

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE
ALPHA-AMILASA Y SU PODER INSECTICIDA SOBRE EL
GORGOJO PINTO DEL FRIJOL *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)**

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

OLIVIA JATOMEA FINO

MARZO DEL 2003

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE
 ALPHA-AMILASA Y SU PODER INSECTICIDA SOBRE EL GORGOJO DEL
 FRIJOL PINTO *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)

TESIS

Sometida a la consideración del
 Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

Olivia Jatomea Fino

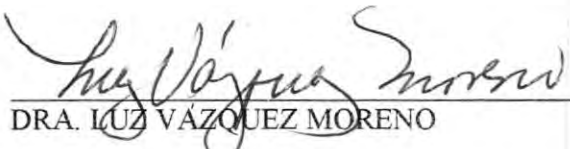
Como requisito parcial para obtener
 El grado de Maestro en Ciencias en Horticultura


Marzo del 2003


Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR: 
DRA. LUZ VÁZQUEZ MORENO

ASESOR: 
M.S. ALFREDO SERRANO ESQUER

ASESOR: 
M.C. JOSÉ JESÚS JUVERA BRACAMONTE

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento sincero a la Dra. Luz Vázquez Moreno por la dirección, y asesoría que me brindó para realizar este trabajo.

De manera muy especial agradezco al M.S. Alfredo Serrano su apoyo, y su gran labor de asesoría reconocida.

Al M.C. José Jesús Juvera Bracamontes agradezco su asesoría y sus acertadas sugerencias.

A la M.C. Ma. Del Refugio Robles Burgueño le agradezco su valiosa asesoría y el apoyo que me brindó para realizar este trabajo.

Agradezco a la M.C. Ana María Guzmán Partida la asesoría y su valiosa ayuda.

M.C. Gabriela Ramos Clamont agradezco su asesoría y el apoyo dado en el laboratorio.

Dra. Carmen Candia Plata muchas gracias por los conocimientos y apoyo personal dado en el laboratorio Bioquímica de Proteínas.

Agradezco a la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por el apoyo que me brindaron para participar en el programa de la Maestría en Ciencias en Horticultura.

Finalmente agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por el apoyo en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Con inmenso amor a mis hijas Olivia, Cristina y Evelina. Ellas han motivado mi deseo de superación.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
LITERATURA REVISADA	3
Importancia de las Leguminosas que se Consumen Comúnmente	3
Importancia de las Leguminosas Silvestres	4
Descripción Botánica del Palo Fierro <i>Olneya tesota</i> (Gray).....	5
Importancia del Palo Fierro	7
Mecanismos de Defensa Natural en las Plantas	7
Gorgojo pinto del Frijol <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman).....	8
Daños e Importancia Económica	8
Habitat, Características y Ciclo de Vida	9
Mecanismo de Acción de Inhibidores	11
Condiciones Experimentales para el Ensayo de la Inhibición de la Actividad de la Alpha-amilasa	12
Purificación de los Inhibidores Alpha-amilasa, usando Procedimientos Cromatográficos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15

Obtención de las Muestras	15
Cultivo de Brúquidos y Preparación de Alpha-amilasa Larval.....	15
Actividad de Alpha-amilasa.....	16
Obtención de Extractos Crudos de Leguminosas.....	17
Actividad del Inhibidor Alpha-amilasa.....	18
Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha-amilasa	18
Obtención del Extracto	18
Fraccionación de Proteínas	20
Cromatografía de Filtración en Gel	20
Cromatografía de Intercambio Aniónico	21
Determinación de la Concentración de Proteínas	22
Método de Lowry	22
Método de Bradford	22
Caracterización Electroforética	22
Electrotransferencia	24
Detección de Proteínas en Membrana de Nitrocelulosa	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Obtención de la Muestra	26
Obtención de Extractos Crudos de Leguminosas	26
Cultivo de Brúquidos y Preparación de Alpha-amilasa	27
Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha-amilasa	27

Obtención del Extracto Crudo	29
Fraccionación de Proteínas por Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	29
Cromatografía de Filtración en Gel	29
Cromatografía de Intercambio Iónico	31
Caracterización Electroforética	37
CONCLUSIONES	45
LITERATURA CITADA	46

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Análisis Químico en Semillas de Leguminosas.....	6
Cuadro 2. Ensayos de Actividad Inhibitoria de tres extractos Crudos: frijol tépari, palo fierro y palo verde	28
Cuadro 3. Datos de Purificación para el Inhibidor Alpha-amilasa del palo fierro	30
Cuadro 4. Estimación de las Masas Moleculares Aparentes por Subunidad del Extracto fraccionado con Sulfato de Amonio, fracción no. 1 y no. 2 de la Cromatografía de Filtración en Gel.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol de Palo Fierro <i>Olneya tesota</i> (Gray).....	5
Figura 2. Adulto y larvas del 4to. estadio de <i>Z. subfasciatus</i> (Boheman)	10
Figura 3. Ciclo de Vida de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman).....	10
Figura 4. Curva Lineal de la Maltosa Monohidratada	17
Figura 5. Esquema de Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha- amilasa de Palo Fierro <i>Olneya tesota</i> (Gray)	19
Figura 6. Cromatografía de Filtración en Gel de las Proteínas fraccionadas con Sulfato de Amonio	32
Figura 7. Curva de Calibración de la Columna Sephadex G-75	33
Figura 8. Cromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 1 de la Cromatografía de Filtración en Gel	34
Figura 9. Recromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 4 .	35
Figura 10. Recromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 5 .	36
Figura 11. SDS-PAGE de las Fracciones de Filtración en Gel	39
Figura 12. SDS-PAGE de las Fracciones Proteicas de la Cromatografía de Intercambio Iónico	42
Figura 13. Inmunodetección de Proteínas Electrotransferidas	43
Figura 14. SDS-PAGE con Tinción de Nitrato de Plata	44

OBJETIVOS

Objetivo General.

Aislar y purificar por técnicas cromatográficas a los inhibidores alpha-amilasa, presentes en las semillas de palo fierro *Olneya tesota* (Gray) y probar su efecto sobre tracto gastrointestinal de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

Objetivos Particulares.

1. Llevar a cabo la separación inicial del extracto crudo empleando fraccionación por precipitación con sulfato de amonio, y posteriormente precipitación por calor.
2. Determinar la actividad inhibitoria del inhibidor alpha-amilasa contra la enzima amilasa larval de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), en el extracto crudo y en las proteínas obtenidas de cada etapa cromatográfica.
3. Aislar y purificar los inhibidores alpha-amilasa, empleando cromatografía de filtración en gel, intercambio iónico y recromatografía de intercambio iónico.
4. Caracterizar bioquímicamente a los inhibidores alpha-amilasa por filtración en gel, y electroforesis en gel.
5. Detectar y caracterizar las proteínas por SDS-PAGE que se transfieren a membrana y se realiza la reacción antígeno-anticuerpo.

RESUMEN

Las semillas de leguminosas son una fuente muy rica de proteínas dietarias en muchos países, además contienen un alto nivel de proteínas de defensa que protegen a las semillas contra predación por brúquidos. A pesar de la presencia de estas proteínas hay infestación en las cosechas por brúquidos, los cuales dañan a las semillas cuando están madurando y durante el almacenaje y en especial al frijol común *Phaseolus vulgaris* (L.), ya que es muy susceptible al ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Considerando lo antes expuesto, se realizó este trabajo, donde se aisló, purificó y se caracterizó parcialmente a los inhibidores alpha-amilasa de palo fierro *Olneya tesota* (Gray), probando su efecto inhibitorio contra alpha-amilasa del gorgojo pinto del frijol.

La purificación se llevó a cabo a través de tres etapas cromatográficas: filtración en gel en Sephadex G-75, intercambio iónico en DEAE-Celulosa y recromatografía por intercambio iónico en DEAE-Celulosa. La pureza de los inhibidores alpha-amilasa, se corroboró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La masa molecular nativa aparente se determinó por cromatografía de filtración en gel y fue de 41 kDa. Las masas moleculares de las subunidades de los inhibidores, se determinaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), fueron de 19.9 kDa y 16.2 kDa. Las subunidades de los inhibidores se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa, por una reacción inmunológica se demostró la homología de la proteína lectina con el inhibidor alpha-amilasa. Los inhibidores resultaron ser proteínas termoestables.

Los inhibidores alpha-amilasa se purificaron a homogeneidad electroforética aparente. El inhibidor alpha-amilasa de la fracción no. 1 mostró una actividad total de 9.8 UI, actividad específica de 283.72 UI/mg y un factor de purificación de 81.83. El inhibidor de la fracción no. 2 presentó una actividad total de 7.4 UI, actividad específica de 593.85 UI/mg y un factor de purificación de 170.31.

Palabras claves: palo fierro *Olneya tesota* (Gray), brúquidos, *Phaseolus vulgaris* (L.), *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), inhibidor alpha-amilasa.

ABSTRACT

Leguminous seeds are rich in dietary protein in many countries, and they contain a very high level of defense proteins or insecticidal proteins that protect the seeds against bruchid attack. Even with the presence of these proteins crops continue to be infested by bruchids that harm the seed, when they are maturing and during storage, the common bean *Phaseolus vulgaris* (L.) is quite susceptible to the attack of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Considering this research was accomplished, by isolating, purifying and partially characterizing the alpha-amylase inhibitors of *Olneya tesota* (Gray) (palo fierro), and proving its inhibitory activity against the alpha-amylases of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

The purification was accomplished through three chromatographic stages: Gel filtration in Sephadex G-75, ionic exchange in DEAE-Cellulose and Rechromatography by ionic exchange in DEAE-Cellulose. The purity of alpha-amylase inhibitors were analyzed by electrophoresis in gel of polyacrylamide under denatured and reducing conditions (SDS-PAGE). The apparent native molecular mass was determined to be by gel filtration chromatography, it was 41 kDa. The molecular mass by in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were of 19.9 kDa and 16.2 kDa. Subunits of the inhibitors were electrotransferred to a nitrocellulose membrane and by an immunologic reaction proved the homology with the lectin protein. The inhibitors resulted to be thermostable proteins.

Alpha-amylase inhibitors were purified to homogeneity, and the alpha-amylase inhibitor in fraction number 1 showed a total activity of 9.8 IU, specific activity of 283.72 IU/mg and a factor of purification of 81.38. The inhibitor of fraction number 2 showed a total activity of 7.4 IU, specific activity of 593.85 IU/mg and a factor of purification of 170.3.

Keywords: palo fierro *Olneya tesota* (Gray), bruchids, *Phaseolus vulgaris* (L.), *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), alpha-amylase inhibitor.

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas contienen inhibidores alpha-amilasa proteínicos (α AI), que inhiben la alpha-amilasa digestiva de algunos insectos coleópteros. Por esta acción en el tracto digestivo de la larva del insecto, el inhibidor detiene el crecimiento de la larva que infesta las semillas. Esto se ha mostrado en insectos sujetos a dietas artificiales que contienen diferentes niveles del inhibidor alpha-amilasa de frijol (Ishimoto y Kitamura, 1989; Huesing et al. 1991), la proteína tiene propiedades de insecticida contra las larvas de varios brúquidos (Ishimoto et al. 1999). Algunas especies de plantas tienen un funcionamiento de defensa específico contra insectos fitófagos (Gatehouse y Gatehouse, 1998).

Las leguminosas son dañadas frecuentemente por insectos, siendo las plagas responsables de considerables pérdidas de semillas cosechadas y principalmente, las cosechas de frijol común *Phaseolus vulgaris* (L.) han mostrado ser altamente susceptibles a plagas de coleópteros, tales como *Acanthoscelides obtectus* (Say) y *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Cardona et al. 1989). Sin embargo, algunas proteínas que se encuentran en estos frijoles cultivados ó silvestres, muestran actividad insecticida y pueden proteger a las semillas de predación por insectos. Recientes evidencias muestran que el inhibidor alpha-amilasa existe en dos variantes alélicas en el frijol común. Las isoformas encontradas en frijoles cultivados (Moreno y Chrispeels, 1989), es ahora llamado α AI-1; una variante, α AI-2, fue encontrada en algunas de las líneas de frijol común silvestre, que contiene arcelina e inhibe la actividad de la alpha-amilasa de *Z. subfasciatus* (Boheman) (Gatehouse et al. 1987; Suzuki et al. 1993).

Las dos isoformas del inhibidor difieren en su especificidad hacia amilasas. El α AI-1 inhibe a la alpha-amilasa pancreática porcina (PPA), así como a las alpha-amilasas de *Callosobruchus maculatus* (F.), *Callosobruchus chinensis* (L.), no inhibe la alpha-amilasa de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Ishimoto y Kitamura, 1989); el α AI-2, no inhibe a

las tres alpha-amilasas antes citadas, pero si inhibe la alpha-amilasa del gorgojo pinto del frijol (Suzuki et al. 1993; Ishimoto y Chrispeels, 1996).

Las semillas de frijol común, contienen un nivel grande de proteínas de defensa de una familia que incluye: el inhibidor alpha-amilasa, lectinas, la proteína similar al inhibidor alpha-amilasa y la arcelina (Chrispeels y Raikhel, 1991). Los genes para estas proteínas están codificadas en un locus simple, en el genoma de *P. vulgaris* (L) (Nodari et al. 1993), y los genes homólogos parecen haber surgido por duplicación de un gene ancestral. La secuencia de aminoácidos de esas proteínas, han sido deducidas de su ADN (ácido-desoxiribonucleico complementario), y muestran alto grado de homología entre ellas (Mirkov et al. 1994).

