



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Obtención de péptidos bioactivos en *Bixa orellana*
L. (achiote).**

Tesis que presenta

Luis Jorge Coronado Cáceres

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado obtención de péptidos bioactivos en *Bixa orellana* (achiote) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (la) DRA RENATA RIVERA MADRID, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Febrero del 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Luis Jorge Coronado Cáceres

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Obtención de péptidos bioactivos en *Bixa orellana* (achiote), bajo la dirección del DRA. RENATA RIVERA MADRID.

AGRADECIMIENTOS

AL CICY A.C.

Al CONACYT por la beca otorgada N° 427738/265366

A la Dra. Renata Rivera Madrid por aceptarme en su grupo de trabajo para desarrollar y financiar esta investigación dentro del proyecto CONACYT N° 98508; "Análisis de genes clave asociados a la variación en la producción de pigmentos en cultivos de importancia comercial a nivel nacional e internacional" así como su apoyo en la dirección de mi tesis.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por permitirme entrar en esta área de conocimiento que me gustó y apasionó mucho.

Al Dr. Ignacio Islas Flores por apoyarme y brindarme su conocimiento y experiencia sobre mi trabajo de investigación desde el nivel licenciatura, así como de mi tesis de maestría y recibir sus sugerencias y corrección como parte de mi comité tutorial.

De la manera más atenta, le quiero agradecer a la M.C. Margarita Aguilar Espinosa por su apoyo, tolerancia, ayuda incondicional, comprensión, consejos y amistad, que me brindó durante todo mi estancia en el CICY, ¡gracias!

A todos mis compañeros del CICY que tuve la dicha de conocer en la etapa como estudiante, tales como: Rodolfo, Víctor, Nayhelli, Nayelí, Abrahán, Salatiel, Alejandrina, Adrián, Dulce, Jacobo, Ángel, Ana, Rosa, Pedro, Yeseña, Ulises, Laura, Sadrak, Yahaira, Jaqueline, Aarón, Diana, Yamileth, Cecilia, Doribet, David y todos aquellos con los que pase momentos agradables, ¡gracias!

AL CIATEJ. A.C.

A la Unidad de Tecnología Alimentaria bajo la dirección del Dr. Jorge Alberto García Fajardo y a la Unidad de Biotecnología por brindarme su espacio, instalaciones y equipos con los cuales yo concluí y desarrolle mi trabajo de investigación

Al personal del CIATEJ que me apoyó directa o indirectamente en este proyecto, como son el M.C. Omar Alcaraz, Dra. Judith Urías Silvas, Q.F.B. Karina Campos Serrano, Dra. María Dolores García Parra, Dra. Socorro Villanueva Rodríguez, Dr. Jorge Alberto

Rodríguez González, Dr. Juan Carlos Mateos Díaz, Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez, Dr. Hugo Esquivel Solís y al Dr. Manuel Reinhart Kirchmayr por su apoyo técnico y logístico durante mi estancia de investigación.

Quiero agradecerle de manera especial a la Dra. Eugenia Lugo Cervantes, colaboradora de este proyecto, una excelente investigadora que me aceptó, acompañó y apoyó en toda mi estancias en el CIATEJ, así como formar parte de mi comité tutorial, ¡gracias!

A mis compañeros del CIATEJ que nunca me dejaron solo durante mi estancia con los cuales me pase momentos felices y agradables; a Alberto Anguiano, Diana Moloka, Isaías Cruz, Isabel Alavés, Marisol Franco, Lym Alonzo, David, Gratel, Rogelio, entre otros y a mis compañeros de la mansión Foster: Rouss Barrón, Sandra Jiménez, Jazmín Ramírez, Gabriela fletes, Sheila, Jesús y Jorge, por su compañía y amistad, ¡gracias!

AL CUCEI

Especialmente al departamento de inmunofarmacología dirigida por la Dra. Ana María Puebla, al Dr. Jorge Iván Delgado y los compañeros del Laboratorio de Inmunofarmacología, Israel, Fernando y Marta, quienes me apoyaron, aconsejaron y compartieron conmigo todas sus experiencias con el modelo de linfoma murino L5178Y.

Al comité de revisión de tesis:

Dra. Renata Rivera Madrid

Dra. Eugenia Lugo cervantes.

Dr. Ignacio Islas Flores

Dra. Ana María Puebla Pérez.

Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez

Por su dedicación, tiempo y paciencia invertida en esta tesis, gracias.

A MI FAMILIA

A mi padre Jorge H. Coronado Fernández y mi madre Ligia del Carmen Cáceres Carvajal, a quienes les dedico esta tesis, y por todos sus consejos y enseñanzas en el transcurso de mi vida. ¡Gracias!

A mi hermano Gerardo Coronado Cáceres quien ha sido mi compañero durante mi infancia, juventud y adultez, ¡gracias!

