico y biótico. Aún con esas características, ha sido subutilizado como cultivo. En contraparte, para la investigación ha habido un interés con respecto a sus propiedades enfocado en el mejoramiento genético para el desarrollo de cultivos, la extracción de la fracción concentrada de lectinas e inhibidores de proteasas como tratamientos alternativos a ciertos tipos de cáncer, así como en la parte de la medicina alternativa (Mhlaba, 2018). México se encuentra dentro de la región Mesoamericana y es considerada como centro primario de diversidad de las especies cultivadas del frijol, aproximadamente 80 especies del género *Phaseolus*. Estudios que han sido realizados con ayuda de marcadores moleculares sugieren los estados de Sinaloa y Jalisco podrían ser donde se originó la variedad de *P. acutifolius* específicamente (Gepts y col., 1986; Soto-López y col, 2005).

2.2. Proteínas

Las funciones que tienen las proteínas, son varias, diferenciadas entre ellas y de suma importancia, ya que determinan la estructura y la forma de las células, permitiendo a las células defenderse de agentes externos, mantener su integridad estructural, controlar y regular sus funciones y reparar los daños. Esto lo realizan gracias a su unión selectiva a moléculas y de esta manera llevan a cabo un sinfín de interacciones y funciones en las células (Luque-Guillén, 2009).

Las proteínas se conforman a partir de la unión de 20 aminoácidos que se unen covalentemente en diferentes combinaciones para formar diversos tamaños y estructuras, a dicha secuencia se le conoce como la estructura química central de la proteína y el orden de los aminoácidos de la secuencia o estructura primaria de la proteína determinarán la función que desempeñará cada proteína (Luque-Guillén, 2009). Sin embargo, este polímero de aminoácidos lineales pueden unirse en cuatro niveles de organización según el tamaño: estructuras primaria, ya sea simple unión de dos aminoácidos llamado dipéptido, secundaria gracias a los puentes de hidrógeno que permiten un plegamiento de los polipéptidos, terciaria conformadas por polipéptidos, en un forma tridimensional permitiendo a los átomos que los componen la interacción con otros ligandos y estructura cuaternaria conformada por varias cadenas polipeptídicas, es decir una proteína oligomérica, formando macromoléculas (Guerrero y col., 2003). Por lo tanto, gracias a estas estructuras que adquieren las proteínas es que pueden llevar a cabo miles de funciones específicas en las células para cada tipo de proteína, entre ellas funciones transportadoras, enzimáticas, estructurales, hormonales, de reserva, reguladoras, de defensa, entre otras, siendo las biomoléculas más versátiles y con mayor diversidad en los seres vivos, dirigiendo casi todos los procesos celulares vitales (Luque-Guillén, 2009).

2.2.1. Proteínas de resistencia

Las proteínas de resistencia (R) están directamente relacionadas en el reconocimiento de patógenos y el inicio a la defensa de la planta (Lukasik, 2009). Es conocido como el sistema inmune innato de la planta. Estas proteínas comúnmente contienen repeticiones de leucina (LRR), un sitio central de unión a nucleótidos (NBS) así como un dominio amino terminal variable. Los LRR están relacionados con el reconocimiento y la especificidad de señalización es determinada por el dominio amino terminal; como ya se mencionó el NBS conforma un dominio de unión a nucleótidos, el cual funciona también como un interruptor molecular (Takken, 2006).

Evolutivamente las plantas han generado una serie de sistemas de defensa contra la infección y ataque de patógenos e insectos con diferentes estrategias de infección, basados en barreras constitutivas e inducibles (Lamb y col. 1989) (Chen, 2008). Las de carácter constitutivas son barreras físicas-químicas normales en el desarrollo de la planta, es decir preexistentes al ataque (Lamb y col. 1989) (Jones y Dangl, 2006) las cuales pueden afectar al insecto una vez que ha ingerido la planta con una toxicidad directa o en la reducción de la digestibilidad (Jones y Dangl, 2006) pueden ser clasificadas como antinutricionales, afectando el valor nutricional (Chen, 2008). Las defensas inducibles son activadas al momento que se está teniendo contacto o daño tisular por el invasor de la planta requiriendo una ruta de señalización regulada a nivel transcripcional con expresión de genes de defensa (Lamb y col., 1989; Jones y Dangl, 2006; Chen 2008). Ambos sistemas de defensa podrán variar y ser particulares según la especie, ya que se encuentran en la memoria genética y dependerá de la capacidad de sintetizar sustancias específicas contra patógenos de cada especie de plantas (García, 2003; Tofiño y col., 2007).

Dentro de estas estrategias mencionadas físicas y moleculares que han ido desarrollando las plantas a través del tiempo ante ataques de insectos y microorganismos, las que son dirigidas al intestino de los insectos y han generado mucho interés por los efectos tóxicos y/o antimetabólicos con repercusiones en

aspectos de la fisiología y el desarrollo de los mismos a través de la ingesta de proteínas bioactivas como lo son los IPs (Lawrence y Koundal, 2002) y las lectinas (Napoleão y col., 2019). Muchos de los genes involucrados se activan o reprimen al ser sensibles al estrés, regulando de manera precisa la tensión, conduciendo a una respuesta ante el estrés y tolerancia a nivel celular (Rehman y col., 2017).

2.2.1.1. Lectinas

Existen múltiples proteínas vegetales con un papel clave en la defensa y resistencia de las plantas, entre ellas se encuentran las lectinas (Blanco-Labra y col. 2002). Las lectinas son proteínas de origen no-inmune de unión a carbohidratos, con capacidad de aglutinación celular y/o precipitación de glicoconjugados (Goldstein y col., 1980; Sharon y Lis, 2004) transformación de linfocitos, además de presentar algunos efectos tóxicos (Vierbuchen, 1991). Son proteínas muy estables (Chen, 2008) y poseen por lo menos un dominio específico no catalítico que se une reversiblemente, específica y no enzimática a monosacáridos, polisacáridos o como estructuras de glucano unidas a proteínas o lípidos (Peumans and Van Damme, 1995). Hasta ahora, esta definición es aceptada por la comunidad científica (Van Damme y col., 2008; Van Holle y Van Damme, 2018).

El estudio de las lectinas comenzó hace más de cien años por su efecto de aglutinación celular, visto en eritrocitos, plaquetas, linfocitos, espermatozoides y células tumorales (Gabiús, 2000); convirtiéndose en blanco de interés para el diagnóstico y estudio de patologías asociadas con alteraciones en la glicosilación celular, como en algunos tipos de cáncer (Ghazarian y col., 2011; André y col., 2015; Kudelka y col., 2015), reconocimiento de glicosilaciones asociadas a tumores (Gorelik y col., 2001). Las lectinas se unen a la superficie celular no covalentemente reconociendo proteínas específicas de las membranas celulares, que frecuentemente se ven alteradas en las células cancerosas (García-Gasca y col., 2012). Por lo tanto gracias a la capacidad de las lectinas de interactuar con glicoproteínas de membrana ha sido posible el reconocimiento selectivo de

glicoproteínas alteradas en células cancerosas como por ejemplo en aglutinina de *Viscum álbum*, *L. coloratu*, selección que impide a las células cancerosas proliferar induciendo dichas células a la apoptosis (Park y col, 2001) teniendo entonces un potencial terapéutico por su actividad antitumoral y efectos citotóxicos que inducen a la muerte celular programada como la apoptosis y la autofagia (Fu y col., 2011). En otro estudio se evaluó el efecto de una fracción concentrada de lectina de frijol Tépari (TBLF) sobre el crecimiento de líneas celulares de cáncer humano; cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75), células de cáncer en el cuello uterino (HeLa, SiHa y C33A) y células de cáncer de colon (CaCo2), donde se observó un efecto citotóxico 72 hrs después de tratamiento en todas las líneas celulares de cáncer humano, teniendo una mayor sensibilidad a la TBLF la línea de cáncer de colon (CaCo2), mostrando así la capacidad de reconocer selectivamente tipos de células cancerosas diferentes, mayormente en el reconocimiento entre células normales y cancerosas (López-Martinez y col., 2008). En el 2012 García-Gasca y col en otro proyecto, informaron que las fracciones de proteína de frijol Tepari con lectina, mostraron un efecto antiproliferativo sobre los fibroblastos 3T3 murinos transformados y no transformados, por lo que sobre los fibroblastos transformados 3T3 hubo una retención de su actividad biológica (García-Gasca y col; 2012).

Sin embargo, aunque las lectinas se encuentran conformando a todos los Seres vivos, existe una mayor caracterización en las proteínas de unión a carbohidratos de las plantas. Éstas proteínas vegetales son muy diversas en cuanto a sus estructuras moleculares, sus propiedades bioquímicas, secuencias que las conforman y por lo tanto las actividades biológicas que desarrollan, clasificándose en diferentes familias (Lambin, y col., 2020) La estructura tridimensional de las lectinas vegetales en general se caracteriza por láminas β , conectadas por vueltas α y β y curvas. Las interfaces cuaternarias y los bucles cortos se forman entre láminas β y estas están conectadas por bucles formando cadenas antiparalelas que generalmente se encuentran desprovistas de hélice α (Clavijo, 2018).

Las lectinas tienen una interacción con los glicoconjugados que están relacionados a las superficies celulares, de esta manera tienen un efecto negativo

en la parte del intestino medio de los insectos. El estrés oxidativo, la inducción de apoptosis, la rotura de la matriz peritrófica, el borde y la capa secretora celular, así como también interferencia en la absorción de nutrimentos, hasta incluso cruzar la barrera intestinal y llegar a la hemolinfa, son algunos de los efectos que presentan los insectos. Sin embargo, aunque a través de la coevolución poblaciones de insectos han presentado resistencia ante esta presión selectiva, gracias a la acción de los inhibidores de proteasa y principalmente a las lectinas, esta resistencia por parte de los insectos se ve minimizada (Napoleão y col., 2019). Napoleão y col en 2019 revisó los mecanismos de acción que tienen las lectinas en el intestino medio. Una vez que el insecto ha ingerido las lectinas, éstas no se degradan rápidamente por lo que existe una interacción entre las lectinas y la quitina o las glicoproteínas que se encuentran en el intestino medio del insecto teniendo un efecto negativo en la integridad del mismo. Las lectinas se unen también a receptores de membrana lo cual puede provocar una reacción en cascada contra las mitocondrias provocando muerte celular programada y afectando también la absorción de nutrimentos, la digestión, señalización y transporte a través del intestino medio. Por otra parte, las lectinas pueden causar efectos sistémicos cuando logran entrar a la hemolinfa (Liu y col., 2019).

Se han encontrado en investigaciones previas como (Sanz-Aparicio y col., 1997; Vandenborre y col., 2011) el papel de las lectinas vegetales en el almacenamiento y transporte de hidratos de carbono en las semillas, crecimiento de la planta, en la inhibición del crecimiento de los hongos, en la unión de bacterias fijadoras de nitrógeno a la raíz de la planta, así como mecanismo de defensa contra insectos depredadores (Vandenborre y col., 2011).

2.2.1.1.1. Clasificación de las lectinas

Las lectinas las encontramos ampliamente distribuidas en todos los reinos, donde se incluyen bacterias, animales, plantas, incluso virus y protozoarios (Branco y col., 2004; Lannoo y col., 2007; Martínez-Alarcón, 2017).

Con el paso del tiempo han ido apareciendo nuevas y diferentes formas de agrupar a las lectinas con base a diferentes criterios de clasificación por ejemplo en las que se refiere a ellas por su origen taxonómico; es decir que las divide según los organismos donde se encuentren por ejemplo lectinas vegetales, lectinas animales, lectinas de bacterias, entre otros. Otra manera de clasificarlas es por su localización dentro de la célula por ejemplo lectinas extracelulares, lectinas intracelulares, lectinas citoplasmáticas, lectinas de unión a membrana, entre otras. Con respecto a su función por ejemplo en animales están las galectinas, selectinas, collectinas y pentraxinas y en microorganismos las hemaglutinas, adhesinas y toxinas. Por su estructura como las lectinas tipo beta prisma (tipo B), lectinas dependientes de calcio (tipo C), lectinas de semillas de leguminosas (tipo L), lectinas de tipo ricino (tipo R), entre otras. También por su reconocimiento a carbohidratos que sólo se encuentran en plantas y animales, por ejemplo, lectinas de unión a manosa, lectinas de unión a galactosa, entre otras (Martínez- Alarcón, 2017). Se han podido clasificar en 12 familias con respecto a la estructura de sus dominios de unión a carbohidratos (Van Damme, 2008).

Las lectinas desempeñan muchas y diversas funciones biológicas fundamentales en las plantas, porque se encuentran en muchos órganos y tejidos de muchas especies diferentes dependiendo de su función en la planta, conformando casi toda la planta, semillas, órganos de almacenamientos, raíces, así como en las hojas, teniendo una gran interacción e importancia en la comunicación entre células e interacción huésped-patógeno (Sharon y Lis, 2004). Las lectinas vegetales por lo tanto se encuentran presentes una gran cantidad de actividades anti-patógenos, antivirales, antifúngicas, antibacterianas, antiinsectos y contra depredadores, dichas actividades antipatógenas les permiten actuar como estrategia de defensa y protección ante agentes externos, patógenos y nocivos

(Chang y col., 2012). En la última década se han descrito varios tipos de lectinas vegetales que son reguladas por ciertas condiciones tanto bióticas como abióticas, como estrés, ante heridas, herbivoría, sequía, frío y salinidad, a este grupo de lectinas se le conoce como "inducibles", las cuales se ha visto que se expresan principalmente en tejidos que no tienen un almacenamiento como raíces, flores y hojas. Este tipo de lectinas se diferencian por su expresión baja y su localización celular (Van Damme y col., 2008; Vandenborre y col., 2011).