El inhibidor alpha-amilasa es una glicoproteína (alrededor de 15% de carbohidratos), y su masa molecular nativa ha sido estimada de 40 a 50 kDa por experimentos de filtración en gel (Ho y Whitaker, 1993; Powers y Whitaker, 1977; Sengupta-Gopalan et al. 1985). El inhibidor está compuesto de subunidades de masa molecular de 15 a 18 kDa, y se ha propuesto que puede ser un trímero o un tetrámero de polipéptidos idénticos, (Lajolo y Finardi-Filho, 1985; Powers y Whitaker, 1977) o polipéptidos diferentes (Moreno y Chrispeels, 1989; Sengupta-Gopalan et al. 1985).

La propuesta de este trabajo fue aislar, purificar y caracterizar parcialmente los inhibidores alpha-amilasa presentes en las semillas de una leguminosa silvestre, el palo fierro *Olnya tesota* (Gray). Se probó la actividad inhibitoria de los inhibidores contra la alpha-amilasa larval del gorgojo pinto del frijol.

LITERATURA REVISADA

Importancia de las Leguminosas que se Consumen Comúnmente.

Las semillas de las leguminosas son una fuente muy rica de proteínas y almidón. Estas reservas son utilizadas durante la germinación para proveer energía, nitrógeno y carbono para el crecimiento de la planta (Ashton, 1976). Las especies más cultivadas son la soya *Glycine max* (L.), el chícharo *Pisum sativum* (L.), el cacahuete *Arachis hipogaea* (L.), la lenteja *Latirus esculenta* (L.), el garbanzo *Cicer arietinum* (L.), la haba *Vicia faba* (L.) y el frijol *Phaseolus vulgaris* (L.). De estas especies se pueden elaborar una gran variedad de productos, son alimento básico para la población por el aporte calórico y proteico. Se ha complementado la alimentación de estas leguminosas con cereales como el trigo y el maíz. Cuando ambos granos son consumidos en proporción adecuada, la cantidad de la proteína en la dieta es más alta (Canett y Valenzuela, 1984).

Las leguminosas también son excelentes forrajes para la alimentación animal. Son utilizadas como colorantes naturales, como gomas de amplio uso en la industria, como materia prima para la industria química y farmacéutica (reactivos, laxantes, esteroides, materiales aislantes y lubricantes). Un aprovechamiento autorizado por la SARH, fue la producción de carbón vegetal de 1970 a 1985, se encontró que el principal producto derivado del mezquite fue el carbón vegetal con un 94%, siguiendo la leña en raja con un 4%, y postes para cerca, madera en rollo, brazuelo y curvos para la construcción de barcos pesqueros con el resto (Bourges y Valencia, 1987; Solis y Molina, 1992).

Las leguminosas tienen la propiedad de poder utilizar el nitrógeno fijado por las bacterias del suelo del género *Rhizobium*, esto les permite sintetizar aminoácidos, así como el poder acumular una gran cantidad de proteínas. Por esta propiedad las leguminosas son una buena fuente de pro-

teína, ya que contienen alrededor de 19 a 37%, superior al encontrado en cereales (5 a 12%), y en verduras, tubérculos y helechos que contribuyen solo con 0.5 a 3% (Bidwell, 1987).

Las semillas de leguminosas, son la mejor fuente de proteínas dietaria en muchas partes del mundo, particularmente en muchos países situados a lo largo de la zona tropical y subtropical, donde la disponibilidad y consumo de proteína animal es baja a causa de restricciones económicas y/o sociales (Singh and Singh, 1990). En México el frijol constituye la base de la alimentación de la población y dada la cantidad de hectáreas sembradas y el volumen de consumo, ocupa el segundo lugar en importancia nacional (Cortez et al. 1991).

Importancia de las Leguminosas Silvestres.

Las leguminosas silvestres durante miles de años, han constituido la base para la subsistencia de los grupos étnicos en el desierto de Sonora, en el suroeste de América del Norte y Norte de México. Las especies más utilizadas por los nativos como fuente primaria de alimento fueron: el mezquite (*Prosopis juliflora* (Swartz)), el frijol tépari *Phaseolus acutifolius* (Gray), la gatuña *Mimosa grahamii* (A.Gray), el palo fierro *Olneya tesota* (Gray), el palo verde *Parkinsonia aculeata* (L.), entre otros. Todas son ricas en proteínas y aceites (Felger and Nabhan, 1976).

En el estudio de composición química en semillas de leguminosas silvestres realizado por Ortega et al. (1996), la concentración de proteínas fue de 19.5 a 30%. Se obtuvo el mayor porcentaje en la semilla de gatuña y la más baja fue en palo fierro. Se compararon estas proteínas con proteínas de leguminosas de cultivo, observándose que el porcentaje de proteínas es muy similar al encontrado en garbanzo, frijol y chícharo, con excepción al de soya. El porcentaje de cenizas (Cuadro 1), varió de 1.3 a 5.0%, siendo buena fuente de minerales, como hierro, potasio, calcio, zinc, magnesio y fósforo (Ortega et al. 1996).

La concentración de carbohidratos asimilables, varió desde 43% en gatuña hasta 62% en palo verde. Las especies silvestres tienen una mayor concentración de carbohidratos que las especies cultivadas, con excepción de la soya (Cuadro 1).

Descripción Botánica del Palo Fierro *Olneya tesota* (Gray).

Pertenece a la familia leguminosae (Figura 1). Es un árbol de 8 m de altura, su corteza es dura y brillante, sus hojas son delgadas y verdes que pierde en tiempo de sequía o fríos muy intensos. El fruto es una vaina pequeña indehiscente, que contiene de dos a tres semillas, las cuales son de color negrusco, ovaladas de 8 mm de largo, con apariencia de enceradas. La madera externa es de color amarillo claro con un espesor de 2 a 4 cm, la madera del centro es café oscuro y es extremadamente dura (Shreve y Wiggins, 1986).



Figura 1. Árbol de Palo Fierro *Olneya tesota* (Gray).

Fuente: fotografía proporcionada por CIAD.

Semilla	Proteína %	Cenizas %	Fibra %	CHO %	Aceite %
P. aculeata (palo verde)	21.0	3.3	5.0	62	8.5
O. tesota (palo fierro)	19.5	2.5	6.5	61	10.3
M. grahamii (gatuña)	30.1	1.3	2.3	43	23.5
P. juliflora (mezquite)	28.7	3.5	5.2	49	14.5
C. arietinum (garbanzo)	20.1	3.5	5.6	71	6.6
G. max ^d (soya)	37.8	5.3	5.8	33	18.7
P. vulgaris ^d (frijol)	20.9	4.3	5.1	68	1.5
P. sativum ^d (chícharo)	19.3	4.0	5.5	68	3.2
^a : Base seca	^b : N x 6.25		^c : Por diferencia		
^d : Hernández y Bourges, 1983.					

(Ortega et al, 1996).

Cuadro 1: Análisis Químico en Semillas de Leguminosas.

Importancia del Palo Fierro.

El palo fierro es muy apreciado por la tribu Seri ya que consumen las semillas tostadas o molidas cuyo sabor es similar al cacahuete, de la madera fabrican lanchas, palos para remar, arpones para la caza de la tortuga y como medicina para provocar vómito (Felger y Moser, 1971). El palo fierro se considera como una planta nativa, sus semillas y hojas son consumidas por el ganado durante la época de sequía, por mantenerse siempre verde, a excepción de los años con heladas y secos (Solis, 1998).

Desde el punto de vista económico, esta planta es utilizada en la obtención de diversos productos como: forraje para fauna silvestre y domesticada, medicina, alimento, combustible (leña y carbón) y en la elaboración de artesanías en Sonora (Solis, 1993).

Mecanismos de Defensa Natural en las Plantas.

Uno de los factores más importantes del mecanismo de defensa natural es la defensa química, que será considerada detalladamente. Las plantas tienen una gran capacidad metabólica y producen muchos químicos secundarios, los cuales son tóxicos, antinutricios o adversos a otras especies, las cuales pueden ser predadores potenciales (Norris y Kogan, 1980), así tenemos a las piretrinas de los crisantemos y alcaloides como la nicotina del tabaco. Otras clases de compuestos secundarios de las plantas, que han sido implicados en protección contra el ataque de insectos son: los terpenoides, esteroides, flavanoides, fenólicos, glucosinolatos, glicósidos cianogénicos, rotenoides, saponinas y aminoácidos no-proteínas (Gatehouse et al. 1991). Sin embargo, estos compuestos no son responsables actualmente de la resistencia contra plagas que se alimentan de semillas en leguminosas, ya que esos compuestos han sido conciente o inconscientemente reducidos o eliminados de las semillas por selección de generación o progenie, debido a

que son sustancias que producen olor, o sabor desagradable o por toxicidad a humanos y animales (Kitamura et al. 1990).

Un mecanismo de defensa en las plantas está basado en proteínas, que pueden ser ingeridas para tener un efecto, y el sitio blanco de muchas es el sistema digestivo del insecto. Por ejemplo, la resistencia de ciertas líneas silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris* (L.) al *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (gorgojo) es debido, en parte, a una proteína, arcelina-4, la cual reemplaza grandemente a la proteína convencional almacenada en frijol cultivado, faseolina. La arcelina no es digerible por este insecto, por lo tanto, la larva muere por falta de alimento en esas semillas resistentes (Minney et al. 1990). No se conoce el mecanismo (Fabre et al. 1998).

Inhibidores proteinaceos de enzimas digestivas de insectos tienen un efecto similar (Gatehouse et al. 1979), y ciertas lectinas destruyen las células del epitelio digestivo de los insectos (Gatehouse et al. 1990).

Otro grupo de proteínas relacionadas con factores tóxicos en las plantas, son las proteínas que inactivan ribosomas (RIP_s) tales como la ricina de la higuera, han mostrado ser altamente tóxicas a ciertos insectos (Gatehouse et al. 1990).

Gorgojo del Frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

Daños e Importancia Económica.

Zabrotes subfasciatus (Boheman) es una de las plagas universales e importantes, encontradas en frijoles almacenados (Cardona y Ashok, 1990). *Phaseolus vulgaris* (L.) se ha sembrado extensamente a lo largo del sur de América y partes de África Central, donde las semillas forman una fuente de alimento más importante. El daño que ocasionan los insectos a estas semillas, se considera el más importante en post-cosecha y se calcula una pérdida de 25 al 40% (FAO, 1977). Las plagas principales son los brúquidos

25 al 40% (FAO, 1977). Las plagas principales son los brúquidos *Acanthoscelides obtectus* (Say) y *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Hill, 1983).

Estudios realizados en el estado de Sonora reportaron que uno de los insectos más comunes que daña el frijol almacenado es *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Estos insectos atacan a cualquier tipo de frijol, siendo más susceptibles ciertas variedades como Río Grande, Bolita Querétaro, Canario, Pinto UI-114, Mayocoba, con daños de semilla de 27.5, 36.1, 21.1, 31.0 y 31 % respectivamente. Las variedades blancas y pequeñas como Tépari MAS LCCG-30, Tépari Chihuahua 79, y Yorimoni fueron resistentes presentando daño mínimo en semillas de 0.9, 1.9 y 1.4 % respectivamente (Borboa et al. 1997). El daño es causado por la larva al alimentarse del grano, disminuye la calidad del mismo por la presencia de huevos, excremento y cuerpos de insectos adultos. Por otro lado, ocasionan pérdida nutricional y de la capacidad de germinación de las semillas (Wong et al. 1987).

Habitat, Características y Ciclo de Vida.

Habitat. Se distribuye en regiones tropicales de Asia y África, y subtropicales de Centro y Sur América, se desarrolla adecuadamente en climas cálidos y templados (Singh, 1979).

Características. El insecto muestra un dimorfismo sexual pronunciado. El macho tiene una longitud de 1.5 a 2.5 mm. La hembra presenta manchas pálidas sobre los élitros y es más grande que los machos (2 a 3 mm), su color es gris o pardo grisáceo. Los adultos poseen espuelas móviles en el ápice de la tibia de las dos patas traseras y poseen pequeños dientes en el fémur. Las hembras ovipositan en la superficie de la semilla (Figura 2). Los huevos son blancos de forma redonda (Pierre y Pimbert, 1981).

Ciclo de vida. Las hembras fijan sus huevos hemisféricos en la superficie de las semillas, produciendo un promedio de 50 huevecillos de 2 a 30 horas después de la cópula, los cuales se observan recién ovipositados de un color cristalino, después se tornan a un blanco sucio; la larva que sale de la eclosión del huevecillo es robusta, encorvada, de un color blanco marfil, midiendo aproximadamente un poco más de 2.0 mm de longitud. El periodo

larvario tiene una duración de 12 a 18 días, muda 4 veces y forma cavidades donde pasará el estado de pupa, cerca de la cascarilla en un lugar preparado

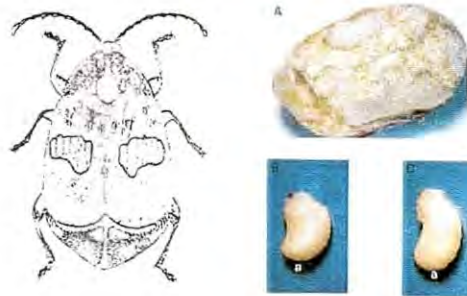


Figura 2. Adulto y larvas del 4to. estadio de *Z. subfasciatus* (Boheman).

Fuente: Juvera, 1986 y Paes, 2000.

por la larva, quedando un orificio circular al emerger el adulto. El ciclo completo lo realiza dentro de las semillas y dura de 28 a 42 días, el adulto vive de 2 a 4 semanas. Las condiciones de desarrollo son: temperatura 21 a 30°C y humedad relativa de 20 a 67% (Figura 3).