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a una personita muy especial en mi vida, a Fanny Cámara Tzakún, quien entró a mi vida y me ha acompañado en las buenas y malas, que ha hecho hasta lo imposible con tal de verme, que si bien es cierto que en gran parte de mi tesis no ha estado en cuerpo, sí lo ha estado en alma, mente y sobre todo en corazón, y ha hecho de mis momentos los más felices, y mi razón para continuar. Mi amor, ¡mil gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. CÁNCER.....	3
1.1.1. CÁNCER EN EL MUNDO.....	4
1.1.2. CÁNCER EN LATINOAMÉRICA Y MÉXICO.....	5
1.2.1. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS NUTRACÉUTICOS EN LA APOPTOSIS, LA ANGIOGÉNESIS Y LA METÁSTASIS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS	7
1.3. PROTEÍNAS.....	8
1.3.1. PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO	9
1.3.1.1. LAS GLOBULINAS SON LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO MÁS ABUNDANTES.....	10
1.3.1.2. LAS PROTEÍNAS 2S PRESENTES EN LAS SEMILLAS DE PLANTAS DICOTILEDÓNEAS	11
1.3.1.3. SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO	12
1.3.1.4. PROTEÍNAS MOVILIZAN LOS AMINOÁCIDOS DEPOSITADOS EN LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO.....	13
1.3.2. FUNCIÓN	14
1.3.3. PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.....	14
1.4.1. PÉPTIDOS	16
1.4.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS	16

1.4.3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS.....	17
1.4.4. PROPIEDADES DE LOS PÉPTIDOS	18
1.4.5. PÉPTIDOS CON PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS	19
1.4.6. PÉPTIDOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS	19
1.4.7. ACTIVIDAD ANTIHIPERCOLESTEROLÉMICA	20
1.4.8. ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA	21
1.4.9. PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS.....	22
1.4.11. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA.....	25
1.5. <i>BIXA ORELLANA</i>	31
1.5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	31
1.5.3. LOS PIGMENTOS NATURALES EN <i>BIXA ORELLANA</i>	33
1.5.4. CAROTENOIDES	33
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
JUSTIFICACIÓN	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	38
.....	38
BIBLIOGRAFÍA	39
CAPÍTULO II	53
MATERIALES Y MÉTODOS	53

2.1 MATERIAL VEGETAL	53
2.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	53
2.3. EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE RESERVA Y FRACCIONAMIENTO DE ALBÚMINAS, GLOBULINAS Y GLUTELINAS	54
2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	55
2.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO	55
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE <i>BIXA ORELLANA</i> POR FPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS, CLRP)	55
2.7. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	56
2.8. ACTIVIDAD ANTITUMORAL SOBRE EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y EN RATONES BALB/c.....	56
2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LOS MÉTODOS ABTS Y ORAC	58
2.9.1. MÉTODO DEL RADICAL CATIONICO ABTS**	58
2.9.2. MÉTODO DEL RADICAL OXÍGENO USANDO FLUORESCENCIA (ORAC-FL)	59
2.10. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SECUENCIAL DE LA FRACCIÓN ALBÚMINA USANDO PEPSINA, TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA.....	60
2.11. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	61
2.12. FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR FPLC	61
2.13. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS SOBRE CÉLULAS TRANSFORMADAS (LINFOMA MURINO L5178Y).....	62
2.14. EFECTO DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS SOBRE ESPLENOCITOS DE RATÓN BALB/c	64

BIBLIOGRAFÍA	65
CAPÍTULO III	69
RESULTADOS.....	69
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y MOLIENDA	69
3.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO	69
3.3. OBTENCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS	70
3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO EN SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	72
3.5. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE ALMACENAMIENTO DE <i>BIXA ORELLANA</i>	74
3.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LAS FRACCIONES PROTEICAS CON CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES OBTENIDAS DE LAS SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	75
3.6.1. MÉTODO DEL RADICAL CATIONICO ABTS* ⁺	75
3.6.2. MÉTODO DEL RADICAL OXÍGENO USANDO FLUORESCÉINA (ORAC-FL)	77
3.7. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DE LAS SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	79
3.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i> POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS (FPLC)	80
3.9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN PROTEICA CORRESPONDIENTE A ALBÚMINA DE SEMILLAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	82
3.10. PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR FPLC	86
3.11. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES HIDROLIZADAS DE ALBÚMINA Y SU EFECTO SOBRE CÉLULAS TRANSFORMADAS DE LINFOMA MURINO L5178Y	89
3.12. EFECTO DE LOS PURIFICADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS	