Sin embargo, aunque las lectinas se encuentran de manera ubicua, conformando a todos los seres vivos, existe una mayor caracterización en las proteínas de unión a carbohidratos de las plantas. Éstas proteínas vegetales son muy diversas en cuanto a sus estructuras moleculares, sus propiedades bioquímicas, secuencias que las conforman y por lo tanto las actividades biológicas que desarrollan, clasificándose en diferentes familias (Lambin y col., 2020) De las lectinas vegetales, las lectinas aisladas de legumbres han sido las más estudiadas, éstas generalmente están constituidas por dos o cuatro subunidades iguales de 25 a 30 kDa, cada una de las subunidades tiene un sitio de unión para iones metálicos (Ferriz-Martínez y col., 2014).

2.2.1.1.2. Lectinas de frijol Tépari

Las lectinas de leguminosas son lectinas de la familia de las Fabaceae y esta es la más grande de las lectinas vegetales. Se han aislado hasta ahora 100 lectinas de legumbres de 70 especies distintas de esta familia. Robin fue la primera lectina de leguminosa aislada de la corteza de *robinia pseudoacacia* o comúnmente langosta negra en 1890 por Podery Cambier (Liener, 2012). Desde 1997 Olsen y col. Indicaron que las lectinas de leguminosas se conforman por aminoácidos que alcanzan los 30 kDa.

La mayor parte de las lectinas de leguminosas son protómeros maduros compuestas de una cadena polipeptídica de casi 250 residuos de aminoácidos. Muchas lectinas de leguminosas están N-glicosiladas y contienen una o dos cadenas de glucano. Por otra parte, las lectinas de leguminosas son las únicas entre las plantas que son metaloproteínas, es decir que son lectinas que los

protómeros están unidos fuertemente a los iones Mn^{2+} y Ca^{2+} responsables de su propiedad de unirse a los carbohidratos (Peumans y col., 2001). Debido a estas características ha sido de gran interés el estudio de las propiedades de las lectinas del frijol Tépari.

Trabajos in vitro realizados sobre diferentes líneas celulares con cáncer en base a una fracción concentrada de lectina de frijol Tépari mostraron un efecto citotóxico diferente sobre las células normales y de células cancerígenas, mostrando mayor sensibilidad las células de cáncer de colon ante las lectinas (García-Gasca y col., 2012). Por lo cual en los últimos años han sido objeto de estudio de carbohidratos complejos y los cambios producidos en las interacciones celulares cuando ocurren los procesos fisiológicos y patológicos, dando a conocer que cuentan con un amplio espectro de aplicaciones en el ámbito industrial y farmacológico (Ferriz-Martínez y col., 2010).

2.2.1.2. Inhibidores de proteasas

Existen proteínas importantes que se encuentran relacionadas con la defensa, unas de ellas son los Inhibidores de proteasa vegetal (IPs) y se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas. Dichas proteínas vegetales (IPs) son de tamaño pequeño, heterogéneas, específicas y se han descrito se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, además de en tejidos de almacenamiento como tubérculos y semillas (De Leo y col., 2002), encontradas en gran cantidad en las semillas y tienen un papel importante en la degradación de las proteínas, metástasis y apoptosis, así como equilibrar y regular algunos procesos proteolíticos reduciendo o neutralizando su acción catalítica, además de estar involucradas en la modulación de la tolerancia ante situaciones de tensión y estrés abiótico., por esta gran multifuncionalidad a través del tiempo, los IPs son una alternativa como tratamiento contra enfermedades como SIDA, tumores, patologías virales, o disminución de metástasis, entre otros, además de su papel en la protección contra plagas y patógenos en plantas (Rehman y col., 2017; García, 2014; Blanco-Labra, 2002)

Las investigaciones de los inhibidores de proteasa vegetal (IPs) comenzaron hace 60 años, después de la segunda guerra mundial cuando Kunitz, Bowman y Birk purificaron y caracterizaron los inhibidores de proteasa en la soja. Posteriormente se encontraron nuevas familias de genes relacionadas, hasta ahora que conocemos 13 familias diferentes de genes inhibidores de proteasa, las cuales se dirigen a todas las principales familias de proteasas, comúnmente se encuentran inhibiendo las proteasas de herbívoros o patógenos de plantas (Jongsma & Beekwilder, 2011).

2.2.1.2.1. Clasificación de los Inhibidores de proteasas

Las plantas cuentan con un gran número de inhibidores de proteasas clasificados en: inhibidores de serin proteasas, inhibidores de cistein proteasas, inhibidores de metaloproteasas e inhibidores de aspártico proteasas, de acuerdo las enzimas que reconocen y actualmente son clasificadas en diversas familias con respecto a la estructura del dominio que presentan y a la secuencia de aminoácidos (Chaparro, Porrilla y Elizalde, 2009; Rawlings y col., 2008). Entre los inhibidores de proteasa vegetales el que más se ha estudiado es el de soya Bowman-Birk (IBB), el cual es un polipéptido de 7.8 kDa. Por lo tanto, se ha visto el papel importante que tienen los IPs como defensa ante situaciones adversas en plantas (Chaparro, Porrilla y Elizalde, 2009; Blanco-Labra, 2002). En 1972 Green y Ryan descubrieron hojas de plantas que habían sufrido daño mecánico de insectos, y estas indujeron altos niveles de IPs en respuesta al daño por insectos (Jongsma & Beekwilder, 2011).

2.2.1.2.2. Inhibidores de proteasas vegetales

La digestión, inmunidad y osmorregulación de los insectos es realizada en el intestino medio y por medio de proteasas digestivas degradan las proteínas a péptidos y aminoácidos, para así utilizar dichos aminoácidos en la biosíntesis de proteínas estructurales y funcionales, que son esenciales para los insectos (Dunse y col., 2010), y se sabe que una gran familia de genes de proteasas digestivas forman parte de los insectos (Ross y col., 2003; Kanost y col, 2004), Las serin proteasas, entre ellas las tripsinas, quimotripsinas y elastasas en el intestino de los insectos, son responsables de más del 90% de la actividad digestiva (Napoleão y

col., 2019), varias de éstas estrategias de defensa y funcionalmente esenciales para ellos, son perturbadas por agentes insecticidas como las proteínas bioactivas (lectinas e IPs) ya que son defensas directas inducidas como respuesta a la herbivoría por las plantas. Los IPs por ejemplo interfieren con la digestión, pues reducen la eficacia digestiva al inhibir dichas proteasas esenciales (Kuwar y col., 2015) teniendo efectos negativos en el crecimiento, desarrollo y la reproducción impidiendo la disponibilidad de aminoácidos y absorción de nutrimentos retrasando el desarrollo, reduciendo la fertilidad y causando deformidades (Napoleão y col., 2019). Por otro lado, se ha visto que existe una coevolución en los mismos en una lucha constante, lo que hace que los insectos puedan cambiar el conjunto de proteasas secretadas en su intestino, aumentando los niveles de proteasas y/o pueden inducir la expresión de proteasas que son menos sensibles a los IPs, (Habib y Fazili, 2007) (Napoleão y col., 2019) como es el caso de *Helicoverpa armígera* un lepidóptero con una gran capacidad de adaptación a los IPs. (Kuwar y col., 2015), de esta forma se lleva a cabo una batalla entre moléculas inhibitoras y proteasas, evadiendo los efectos de los inhibidores respondiendo con la inducción de proteasas insensibles a los Inhibidores de proteasa, otros insectos mostraron eficacia en la degradación de los inhibidores con proteasas (Jongsma & Beekwilder, 2011).

Diversos estudios como el de Machado en el 2017 con *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) mostró una reducción en la actividad de las proteasas de su intestino medio teniendo un efecto en la duración de los estados larvarios, pupas y adultos estadios, aumentando estas etapas que son de mayor vulnerabilidad y depredación, mostró una reducción del 96% del peso de las larvas, inducción de malformaciones y un aumento del costo metabólico. Por otro lado, en el estudio de Mital y col en el 2014 al ser incorporada el inhibidor de tripsina de semillas de *Phaseolus vulgaris* en la dieta de larvas de segundo estadio de *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera litura* (Lepidoptera) se observó inhibición en las proteasas del intestino, hubo reducción en el crecimiento larvario, retraso en el estado de pupa, generó deformidades en los adultos, así como aumento en la mortalidad.

Los efectos sobre los insectos herbívoros son a veces relativamente menores o incluso hasta ausentes con respecto a la mortalidad y el desarrollo, sin embargo, los pocos o muchos que se den, afectan ecológicamente y severamente en el desarrollo e incluso pueden seguir afectando a las próximas generaciones con una fecundidad reducida (Jongsma & Beekwilder, 2011).

Investigaciones han reportado la acción insecticida de los IPs contra Dípteros, Lepidopteros, Hemípteros y Coleopteros, dependiendo de la especificidad del inhibidor con respecto al tipo de enzima, interferirá en mayor o menor medida en la digestión de proteínas en el intestino medio del insecto.

Por ejemplo, el Coleoptero *Hypothenemus hampei* posee proteasas intestinales de alta homología con proteínas de almacenamiento como la vicilina y la conglutina y por tanto, el inhibidor de la proteasa aspártica de semillas de *Lupinus bogotensis* es muy activo contra este insecto (Molina, 2014) (Napoleão y col., 2019).

Hoy en día se utilizan los genes de resistencia para estudiar en cultivos transgénicos. *Cowpea trypsin* (CpTI) fue la primera planta a la que se le transfirió exitosamente gen PI de resistencia a insectos, en ese caso resultó altamente eficaz contra el gusano del tabaco (*Heliothis virescens*), a partir de ese acontecimiento se han realizado un considerable progreso en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos con la expresión de genes PI (Rehman y col., 2017).

2.3. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios como lo son los alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos; no se encuentran actuando en el metabolismo primario de las plantas, sino que estos compuestos químicos se encuentran interviniendo en las interacciones ecológicas importantes que existe entre la planta y su ambiente.

Dichos metabolitos son sintetizados cuando las plantas están en condiciones adversas por ejemplo el ataque de herbívoros, microorganismos y la competencia con diferentes especies por luz, agua y nutrimentos. Hoy en día se han estudiado

las propiedades curativas y nutraceuticas que proporcionan (Cabrera-Carrión, 2017).

Existen diferentes variaciones ambientales, a las cuales las plantas van a responder, como lo son por ejemplo dependiendo de la época del año en la que se encuentren, la fertilización, plagas y enfermedades y los daños que estas producen, todo ello influye en la producción de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios no se van a encontrar distribuidos de manera uniforme por toda la planta, sino que se encuentran restringidos a órganos particulares de la planta, o ya sea a determinadas células y/o tejidos dentro de ese órgano (Pérez-Pérez y col., 2014).

2.3.1. Compuestos fenólicos

Aunado a las proteínas de resistencia existen compuestos fenólicos que pueden incrementar sus niveles en diversas estructuras de las plantas, como lo son tallo, hoja, flor o fruto (Juszczuk y col., 2004), ya que son un grupo de metabolitos secundarios mayormente presentes en el reino vegetal (Boudet, 2007) y tienen un papel importante en la defensa contra la radiación UV y la agresión de patógenos, gracias a sus propiedades antibióticas, antinutricionales o desagradables, (Manach y col., 2004) además de tener propiedades antivirales, antialérgicas, antiinflamatorias, así como capacidad nutraceutica, la cual se debe a la capacidad antioxidante (Katoch, 2020).

Actualmente se han descrito miles de compuestos fenólicos vegetales que se pueden agrupar en diferentes clases conforme a su estructura química básica, es decir el número y tipo de anillos fenol y en subclases de acuerdo con su asociación a carbohidratos y formas polimerizadas (Manach y col., 2004).

Existen dos vías biosintéticas por las cuales pueden ser sintetizados los fenoles, la ruta del ácido malónico o la ruta del ácido shikímico, los flavonoides por ejemplo pueden ser sintetizados por las dos. Algunos fenoles son solubles en solventes orgánicos, otros son solubles en agua al ser glucósidos o ácidos carboxílicos y otros son polímeros muy grandes (Tomás-Barberán, 2003).

Los compuestos fenólicos en semillas de leguminosas tienen capacidad antioxidante ya que inhiben la peroxidación de lípidos, quelatan iones metálicos, así como la eliminación de radicales libres., dichos compuestos son principalmente taninos, antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides (Katoch, 2020).

Estos compuestos pueden determinar la sobrevivencia o no de una planta, cumpliendo diversos procesos como: la comunicación en las células, el crecimiento, o la reproducción. Algunos estudios han revelado que los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides, pueden ser los principales contribuyentes a la actividad antioxidante que exhiben las plantas, (Mustafa y col., 2010) además de ser los responsables de la sorprendente plasticidad metabólica vegetal que les permite adaptarse ante diferentes y cambiantes entornos abióticos y bióticos, y de proporcionar diferentes colores rojo, azul y pigmentos violetas, sabores y quelantes de metales, como agentes de señalización entre las plantas y otros organismos sobre el suelo y por debajo de él, así como pantalla ante la luz ultravioleta (Boudet, 2007; Lattanzio, 2006). Se ha reportado que semillas de color más oscuro y altamente pigmentadas, tienen alto contenido fenólico y está relacionado a su capacidad antioxidante (Katoch, 2020).