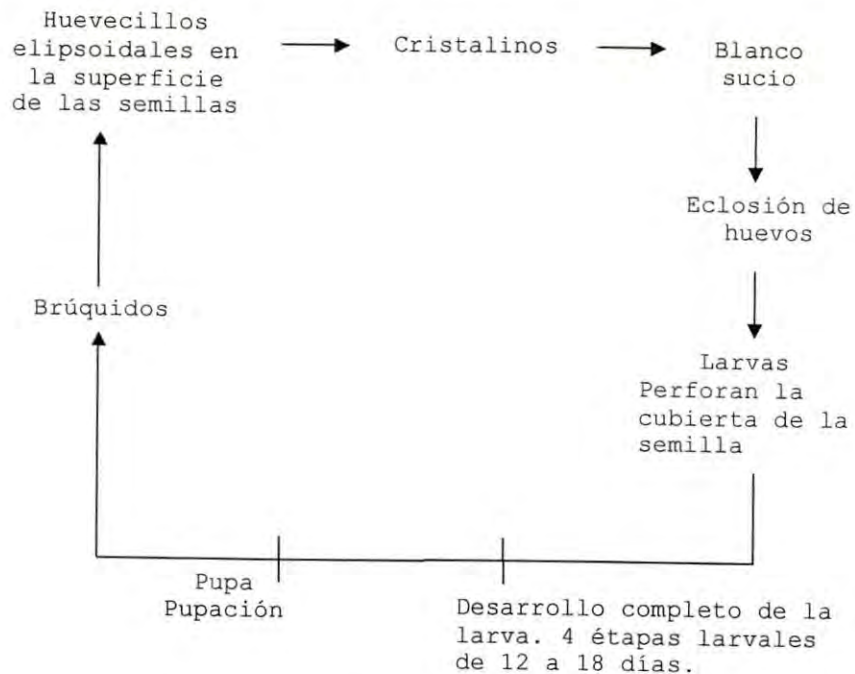
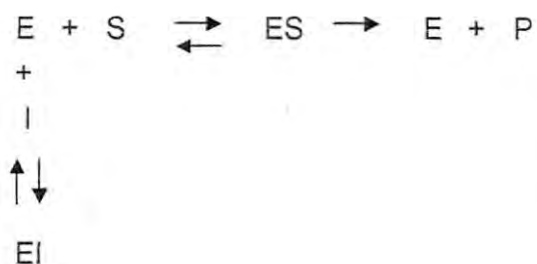


Figura 3. Ciclo de vida de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Juvera, 1986).

Mecanismos de Acción de Inhibidores.

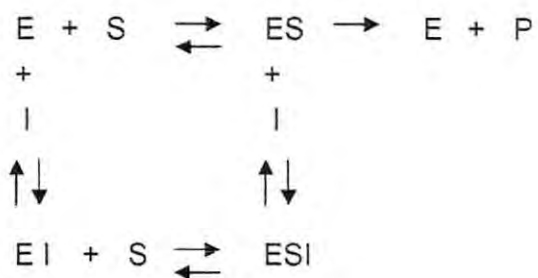
El mecanismo de acción de un inhibidor se estudió experimentalmente, realizando determinaciones de la actividad enzimática a varias concentraciones de sustrato, en ausencia y en presencia de una concentración fija de inhibidor. La representación gráfica de los resultados permite establecer el tipo de inhibición.

Reacciones que ocurren en presencia de un inhibidor competitivo, se representan como sigue:



El inhibidor (I) y sustrato (S) solo puede unirse con la enzima (E) libre pues ambos se excluyen mutuamente. La enzima unida al inhibidor es inactiva. En presencia del inhibidor se requieren concentraciones mayores de sustrato para obtener la misma velocidad que en ausencia del mismo (Blanco, 1997).

Reacciones que ocurren en presencia de un inhibidor no competitivo, se representan de la siguiente manera:



La unión del sustrato con la enzima no está afectada y el inhibidor se une ya sea con enzima libre o con el complejo ES. Una vez formado el complejo ESI, la enzima se inactiva disminuyendo la velocidad máxima sin modificar la constante de Michaelis-Menten (Blanco, 1997). En el trabajo realizado por Frels y Rupnow (1985) dos inhibidores purificados de frijol negro, funcionaron por la vía de un mecanismo no competitivo como el antes citado para inhibir la α -amilasa, también en maíz (Blanco-Labra e Iturbide-Chinas, 1981), y Trigo (Saunders y Lang, 1973).

Condiciones Experimentales para el Ensayo de la Inhibición de la Actividad de la α -Amilasa.

Estudios con inhibidores de plantas, han demostrado que la inhibición de la actividad de la α -amilasa, es una reacción que depende del tiempo y que la enzima y su inhibidor deben incubarse 30 minutos antes de que el sustrato sea añadido, así se observa la máxima inhibición. Este parámetro es importante, porque la reacción de inhibición es frecuentemente menos rápida que la hidrólisis del sustrato, y sería posible que algunos inhibidores podrían unirse con el sustrato amilasa (Warchalewski, 1983; Whitaker, 1983). Es importante escoger el método para ensayar la actividad de la amilasa y el sustrato. Los sustratos comúnmente usados son el almidón gelatinizado, p-nitrofenil- α -D-maltoheptaosida, maltotetraose, una mezcla de oligosacáridos conteniendo cantidades conocidas de polímeros con 4 o 10 residuos glucosa, y almidón carboximetilado (Parviainen et al. 1984).

Dependiendo del sustrato usado la actividad de la α -amilasa puede ser determinada por alguna de las siguientes técnicas: sacarogénica (Bernfeld, 1955); iodométrico, algunas veces llamado amiloclásico (Smith y Roe, 1957); o cromagénico (Ceska et al. 1969; Tuzhilin et al. 1982), debido a la gran cantidad de factores de interferencia, especialmente si la amilasa y el inhibidor no están purificados, los resultados pueden variar si el método no es bien escogido.

El método de tinción con yodo, no puede ser utilizado para concentraciones de almidón de un rango amplio y también tiene la desventaja de ser afectado por proteínas inactivas, si están presentes (Wilding, 1963).

El procedimiento de azúcar reducido -ferricianida, es sensible a la interferencia de sustancias reducidas y se usa solamente cuando la amilasa y el inhibidor están muy puros.

Si el almidón es usado como sustrato, debe tratarse con borohidruro de sodio para eliminar grupos reductores endógenos (Strumeyer, 1967).

Otras condiciones experimentales, son el pH, fuerza iónica y temperatura, ya que tienen influencia en los resultados de las pruebas de la inhibición de la alpha-amilasa.

Muchas alpha-amilasas, son glicoproteínas asociadas con Ca^{++} y pueden ser inactivadas irreversiblemente por la remoción de Ca^{++} , y son activadas por la presencia de Cl^- en la mezcla de ensayo (Silano et al. 1977). Esta información indica la necesidad de añadir iones Ca^{++} y Cl^- a la mezcla de incubación de la alpha-amilasa. Se debe tener cuidado de evitar que sustancias capaces de secuestrar esos iones estén en el medio de incubación, para evitar resultados falsos positivos o negativos.

Purificación de los Inhibidores Alpha-amilasa, Usando Procedimientos Cromatográficos.

La purificación del inhibidor alpha-amilasa en semillas de frijol tépari, se llevó a cabo mediante las siguientes etapas cromatográficas: el extracto crudo después de haber sido sometido a fraccionación con sulfato de amonio, fue fraccionado en cromatografía de filtración en gel, en una columna Sephadex G75. La siguiente etapa fue la cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Sepharosa CL-6B, en ella se aplicó la fracción con actividad inhibitoria. La fracción activa obtenida, por último se aplicó a HPLC utilizando una cromatografía de intercambio catiónico. Se purificó un inhibidor alpha-amilasa con una masa molecular de

39 kDa por filtración en gel, y de 37.7 kDa por SDS-PAGE (Blanco-Labra et al. 1996).

De las semillas del frijol negro se obtuvo el inhibidor alpha-amilasa, y se purificó por extracción con agua y precipitación con etanol, seguida por cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE-Celulosa, y filtración en gel en columna de Sephadex G100. La masa molecular del inhibidor fue de 53 kDa por filtración en gel (Lajolo y Finardi-Filho, 1985).

La purificación del inhibidor alpha-amilasa (α A1-2) se llevó a cabo mediante la fraccionación del extracto crudo, iniciando con precipitación por pH de 4.0, seguida por una precipitación de proteínas con sulfato de amonio saturado. Las proteínas obtenidas del precipitado se dializaron y se suspendieron en KPO_4 20 mM, pH 6.7. Se utilizaron en una sola etapa cromatográfica de intercambio iónico en columna DEAE-Celulosa, con un gradiente de 0 a 100 mM de NaCl. Se obtuvieron polipéptidos de masa molecular en un rango de 15 a 18 kDa (Grossi de Sa et al. 1997).

El inhibidor del frijol blanco kidney se purificó por tres etapas cromatográficas: en el intercambio aniónico (DEAE-Celulosa) se aplicó el extracto previamente sometido a calentamiento (60°C) y a fraccionación con etanol. La siguiente etapa fue la cromatografía por filtración en gel (Sephadex G75), concluyendo con una cromatografía de intercambio aniónico (CM-Celulosa). La masa molecular de los inhibidores obtenidos (WKB 858^A y WKB 858^B), fueron de 38 kDa por electroforesis en gel y 20 kDa usando cromatografía FPLC-Superosa (Ho y Whitaker, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras.

Las vainas de Palo fierro *Olneya tesota* (Gray) y Palo verde *Parkinsonia aculeata* (L.) se recolectaron cuando alcanzaron el crecimiento y madurez completo; en los meses de Julio y Agosto del año 2000.

Las semillas se sacaron de las vainas manualmente y se procedió a la separación de los granos no dañados.

Las semillas seleccionadas se sometieron a la molienda utilizando un molino de martillo tipo Willey con malla 100. Una vez pulverizadas las semillas, se procedió al desengrasado haciendo una extracción de aceite con hexano, siguiendo el método Am 2-93 del AOAC (1990), obteniéndose las harinas desgrasadas con las que se hicieron los extractos crudos.

Cultivo de Brúquidos y Preparación de Alpha-amilasa Larval.

Los brúquidos, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), que se utilizaron para hacer los cultivos fueron donados por el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Los cultivos se hicieron en frascos de vidrio con tapaderas monohoradadas cubiertas por una malla. Las semillas de frijol mayocoba lavadas y secas se introdujeron a los frascos, se utilizó un aspirador entomológico para introducir los brúquidos adultos. Por cada 50 semillas se emplearon 7 parejas de insectos para que ovipositaran (Fory et al. 1996). La incubación se realizó a temperatura ambiente.

Para hacer el extracto crudo larval se utilizaron tres larvas del cuarto estadio de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), las cuales fueron diseccionadas en placas frías, empleando un estereoscopio de 4X de resolución, para obtener los aparatos digestivos. Éstos se maceraron y homogenizaron en 6 ml

de bufer de fosfato de sodio 0.02 M con NaCl 20 mM, CaCl₂ 0.1 mM, pH 6.7 y 20 µL de PMSF 1 mM por larva. El extracto se centrifugó a 10500 r.p.m. durante media hora y se filtró con fibra de vidrio (Blanco-Labra et al. 1996). El sobrenadante fue utilizado para el ensayo de la actividad de la enzima alpha-amilasa larval, y también para probar la actividad inhibitoria del inhibidor alpha-amilasa de la leguminosa.

Actividad de Alpha-amilasa.

La actividad enzimática del extracto crudo larval obtenido de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) fue evaluada por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico según el método de Bernfeld (1955) modificado por Frels y Rupnow (1984). El sustrato fue almidón soluble al 2% reducido con borohidruro de sodio, de acuerdo a Strumeyer (1967). Se tomaron alícuotas de 50 a 200 µL del extracto enzimático y se adicionaron con 375 µL de una solución de almidón al 2%, con lo que se inició la reacción. La temperatura de incubación fue de 25°C por un tiempo de 5 minutos, al final de los cuales se adicionó 1 ml de una solución conteniendo ácido dinitrosalicílico al 1%, en solución de tartrato de sodio-potasio al 30% y NaOH 0.5 N. Se calentaron a ebullición los tubos del ensayo y se enfriaron añadiendo 10 ml de H₂O destilada. La absorbancia se leyó a 540 nm contra un blanco preparado de la misma manera pero sin enzima. La actividad de alpha-amilasa fue expresada en mg maltosa liberada / 5 minutos a 25°C / 200 µL de extracto crudo larval (Gatehouse et al. 1986).

La concentración de la maltosa producida fue determinada utilizando una curva estándar de maltosa monohidratada. Se hizo la curva tomando alícuotas de 125, 250, 375 y 500 µL de solución maltosa (1 µg/ml) con concentraciones de 0.000125, 0.000250, 0.000375 y 0.000500 mg respectivamente, cada alícuota se aforó a 625 µL con bufer PBS 0.02 M, pH 6.7. Se incubó bajo las mismas condiciones del ensayo de la medición de la actividad enzimática, siguiéndose igual el ensayo hasta leer la absorbancia

contra un blanco preparado de la misma manera, pero sin maltosa a 540 nm (Figura 4). Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que libera 1.0 μmol de maltosa en 5 minutos, pH 5.8 a una temperatura de 25°C.

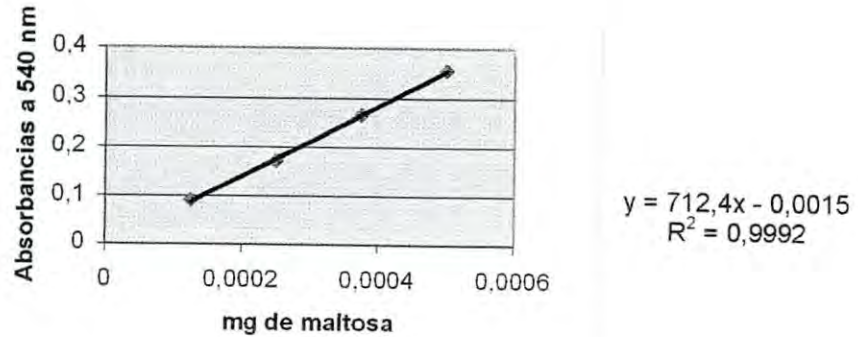


Figura 4: Curva lineal de la maltosa monohidratada (0 a 0.0005 mg).