DEL BAZO DE RATÓN BALB/c	92
CAPÍTULO IV	93
DISCUSIÓN	93
BIBLIOGRAFÍA	98
CAPÍTULO V	103
CONCLUSIONES	103
PERSPECTIVAS.....	105
RECOMENDACIONES	106



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Mecanismo propuesto de la actividad del péptido lunasina.	29
FIGURA 1.2. Modelo de E1A-Rb-HDAC para explicar la capacidad de lunasina para suprimir la transformación inducida por E1A	30
Figura 1.3. Extrategia experimental.....	37
Figura 2.1. Metodología de evaluación tumoral de linfoma murino L5178Y de proteínas de reserva de semillas en <i>Bixa orellana</i>	57
Figura 3.1. Perfil proteico de la fracción albúmina para demostrar su integridad en diferentes condiciones de extracción.....	70
Figura 3.2. Perfiles electroforéticos de las proteínas de almacenamiento de <i>Bixa orellana</i>	71
Figura 3.3. Cuantificación de diferentes fracciones proteicas usando el método de Bradford	72
Figura 3.4. Actividad inhibidora de la oxidación causada por las proteínas de almacenamiento de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	78
Figura 3.5. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a albúmina de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	81
Figura 3.6. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a globulinas totales de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	81
Figura 3.7. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a glutelinas totales de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	82
Figura 3.8. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de hidrólisis de albúmina con la enzima pepsina.....	83
Figura 3.9. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de hidrólisis de albúmina con la enzima tripsina.....	84
Figura 3.10. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de la hidrólisis de albúmina con la enzima quimotripsina.	84
Figura 3.11. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina sin tratamiento enzimático de semillas de <i>Bixa orellana</i>	86
Figura 3.12. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con la enzima pepsina a un tiempo de 40 minutos.....	87

Figura 3.13. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con tratamiento secuencia de pepsina y posteriormente con tripsina.	87
Figura 3.14. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con tratamiento secuencial pepsina- tripsina y posteriormente quimotripsina.	88
Figura 3.15. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con alcalasa	88
Figura 3.16. Efecto citotóxico de albúmina y los hidrolizados con enzimas digestivas sobre células transformadas de linfoma murino L5178Y.	90
Figura 3.17. Efecto citotóxico de albúmina y los hidrolizados de albúmina con la enzima alcalasa en células transformadas de linfoma murino L5178Y.	91
Figura 3.18. Efecto de las fracciones hidrolizadas de albúmina sobre la proliferación de linfocitos de ratón BALB/c	92

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Principales péptidos con actividad antihipertensiva obtenidos de diferentes fuentes naturales	23
Cuadro 1.2. Contenido de lunasina en extractos obtenidos de diferentes semillas, granos y plantas medicinales	28
Cuadro 3.1. Análisis bromatológico de las semillas de <i>Bixa orellana</i> sin pigmento	69
Cuadro 3.2. Contenido de proteínas de almacenamiento de cada fracción proteica presentes en <i>Bixa orellana</i>	73
Cuadro 3.3. Composición de aminoácidos de las diferentes proteínas de almacenamiento de <i>Bixa orellana</i>	74
Cuadro 3.4. Actividad antioxidante de las fracciones proteicas en semillas de <i>Bixa orellana</i>	76
Cuadro 3.5. Efecto de la fracción albúmina sobre las semillas de <i>Bixa orellana</i> sobre modelo linfoma murino L5178Y	79
Cuadro 3.6. Grado de hidrolisis de la albúmina con diferentes enzimas digestivas	85

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'- azino-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico).
APPH	2, 2' Azobis (2-metilpropionamida) diclorhidrato
ASB	Albúmina Sérica Bovina
BBI	Inhibidor Bowman-Birk.
BBIC	Inhibidor Bowman-Birk concentrado
CTC	Cobre tartrato-carbonato
DH	Grado de hidrólisis
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DOC	Desoxicolato de sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
GHS	Glutación Reducido
GGPP	GeranilGeranildifosfato
GPP	Geranil difosfato
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPP	Isopentilpirofosfato
kDa	Kilodaltones.
MTT	Bromuro de 3- (4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORAC-FL	Capacidad atrapadora de radical oxígeno
PEP	Pepsina

PDS	Fitoeno desaturasa
PSY	Fitoeno Sintasa
Q	Quimotripsina
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	Capacidad Antioxidante en Equivalente de Trolox
TNBS	Ácido Trinitrobenzensulfónico
Tris-HCl	Tris(hidroximetil) aminometano
TRY	Tripsina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sodico
ZDS	ζ-caroteno desaturasa