Los compuestos fenólicos tienen su producción y almacenamiento en las capas subepidérmicas de los tejidos vegetales que se encuentran más expuestos al estrés y al ataque de patógenos (Rather y col., 2017), esta concentración de los compuestos fenólicos en los tejidos vegetales se va a ver afectada dependiendo la etapa de desarrollo de la planta y su crecimiento, así como de la temporada, además de la concentración; la síntesis de los compuestos fenólicos se verán afectados también por diversos factores internos y externos como lo son las heridas, ataque de patógenos, sequía, entre otros (Bhattacharya y col., 2010).

Los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grupos: los compuestos fenólicos preformados, es decir que son sintetizados mientras la planta desarrolla normalmente sus tejidos vegetales y los compuestos fenólicos inducidos, los cuales son sintetizados como una respuesta ante situaciones de infección o de lesiones físicas, o ante estrés como radiación UV, sales de metales pesados,

temperatura, entre otros; su síntesis es mejorada durante periodos de estrés biótico y/o abiótico (Lattanzio, 2006). Hoy en día estos compuestos reciben una atención especial por sus factores y propiedades altamente protectoras contra enfermedades crónicas degenerativas como cataratas, degeneración macular, enfermedades neurodegenerativas y diabetes mellitus, así como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Scalbert y col., 2005).

2.3.1.1. Flavonoides

Son estructuras fenólicas que tienen un grupo carbonilo (Domingo & López-Brea, 2003), es decir, su esqueleto carbonado está formado por quince carbonos que se encuentran ordenados en dos anillos aromáticos que a su vez están unidos por un puente de tres carbonos y su clasificación se basa en el grado de oxidación de dicho puente, los principales son las antocianinas, las cuales proveen de pigmentos, las flavonas, flavonoles e isoflavonas, Tienen como función la defensa y la pigmentación (García & Carril, 2011). Han estado presentes en la naturaleza por más de mil millones de años, explicando la amplia gama de actividades bioquímicas y farmacológicas que ellas ejercen sobre el hombre y otros mamíferos como respuesta de la coexistencia y coevolución (Estrada y col; 2012).

Estos compuestos fenólicos fueron descubiertos por el premio nobel por Szent-György. Fue aislada de la cáscara de limón en 1930 una sustancia llamada citrina, la cual regulaba la permeabilidad de los capilares. En un comienzo los flavonoides fueron denominados vitamina P por la permeabilidad que presentaban, también fueron nombrados vitamina C por las propiedades similares a la vitamina C, pero no pudo ser confirmado que fueran vitaminas y en 1950 se quitaron como propuestas (Martínez-Flórez y col., 2002).

Los flavonoides forman la familia más amplia de los compuestos fenólicos (Domingo & López-Brea, 2003) y son de los más importantes ya que tienen una gran capacidad antioxidante y por lo tanto se les atribuye una gran capacidad de efectos terapéuticos ante diversas situaciones comprometedoras para el cuerpo humano, como lo son por ejemplo actividad antiinflamatoria, actividad cardiotónica, hepatoprotectora, antimicrobiana, antineoplástica, entre otras. Por eso es que hoy

en día ha incrementado la importancia de conocer y estudiar las propiedades antioxidantes de los vegetales que son consumidos en la dieta humana y animal también (Avella y col., 2008) Algunos flavonoides tienen capacidad antiviral, como es el caso de la glicirricina que es sintetizada por el regalíz (*Glycyrrhiza glabra*), así como muchos también hacen frente a los microorganismos (Domingo & López-Brea, 2003).

Algunos tipos de flavonoides dan resistencia a la fotooxidación de la luz ultravioleta, transporte de hormonas y defensa contra depredadores, así como resistencia ante infecciones fúngicas y virales. Las flavonas y flavonoles actúan como señales de atracción ya que se encuentran en flores donde tienen la capacidad de absorber longitudes de onda cortas que las antocianinas, de esta manera no son posibles de ver por los seres humanos, pero los insectos polinizadores si las pueden ver, ya que ellos ven en el rango del UV, asegurando así su reproducción y conservación (Estrada y col., 2012; García & Carril, 2011).

2.3.1.2. Taninos

Los taninos son sustancias fenólicas poliméricas de gran peso molecular, brindando protección a las plantas contra heridas ya que tienen toxicidad contra microorganismos y herbívoros, por lo tanto, son también considerados como factores antinutritivos por el efecto adverso que tienen sobre la digestibilidad de las proteínas (De Jesús-Benevides y col., 2011). Los taninos tienen la capacidad de unirse a proteínas para desnaturalizarlas y se dividen en hidrolizables y condensados, con respecto a la función, como su nombre lo indica, en que puedan ser hidrolizados o no. Los condensados son polímeros se componen de unidades de flavonoides que están siendo unidas por enlaces C-C por lo que no pueden ser hidrolizados, sin embargo, si pueden ser oxidados si es un ácido fuerte. Por su parte los hidrolizables, son polímeros heterogéneos que se componen de ácidos fenólicos, en especial ácido gálico y azúcares simples. Se hidrolizan con mayor facilidad ya que son de menor tamaño que los condensados (García & Carril, 2011).

Se empleó el término "tanino" para determinar a las sustancias presentes en extractos vegetales que tenían la capacidad de combinarse con proteínas de la piel animal para evitar la putrefacción y de esta manera se convertían en cuero (conocido como curtido, donde se unen al colágeno y así aumenta su resistencia al calor, microorganismos y al agua). Hoy en día se han descrito más de 30 taninos que tienen la capacidad de inhibir hongos y bacterias (Domingo & López-Brea, 2003)

Estos compuestos fenólicos tienen importancia en la relación herbívoro-planta por su capacidad de reducir la digestibilidad de las plantas actuando como repelentes ya que tienen un específico sabor astringente y en muchas ocasiones toxicidad (González y col., 2011).

2.3.1.3. Antocianinas

Las antocianinas son parte de los flavonoides y son responsables de brindar la mayoría de los colores que vemos en los frutos y flores, lo cual los hace también importantes en el proceso de la polinización y en la dispersión de semillas, su color depende de los grupos hidroxilo y metoxilo en su anillo B y también va a depender del pH de las vacuolas en que son almacenadas, por ejemplo, cianidina (rojo- púrpura) (García & Carril, 2011; Lopes y col., 2007).

La palabra antocianina proviene del griego; anthos = flor, kyanos= azul oscuro. Seguidas de la clorofila, son los pigmentos vegetales más importantes y son el grupo más grande solubles en agua. La mayor cantidad de ellos se encuentran en angiospermas (Lopes y col., 2007).

Las antocianinas son glicósidos que poseen un azúcar en posición tres y cuando no poseen ningún azúcar se conocen como antocianidinas (García & Carril, 2011). Ellas ayudan a reducir la captura de la radiación al estar presentes en la superficie de las hojas y parénquima de las plantas, de esta manera ayudan a proteger a los cloroplastos y reducen la fotooxidación y la foto-inhibición (Mendoza, 2012).

2.3.1.4. Capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos son compuestos antioxidantes, ya que tienen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo que causan los radicales libres, de esta manera ayudan a reducir el riesgo de tener varias enfermedades degenerativas que están relacionadas al estrés oxidativo. El estrés oxidativo es definido como el desequilibrio entre las especies oxidantes y las especies reductoras que se encuentran en un organismo a nivel celular. (Miller y col., 1993; Avella y col., 2008) El estrés oxidativo es un proceso biológico que sucede cuando la velocidad en que se forman los radicales libres es mayor a la actividad de los sistemas protectores, ya que estos se encargan de controlar por medio de la acción controlada de enzimas y nutrimentos antioxidantes vegetales como vitaminas y fitoquímicos, que son compuestos bioactivos antioxidantes, formando el grupo más importante en de los polifenoles los cuales son independientes del sistema enzimático (Clavijo & Herrera, 2006).

Los antioxidantes tienen la capacidad de retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, previniendo el cambio de coloración y la producción de malos olores en los alimentos, los antioxidantes pueden ser naturales o sintéticos, por ejemplo, los que se utilizan comercialmente, sin embargo, estos a menudo resultan inestables ocasionando efectos adversos. Algunos de los compuestos de origen natural con capacidad antioxidante son los carotenoides, vitamina C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros (Cardeño y col., 2007)

Hoy en día muchas personas optan por llevar una terapia antioxidante como alternativa barata para el tratamiento de enfermedades que están relacionadas con el estrés oxidativo, pues se conoce a través de diversos estudios el efecto antioxidante que tienen productos naturales que provienen de las plantas (Avella y col., 2008).

2.4. Nitratos y nitritos

Como se mencionó anteriormente existen compuestos tóxicos en las plantas, productos como metabolitos en las plantas producidos como defensa ante

diversas amenazas como hongos, bacterias, depredadores e insectos, siendo así estas sustancias tóxicas o factores antinutricios las que ofrecen un mecanismo protector para la planta (Jackson y col., 2015).

Compuestos iónicos encontrados en la naturaleza y forman parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato conocido como (NO_3^-) se refiere a la forma estable de las estructuras que han sido oxidadas del nitrógeno y tiene baja reactividad química, pero a pesar de eso puede ser reducido por acción microbológica.

El nitrito conocido como (NO_2^-) resulta oxidado fácilmente por procesos químicos o biológicos a nitrato (NO_3^-), o puede ser reducido y de esta manera originar diversos compuestos nuevos (Antón & Lizaso, 2001).

Como fuente primaria de los nitritos (80-90%) proviene de las plantas, sobre todo las verduras de hoja verde, contribuyen más del 70% del total del nitrato ingerido (Tamme y col., 2010).

3. Justificación

En las últimas décadas se han estudiado y utilizado las lectinas del frijol Tépari como agentes potenciales coadyuvantes en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. La obtención de dichas proteínas es un proceso largo y costoso por lo que es imperativo evaluar diferentes estrategias como el daño mecánico en la planta como forma de estímulo capaz de incrementar la expresión y obtención de este tipo de proteínas de resistencia que presentan actividad biológica.

4. Hipótesis

El daño mecánico manual (corte) posterior al llenado de vaina en las hojas del frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) induce la sobreexpresión de moléculas bioactivas de resistencia en hojas y semillas de la planta.

5. Objetivo general

Determinar si existe aumento en la expresión de biomoléculas como lectinas e inhibidores de proteasa y compuestos fenólicos en plantas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) mediante un corte físico de hoja posterior al llenado de vainas.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de lectinas e IPs en los diversos tratamientos
- Cuantificar las unidades aglutinantes de lectinas contra células humanas del grupo sanguíneo A+.
- Determinar la actividad inhibitoria contra diversas enzimas (Tripsina, Quimotripsina)
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas, taninos y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en extractos acuosos de planta de frijol Tépari de acuerdo a cada tratamiento.
- Determinar el contenido de nitritos y nitratos en extractos acuosos de planta de frijol Tépari de acuerdo a cada tratamiento.

6. Materiales y Métodos

6.1 Obtención de semillas de frijol Tépari

Las semillas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) fueron obtenidas en la comunidad de Arizpe en Hermosillo, Sonora, México (30°19' 51.96" N, 110° 10' 04.36" O).

6.1 Preparación de parcela y germinación de plantas

Las semillas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) fueron obtenidas en la comunidad de Arizpe en Hermosillo Sonora, (30°19' 51.96" N, 110° 10' 04.36" O). La germinación y cultivo de las semillas se realizó en la comunidad de Concá, municipio de Arroyo Seco, Qro. Ubicado en las coordenadas 21° 26' 05.7", de latitud norte y 99° 38' 22.0" longitud oeste, presentando una altitud de 520 msnm. La siembra se realizó al aire libre en tierra de cultivo, se realizó fertilización con humus de lombriz mineralizado. El riego del cultivo se realizó con un sistema de goteo con cintilla de goteros integrados, a 20 cm de distancia. La siembra se realizó de manera manual, seleccionando las semillas de color blanco-amarrillo, descartando las que presentaran tejidos necróticos, las que estuvieran dañadas o incompletas. Se colocaron semillas cada a 20cm de distancia, sobre cada semilla se colocó un gotero, para mantener el mismo porcentaje de humedad en el suelo. Las plantas fueron divididas en tres grupos mediante bloques al azar con tres repeticiones. Cuando las plantas tuvieron el 100% de su follaje vegetativo y el 100% del llenado de vainas, al primer grupo de plantas se le realizó daño mecánico foliar al 50% de las hojas; al segundo grupo se le realizó daño mecánico foliar al 80% de las hojas, y al tercer grupo de denominó control, al cual no se le realizó ningún tipo de daño mecánico. El daño mecánico consistió de dos o tres cortes en la superficie de la hoja sin retirarla de la planta como se muestra a continuación.



Figura 1. Hojas de frijol Tépari, previo al daño mecánico realizado.

Los tres grupos se mantuvieron en las mismas condiciones de riego, luz y sombra. Cuando la planta se encontró al 80% de su etapa de maduración, es decir se encontró un 80% de vainas secas (coloración amarilla o pigmentada) y un 20% de vainas frescas (a un 60% de maduración del grano) se realizó la cosecha de semillas y se colectaron muestras foliares. Las hojas fueron almacenadas en una hielera con geles congelados para transportarse al laboratorio en donde fueron secadas en una estufa con circulación forzada de aire y temperatura de 45°C y posteriormente se molieron en un molino (Tomas Wiley) con una criba de 0.5 mm. El polvo obtenido se almacenó en un ultracongelador a -80°C hasta su utilización posterior. Lo mismo se realizó con las semillas.