Obtención de Extractos Crudos de Leguminosas.

Se prepararon por separado los extractos de palo fierro, palo verde y frijol tépari, los últimos como controles, de la siguiente manera, se homogenizaron 10 g de harina con 50 ml de bufer de fosfato de sodio 0.02 M, pH 6.7 y 50 μL de PMSF 0.1 M para inhibir la actividad de proteasas. Cada homogenizado se dejó agitando a 4°C durante 4 horas para una mejor extracción del inhibidor y se centrifugó a 15000 r.p.m. por 20 minutos. El sobrenadante se filtró con fibra de vidrio (Ishimoto y Kitamura, 1989). El filtrado de la harina de palo fierro y el de palo verde, se sometieron a calentamiento de 70°C durante 15 minutos y se centrifugaron a 15000 r.p.m. Los dos sobrenadantes de palo fierro y palo verde y el filtrado del frijol tépari, se utilizaron en los ensayos de actividad inhibitoria contra la α -amilasa de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

Actividad del Inhibidor Alpha-amilasa.

Se combinaron 200 μL del extracto larval diluido 1:2000 en bufer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 5.8 conteniendo NaCl 0.02 M y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM con cada una de las alícuotas de (0, 50, 100, 150 y 200 μL) del extracto de la planta, diluido 1:20 en el mismo bufer. Un blanco fue preparado sin extracto larval ni el extracto de la planta. Todas las combinaciones se aforaron a 625 μL con bufer de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 5.8 conteniendo NaCl 0.02 M y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, se incubaron por 30 minutos a 25°C para que se forme el complejo enzima inhibidor (Frels y Rupnow, 1984). A cada combinación se le añadieron 375 μL de una solución de almidón al 2% reducido (Strumeyer, 1967), la temperatura de incubación fue de 25°C y la reacción se dejó transcurrir por un tiempo de 5 minutos, al final de los cuales se adicionó 1 ml de una solución conteniendo ácido dinitrosalicílico al 1%, en solución de tartrato de sodio-potasio al 30% y NaOH 0.5 N, se calentaron a ebullición y se enfriaron añadiendo 10 ml de H_2O destilada. La absorbancia se leyó contra un blanco preparado de la misma manera pero sin enzima ni inhibidor a 540 nm. Los resultados fueron comparados con la actividad de la misma cantidad de enzima sin inhibidor. Una unidad de inhibición (IU) fue definida como la cantidad del inhibidor alpha-amilasa que inhibe 1 unidad de actividad de alpha-amilasa / 5 minutos / 25°C.

Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha-amilasa.

Obtención del Extracto.

En este procedimiento la extracción y la purificación se basó en la metodología propuesta por M. Ishimoto y K. Kitamura en 1989 (Figura 5). Se utilizaron 30 g de harina desgrasada de palo fierro con 300 ml de bufer de fosfato de sodio 0.02 M, pH 6.7 y 150 μL de PMSF 0.1 M inhibidor de proteasas, se dejó el homogenizado agitando a 4°C durante 4 horas para una

mejor extracción del inhibidor, y se centrifugó a 15000 r.p.m. por 20 minutos. El sobrenadante se filtró en filtros de fibra de vidrio, y se le determinó la actividad inhibitoria contra *Z. Subfasciatus* (Boheman).

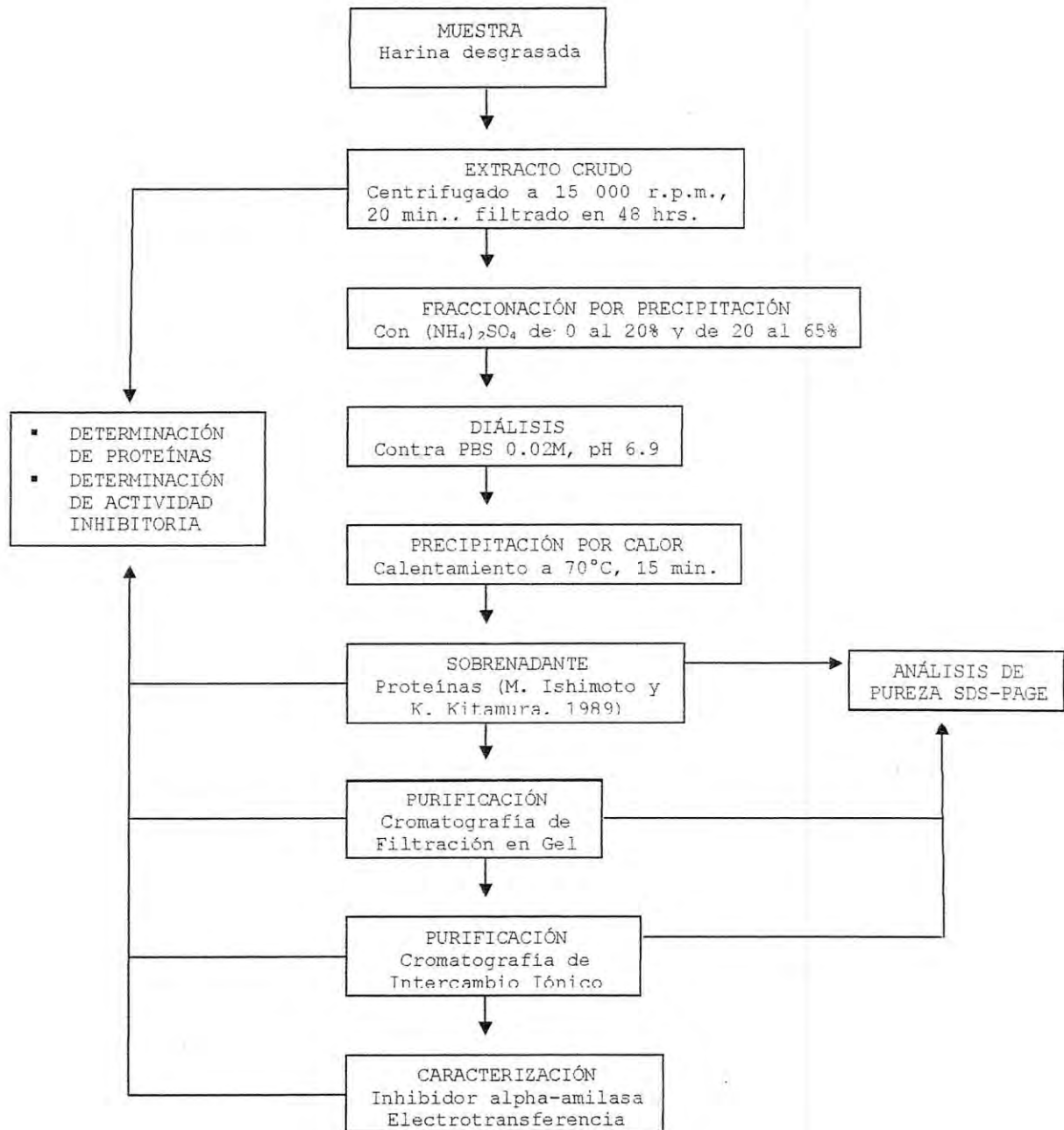


Figura 5: Esquema de Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha-amilasa de Palo Fierro *Olneya tesota* (Gray)

Fraccionación de Proteínas.

El extracto crudo se sometió a fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio. La precipitación salina de proteínas se realizó de 0 al 20% y de 20 al 65%. En 235.5 ml de extracto crudo se disolvieron 24.96 g de sulfato de amonio. La mezcla se agitó por 1 hora a 4°C y después se centrifugó a 18000 r.p.m. durante 20 minutos, el precipitado se descartó y en el sobrenadante de 244 ml se disolvieron 67.34 g de sulfato de amonio ya disueltos, la mezcla se agitó por 1 hora a 4°C. La mezcla se centrifugó a 18000 r.p.m. durante 20 minutos, el sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 200 ml de PBS 0.02 M, pH 6.7 y se sometió a diálisis 36 horas en membrana con un tamaño de poro de 10000. El dializado se sometió a un calentamiento a 70°C durante 15 minutos, se centrifugó a 18000 r.p.m. por 20 minutos. El volumen del sobrenadante conteniendo proteínas fue de 206 ml aproximadamente, el cual fue posteriormente concentrado utilizando una celda de filtración (AMICON), a un volumen de 22 ml y con una concentración final de 792 mg de proteínas. A este concentrado se le determinó la actividad inhibitoria contra la alpha-amilasa de *Z. subfasciatus* (Boheman). Se utilizaron los 9 ml para hacer tres corridas cromatográficas de filtración en gel.

Cromatografía de Filtración en Gel.

En esta cromatografía se utilizó una matriz de Sephadex G-75 (1.6 x 95 cm) previamente equilibrada con el bufer fosfato de sodio 0.02 M, pH 6.7. El volumen de la muestra aplicada fue 3 ml (105.35 mg de proteínas) con actividad inhibitoria. La velocidad de flujo fue de 0.6 ml/min regulado por una bomba peristáltica (BIO-RAD); y se recolectaron fracciones de 3 ml con la ayuda de un fraccionador (BIO-RAD). Se obtuvieron los cromatogramas monitoreando el proceso cromatográfico a 280 nm con un monitor UV-(BIO-RAD) y un graficador (BIO-RAD). A las fracciones obtenidas se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al. 1951), y también la actividad inhibitoria contra alpha-amilasa de *Zabrotes*

subfasciatus (Boheman). La fracción activa no. 1 de cada corrida se congeló a -19°C , y posteriormente se utilizaron en la cromatografía de intercambio aniónico.

Cromatografía de Intercambio Aniónico.

Para la separación de las proteínas por este tipo de cromatografía se utilizó una columna DEAE-Celulosa (2.5 x 8.2 cm) con adaptador de flujo. Se equilibró la columna con bufer de fosfato de sodio 0.02 M, pH 6.7. Se aplicó un volumen de 20 ml (59 mg de proteína) de la fracción 1 de la cromatografía de filtración en gel. Se inició el lavado de la matriz con el bufer de equilibrio, con una velocidad de flujo de 0.6 ml/min regulado por una bomba peristáltica P-1 (Pharmacia), y se recolectaron fracciones de 3 ml.

Se obtuvieron los cromatogramas monitoreando la elución de la proteína a 280 nm. Se continuó la corrida usando un gradiente lineal de elución de PBS 0.02 - 0.25 M, pH 6.7 (Ishimoto y Kitamura, 1989), empleando un formador de gradiente el que se conectó al adaptador de la columna para llevar a cabo la elución del inhibidor α -amilasa, monitoreando la absorbancia 280 nm. Las fracciones se juntaron (picos), se concentró y se lavó el exceso de sales con PBS 0.02 M, pH 6.7, para determinar actividad inhibitoria resultando positiva en la fracción 4 y 5. La columna se lavó con 4 volúmenes de cama de PBS 0.25 M, pH 6.7 para rescatar la proteína que se quedó en la columna. Posteriormente la columna se lavó con 3 volúmenes de cama de NaOH 0.1 M para dejar limpia la matriz de proteínas, después se lavó con 4 veces el volumen de cama con H_2O bidestilada para quitar el NaOH.

Las fracciones con actividad inhibitoria, se concentraron y se les quitó el exceso de sal dializando contra PBS 0.02 M, pH 6.7. Las fracciones con actividad inhibitoria se aplicaron de forma independiente a la misma columna, bajo las mismas condiciones que la corrida anterior, obteniéndose una fracción con actividad inhibitoria de la fracción no. 4 y de la fracción no. 5, se obtuvieron las fracciones no. 2 y 3, y solo la no. 2 presentó actividad inhibitoria.

Determinación de la Concentración de Proteínas.

Método de Lowry.

Al extracto crudo, a las proteínas fraccionadas con sulfato de amonio, a las distintas fracciones (picos) de la cromatografía de filtración en gel y de intercambio iónico, se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, utilizando como estándar proteico a la albúmina de suero bovino. Se graficó una curva del tipo $y = mx + b$ a partir de la cual se estimó la concentración de la proteína problema. Después de que se obtuvo la curva se le practicó una regresión lineal para obtener el coeficiente de determinación (R^2), indicador de la confiabilidad de la curva, los valores deben ser lo más cercano posible a 1. La curva estándar se hizo por triplicado, las diluciones y los blancos se prepararon con el buffer PBS 0.02 M, pH 6.7. Una vez preparados el blanco y las diluciones, se siguió el procedimiento de Lowry para determinación de proteínas, midiendo la absorbancia de cada tubo en el espectrofotómetro a 750 nm.

Método de Bradford.

A las fracciones proteicas de la cromatografía de intercambio iónico, se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), se realizó una curva de albúmina de suero bovino (10 a 90 $\mu\text{g/ml}$) por triplicado, la concentración de la solución patrón de albúmina de suero bovino fue de 1 mg/ml. Se midió la absorbancia a 595 nm.

Caracterización Electroforética.

Las proteínas fraccionadas con sulfato de amonio, las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel y por cromatografía de intercambio iónico (éstas últimas se dializaron contra agua para quitar el

exceso de sales, el último dializado fue con PBS 0.02 M, pH 6.7), se concentraron en centricones con un tamaño de poro de 3000 y 10000 Da, hasta llegar a concentraciones de soluto 10 veces en algunas muestras. Los estándares de proteína empleados fueron miosina, 208 kDa; β -galactosidasa, 144 kDa; albúmina de suero bovino, 87 kDa; anhidrasa carbónica, 44.1 kDa; inhibidor tripsina de soya, 32.7 kDa; lisosima, 17.7 kDa; aprotinina, 7.1 kDa (BIO-RAD Raleidoscope Prestained Standards). También se usaron los estándares de masas moleculares de amplio rango de 6.5 kDa a 200 kDa (BIO-RAD). Con las fracciones concentradas se aplicaron a geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Se inyectaron 25 μ g de cada proteína por pozo, en el gel al 12% de poliacrilamida en una cámara vertical Mighty Small (Hoefer, San Francisco, CA.), y las condiciones de corrida fueron 85 voltios constantes durante 3 horas. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie al 0.125%, en metanol al 50% y ácido acético al 10%, y desteñidos por difusión con la misma solución sin colorante.