Las fechas de tratamiento como lo reporta Martínez–Martínez en (2015) se muestran a continuación.

Tabla 1. Modelo experimental, fechas de siembra, floración y colecta de semillas

Evento	Fecha
Siembra	3 Julio 2015
Floración	8 Agosto 2015
Formación de primeras vainas	15 Agosto 2015
Tratamientos	12 Septiembre de 2015
Cosecha	27 de Septiembre de 2015

6.2 Caracterización de compuestos de hoja

6.2.1 Preparación del extracto foliar

Se pesó 200 mg de muestra seca y molida, se extrajo con 10 mL de agua durante 30 min en un ultrasonicador (modelo BRANSON 5510) a 42 kHz +/- 6% a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel Whatman (0.20 μ m), el sobrenadante obtenido se almacenó en frascos color ámbar a -20°C hasta su análisis.

6.2.2. Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Se realizó la curva de calibración para fenoles totales utilizando ácido gálico como estándar en las concentraciones de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, y 12 μ l. Se tomó una alícuota del extracto (12.5 μ l) y se llevó a un volumen de 50 μ l de agua destilada. Posteriormente se mezcló con 32 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), se le agregaron 156 μ l de NaCo₃ al 20% y se dejó reposar en ausencia de luz durante 2 horas a temperatura ambiente. El control se preparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. Después de 2 horas se midió la absorbancia de cada una de las muestras por triplicado en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 750 nm y

los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de materia seca (mg EAG / 100 g MS).

6.2.3. Determinación de flavonoides

Los flavonoides totales se determinaron por el método colorimétrico del cloruro de aluminio (Zhishen y col., 1999). Se realizó la curva de calibración utilizando catequina como estándar en las concentraciones de 100, 200, 300, 500, 700, 900, 1000 μ l. Se tomó una alícuota del extracto (31.25 μ l) y se añadieron 156 μ l de agua destilada, después se añadieron 9.4 μ l de NaNO_2 al 5% y se dejó reposar durante 6 min, posteriormente se agregó AlCl_3 al 10% y se dejó reposar por 5 min, después se añadió 63 μ l de NaOH (1M); Finalmente se agregó 35 μ l de agua destilada. El control se preparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. La curva y la muestra se leyeron a 510 nm y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de catequina por 100 g de materia seca (mg EC/100 g, MS).

6.2.4 Taninos condensados

Los taninos condensados se determinaron por el método de vainillina (Deshpande and Cheryan, 1985). Se realizó una curva de calibración utilizando catequina como estándar en diferentes concentraciones: 0.2, 0.6, 0.8, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, y 0.20 μ l. Para la determinación de la muestra se tomó una alícuota del extracto (40 μ l) y se agregó 200 μ l de la solución de vainillina 1% recién preparada y HCl 8% en metanol con relación de 1:1. El control fue metanol sustituyendo la cantidad de la muestra aunado con 200 μ l de la solución de vainillina 1% y HCl 8%. La curva como la muestra se leyeron a una longitud de onda de 492 nm y los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina por 100 g de materia seca (mg EC/100g, MS).

6.2.5. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial

La determinación de antocianinas se realizó por pH diferencial (Del Carpio Jiménez y col., 2009). Se realizó una extracción con 200 mg en 16-18 mL de etanol acidificado en un ultrasonificador (modelo BRANSON 5510) a 42 kHz +/- 6% a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, el extracto se ajustó

a un pH de 1.0 con HCl (4N), se centrifugó a 3000 rpm por 15 min y cada uno de los extractos se filtró a través de papel Whatman (0.20 µm), después se tomó una alícuota (240 µl) por triplicado y se leyó a una absorbancia de 535 nm. La concentración de antocianinas monoméricas en la muestra se calculó como cianidina 3-glucósido, según la siguiente fórmula:

$$C = (A \times PM \times FD \times PmVol) / (\epsilon \times 1)$$

C= Concentración de antocianinas totales (mg/Kg)

A= Absorbancia máxima

ϵ : Absortividad molar de cianidina 3-glucósido ($25,965 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

Vol= Volumen total del extracto de antocianinas

PM= Peso molecular de cianidina 3-glucósido (449)

Pm= Peso de la muestra en mg

6.2.6. Nitratos y Nitritos

Los nitratos y nitritos se determinaron por el método de (Miranda y col., 2001). Para los nitratos se realizó una curva de calibración utilizando nitrato y nitrito de sodio en concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl. Para los nitritos se realizó una curva de calibración con el mismo estándar en concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32 µl. Para la determinación de nitratos se tomó una alícuota del extracto (100 µl) seguido de 100 µl de VCL_3 al 5%, 50 µl de naftil-etil-niamida y 50 µl de sulfanilamida. Se dejó 45 min en incubación y protegido de luz, la absorbancia de las muestras se midió frente al control, preparado de la misma manera solo reemplazando la cantidad del extracto por agua destilada. Para determinar los nitritos se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la excepción de que no se agregó VCL_3 al 5%. El contenido total de nitratos y nitritos se expresó como mg de equivalentes de NaNO_3 y NaNO_2 por g de materia seca.

6.3. Capacidad antioxidante

6.3.1. DPPH

La metodología de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se realizó en base a la técnica realizada por (Fukumoto and Mazza 2000). Se preparó el radical DPPH pesando 1.5 miligramos de DPPH y se disolvió en 25 ml de metanol grado reactivo. Se realizó la curva de calibración utilizando Trolox como estándar en diferentes concentraciones: 0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 μ l. Se tomó una alícuota del extracto (20 μ l) y se agregó 200 μ l de DPPH. El blanco fue 20 μ l metanol y 200 μ l de agua destilada, para el control se utilizó 20 μ l metanol y se adicionaron 200 μ l de DPPH. La curva y la muestra se dejaron en incubación en ausencia de luz durante 1 h, posteriormente se leyeron a una longitud de onda de 520 nm. Los resultados se expresaron en μ mol equivalentes de Trolox por 100 g de materia seca (μ mol ET / g ms).

La capacidad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ ARA} = [(\text{ABS control} - \text{ABS muestra}) / \text{ABS control}] \times 100$$

Donde ARA= actividad antirradical, ABS es la absorbancia a 520 nm del control y de la muestra.

6.3.2. TEAC o ABTS

El ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) se realizó en base a la técnica realizada por (Van Den Berg, y col., 1999). La técnica consistió en mezclar ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-6 ácido sulfónico) al 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM en agua por 12 h a temperatura ambiente para producir el radical ABTS.

Posteriormente la solución concentrada de ABTS se diluyó con etanol, pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 la cual se leyó en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 734 nm. Después se tomó una alícuota del extracto (20 μ l) y se le adicionó 230 μ l de la

dilución de ABTS. El blanco se realizó usando 20 µl de metanol diluido en 230 µl de etanol, mientras que el control se preparó añadiendo 20 µl de metanol y más 230 µl de ABTS. Se realizó una curva calibración utilizando Trolox como estándar en diferentes concentraciones 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 µmol. La curva como la muestra se dejaron incubar en ausencia de luz por 1 h. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a la misma longitud de onda y los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox/g de muestra seca. El porcentaje de inhibición (% IC) de ABTS se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ IC} = [(\text{ABS control} - \text{ABS muestra}) / \text{ABS control}] \times 100$$

Donde IC= inhibición, ABS es la absorbancia a 743 nm del control y de la muestra.

6.4. Extracción de lectinas e IPs de semilla de frijol

El proceso de extracción de los IP y lectinas se basó en la metodología propuesta por Campos y col. (1997) y García-Gasca y col. (2012), con modificaciones. La semilla se trituró en un molino eléctrico modelo A-10 (Analytical Tekmar, Germany) hasta obtener harina. La harina fue desgrasada con una mezcla de cloroformo-metanol 3:1 (v/v), en proporción 4:1 p/v (harina-agua) en agitación por 30 min. Los solventes se retiraron por filtración al vacío y se repitió el proceso 3 veces. La harina desgrasada se secó a temperatura ambiente. Las proteínas de interés se extrajeron de la siguiente manera. Se colocaron 100 g de harina desgrasada en 500 mL de agua desionizada, en agitación constante a 4°C durante 12 h. posteriormente, esta mezcla se centrifugó a 39,200 G. Se recuperó el sobrenadante (extracto crudo). A partir del extracto crudo se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio, iniciando con 40% de saturación, se recuperó el sobrenadante y se llevó al 60% de saturación para precipitar la proteína (P-60), el extracto se nombró (LIP-60), posteriormente la proteína obtenida se dializó contra agua utilizando membrana de 3 kDa hasta alcanzar 2 micro oms, este procedimiento se realizó para cada tratamiento de semillas de manera independiente.

6.5. Caracterización fisicoquímica del extracto LIP-60

6.4.1. Perfil electroforético SDS PAGE

Los perfiles electroforéticos de las fracciones obtenidas se obtuvieron mediante SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 10% mediante el método de Laemmli (1970). La cantidad de proteína total en la fracción se determinó previamente con el método de Bradford (1976).

6.4.2. Identificación de glicoproteínas

Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. La determinación de glicoproteínas se realizó con la técnica de tinción de Schiff (Sigma-Aldrich) ácido peryódico (PASS). Brevemente, los geles se fijaron con etanol al 50% por 30 min, posteriormente se lavaron con agua destilada por 10 min y se incubaron 30 min en una solución de ácido peryódico 1% (v/v) ácido acético 3% (v/v) (preparada en fresco). Después de esto, los geles se lavaron con agua destilada 6 veces por 5 min para después lavarse 2 veces por 10 min con una solución de metabisulfito de sodio 0.1% en 10 mM HCl (preparada en fresco) y se incubaron con el reactivo de Schiff por una hora en ausencia de luz. Pasado este tiempo se lavaron con la solución de metabisulfito de sodio al 0.1% en HCl durante 1 hora en ausencia de luz, enseguida los geles se lavaron varias veces por 2 h en ausencia de luz con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% (v/v) en 10 mM HCl (preparada en fresco). Por último, se dejaron los geles en una solución de ácido acético 7.5% (v/v) metanol 5% (v/v) en agua destilada. Las bandas color violeta indican presencia de glicoproteínas (Walker, 1994)

6.4.3. Actividad aglutinante

La determinación de la actividad aglutinante se realizó mediante el método descrito por (Jaffé, 1980), en el cual se realizan diluciones dobles seriadas en placas de 96 pozos, se colocaron 100 μ L de PBS como control negativo, después en los pozos inferiores se agregó por triplicado, 100 μ L de la fracción a una concentración de 100 μ g/mL, posteriormente se agregaron 50 μ L de PBS en el resto de placa y se realizaron diluciones seriadas comenzando en el primer pozo y pasando a los siguientes. A cada pozo se le agregaron 50 μ L de eritrocitos

humanos tipo A+ al 2%, los cuales habían sido previamente fijados con glutaraldehído (Turner y Liener, 1975) la placa se incubó a 37° C durante 2 h para posteriormente determinar la actividad específica como lo muestra en la siguiente ecuación.

$$AE = \frac{2^n}{mg}$$

Figura 2. AE=Actividad específica aglutinante (U/mg) expresada en unidades por mg de proteína inicial, n=Última dilución con aglutinación apreciable al microscopio, mientras que mg es la cantidad de proteína presente en la muestra.

6.4.4. Actividad inhibitoria

A partir de la fracción LIP-60 se determinó la actividad inhibitoria del IP contra tripsina bovina con el sustrato *N*-benzoil-arginina-*p*-nitroanillida (BApNA), de acuerdo con el método de (Schwartz y Takenaka, 1955), en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pozos (Erlanger y col., 1961). Se realizó una dilución 1:10 a partir de la fracción LIP-60, se tomó una muestra de 5 µL, al cual se le agregaron 95 µL de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8, 10 µL de tripsina bovina y 10 µL de sustrato BApNA y se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro para microplaca xMark™. Se tomó un pozo como control utilizando la misma cantidad de sustrato y enzima sin la fracción LIP-60.

La actividad inhibitoria contra quimotripsina se determinó de la siguiente manera. Se tomó una muestra de 5 µL al cual se le agregaron 95 µL de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8, 10 µL de quimotripsina bovina y 10 µL de sustrato Suc-AAPF-pNA mediante el método de (Erlanger y col., 1961).

6.4.5. Zimograma de inhibición

La detección de las proteínas con actividad de IP fue mediante la digestión con tripsina bovina se llevó a cabo según los protocolos de Ohlsson y col. (1986) y Vinokurov y col. (2005). Se realizó una electroforesis de acuerdo al sistema de Laemmli (1970). Posteriormente se lavó el gel con agua destilada por 5 minutos, se realizó una dilución de 1 mg de proteína/mL de agua, esta dilución se colocó sobre el gel y se dejó incubar por 4 horas a 37 °C, posteriormente se lavó el gel con agua y se tiñó con azul de coumassie para observar la presencia de inhibidores.

6.4.6. Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico R Software (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria), versión 3.5.3.

Para cada una de las variables de contenido de compuestos fenólicos se hizo una gráfica de los valores obtenidos por cada ensayo y réplica en los diferentes tratamientos para ver lo disperso que se encontraban las observaciones unas de otras. Se realizaron análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para todos los datos de contenido de compuestos fenólicos. Los factores que se tomaron como variables fueron el porcentaje de daño mecánico foliar, es decir cada uno de los 3 tratamientos y el otro el número de ensayo. El número de ensayo se tomó como bloque.

Posteriormente se realizaron pruebas pos hoc de Tukey. No se realizó la prueba de Dunnet para comparar los tratamientos con el control, ya que también era de interés conocer si los tratamientos de 50 y 80% eran diferentes entre ellos. Para cada variable de contenido de compuestos fenólicos se hizo una gráfica de medias con barras de error de desviación estándar. Se colocaron arriba de estas barras letras que indican si los tratamientos son estadísticamente iguales o diferentes utilizando un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación $p < 0.05$.

Finalmente se hizo un análisis de correlación para determinar que variables de contenido de componentes fenólicos estaban significativamente asociados entre ellos y de qué manera.

7. Resultados y Discusión

Compuestos fenólicos totales en hoja de frijol Tépari

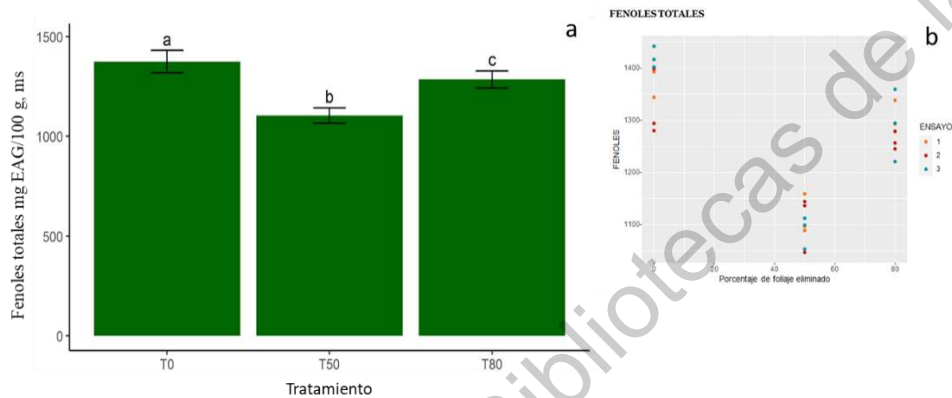


Figura 1. Determinación de compuestos fenólicos totales de hoja de frijol Tépari. a) Se observa diferencias significativas entre los de los dos tratamientos en relación al control, donde el tratamiento 80% de corte foliar presenta un incremento de fenoles en relación del tratamiento con 50% de corte foliar. b) Se muestran los datos de contenido de fenoles totales en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 1 (amarillo) (0%) fue el de mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y el tratamiento 2 (azul) con menos cantidad de compuestos fenólicos totales.

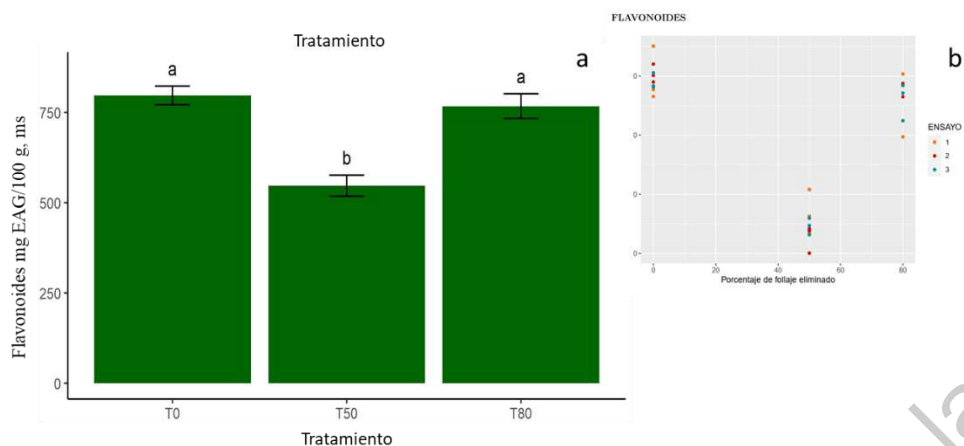


Figura 2. Determinación de Flavonoides. a) Se observa el análisis de flavonoides en los diversos tratamientos de hoja, en donde el tratamiento 80% de corte foliar no presenta diferencias significativas en relación al control, mientras que el tratamiento 50% presenta diferencias significativas y una disminución en la presencia de flavonoides. b) Se muestran los datos de contenido de flavonoides totales en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 1 (amarillo) (0%) fue el de mayor cantidad de flavonoides totales, seguido del tratamiento 3 (80%), sin embargo, la diferencia es muy poco significativa a simple vista entra estos dos tratamientos y el tratamiento 2 (azul) (50%) significativamente con menor cantidad de flavonoides totales.

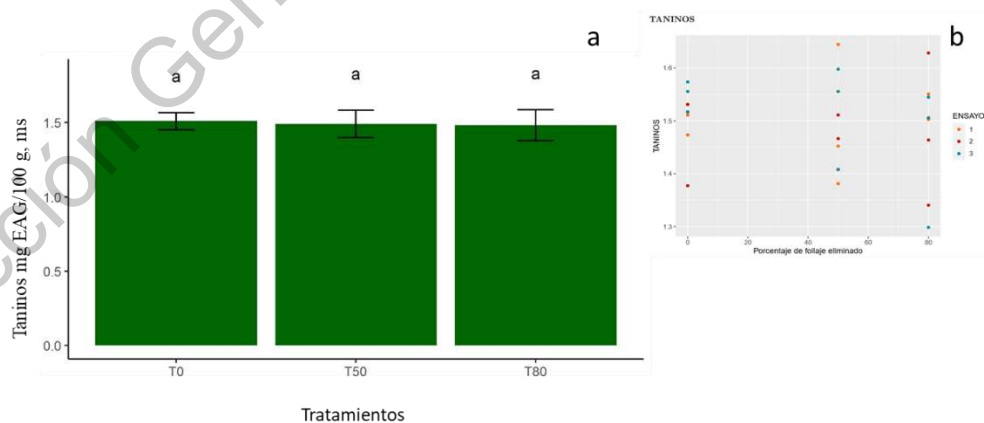


Figura 3. Determinación de taninos condensados. a) En la gráfica se puede apreciar que no existe diferencia significativa en la presencia de taninos

condensados de los tratamientos en relación al control. b) Se muestran los datos de contenido de Taninos totales en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde los tres ensayos se muestran muy dispersos lo cual nos indica que hay variabilidad entre ellos, sin embargo, no se ven diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual nos indica que no hay un tratamiento que tenga mayor cantidad de taninos, sino que los tres tratamientos tienen la misma cantidad.

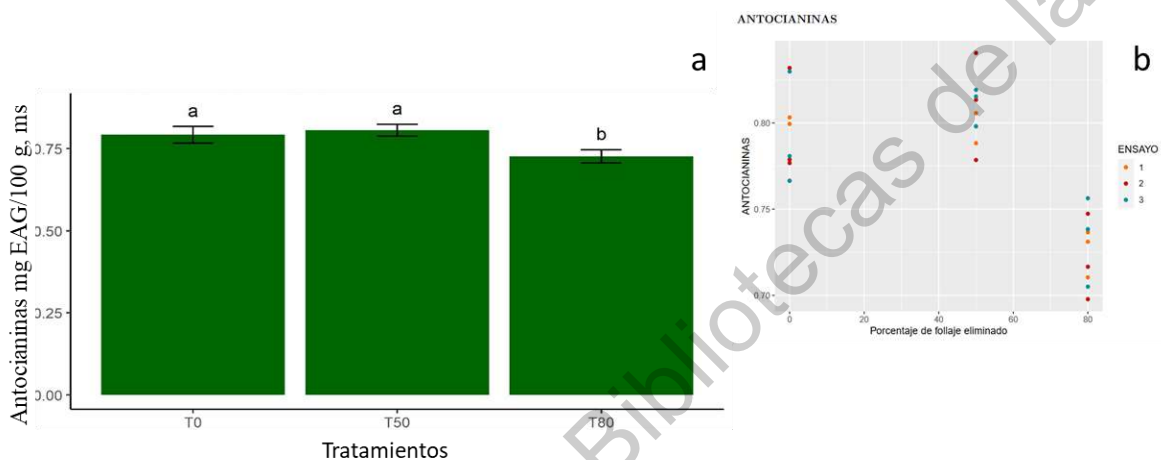


Figura 4. Determinación de antocianinas en hoja de frijol. a) En el gráfico se puede observar diferencias significativas de antocianinas entre el control y el tratamiento a 80% de corte foliar presentando una disminución, mientras que el tratamiento 50% no presentó diferencias significativas. b) Se muestran los datos de contenido de antocianinas totales en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 2 (rojo) (50%) fue el de mayor cantidad de flavonoides totales, seguido del tratamiento 1 (0%), sin embargo la diferencia es muy poco significativa a simple vista entre estos dos tratamientos y el tratamiento 3 (azul) (80%) significativamente con menor cantidad de flavonoides totales con respecto a los otros dos tratamientos.

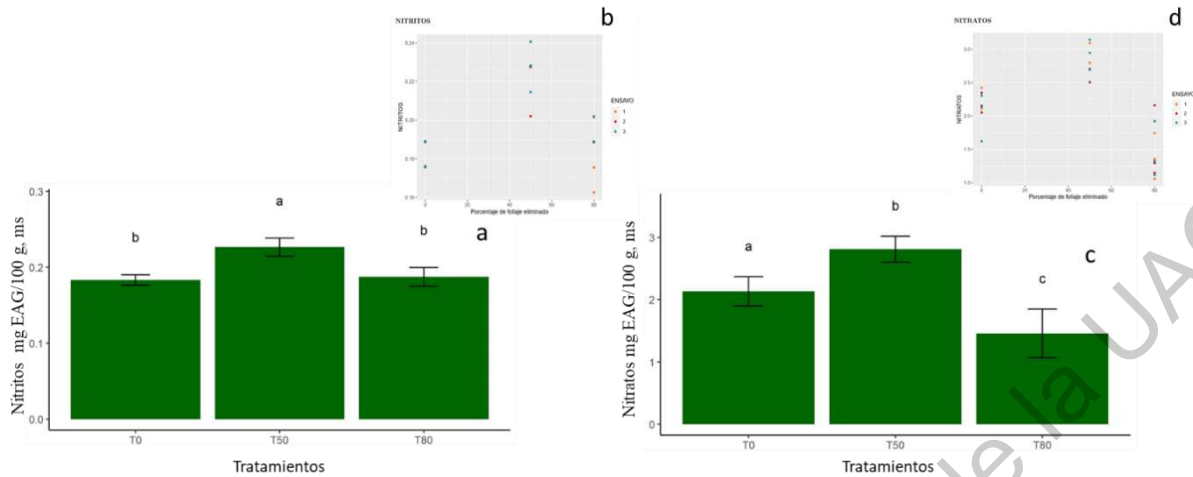


Figura 5. Determinación de nitritos y nitratos en hoja de frijol Tépari. a) y c) Se observa en las gráficas un incremento en la cantidad de nitritos y nitratos para el tratamiento 50% de corte foliar, no presentando diferencias entre el control y el tratamiento 80%. Para los nitratos de observa diferencias significativas entre los tres tratamientos observando un incremento en el tratamiento 50% en relación al control. b) y d) Se muestran los datos de cantidad de nitritos y nitratos en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 2 (50%) mostró tener mayor cantidad, seguido del tratamiento 3 (80%) y el tratamiento 1 (0%) menor cantidad de nitritos.

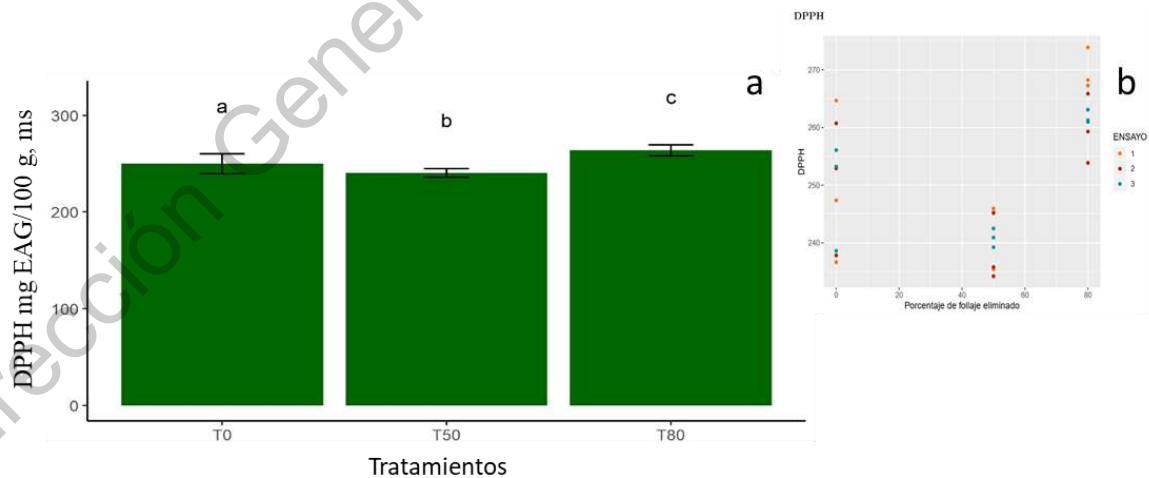


Figura 6. Determinación de DPPH en hoja de frijol Tépari. a) Se pudo determinar que los tratamientos presentan diferencias significativas entre los tres

tratamientos, mostrando un ligero incremento en la cuantificación de DPPH para el tratamiento 80% en relación al control y al tratamiento 50%. b) Se muestran los datos de la capacidad antioxidante (DPPH) en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 3 (80%) mostró tener mayor capacidad antioxidante, seguido del tratamiento 1 (0%) el cual mostró mayor variabilidad entre ensayos y el tratamiento 2 (50%) menos capacidad antioxidante.