Se realizó también la tinción con nitrato de plata a los geles, variando la inyección a muestras de 2 μ g. La detección de las bandas de proteínas se hizo de acuerdo al siguiente método (Wray et al. 1981): el gel se sumergió en una solución fijadora (etanol 40%, ácido acético 10%) durante 30 minutos con agitación lenta en el columpio, esto permitió que las proteínas precipitaran y que el SDS migrara fuera del gel. Se sacó el gel sin lavar y se sumergió en una solución incubadora (etanol 30%, acetato de sodio anhidro 6.8%, tiosulfato de sodio-5H₂O 0.2%, glutaraldehído 0.25%) durante 30 minutos o hasta 24 horas. En esta solución se formaron los aductos de proteína con el glutaraldehído y los complejos con el tiosulfato. El gel se lavó con H₂O milli Q tres veces, cada 5 minutos (cuando se lava menos de 5 minutos aumenta el color en el fondo y si se lava más de 5 minutos disminuye la sensibilidad de la tinción y se pueden perder bandas). El gel lavado se sumergió en solución de plata (reacción con plata), se cubrió la charola totalmente con papel aluminio y se incubó durante 20 minutos con agitación lenta. Se lavó el gel con H₂O milli Q para sumergirse en solución reveladora precalentada a 40°C durante 2 o 3 minutos, se reemplazó por solu-

ción precalentada nueva y se dejó hasta la aparición de las bandas. Enseguida, el gel se sumergió en una solución de EDTA al 0.05 M durante 10 minutos. Esta solución evitó que el gel se tornara amarillento, se lavó con H₂O milli Q tres veces, cada una de 5 minutos y se sumergió en una solución preservante por al menos 20 minutos. El gel se colocó en una hoja de cellophan o plástico humedecido con la solución preservante, evitando burbujas y se empleó para fotografiarse.

Electrotransferencia.

Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22 micras (MSI, Micron Separation Inc.). La electrotransferencia se realizó con un equipo Semi-DryBlotter (BUCHLER Instruments), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la transferencia se utilizaron los siguientes buferes: Tris-Glicina-Metanol (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) usado para preequilibrar el gel de 15 a 30 minutos; bufer ánodo no. 1 (Tris 0.3 M, metanol 20%, pH 10.4); bufer ánodo no. 2 (Tris 0.025 M, metanol 20%, pH 10.4) y bufer cátodo (Tris 0.025 M, 0.04 M ácido aminocaproico, metanol 20%, pH 9.4). Las condiciones de transferencia fueron 60 miliamperes por 1 hora y media, y se emplearon marcadores para vigilar la adecuada transferencia.

Detección de Proteínas en Membrana de Nitrocelulosa.

Las proteínas inmovilizadas en membrana de nitrocelulosa, se usaron para la identificación de las subunidades del inhibidor alpha-amilasa de palo fierro. Para dicha identificación se utilizó el antisuero, antilectina (Anti-PF2) proporcionado por el Laboratorio de Proteínas de Ciencias de los Alimentos del CIAD y el Anti-Rabbit-IgG (SIGMA). Aunque el Anti-PF2 reconoce

lectinas, fue utilizado porque las lectinas presentan una elevada homología (a nivel de proteína) con los inhibidores de α -amilasa de frijol, reportados en la literatura (Young and Oomen, 1992; Suzuki et al. 1994; Rougé et al. 1993; Lee et al. 2002). Se realizó la detección de la reacción Antígeno-anticuerpo de acuerdo a Maniatis et al. (1989), de la siguiente manera: se incubó la membrana al menos por 1 hora con suficiente solución bloqueadora TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5 con 4% de leche descremada). Se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS, pH 7.5. Se incubó 1 hora con Anti-PF2 diluido 1:5000 en solución bloqueadora, con agitación moderada. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces por 10 minutos con bufer TBS, pH 7.5 y se le agregó con agitación moderada por 1 hora un anticuerpo secundario en bufer de incubación (solución bloqueadora más 0.1% Tween 20). Se utilizó una dilución del anticuerpo secundario acoplado con la enzima fosfatasa alcalina (Anti-IgG de conejo-AP) de 1:1000. Después se lavó la membrana 3 veces con bufer TBS. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo al mezclar 200 μ L de la solución A (0.02 g de NTB (Azul de nitrotetrazolio + 78 μ L H₂O + 182 μ L de DMF (dimetilformamida)) y 320 μ L de la solución B (0.01 g de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) + 480 μ L de H₂O), en 19.48 ml del bufer sustrato NTB/BCIP, pH 8.0. Esta solución se agregó a la membrana cada 10 minutos, se observaba para distinguir las bandas. Se detectó el color de las bandas de proteínas, mediante la reacción enzimática entre la enzima fosfatasa alcalina y los sustratos NBT/BCIP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de la Muestra.

Las semillas de palo verde y palo fierro se sometieron a molienda y a desgrasado obteniéndose 250 g de harina de cada especie. Las semillas de frijol tépari solo se sometieron a molienda y se obtuvieron 200 g. Las harinas se guardaron a -19°C hasta ser utilizadas.

Obtención de Extractos Crudos de Leguminosas.

La filtración de los extractos crudos de las tres especies duró diferentes tiempos, el palo fierro en 3 horas, el palo verde en 5 horas y el frijol tépari en 1 hora. El volumen de cada especie fue de 30 ml, 28 ml, y 34 ml respectivamente. Se determinó la actividad inhibitoria en cada uno de los extractos recién preparados, sin ser tratados térmicamente a 70°C durante 15 minutos. Solo presentó actividad inhibitoria el frijol tépari con 82.65 UI/ml. Este extracto mostró actividad inhibitoria al igual que el extracto de frijol kidney blanco reportado por Cinco, et al. (1985), sin haber sido sometido a tratamiento térmico.

Los extractos de palo fierro y palo verde fueron tratados térmicamente a 70°C durante 15 minutos, el calor permitió la desnaturalización, agregación y precipitación de las proteínas que no eran estables a esa temperatura. Se procedió a hacer el ensayo de actividad inhibitoria a cada uno de los tres extractos al mismo tiempo. El extracto de palo verde no presentó actividad inhibitoria, los extractos de palo fierro y frijol tépari presentaron actividad inhibitoria contra el extracto larval de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Un volumen de 200 μL de extracto larval se incubó con cada una de las alícuotas de extractos de *Olneya tesota* (Gray): 50, 100, 150, 200 μL , y presentaron

actividad inhibitoria contra el extracto larval con 77.55, 46.94, 43.54 y 41.32 UI/ml respectivamente (Cuadro 2).

Cultivo de Brúquidos y Preparación de Alpha-amilasa Larval.

Las larvas del cuarto estadio se desarrollaron entre 17 y 24 días después de que las hembras adultas ovipositaron en el frijol mayocoba. En este estadio la larva es robusta, encorvada de un poco más de 2.0 mm de longitud y de color blanco marfil, esta larva corta un opérculo (Steffan, 1945), el cual es usado para emerger cuando es adulto.

De 15 a 20 larvas se colocaron en microtubos y se guardaron a -19°C . Durante 15 días, las larvas conservaron la actividad de alpha-amilasa, esto confirma el trabajo realizado por Campos, et al. (1989), donde las larvas fueron almacenadas y congeladas intactas a -17°C . Por otro lado, el extracto preparado fue de 6.0 ml, se utilizó inmediatamente en los ensayos debido a que perdía actividad rápidamente. En trabajos realizados en frijol común, donde utilizaron extractos de *Z. Subfasciatus* (Boheman) también los usaron inmediatamente (Ishimoto y Chrispeels, 1996; Fory et al. 1996), porque no eran estables.

Extracción y Purificación del Inhibidor Alpha-amilasa.

La tabla 3 muestra el esquema de extracción y purificación utilizado para el inhibidor alpha-amilasa de palo fierro *Olneya tesota* (Gray). El inhibidor se purificó mediante las siguientes etapas consecutivas: preparación del extracto crudo, fraccionación por precipitación del extracto crudo con sulfato de amonio, filtración en gel en Sephadex G-75, Intercam-

Frijol tépari				Palo fierro				Palo verde			
μL de extracto crudo larval	μL de extracto crudo de frijol tépari	mg de maltosa	U/ml	μg de extracto larval	μg de extracto crudo de palo fierro	mg de maltosa	U/ml	μg de extracto larval	μg de extracto crudo de palo verde	mg de maltosa	U/ml
0	0	0		0	0	0		0	0	0	0
200	0	1.373×10^{-4}		200	0	1.373×10^{-4}		200	0	1.373×10^{-4}	0
200	50	1.148×10^{-4}	65.31	200	50	1.111×10^{-4}	77.55	200	50	1.541×10^{-4}	0
200	100	8.473×10^{-5}	76.53	200	100	1.050×10^{-4}	46.94	200	100	1.526×10^{-4}	0
200	150	5.474×10^{-5}	79.80	200	150	9.244×10^{-5}	43.54	200	150	1.541×10^{-4}	0
200	200	2.381×10^{-5}	82.652	200	200	8.053×10^{-5}	41.32	200	200	1.856×10^{-4}	0

Cuadro 2: Ensayos de actividad inhibitoria de tres extractos crudos: frijol tépari, palo fierro y palo verde.

bio iónico en DEAE-Celulosa y repurificación en intercambio iónico DEAE-Celulosa.

Obtención del Extracto Crudo.

De 30 g de harina desgrasada de palo fierro, se obtuvo un volumen de 235.5 ml de extracto crudo. Este extracto presentó una concentración de proteínas de 10.5 mg/ml que corresponde a 52.7 mg de proteína soluble/gramo de harina, es decir, el 5.27% del peso de harina es proteína soluble (Cuadro 3).

Fraccionación de Proteínas por Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El extracto crudo se sometió a la fraccionación de 0 a 20% y se obtuvo un volumen de 235.5 ml, el cual fue fraccionado de 20 a 65% obteniéndose un volumen de 22 ml y mostró una concentración de 36 mg/ml con actividad inhibitoria de 245.3 UI/ml (Cuadro 3).

Cromatografía de Filtración en Gel.

En esta cromatografía, las proteínas se separaron en dos fracciones principalmente. La fracción no. 1 contuvo casi toda la proteína (105.35 mg) con actividad inhibitoria de 101.7539 UI/ml, y la fracción no. 2 tuvo muy baja concentración de proteínas (1.15 mg) y no presentó actividad inhibitoria (Figura 6). En la fracción no. 1 se observó que son dos picos traslapados que contienen el inhibidor. Comparando este cromatograma con el derivado del realizado con frijol tépari, ahí se observaron los dos picos separados y el no. 2 es el que presentó la actividad (Blanco-Labra et al. 1996). Este trabajo antes citado mostró una mejor separación de las proteínas, en la región en donde se encontró el inhibidor α -amilasa, por lo que se procedió a realizar una cromatografía de diferente tipo.

Procedimiento	Fración	Volumen total (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad inhibitoria (UI/ml)	Actividad inhibitoria total (UI) ^b	Actividad específica (UI/mg)	Purificación (veces)
Extracto crudo		235.5	10.5	2472.8	36.6	8619.3	3.486	1
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄		22	36.0	792	245.33	5397.3	6.8148	1.95
Filtración en gel Sephadex G-75	1	35	3.01	105.35	101.7539	3561.4	33.805	9.697
Intercambio iónico DEAE-Celulosa (M = Frac. 1)	4	63	0.011	0.693	13.1658	829.4	1196.89	343.34
	5	44	0.024	1.056	26.3310	1158.6	1097.125	314.72
Intercambio iónico DEAE-Celulosa (M = Frac. 4)	1	1.5	0.0236	0.0345	6.5255	9.8	283.72	81.38
Intercambio iónico DEAE-Celulosa (M = Frac. 5)	2	1.3	0.00968	0.0125	5.7	7.4	593.852	170.31

^a Extraído de 30 g de harina desgrasada de palo fierro.

^b Una unidad de inhibición (UI) se define como la cantidad del inhibidor alpha-amilasa que inhibe 1 unidad de actividad de alpha-amilasa / 5 minutos / 25°C.

Cuadro 3: Datos de Purificación para el Inhibidor Alpha-amilasa del palo fierro^a.

La cromatografía de filtración en gel también se utilizó para estimar la masa molecular nativa de los inhibidores alpha-amilasa. Se realizó la curva de calibración de la columna Sephadex G-75 con el bufer PBS 0.02 M, pH 6.7, donde se determinó el volumen inicial, utilizando el azul de dextrana (0.2 mg) y fue de 75 ml. Los marcadores proteicos fueron citocromo C 1.0 mg, anhidrasa carbónica 0.9 mg y albúmina de suero bovino 2.5 mg. El volumen de elución de la fracción no. 1 de filtración en gel fue de 93 ml y la relación V_e/V_o fue de 1.24 (Figura 7). La masa molecular aparente del inhibidor alpha-amilasa fue de 41 kDa.

Cromatografía de Intercambio Iónico.

La cromatografía de intercambio iónico de la fracción no. 1 antes descrita presentó 5 fracciones (Figura 8), la fracción no. 4 y no. 5 presentaron actividad inhibitoria de 13.17 y 26.33 UI/ml respectivamente, con una concentración de proteínas de 0.693 y 1.056 mg (Tabla 3). Por presentar una ligera contaminación se volvió a realizar la cromatografía de intercambio iónico para cada fracción de manera independiente.

La recromatografía de la fracción no. 4 mostró una fracción con actividad de 6.53 UI/ml y una concentración de proteínas de 0.0345 mg (Figura 9).