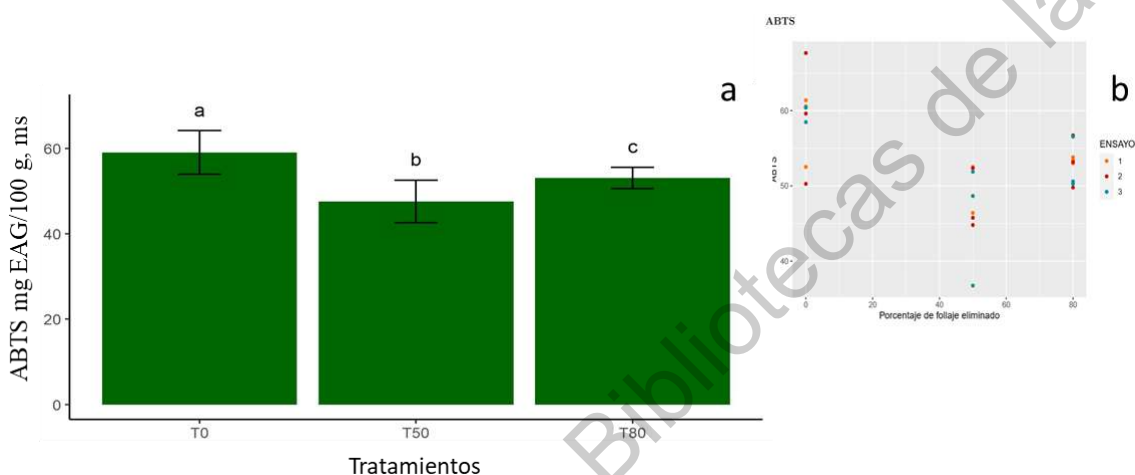


Figura 7. Determinación de TEAC o ABTS en hoja de frijol Tépari. a) Se puede observar que los tratamientos presentan diferencias significativas entre los tratamientos y el control, presentando los dos tratamientos una disminución en la concentración. b) Se muestran los datos de la capacidad antioxidante (ABTS) en los diferentes tratamientos (0, 50 y 80% de daño mecánico foliar), en los tres ensayos realizados; donde el tratamiento 1 (0%) mostró tener mayor capacidad antioxidante, seguido del tratamiento 3 (80%) y el tratamiento 2 (50%) menos capacidad antioxidante (ABTS).

Análisis de correlación

El análisis de correlación se hizo para determinar que variables de contenido de componentes fenólicos estaban significativamente relacionados entre todos ellos y de qué manera.

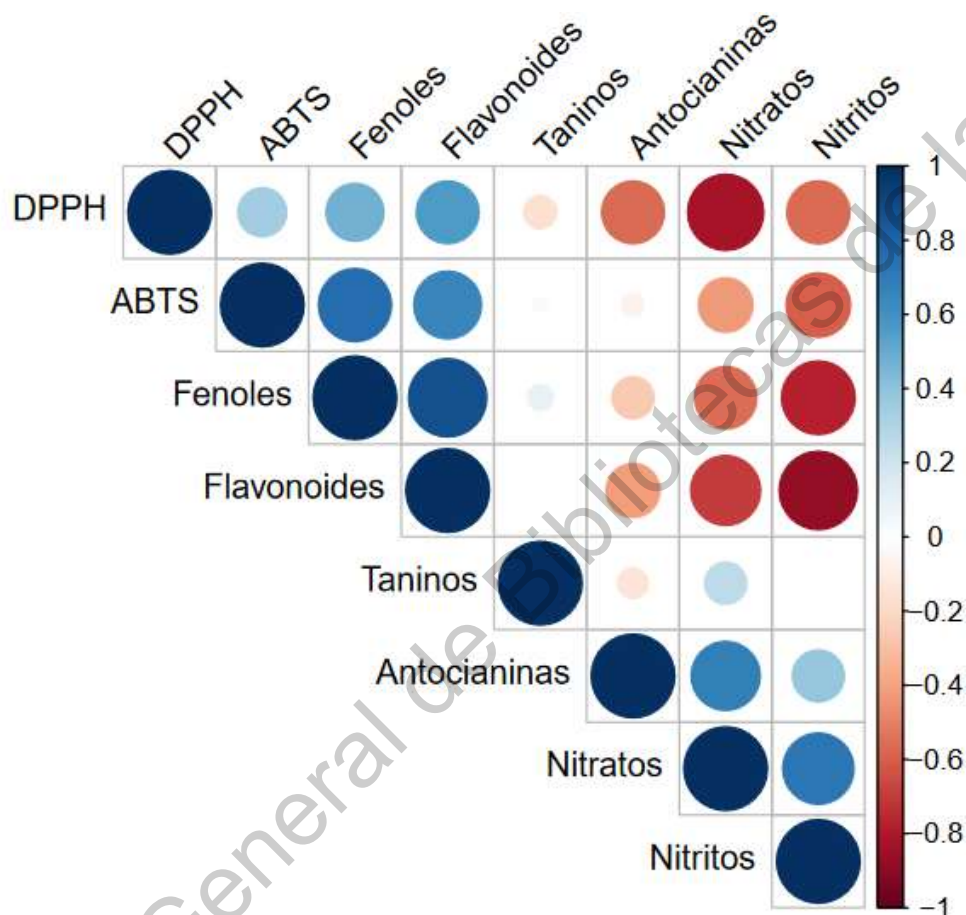


Figura 8. Análisis de correlación del contenido entre los diferentes componentes fenólicos: donde se muestra de que manera todos los componentes fenólicos, nitritos y nitratos se relacionan entre sí. Dependiendo el tamaño del círculo y la intensidad de color, es la correlación que tienen entre ellos y con respecto al gradiente de coloración, de azul a rojo van de ser proporcionales a inversamente proporcionales entre sí, respectivamente.

Los resultados obtenidos para el análisis de moléculas de resistencia en la hoja, arrojaron diversos niveles entre los tratamientos, para el caso de los compuestos fenólicos se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento 50% de corte foliar, incrementando los niveles de fenoles en el tratamiento 80% de corte foliar, algunos trabajos han descrito que existe incremento en moléculas de resistencia cuando la planta sufre estrés por corte ya sea por insectos, animales o hasta el clima (Manzanares 2015), a su vez se ha descrito que el estrés salino en el suelo puede provocar la transcripción de los genes de nodulación (nod) en *Rhizobium* al modificar la composición de exudados radicales como compuestos fenólicos, taninos o flavonoides, estos cambios pueden incrementar o disminuir dependiendo el grado de estrés que se pueda generar en la planta (Andrés y col., 1995).

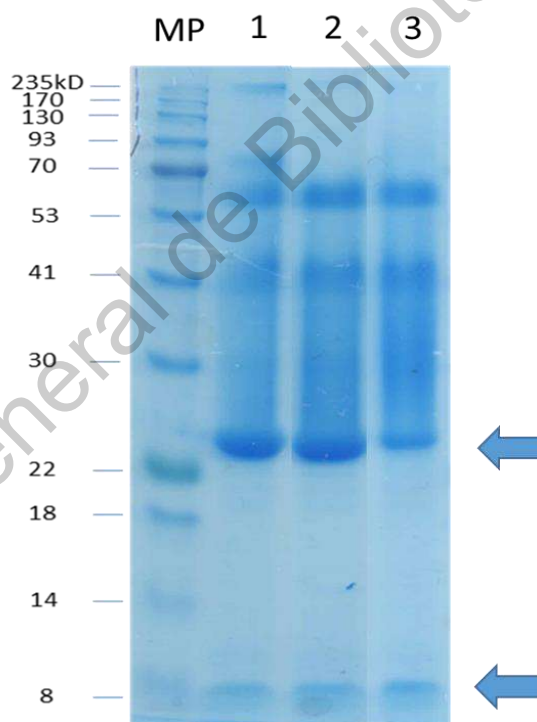


Figura 9. Perfil electroforético SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida, tinción de coumassie. Se colocaron 10 μ l de cada muestra por carril, **MP)** Marcador de peso molecular, **1)** Control **2)** Tratamiento 50% de corte foliar, **3)** Tratamiento 80% de corte foliar

Identificación de glicoproteínas.

Se pudo determinar la presencia de proteínas en los tres tratamientos, cada perfil mostró diversas proteínas que tiñeron para reconocimiento de carbohidratos como se observa en la figura 2, y se realizó zimograma de inhibición para determinar la presencia de inhibidores de proteasa como se muestra en la figura 13, Estas proteínas se han observado en diversos trabajos (Cervantes 2016; García y col., 2012)

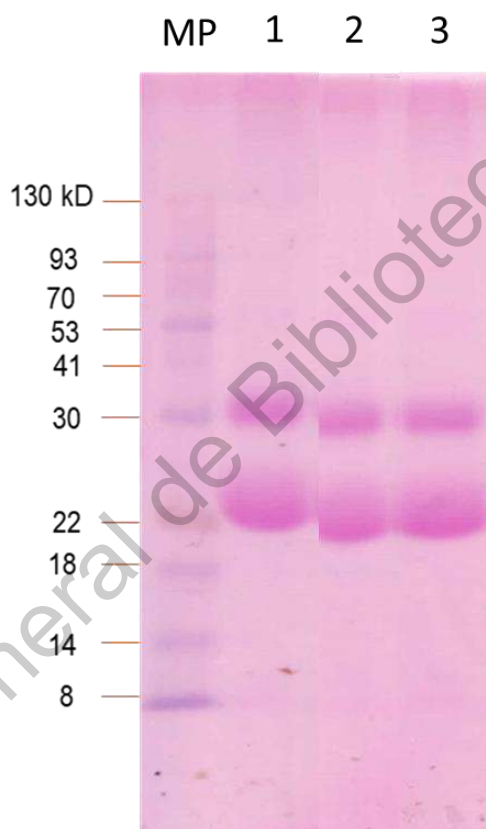


Figura 10. Perfil electroforético SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida, tinción de Schiff (PASS). Se colocaron 10 μ l de cada muestra por carril, **MP)** Marcador de peso molecular, **1)** Control **2)** Tratamiento 50% de corte foliar, **3)** Tratamiento 80% de corte foliar.

Actividad aglutinante



Figura 11. Actividad Aglutinante de los diversos tratamientos. Se puede observar incremento en la actividad aglutinante en los tratamientos 50 y 80%, presentando diferencias significativas en los tres tratamientos, ya que como se puede observar en la gráfica las unidades aglutinantes en el tratamiento control se encuentran en 1300 aproximadamente, las unidades aglutinantes para el tratamiento del 50% se encuentran en 2500 aproximadamente y por último vemos un mayor incremento en las del tratamiento del 80% con aproximadamente 6500 unidades aglutinantes. Esto nos muestra claramente un incremento en relación al daño mecánico en las plantas, así como describen algunos trabajos sobre la producción de lectinas como defensa en situaciones de estrés y adversas ante depredadores (Vandenborre y col., 2011).

La presencia de proteínas de resistencia como las lectinas o los inhibidores de proteasas pueden generar estrés en sus depredadores también (Moreno 2009) son compuestos que han existido desde hace miles de años y suelen ser tóxicos para sus depredadores, de esta forma se puede describir la coevolución de las especies (Fontúrbel 2002)

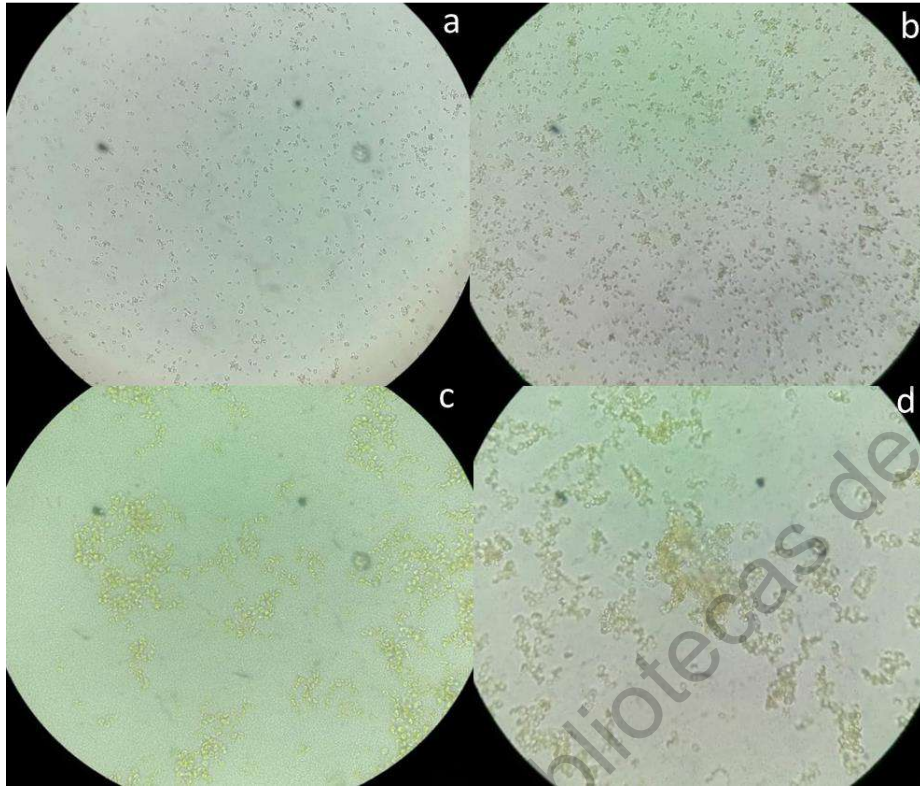


Figura 12. Aglutinación presente en cada tratamiento. a) Eritrocitos control negativo, b) Tratamiento control c) tratamiento 50% de corte foliar, d) tratamiento 80% de corte foliar.