La recromatografía de la fracción no. 5 presentó tres fracciones, la no. 2 con una actividad de 5.7 IU/ml y una concentración de proteína de 0.0125 mg, las fracciones no. 1 y no. 3 no presentaron actividad inhibitoria (Figura 10).

En esta última etapa de purificación, se separaron 2 proteínas. En la fracción no. 4 se obtuvo una proteína con actividad total 9.8 UI, actividad específica de 283.72 UI/mg y el factor de purificación de 81.38. En la fracción no. 5 se separó una proteína en la fracción no. 2 con una actividad total de 7.4 UI, actividad específica de 593.85 UI/mg y el factor de purificación de 170.31.

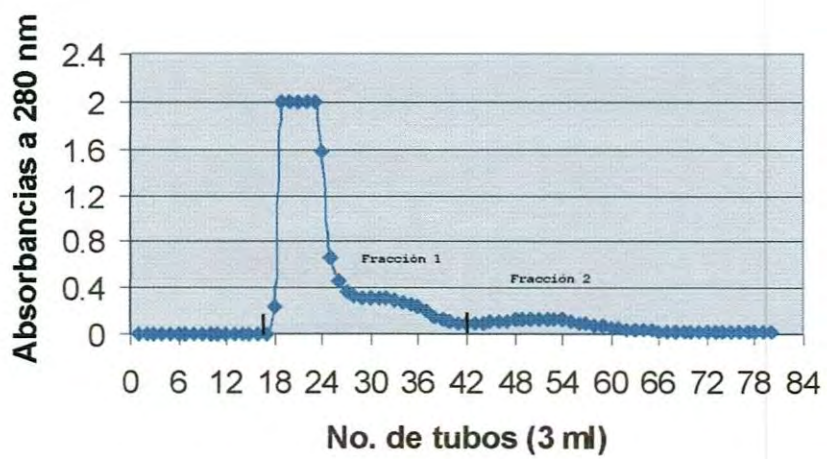


Figura 6: Cromatografía de Filtración en Gel de las Proteínas Fraccionadas con Sulfato de Amonio variando del 20 al 65% (105.35 mg). La fracción del tubo 17 al 42 presentó actividad inhibitoria.

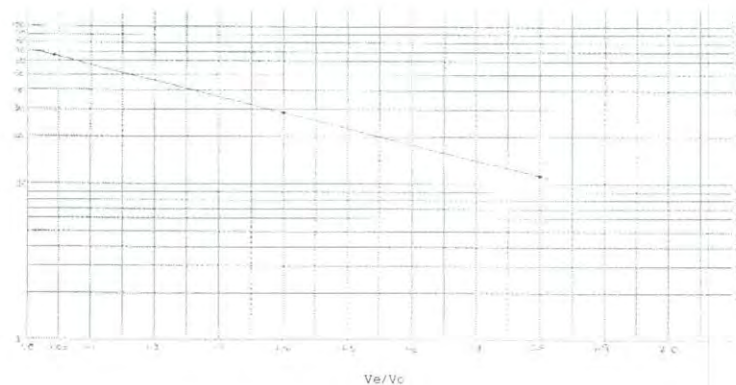
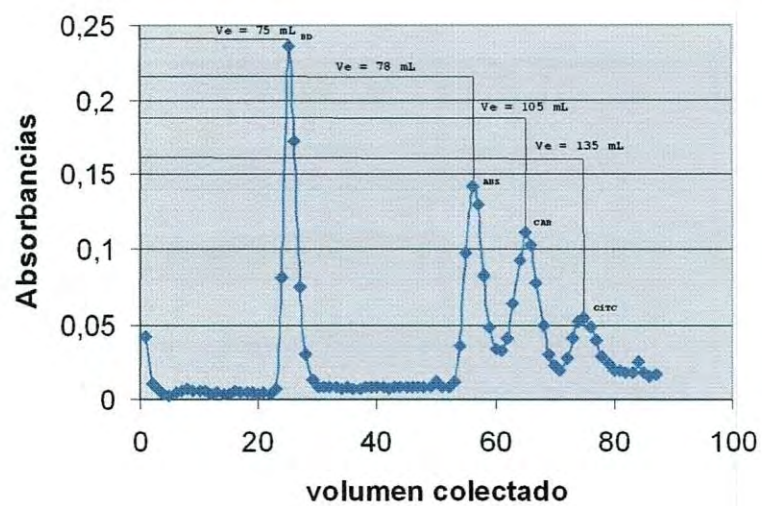


Figura 7: Curva de Calibración de la Columna Sephadex G75. Bufer PBS 0.02 M, pH 6.7, muestra estándares de pesos moleculares de 6500 a 66000, con un vial de azul de dextrana SIGMA Chemical Company, flujo 0.6/min, sensibilidad 0.05.

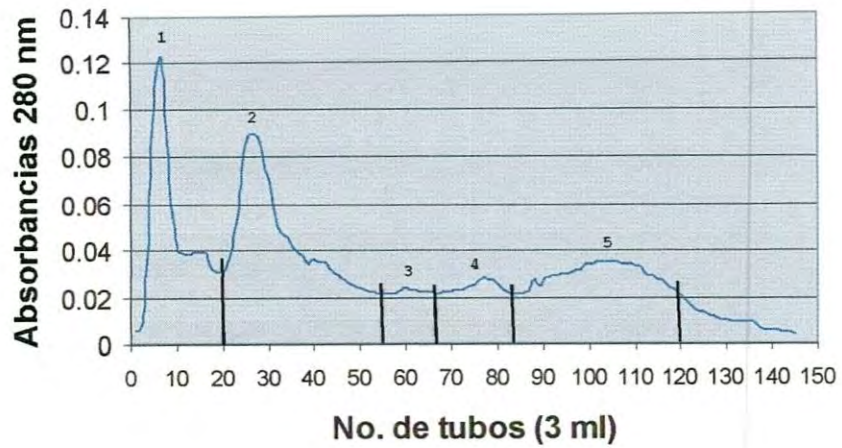


Figura 8: Cromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 1 de la Cromatografía de Filtración en Gel (59 mg de proteína). La fracción no. 4 del tubo 67 al 83 y la fracción no. 5 del tubo 84 al 122 presentaron actividad inhibitoria.



Figura 9: Recromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 4 de la Cromatografía de Intercambio Iónico (0.6930 mg). La fracción no. 1 del tubo 10 al 40 presentó actividad inhibitoria.

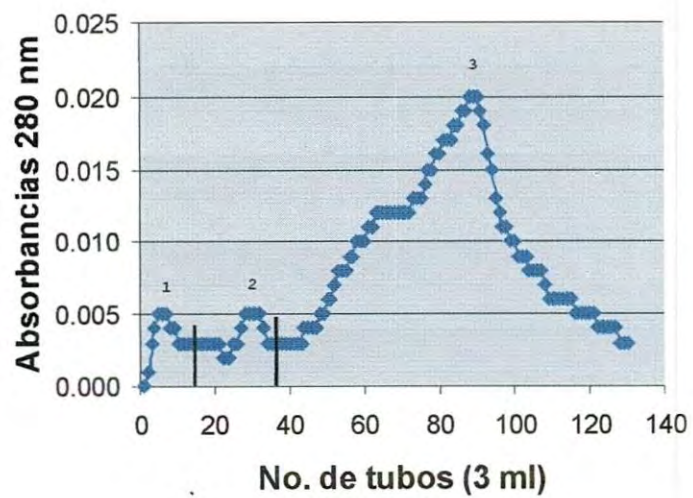


Figura 10: Recromatografía de Intercambio Iónico de la fracción no. 5 de la Cromatografía de Intercambio Iónico (1.0560 mg). La fracción no. 2 del tubo 20 al 35 presentó actividad inhibitoria.

Caracterización Electroforética

En la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y desnaturalizantes, de las proteínas fraccionadas con sulfato de amonio y las fracciones de la cromatografía de filtración en gel (Figura 11). El carril (a) se cargó con los estándares de masas moleculares coloridas (BIO-RAD). El carril (b) se cargó con las proteínas precipitadas con sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mostró en la región cercana al marcador de 17.7 kDa algunas bandas y una de ellas con una masa molecular de 17.5 kDa, en la región del marcador de 32.7 kDa se apreciaron algunas bandas siendo la más cercana de 33.3 kDa. El carril (c) se cargó con la fracción no. 1 de la cromatografía de filtración en gel, mostró bandas en la región del gel cercanas al marcador de 17.7 kDa, y la más cercana tuvo una masa molecular de 17.5 kDa, la región cercana al marcador 32.7 kDa tuvo una banda con una masa molecular de 33.8 kDa. El carril (d) se cargó con fracción no. 2 de la cromatografía de filtración en gel, se apreciaron dos bandas que no están cercanas a la región del marcador 17.7 kDa y las masas moleculares son 13.8 kDa y 8.8 kDa (Cuadro 4).

La masa molecular aparente del inhibidor alpha-amilasa se apreció en los carriles (b y c) con una banda en cada carril de 17.5 kDa y 17.3 kDa respectivamente. Esto coincide con el resultado de masas moleculares de 15 a 18 kDa obtenidos por SDS-PAGE en frijol *Phaseolus vulgaris* (L.) (Lajolo et al. 1985; Ceriotti et al. 1989).

Las fracciones de intercambio iónico sometidas a SDS-PAGE, mostraron en los carriles (c, d y e) bandas con masas moleculares de 35.0 kDa, 35.8 kDa y 35.8 kDa respectivamente (Figura 12). En los carriles (f y g) en la región del gel cercana al marcador 31 kDa, se observó en cada carril una banda con tinción débil con masa molecular igual de 35.4 kDa. También se observó en la región del gel cercana al marcador 21.5 kDa, una banda en cada carril con masa molecular aparente de 18.4 kDa de dos subunidades del inhibidor, estos datos coinciden con los obtenidos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* (L.)) de masa molecular de 15 a 19 kDa (Moreno et al. 1990).

Las fracciones que se separaron por cromatografía de intercambio iónico, se sometieron a SDS-PAGE y después las proteínas se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa, las proteínas fueron detectadas con un anticuerpo primario Anti-PF2 específico para lectinas de palo fierro. En el inmunoblot se mostró la presencia de proteínas activas con baja masa molecular, en cada uno de los tres carriles (b, f y g) que tuvieron la misma masa molecular de 18.6 kDa. Estudios hechos por Pueyo y Delgado (1997), demostraron que la presencia de polipéptidos con masa de 14000 a 20000, es indicativo de inhibidores alpha-amilasa. También se mostraron proteínas de masa molecular alta en el carril (a), dos bandas, una de 60.2 kDa y otra de 35.4 kDa, en los carriles (b, c, d, e, f y g) en cada carril hay una banda de 35.4 kDa (Figura 13). Esta masa molecular es parecida a la de la subunidad PF2, lectina de palo fierro, reportada por Vázquez-Moreno et al (2000) lo cual confirma, que la presencia de esas bandas nos indica reacción cruzada del inhibidor alpha-amilasa con las lectinas de palo fierro. Los resultados de estudios hechos con semillas de frijol han reportado que contienen una variedad de polipéptidos que reaccionaron cruzado con los anticuerpos del inhibidor alpha-amilasa y de PHA (lectina), y la actividad del inhibidor alpha-amilasa está siempre asociado con polipéptidos que reaccionan cruzado en el rango de masa de 14 000 a 18 000 (Pueyo et al. 1993).

Los inhibidores se purificaron más extensamente aplicando a las fracciones no. 4 y no. 5 una recromatografía de intercambio iónico por separado, las fracciones obtenidas de cada corrida se sometieron a SDS-PAGE con tinción de nitrato de plata. El carril (b) se cargó con la fracción no. 3 de la fracción no. 5 y se obtuvo una banda con masa molecular de 15.9 kDa. El carril (c) se cargó con la fracción no. 2 de la fracción no. 5 y se obtuvo una banda de masa molecular de 16.2 kDa. El carril (d) se cargó con la fracción no. 1 de la fracción no. 4 y se obtuvo una banda de 19.9 kDa (Figura 14).