Se pudo determinar un incremento en las unidades aglutinantes en relación al corte foliar, sin embargo, aunque esto no está muy repostado en la literatura, se puede observar a través de diversos estudios características importantes que nos inclinan a pensar que están relacionados.

El estudio de Kazanjian, A., y Fariñas, M. (2006), donde se evaluó el extracto acuoso y precipitado de proteínas de *Aplysina lacunosa*, en relación con su actividad hemaglutinante, mostró que hubo actividad aglutinante por la presencia de lectinas, en ese caso de lectinas de origen marino, las cuales varían entre 8.5 kDa a 400 kDa. Como se ha mencionado desde hace más de cien años las lectinas se conocen gracias a la propiedad biológica y muy importante de la aglutinación celular como eritrocitos, entre otras; esta propiedad aglutinante tendrá un carácter diferente dependiendo de la planta obtenida. Por ejemplo, extractos

obtenidos de garbanzo y lenteja tienen propiedad de aglutinar sangre de conejo, a diferencia de aglutininas provenientes de *P. vulgaris* y *P. lunatus* que tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos A+ (Barragán y col, 2014). Por lo anterior es que podemos sugerir que el incremento en la aglutinación fue proporcional a la saturación de lectinas por pozo, la cual se ve muy marcada en cada uno de los tratamientos, incluyendo el control, aumentando en relación al daño empleado en cada uno.

Hoy en día las lectinas han sido objeto de estudio, muchas de ellas han sido utilizadas para el estudio de membranas celulares alteradas o normales por su propiedad aglutinante (Barragán y col, 2014).

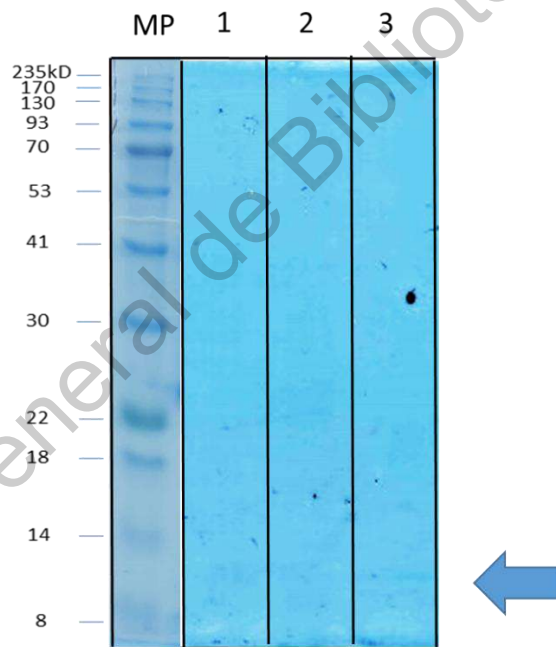


Figura 13. Zimograma de inhibición. Se puede observar la presencia de Inhibidores de proteasa que rondan los 8 kD, (MP) Marcador de peso, 1) Tratamiento control, 2) tratamiento 50% corte foliar, 3) tratamiento 80% corte foliar.

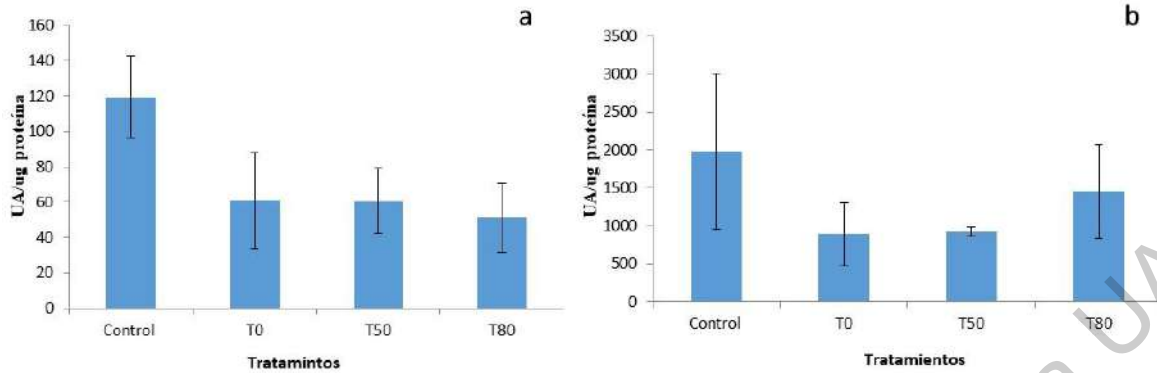


Figura 14. Unidades de actividad enzimática. a) Se puede observar las unidades de actividad enzimática para tripsina, en donde no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos, pero si en relación al control. b) Se puede observar las unidades de actividad enzimática para quimotripsina, en donde de igual manera, no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos, pero si en relación al control.

Los resultados mostrados para lectinas determinan que el corte foliar puede inducir al incremento de las unidades aglutinantes ya que hubo una mayor cantidad de unidades aglutinantes proporcional al daño foliar. Por otra parte, para los inhibidores de proteasa, los resultados no indican que el corte foliar sea un factor importante en la expresión de este tipo de proteínas, sin embargo algunos estudios demuestran que existe un incremento en la expresión de este tipo de proteínas en plantas, es decir, efectos sistémicos como la síntesis de IPs en tejidos que se encuentran relativamente lejanos al sitio donde se inició el daño en defensa a ataques de patógenos, como lo son las semillas (Blanco-Labra, 2002), así como proteínas de defensa ante situaciones de estrés y escasez (Moreno 2009; Barkla y col., 2007) ya que actúan como proteínas de reserva al ser proteínas protectoras constitutivas (Blanco-Labra, 2002).

Cabe mencionar también que la respuesta de defensa de los insectos tiene como comienzo el reconocimiento de las secreciones bucales que producen los insectos y son transmitidos dentro de la planta en una serie de procesos que desencadena una serie de formas de resistencia contra los insectos, esto les ha permitido tener

una estrecha relación que los ha llevado a una coevolución, donde ambos son necesarios el uno al otro (Musser y col., 2006; Zavala 2010) lo que nos puede llevar a pensar que no hubo tal reconocimiento. También se sabe que no todas las plantas representan el mismo interés por ser ingeridas, debido a que algunas producen más compuestos químicos tóxicos que otras (Zavala 2010) esto significa que no todas las plantas tienen la misma producción de compuestos de defensa. Hay estudios que explican una evaluación de genes expresados al mismo tiempo, mostrando como ciertos genes sólo se expresan cuando el daño ha sido producido por un herbívoro. Otros estudios en árboles y otras plantas herbáceas mostraron como plantas dañadas mecánicamente tenían patrones de expresión genética diferentes de las que tuvieron secreciones bucales de insectos en las heridas, lo cual nos indica que las plantas reconocen el ataque de los insectos aumentando los compuestos tóxicos de defensa por los compuestos químicos provenientes de la saliva de los insectos algunas de estas plantas fueron *Arabidopsis thaliana* (De Vos y col, 2005), *Nicotiana attenuata* (tabaco coyote) (Voelckel col., 2004), *Populus trichocarpa* x, *Populus deltoides* (Major y Constabel, 2006; Zavala, 2010; Camarena 2009) esto con el objetivo de no gastar recursos de defensa, así las plantas deben reconocer y diferenciar entre el daño mecánico y la alimentación por insectos produciendo así una expresión de genes después de la síntesis de proteínas y la metabolitos secundarios de defensa (Camarena 2009). Por lo anterior es que podemos llegar a pensar que en la parte experimental de este trabajo hubo situaciones que no fueron concluyentes para obtener el resultado pensado respecto a los resultados obtenidos en la producción de inhibidores de proteasa ya que se realizó daño mecánico en un solo momento del ciclo de vida de la planta, además de que sólo se realizó daño de dos porcentajes diferentes y en una misma zona de la planta, es decir en las hojas, lo cual puede ser que no haya sido suficiente para que la planta tenga estrés prolongado puesto que en la naturaleza las plantas se ven expuestas a ataques de plagas o patógenos que producen un daño constante o incluso generacional. Sin embargo esta posibilidad es hipotética y requiere de una mayor comprobación experimental; lo que podría sugerirnos hacer otro diseño experimental cambiando esas variables, pudiera ser

trabajando directamente con los insectos o incluso de manera generacional entre las plantas, haciendo una reproducción cruzada para así poder sobreexpresar dichos genes y obtener las proteínas de resistencia de interés en una mayor expresión, entre otros posibles métodos experimentales que podrían darnos un mayor panorama de respuestas a las interrogantes.

8. Conclusión

Los resultados presentados en este proyecto indican que el estrés inducido por el daño mecánico foliar previamente al llenado de vaina en la planta de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), no incrementó significativamente los niveles de compuestos de resistencia en la hoja, mientras que, en la expresión de proteínas de resistencia, se observó un incremento en las unidades aglutinantes en relación a un mayor daño mecánico foliar. En la actividad inhibitoria no se pudieron observar diferencias significativas en el incremento de la actividad de los inhibidores con respecto al daño mecánico foliar producido.

Los resultados mostraron que el daño mecánico foliar no es un método que induzca una sobreexpresión de moléculas de resistencia en hoja a corto plazo, pero si lo puede ser en proteínas como las lectinas o los inhibidores de proteasa presentes en la semilla, se recomienda hacer entrecruzamientos de los organismos que reciban el estrés mecánico para mejorar la expresión de dichos compuestos..

9. Referencias bibliográficas

Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731. DOI <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>

Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Reyes-Ramírez, H., Enríquez-Vara, J. N., & García-Morales, S. (2020). Bioactive compounds, antioxidant activity, and antinutritional content of legumes: a comparison between four *Phaseolus* species. *Molecules*, 25(15), 3528. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules25153528>

Amaeze, O. U., Ayoola, G. A., Sofidiya, M. O., Adepoju-Bello, A. A., Adegoke, A. O., & Coker, H. A. B. (2011). Evaluation of antioxidant activity of *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) Hutch & Dalziel leaves. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011. doi: 10.1155/2011/976701

André, S., Kaltner, H., Manning, J. C., Murphy, P. V., & Gabius, H. J. (2015). Lectins: getting familiar with translators of the sugar code. *Molecules*, 20(2), 1788-1823. doi.org/10.3390/molecules20021788

Andrés, J. A., Correa, N. S., & Rosas, S. B. S. B. (1995). Exudados radicales de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones de estrés salino. Expresión de genes nod en *Rhizobium*. *Agriscientia*, 12.

Arteaga, I. T., Guillen, J. C., Olaya, E. M., Gasca, T. G., Zaragoza, M. V. Á., García-Santoyo, V., ... & Blanco-Labra, A. (2016). Characterization of two non-fetuin binding lectins from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds with differential cytotoxicity on colon cancer cells. *J. Glycobiol*, 5, 117. DOI: 10.4172/2168-958X.1000117

Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Balderas, E., & Pantoja, O. (2007). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotecnología*, 14, 263-272.

- Beebe, S., Rao, I., Blair, M., & Acosta, J. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, 4, 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00035>
- Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
- Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin-and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International journal of peptide and protein research*, 25(2), 113-131. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1985.tb02155.x>
- Birk, Y. (1993). Protease Inhibitors of Plant Origin and Role of Protease Inhibitors in Human Nutrition Overview. In *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents* (pp. 97-106). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2882-1_5
- Blanco-Labra, A., & Mancilla, C. A. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta universitaria*, 12(3), 3-28.
- Bouchenak, M., & Lamri-Senhadji, M. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of medicinal food*, 16(3), 185-198. <http://doi.org/10.1089/jmf.2011.0238>
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>
- Bradford, N. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. *Anal Biochem*, 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Campos, j. E., martinez-gallardo, N; mendiola-olaya, E., & blanco-labra, A; (1997). Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. *Journal of food biochemistry*, 21(4), 203-218. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1997.tb00215.x>

Casas Corredor, Z. Y. C., Montaña, E. A. R., & Castro, N. A. V. (2016). LEGUME LECTINS DOMAIN: STRUCTURAL CHARACTERISTICS AND INSECTISTATIC AND INSECTICIDAL ACTIVITIES. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences (ex Agro-Ciencia)*, 32(2), 157-169. Recuperado a partir de <http://revistasacademicas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/325>

Casas Corredor, Z. Y., Reyes Montaña, E. A., & Vega Castro, N. A. (2016). Lectinas con dominio de leguminosa: características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidas. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 32(2), 157-169. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000200009>

Castillo-Villanueva, A., & Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 55-64.