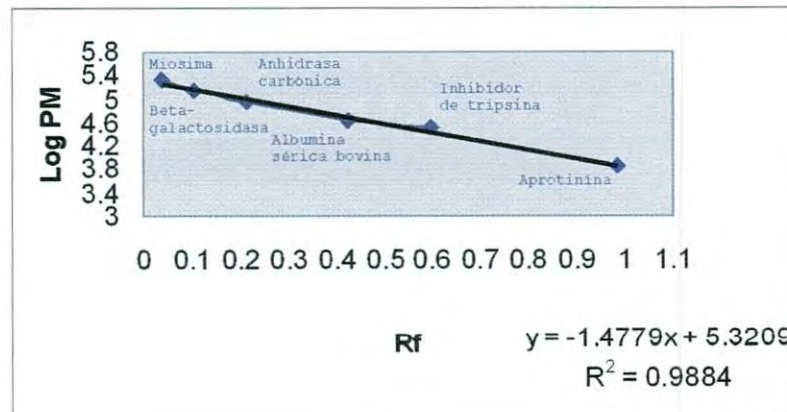
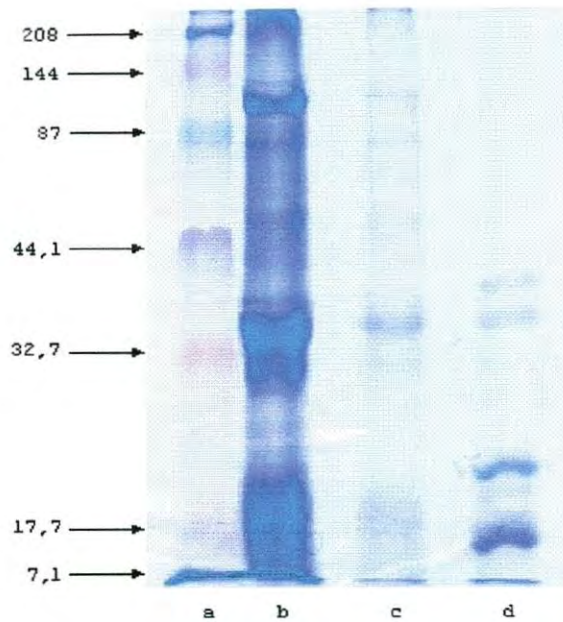


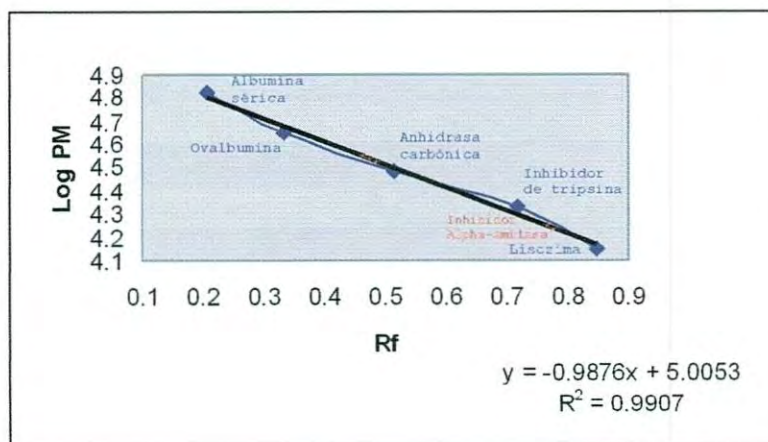
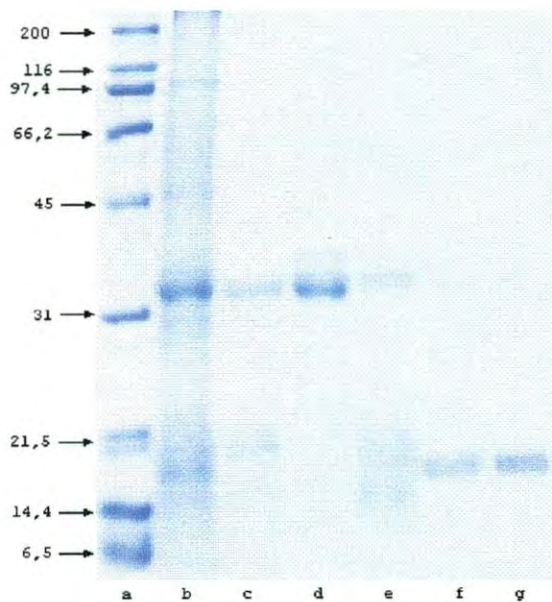
Figura 11: SDS-PAGE de las Fracciones de Filtración en Gel. Carril (a) Estándares de pesos moleculares coloridos (BIO-RAD); (b) Proteínas fraccionadas por precipitación con sales; (c) Fracción no. 1 de la cromatografía de filtración en gel; (d) Fracción no. 2 de la cromatografía de filtración en gel; (e) Estimación de las masas moleculares aparente por subunidad.

Banda	Estándar	PM del estándar	PM de proteínas precip. (NH₄)₂SO₄	PM fracción no. 1	PM fracción no. 2
1	Miosina	208000	192930	192930	40879
2	Beta-galactosidasa	144000	121450	124813	33327
3	Albumina sérica bovina	87000	92512	95060	13759
4	Anhidrasa carbónica	44100	57451	56676	8841
5	Inhibidor de tripsina	32700	33327	33783	7207
6	Lisozima	17700	25386	26442	
7	Aprotinina	7100	17458	17338	
8			9790	11606	
9			7457	10478	
10				9399	

Cuadro 4: Estimación de las Masas Moleculares Aparentes por Subunidad del Extracto fraccionado con Sulfato de Amonio fracción no. 1 y fracción no. 2 de la Cromatografía de Filtración en Gel.

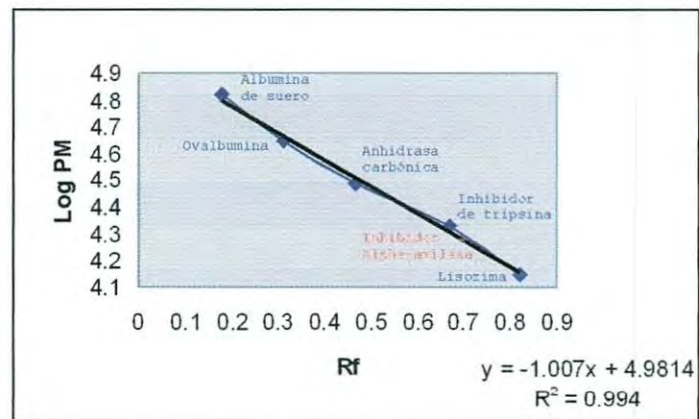
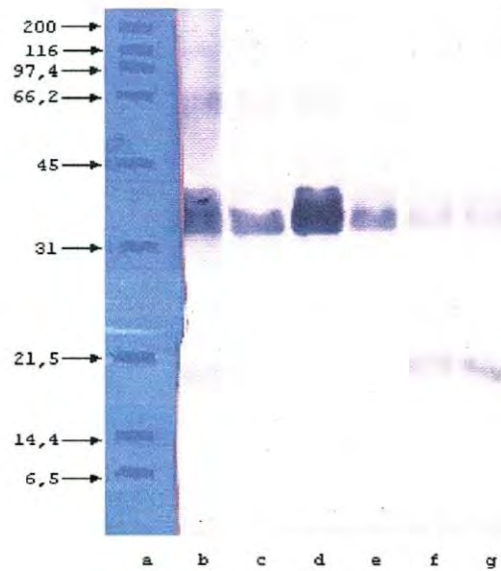
La ligera diferencia de masas moleculares obtenidas entre las subunidades, en las fracciones no. 4 y no. 5, sugiere la presencia de más de un inhibidor, con subunidades diferentes que pueden estar glicosiladas o no.

La masa molecular nativa obtenida por filtración en gel, en la fracción en donde se separaron los inhibidores fue de 41 kDa (Figura 7). Esta masa molecular es muy cercana a la obtenida en el frijol común de 45 kDa en filtración en gel y esta compuesta de subunidades de 15 a 18 ka en SDS-PAGE (Lajolo et al. 1985). También la masa molecular obtenida en frijol *Phaseolus vulgaris* (L.) de 40 kDa en Sephadex G-75 (Ho y Whitaker, 1993).



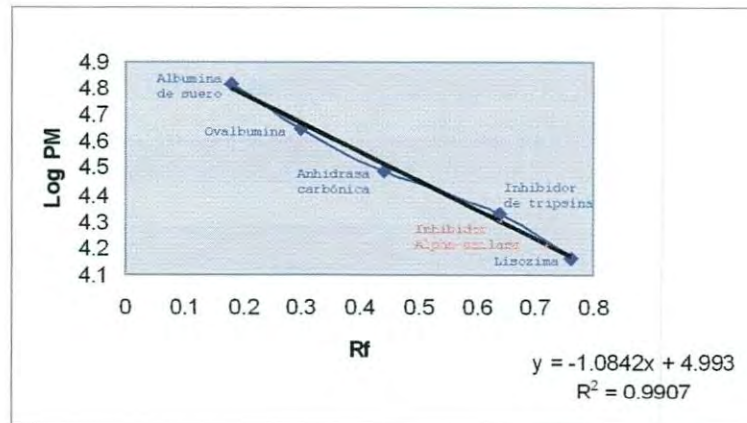
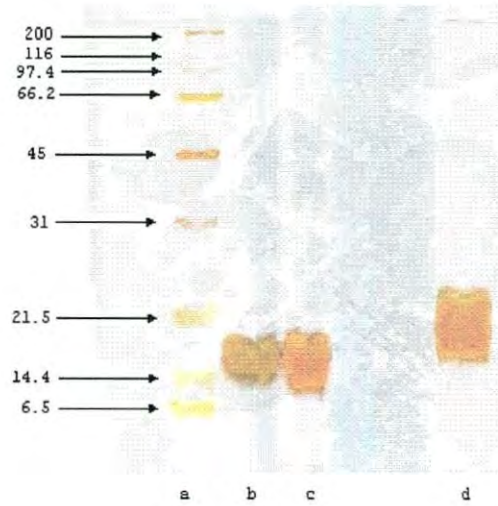
h

Figura 12: SDS-PAGE de las Fracciones Proteicas de la Cromatografía de Intercambio Iónico. Carril (a) Estándares de pesos moleculares de amplio rango (BIO-RAD); (b) Fracción no. 1 de la corrida de cromatografía de filtración en gel; (c - g) Fracciones no. 1, 2, 3, 4 y 5 de la cromatografía de intercambio iónico; (h) Estimación de la masa molecular aparente por subunidad.



h

Figura 13: Inmunodetección de Proteínas Electrotransferidas. Carril (a) Estándares de pesos moleculares de amplio rango (BIO-RAD) en gel revelado con Azul de Coomassie, los demás carriles se revelan con NBT/BCIP; (b) Fracción no. 1 de la cromatografía de filtración en gel en membrana incubada con Anti-PF2; (c - g) Fracciones no. 1, 2, 3, 4 y 5 de la cromatografía de intercambio iónico en membrana incubada con Anti-PF2; (h) Estimación de la masa molecular aparente por subunidad.



e

Figura 14: SDS-PAGE con Tinción de Nitrato de Plata, de las Fracciones Proteicas de la Recromatografía de Intercambio Iónico. Carril (a) Estándares de pesos moleculares de amplio rango (BIO-RAD); (b) Fracción no. 3 de la cromatografía de intercambio iónico de la fracción no. 5; (c) Fracción no. 2 de la cromatografía de intercambio iónico de la fracción no. 5; (d) Fracción no. 2 de la cromatografía de intercambio iónico de la fracción no. 4; (e) Estimación de la masa molecular aparente por subunidades.

CONCLUSIONES

Como resultado de este trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Los inhibidores de palo fierro son termoestables a 70°C durante 15 minutos.
2. Los inhibidores alpha-amilasa presentaron actividad inhibitoria contra la alpha-amilasa larval de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). La actividad inhibitoria fue menos de la mitad, de la que presentó el inhibidor del frijol tépari.
3. Las subunidades de los inhibidores presentaron reacción con un anticuerpo primario Anti-PF2 específico para lectinas de palo fierro, lo que indica una cercana relación antigénica entre ambas moléculas.
4. La masa molecular nativa obtenida por filtración en gel, en la fracción donde se separaron los inhibidores fue de 41 kDa. Las masas aparentes obtenidas de las dos subunidades fueron de 16.2 kDa y 19.9 kDa.
5. Las subunidades que forman cada inhibidor, son idénticas en masa.

LITERATURA CITADA

1. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C. U. S. A.
2. Ashton, E. M. 1976. Mobilization of Storage Proteins of Seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 95 - 117.
3. Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β in "Methods in Enzymology", Vol. I, (Ed.) S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, New York.
4. Bidwell, R. G. S. 1987. Fisiología Vegetal. 1^a. Edición, AGT Editor, Pp. 206 y 208.
5. Blanco, A. 1997. Química Biológica. 6ta. Edición. 6^a. Reimp. Buenos Aires: El Ateneo. Pp. 153 - 154.
6. Blanco-Labra, A. and F. A. Iturbide-Chinas. 1981. Publication and Characterization of an α -Amylase Inhibitor from Maise (*Zea maise*). J. Food Biochem. 5: 1.
7. Blanco-Labra, A., L. Sandoval-Cardoso, E. Mendiola-Olaya, S. Valdés-Rodríguez, and M. G. López. 1996. Purification and Characterization of a Glycoprotein Alpha-amylase Inhibitor from Tepari Bean Seeds (*Phaseolus acutifolius* A. (Gray)). Plant Physiol. Vol. 149. Pp. 650 - 656.
8. Borboa, F. J.; C. F. J. Wong, H. M. L. Topete, M. R. I. Sanchez, R. M. O. Cortez and M. M. Guzman. 1997. Susceptibility of Some Varieties

- of *Phaseolus spp.* to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Southwestern Entomologist. Vol. 22. No. 4. Pp. 455 – 456.
9. Bourges, H. y M. Valencia, 1987. Análisis de la Composición de los Alimentos en México. Antecedentes, situación actual y Perspectivas. Archivo Latinoamer. Nutr. XXXVII (4): 785.
 10. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 72: 248 - 254.
 11. Campos, F. A. P., J. Xavier-Filho, C. P. Silva and M. B. Ary. 1989. Resolution and Partial Characterization of Proteinases and α -Amylase Inhibitors from Midguts of Larvae of the Bruchid Beetle *Callosobruchus maculatus* (F). Comp. Biochem. Physiol. 92B, 51 - 57.
 12. Cannet, B. y M. Valenzuela. 1984. Efecto de los tratamientos sobre la Calidad Nutricional del Frijol Pinto *Phaseolus vulgaris* (L.). Tesis UNISON.
 13. Cardona, C. y K. Ashok. 1990. Key Insect and Other Invertebrate Pests of Beans. Edited by S. R. Singh.
 14. Cardona, C., C. E. Posso, J. Kornegay, J. Valor and M. Serrano. 1989. Antibiosis Effects of Wild Dry Bean Accessions on the Mexican Bean Weevil and the Bean Weevil (Coleoptera: Bruchidea). J. Econ. Entomol. 82, 310 - 315.
 15. Ceriotti, A., A. Vitale and R. B. Bollini. 1989. Lectin Like Protein Accumulates as Fragmentation Products in Bean Seed Protein Bodies. FEBS Lett 250: 157 – 160.