Castillo-Villanueva, A., Caballero-Ortega, H., Abdullaev-Jafarova, F., Garfias, Y., del Carmen Jiménez-Martínez, M., Bouquelet, S., ... & Zenteno, E. (2007). Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. escumite: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5781-5787. doi.org/10.1021/jf063644k

CELIS, U. M. (2018). Efecto de una fracción de lectinas-inhibidor de proteasas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células hematopoyéticas en ratas Sprague Dawley. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/888>

Cervantes-Jiménez R. (2015). Caracterización proteínica de una fracción Lectinas-Inhibidor de Proteasas de Frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con potencial anticancerígeno. Tesis de maestría, 51pp.

Chan, Y. S., Wong, J. H., Fang, E. F., Pan, W., & Ng, T. B. (2012). Isolation of a glucosamine binding leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity towards tumor cells. *PLoS one*, 7(6), e38961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038961>

Chaparro, D. C., Porrilla, Y., & Elizalde, A. D. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 45-54. Recuperado a partir de <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/703>
ISO 690

Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect science*, 15(2), 101-114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x>

Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The plant cell*, 3(1), 1. doi: 10.1105/tpc.3.1.1

Clavijo Romero, F. (2018). Producción de lectinas de origen vegetal y fúngico y evaluación de su potencial antimicrobiano.

Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 80-84.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.

CRUZ, P. H., CAMPOS, E. P., ORTIZ, L. M. M. B., & MARTÍNEZ, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de educación bioquímica*, 24(1), 21-27.

De vos, m.; van oosten, v. R.; van poecke, r. M. P.; van pelt, j. A.; pozo, m. J. 2005. Signal signature and transcriptome changes of arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol. Plant-microbe interact.* 18: 923-937 <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-0923>

Del Carpio Jiménez, Carla, Serrano Flores, Carlos, & Giusti, Mónica. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 76-86. Recuperado en 22 de octubre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2009000100010&lng=es&tlng=pt.

Deshpande SS, Cheryan M (1985) Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. *J Food Sci* 50:905–910. [Doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12977.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12977.x)

Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)

Ferriz-Martínez, R. (2014). Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre cáncer de colon (Doctoral dissertation, Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro).

Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. *Nova Sci*, 71-90. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285472595_The_role_of_plant_lectins_in_cancer_treatment

Fontúrbel, F. (2002). Rol de la coevolución planta–insecto en la evolución de las flores cíclicas en las angiospermas. *Ciencia Abierta*, 17(11).

Fu, L.L., Zhou, C.C., Yao, S., Yu, J.Y., Liu, B., Bao, J.K., 2011. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>

Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 48:3597–3604. Doi.org/10.1021/jf000220w

Gabiús, H. Biological Information Transfer Beyond the Genetic Code: The Sugar Code. *Naturwissenschaften* 87, 108–121 (2000). <https://doi.org/10.1007/s001140050687>

García, E. C. (2014). Inhibidores de proteasas en leguminosas (Doctoral dissertation, Tesis de Licenciatura. Universidad de Valladolid).

García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Martínez, J., Cas-taneda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Rodríguez-Méndez, A. J., Mendiola-Olaya, E., Castro-Guillén, J. L., Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269-1278.

Ghazarian H., Idoni B., Oppenheimer S. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics". *Acta histochem.* 2011; 113:236–47.

Gorelik, E., Galili, U., Raz, A., 2001. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* <https://doi.org/10.1023/A:1015535427597>

Guerrero, L. A. C., Ríos, L. C., & Ancona, D. A. B. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 34-43.

Jaffé, WG. 1980. Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Lienes I.E. (ed) Academic Press, New York, N.Y. pp. 73-102

Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.

Jiménez-Galindo, J. C., & Acosta Gallegos, J. A. (2012). Caracterización de genotipos criollos de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) y común (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo temporal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(8), 1565-1577.

Jiménez-Galindo, J. C., Valdez-Moctesuma, E., & Marbán-Mendoza, N. (2010). EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Phaseolus* spp. COMO FUENTE DE RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 16(2), 99–105

Jones, J.D., and J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444 (7117): 323-9.

Jongsma, M., & Beekwilder, J. 2011. Co-evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. *Current protein and peptide Science*, 12(5), 437-447.

Juszczuk, I. M., Wiktorowska, A., Malusá, E., & Rychter, A. M. (2004). Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, 267 (1-2), 41-49.

Kennedy AR. Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: Troll W, Kennedy AR, eds. *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*. New York: Plenum Press, 1993:9–64

Kennedy, The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 68, Issue 6, December 1998, Pages 1406S–1412S.

Kudelka, M. R., Ju, T., Heimbürg-Molinario, J., & Cummings, R. D. (2015). Simple sugars to complex disease—mucin-type O-glycans in cancer. In *Advances in cancer research* (Vol. 126, pp. 53-135). Academic Press. DOI <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.002>

Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 18-29. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.016>

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lambin, J., Demirel Asci, S., Dubiel, M., Tsaneva, M., Verbeke, I., Wytynck, P., & Van Damme, E. J. (2020). OsEUL Lectin Gene Expression in Rice: Stress Regulation, Subcellular Localization and Tissue Specificity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 185.

Lannoo, N., & Van Damme, E. J. (2014). Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in plant science*, 5, 397.

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.

Liener, I. (Ed.). (2012) *Las lectinas: propiedades, funciones y aplicaciones en biología y medicina*. Elsevier.

Liu, X., Cooper, A. M., Yu, Z., Silver, K., Zhang, J., & Zhu, K. Y. 2019. Progress and prospects of arthropod chitin pathways and structures as targets for pest management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 161, 33-46.

Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana.

Lopes, T., Xavier, M., Quadri, M. G., & Quadri, M. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology*, 13(3). DOI: <https://doi.org/10.18539/cast.v13i3.1375>

López-Martínez, J., Castañeda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., Mendiola-Olaya, E., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2008). Cytotoxic effect of a tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin on human cancer cell lines. https://doi.org/10.1096/fasebj.22.1_supplement.1136.4

Lukasik, E. y Takken, FL (2009). PERMANECE fuerte, proteínas protectoras instigadoras de defensa vegetal. *Opinión actual en biología vegetal*, 12 (4), 427-436.

Luque Guillén, M. Victoria 2009. Estructura y propiedades de las proteínas. España: [Disponible en: https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

Machado SW, Oliveira CFR, Zério NG, Parra JRP and Macedo MLR, Inga laurina. 2017. trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. *Arch Insect Biochem Physiol* 95: e21393

Major, i. T.; constabel, c. P. 2006. Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New phytologist* 172: 617-635. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01877.x>

Malats N, Castaño-Vinyals G. 2007 Cancer epidemiology: study designs and data analysis. *Clinical and Translational Oncology* 9(5):290-7.

Manzanarez, J. L. L. (2015). Efecto de la baja temperatura en la expresión de genes y actividad enzimática asociado a la síntesis de compuestos Fenólicos y Fructanos durante el desarrollo de ajo (*Allium Sativum* L) variedad Coreano. Tesis de maestría 129pp

Martínez Alarcón, D. (2017). Producción de una lectina recombinante de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica.).

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Mateos, R. G., & Leal, R. P. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1), 5-10.

Mendoza G. 2012. Las antocianinas del maíz. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas.

Mhlaba, Z.B., J. Mashilo, H. Shimelis, A.B. Assefa, and A.T. Modi. 2018. Progress in genetic analysis and breeding of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray): a review. *Scientia Horticulturae* 237 (2018) 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.012>

Micheletto, S., Rodriguez-Uribe, L., Hernandez, R., Richins, R. D., Curry, J., & O'Connell, M. A. (2007). Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. *Plant Science*, 173(5), 510–520.

Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110827.

- Mittal A, Kansal R, Kalia V, Tripathi M and Gupta VK, 2014. A kidney bean trypsin inhibitor with an insecticidal potential against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Acta Physiol Plant* 36:525–539.
- Mojica L, de Mejía EG. 2015. Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70 (2): 105–112. DOI <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0477-6>
- Molina, D., Patiño, L., Quintero, M., Cortes, J., & Bastos, S. (2014). Effects of the aspartic protease inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds on the growth and development of *Hypothenemus hampei*: an inhibitor showing high homology with storage proteins. *Phytochemistry*, 98, 69-77 DOI <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.11.004>
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.
- Musser, r. O.; farmer, e.; peiffer, m.; williams, s. A.; felton, g. W. 2006. Ablation of caterpillar labial salivary glands: technique for determining the role of saliva in insect-plant interactions. *J. Chem. Ecol.* 32:981-992
- Mustafa, R. A., Hamid, A. A., Mohamed, S., & Bakar, F. A. (2010). Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of food science*, 75(1), C28-C35.
- Muzquíz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., & Pedrosa, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry reviews*, 11(2-3), 227-244.
- Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D., Nova, I. C., Lima, T. A., Paiva, P. M., & Pontual, E. V. (2019). Insect midgut structures and molecules as

targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*, 75(5), 1212-1222.

Ohlsson BG, Weström BR, Karlsson BW, 1986. Enzymoblotting: a method for localizing proteinases and their zymogens using para-nitroanilide substrates after agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose. *Analytical Biochemistry* 152 (2):239-244

Olsen, L. R., Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Sacchettini, J. C., & Brewer, C. F. (1997). X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin. *Biochemistry*, 36(49), 15073-15080.

Ortega de Santiago L. A. (2012) Purificación y análisis parcial de una lectina aislada de semilla de frijol Téparl (*Phaseolus acutifolius*) Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica.).

Park, W. B., Lyu, S. Y., Kim, J. H., Choi, S. H., Chung, H. K., Ahn, S. H., ... & Choi, M. J. (2001). Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 16(5), 439-447.

Peumans, W. J., Van Damme, J. M., Barre, A., & Rougé, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2* (pp. 27-54). Springer, Boston, MA.

Ramos, C. P. F., Debouck, D. G., & Gutiérrez, A. (1997). Patrones de diversidad genética y domesticación en frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius* Asa Gray). *Acta Agronómica*, 47(4), 19-24. Recuperado a partir de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/48076

- Rehman, S., Aziz, E., Akhtar, W., Ilyas, M., & Mahmood, T. (2017). Structural and functional characteristics of plant proteinase inhibitor-II (PI-II) family. *Biotechnology letters*, 39(5), 647-666.
- Repo de Carrasco, R., & Encina Zelada, C. R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revista de la sociedad química del Perú*, 74(2), 85-99.
- Schwartz G, Takenaka Y. 1955. Spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsins activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 16:571-575.
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R.
- Shisanya, C. A. (2002). Improvement of drought adapted tepary bean (*Phaseolus acutifolius* a. Gray var. *latifolius*) yield through biological nitrogen fixation in semi-arid SE-Kenya. *European Journal of Agronomy*, 16(1), 13–24.
- Soto, J. L. L., Corral, J. A. R., González, J. D. J. S., & Ildfonso, R. L. (2005). Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (*Phaseolus* spp) en la República Mexicana. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(3), 221-230. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=610/61028306>
- Takken, FL, Albrecht, M. y Tameling, WI (2006). Proteínas de resistencia: interruptores moleculares de defensa vegetal. *Opinión actual en biología vegetal*, 9 (4), 383-390.
- Tofiño, A. R.; Romero, H. M.; Ceballos, H. Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, p.245-254, 2007.
- Tomás Barberán, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud.

Torres-Arteaga I. (2010). Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Turner RH, Liener IE. 1975. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Analytical Biochemistry*.68:651-653.

Valencia-Mejía E, Batista KA, Fernández JJA, Fernandes KF. 2019. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Research International* 121:238-246 DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.043>

Valoy, M., Ordano, M., Bernacki, F., Palacio, F. X., López-Acosta, J. C., & Varela, O. (2018). Patterns of herbivory in *Vassobia breviflora* (Solanaceae): variation in foliar damage and natural selection mediated by herbivorous. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1683-1700. DOI <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i4.31869>

Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ (2008) Plant lectins. *Adv Bot Res* 48: 107-209.

Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rouge P (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci* 17: 575-692.

Van Damme, EJM, Lannoo, N. y Peumans, WJ (2008). Lectinas vegetales. *Avances en la investigación botánica*, 107-209.

Vandenborre, G., Smagghe, G., & Van Damme, E. J. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72(13), 1538-1550. DOI <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>

Vavilov, N. I. (1931). Mexico and Central America as the Principal Centre of Origin of Cultivated Plants of New World.

Vierbuchen, M. (1991). Lectin Receptors. En: Current Topics in Pathology Cell Receptors. Seifert, G. Ed. Springer-Verlag, New York. P. 271-361.

Vinokurov KS, Oppert B, Elpidina EN. 2005. An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. Analytical Biochemistry 337(1):164–166.

Voelckel, c.; weisser, w. W.; baldwin, i. T. 2004. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. Mol. Ecol. 13:3187-3195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02297.x>

Wani, S. S., Dar, P. A., Zargar, S. M., & Dar, T. A. (2019). Therapeutic Potential of Medicinal Plant Proteins: Present Status and Future Perspectives. Current Protein & Peptide Science.

Wilfed V, Rallph N. 2008. Phenolic compound. Biochemistry Springer

Zavala, J. A. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. Ciencia hoy, 20(117), 52-59.