16. Ceska, M., K. Birath and B. Brown. 1969. A New and Rapid Method for the Clinical Determination the α -Amylase Activities in human Serum and Urine. Clin. Chem. Acta 26: 437.
17. Cinco, F. J., J. M. Frels, D. L. Holt and J. H. Rupnow. 1985. Determination of the Number and Heat Stability of α -Amylase Inhibitors in White and Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)). J. Food Sci. 50, 533 - 534.
18. Cortez, M. O., M. I. Villaescusa, G. García y R. I. Sanchez. 1991. Utilización de Polvos y Extractos Vegetales para el Control de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) y *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) en granos de frijol almacenado. Depto. De Investigación y posgrado en Alimentos UNISON.
19. Chrispeels, M. J. And N. V. Raikel. 1991. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. Plant Cell 3: 1 - 9.
20. Fabre, C., H. Causse, L. Mourey, J. Koninkx, M. Riviere, H. Hendriks, G. Puzo, J. P. Samana and P. Rougé. Characterization and Sugar Binding Properties of Arcelin-1, an Insecticidal Lectin Like Protein Isolated from Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.) cv. RAZ-2) Seeds. Biochem. J. 329. Pp. 551-560. Printed in Great Britain.
21. FAO. 1977. Analysis of a FAO Survey of Post-Harvest Crop Loses in Developing Countries. AGPP. Misc/27 FAO Rome.
22. Felger, R. S. and M. B. Moser. 1971. Seri Use of Mezquite (*Prosopis glandulosa*) The Kiwa 32 (1) P. 53 - 59.
23. Felger R. S. and G. P. Nabhan. 1976. Deceptive Barrenness Ceres. FAO Rev. a Revel. 50: 34.

24. Fory L. F., F. Finardi-Filho,^{2,3} C. M. Quintero,¹ T. C. Osborn,⁴ C. Cardona,¹ M. J. Chrispeels,² And J. E. Mayer¹. 1996. Alpha-amylase Inhibitors in Resistance of Common Beans to the Mexican Bean Weevil and the Bean Weevil (Coleoptera: Bruchidae). J. Econ. Entomol. 89 (1): 204 - 210.
25. Frels, J. M. and J. H. Rupnow. 1984. Purification And Partial Characterization of Two α -Amylase Inhibitors from Black Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)). J. Food Biochem, 8: 281.
26. Frels, J. M. and J. H. Rupnow. 1985. Characterization of Two α -Amylase Inhibitors from Black Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)). Journal of Food Science -Volume 50: 72.
27. Gatehouse, A. M. R. and J. A. Gatehouse. 1998. Identifying Proteins with Insecticidal Activity: Use of Encoding Genes to Produce Insect-Resistant Transgenic Crops*. Pestic. Sci., 52, 165 - 175.
28. Gatehouse, A. M. R., L. Barbieri, F. Stirpe and R. R. D. Croy. 1990. Effects of Ribosome Inactivating Proteins on Insect Development differences between Lepidoptera and Coleoptera. Entomol. Exp. Appl., 54: 43 - 51.
29. Gatehouse, A. M. R., P. Dobie, R. J. Hodges, J. Meik, A. Pusztai and D. Boulter. 1987. J. Insect. Physiol. 33, 843 - 850.
30. Gatehouse, A. M. R., K. A. Fenton, I. Jepson y D. J. Parey. 1986. The Effects of α -Amylase Inhibitors on Insect Store Pests: Inhibition of α -Amylase in Vitro and Effects on Development in Vivo. J. Sci. Food Agric, 37: 727 - 734.

31. Gatehouse, A. M. R., J. A. Gatehouse, P. Dobie, A. M. Kilminster, and D. Boulter. 1979. Biochemical Basis of Insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.*, 30: 948 - 958.
32. Gatehouse, A. M., V. A. Hilder and J. A. Gatehouse. 1991. Genetic Engineering of plants for Insect Resistance. In *Plant Genetic Engineering, Plant Biotechnology Series, Vol. I*. Ed, D. Grierson. Blackie & Sons Ltd, London/Chapman and Hall, New York. Pp. 105 - 135.
33. Grossi de Sa^{1*}, M. F., T. E. Mirkov², M. Ishimoto¹⁺, G. Colucci and K. Bateman¹⁺. 1997. Molecular Characterization of a Bean α -Amylase Inhibitor That Inhibits the Mexican Bean Weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). *Planta* 203: 295 - 303.
34. Hernández, M. y H. Bourges. 1983. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico. Publicación L-12 de la División de Nutrición. Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zuribán", México, D. F.
35. Hill, D. S. 1983. *Agricultural Insect Pests of the Tropics and Their Control*. P. 519 Cambridge University Press, Cambridge.
36. Ho, M. F. and J. R. Whitaker. 1993. Purification and Partial Characterization of White Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)) α -Amylase inhibitor from Two Experimental Cultivars. *Journal of Food Biochemistry* 17: 15 - 33.
37. Huesing, J. E., R. E. Shede, M. J. Chrispeels and L. L. 1991. Murdock. α -Amylase Inhibitor, not Phytohemagglutinin, Explains Resistance of Common Bean Seeds to Cowpeaweevil. *Plant Physiol.* 96: 993 - 996.

38. Ishimoto, M. and M. J. Chrispeels. 1996. Protective Mechanisms of the Mexican Bean Weevil Against High Levels of α -Amylase Protein in the Phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase Inhibitor Family of the Common Bean and its Relatives. *Plant Mol. Biol.* 26: 1103 - 1113.
39. Ishimoto, M. and K. Kitamura. 1989. Growth Inhibitory Effects of an Alpha-amylase Inhibitor from the Kidney Bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on Three Species of Bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Ent. Zool.* 24 (3): 281 - 286.
40. Ishimoto M.^{2,*}, T. Yamada and A. Kaga. 1999. Insecticidal Activity of an α -Amylase Inhibitor-like Protein Resembling a Putative Precursor of α -Amylase Inhibitor in the Common Bean, *Phaseolus vulgaris* (L.)¹ *Biochemica et Biophysica. Acta* 1432: 104 - 112.
41. Juvera Bracamontes, J. J. 1986. Principales Insectos de Granos Almacenados. Ed. Escuela de Agricultura y Ganadería, UNI-SON. Pp. 21, 22. Hermosillo, Sonora, México.
42. Kitamura, K., M. Ishimoto, S. Ishii. 1990. Bruchid Resistance Factors in *Phaseolus* and *Vigna* legumes. *Economics, Ecology and Coevolution*, 229 - 239.
43. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 - 685.
44. Lajolo, F. M. and F. Finardi-Filho. 1985. Partial Characterization of the α -Amylase Inhibitor of Black Beans (*Phaseolus vulgaris* (L.)) Variety Rico 23, *J. Agric. Food Chem.* 33: 138 - 138.
45. Lee, S. C., P. L. Gepts and J. R. Whitaker. 2002. Protein Structures of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)) α -Amylase Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6618 - 6627.

46. Lowry, O. H., N. J. Rosenbroug, F. A. Lewis and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
47. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; U. S. A.
48. Minney, B. H. P., A. M. R. Gatehouse, P. Dobie, J. Dendy, C. Cardona and J. A. Gatehouse. 1990. Biochemical Bases of Seed Resistance to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (L.) (Common bean); A mechanism for Arcelin Toxicity. *J. Insect. Physiol.*, 36: 757 - 767.
49. Mirkov, T. E., J. E. Wahlstrom, K. Hagiwara, F. Finardi-Filho, S. Kjemtrup and M. J. Chrispeels. 1994. Evolutionary Relationships Among Proteins in the Phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase Inhibitor Family of the Common Bean and its Relatives. *Plant Mol. Biol.* 26, 1103 - 1113.
50. Moreno, J., T. Altabella and M. J. Chrispeels. 1990. Characterization of α -Amylase-Inhibitor, a Lectin-like Protein in the Seeds of *Phaseolus vulgaris* (L.). *Plant Physiol.* 92: 703 - 709.
51. Moreno, J. and M. J. Chrispeels. 1989. Alectin Gene Encodes the α -Amylase Inhibitor of the Common Bean. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7885 - 7889.
52. Nodari, R. O., S. M. Tsai, R. L. Gilbertson and P. Gepts. 1993. Towards and Integrated Linkage Map of Common Bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 85, 513 - 550.

53. Norris, D. M. and M. Kogan. 1980. Biochemical and Morphological Bases of Resistance. In *Breeding Plants Resistant to Insects*, ed. F. G. Maxwell and P. R. Jennings. John Wiley & Sons. Pp. 23 - 60.
54. Ortega, N. M., L. Vazquez and M. R. Robles. 1996. Protein Quality and Antinutritional Factors of Wild Legume Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3130 - 3132.
55. Parviainen, M. T., T. Koivula and M. Jokela. 1984. Serum Amylase and Isoamylase Assay on the Hitachi 705 Automatic Clinical Chemical Analyser. *J. Clin. Chem. Cli. Biochem.* 22: 41.
56. Pierre, D. and M. Pimbert. 1981. Some Data on the Reproductive Activity of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) in the Laboratory. *Series Entomológicas. Vol. 19: Ed. bg. V. Labeyrie.*
57. Pueyo, J. J. and A. D. Salinas. 1997. Presence of α -Amylase Inhibitor in some Members of the Subtribe Phaseolinae (Phaseoleae: Fabaceae). *American Journal of Botany* 84(1): 79 - 84.
58. Rougé, P., A. Barre, H. Causse, C. Chatelain and G. Porthe. 1993. Arcelin and α -Amylase Inhibitor from the seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* (L.)) are Truncated Lectins. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 21, No. 6/7, pp. 695 - 703.
59. Saunders, R. M., and J. A. Lang. 1973. α -Amylase Inhibitors in *Triticum aestivum*: Purification and Physical -Chemical Properties. *Phytochem.* 12: 1237.
60. Sengupta-Gopalan, C., N. A. Reichert, R. F. Barker, T. C. Hall, J. D. Kemp. 1985. Developmentally Regulated Expression of the Bean α -Phaseolin Gene in Tobacco Seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3320 - 3324.

61. Shreve, F. And I. L. Wiggins. 1986. Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford University Press, EUA, Vol. II. P. 1231 - 1265.
62. Silano, V., E. Porerio and I. Buonocore. 1977. A Model for the Interaction of Wheat Monomeric and Dimeric Protein Inhibitors with α -Amylase. Mol. Cell. Biochem. 18: 87.
63. Singh, Y. 1979. Studies on Relative Resistance of Imported Pulses to *Callasobruchus maculatus* (Fabricius) and *C. chinensis* (Linnaeus). Entomol. Newl. 6, 8 - 19.
64. Singh, B. B. and S. R. Singh. 1990. Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution. Klumer Academic Publishers. Pp. 219 - 228.
65. Smith, B. W. and J. M. Roe. 1957. A Micromodification of the Smith and Roe Method for the Determination of Amylase in Body Fluids. J. Biol. Chem. 227: 357.
66. Solis, G. G. 1988. Resultados de Investigación en Poblaciones Naturales No Maderales. Pp. 79 - 83. En: Memorias de la Primera Reunión Científica Forestal y Agropecuaria CIFAPSON-INIFAP-SARH.
67. Solis, G. G. 1993. El Palo Fierro (*Olneya tesota* (Gray)) en el Estado de Sonora. INIFAP-SARH-CETS. La Paz, B. C. S. México. Folleto Técnico No. 1: 3 - 15.
68. Solis, G. G. y M. C. Molina. 1992. Plantas del Desierto Sonorense con Utilización Actual y Potencial. En: Ecología, Recursos naturales y Medio ambiente en Sonora. J. L. Moreno editor. Proambiente, Gobierno del Estado de Sonora y El Colegio de Sonora. Pp. 107 - 115.

69. Steffan, J. R. 1945. Contribution à l'étude de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) Boh Mem. Museum Hist. Nat. XXI 2, 55 - 84.
70. Strumeyer, D. H. 1967. A Modified Starch for Use in Amylase Assays. Analytical Biochemistry 19, 61 - 71.
71. Suzuki, K., M. Ishimoto, F. Kikuchi and K. Kitamura. 1993. Growth Inhibitory Effect of an α -Amylase Inhibitor from the Wild Common Bean Resistant to the Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* (Boheman)). Jpn. J. Breed. 43: 257 - 265.
72. Suzuki, K., M. Ishimoto, M. Iwanaga, F. Kikuchi and K. Kitamura. 1994. Inheritance of Seed α -Amylase Inhibitor in the Common Bean and Genetic Relationship to Arcelin. Theor. Appl. Genet. 90: 762 - 766.
73. Tuzhilin, S. A.; M. Gonda, G. Carbonell and D. A. Dreiling. 1982. Serum Amylases and their Inhibitors. I. Clinical Observations. Am. J. Gastroenterol. 77: 18.
74. Vázquez-Moreno, L., M. Ortega-Nieblas, M. R. Robles- Burgueño and G. Ramos-Clamont. 2000. Purification of Complex Carbohydrate Specific Lectins from *Olneya tesota* (Gray) Seeds Using Tandem Affinity Chromatography. IJBC Overseas Publisher Association. Vol. 00. Pp.1 - 8.
75. Warchalewski, J. R. 1983. Present Day Studies on Cereal Protein Nature Alpha-amylase Inhibitor. Nahrung 27: 103.
76. Whitaker, J. R. 1983. Protease and Amylase Inhibitors in Biological Materials. Page 15 in: Xenobiotics in Foods and Feeds. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 234.

77. Wilding, P. 1963. Use of Gel Filtration in the Study of Human Amylase. *Clin. Chim. Acta* 8: 918.
78. Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray and R. Hancock. 1981. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 118: 197 - 203.
79. Wong, C. F., J. Borboa y M. O. Cortez. 1987. Distribución y Abundancia de Insectos de Granos Almacenados en el Estado de Sonora. *Postcosecha* 7(4): 25 - 29.
80. Young, N. M. and R. P. Oomen. 1992. Analysis of Sequence Variation Among Legume Lectins: A Ring of Hypervariable Residues Forms the Perimeter of the Carbohydrate-Binding Site. *J. Mol. Biol.* Pp. 228, 924 - 934.