RESUMEN

Las proteínas y péptidos con actividad biológica se han convertido en productos de un valor agregado, debido a los nuevos conocimientos sobre sus actividades funcionales y biológicas, tales como: actividad antihipertensiva, hipocolesterolémica, antimicrobiana, antitrombótica, antioxidante así como antitumoral. Se han estudiado las proteínas de leche, huevo, cacao (*Theobroma cacao*) y así como péptidos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), soya (*Glycine max*), trigo (*Triticum vulgare*), entre otras. Todas ellas, mostraron propiedades antitumorales y antioxidantes. Las semillas de *Bixa orellana* L. (achiote) se utiliza como especias o sazónador de carnes en nuestro país (México) para dar color y sabor a los alimentos. Se ha registrado que las semillas de achiote presentan un contenido de proteínas que varía entre 11-17%. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad antitumoral y antioxidante de las proteínas de almacenamiento en las semillas de *Bixa orellana* L., así como obtener péptidos bioactivos y su evaluación de actividad citotóxica y mitogénica. Las proteínas fueron fraccionadas de acuerdo a su solubilidad por el método de Osborne, obteniendo tres fracciones proteicas (albúminas, globulinas y glutelinas), a las cuales se les determinó la actividad antitumoral y antioxidante. La actividad antitumoral se evaluó *in vivo* en ratones BALB/c y la actividad antioxidante *in vitro* por los métodos ABTS y ORAC-FL. Los resultados concluyeron que la fracción de albúminas presentó mayor inhibición de masa tumoral con un 17% con relación al testigo negativo, con respecto a la actividad antioxidante evaluada por el método de ORAC-FL, se observó que la misma fracción de albúminas presentó la mayor absorción del radical oxígeno producto del AAPH, con 5.87 mM Trolox/g proteína; superando al glutatión reducido (GHS) que funcionó como testigo positivo. La actividad antioxidante medida por el método de ABTS mostró que la fracción proteica con mayor actividad antioxidante fue la glutelina con 0.91 ± 0.076 mM Trolox/g proteína. A partir de las albúminas las cuales presentaron actividad antitumoral y antioxidante, se realizó la hidrólisis, con enzimas digestivas (pepsina, tripsina y quimotripsina) simulando el sistema digestivo, con una proporción 1:50 (enzima:sustrato), el extracto hidrolizado se fraccionó por FPLC para obtener cada fracción de péptidos purificada y se realizó el análisis citotóxico en las células transformadas de linfoma murino L5178Y, donde los mejores resultados mostraron que los péptidos denominados B5, B7, C5, C12 y D10 tienen un efecto citotóxico de 99% a una concentración de 10 μ g proteína/mL, posteriormente se

evaluó el efecto mitogénico de estos péptidos en la proliferación celular de esplenocitos de bazo de ratón BALB/c, obteniéndose un efecto mitogénico estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con el péptido, C5 a una concentración de 5 μg proteína/mL.

Estos resultados son la base para continuar estudios más precisos y determinar las bondades que las semillas de achiote puedan ofrecer como alimento funcional.

ABSTRACT

Biologically active proteins and peptides have become value-added products due to new knowledge of their biological and functional activities, such as antihypertensive, hypocholesterolemic, antimicrobial, antithrombotic, antioxidant and antitumor activities. Studies of milk, egg and cocoa (*Theobroma cacao*) proteins and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*), soybean (*Glycine max*) and wheat (*Triticum vulgare*) peptides, among others, have shown their antitumor and antioxidant properties. The seeds of *Bixa orellana* L. (annatto) are used as a spice for seasoning meat in Mexico to give color and flavor to food. Annatto seeds present a protein content ranging from 11 to 17%. The aim of this study was to evaluate the antitumor and antioxidant activity of storage proteins in *Bixa orellana* L. seeds, as well as to obtain bioactive peptides by hydrolyzing the protein that presented the highest antitumor and antioxidant effects using digestive enzymes, and subsequently evaluate the cytotoxic and mitogenic effects of these peptides. The proteins were fractionated by solubility according to the Osborne method. Three protein fractions were obtained (albumins, globulins and glutelins), and the antitumor and antioxidant activities of each fraction were evaluated. Antitumor activity was evaluated *in vivo* in BALB/c mice and antioxidant activity was evaluated *in vitro* by ABTS and ORAC-FL methods. The results showed that the albumin fraction presented 17% greater inhibition of tumor mass compared to the negative control. Antioxidant activity in the same albumin fraction showed the best oxygen radical absorbance against AAPH, measured by the ORAC-FL method with 5.87 mM Trolox/g protein, compared to glutathione (GHS), which was the positive control. The ABTS method for measuring antioxidant activity showed that the protein fraction with the highest antioxidant activity was glutelin with 0.91 ± 0.076 mM Trolox/g proteins. The albumins that showed antitumor and antioxidant activity were hydrolyzed by digestive enzymes (pepsin, trypsin and chymotrypsin), simulating the digestive system, with a ratio of 1:50 (enzyme: substrate). The extract was hydrolyzed and fractionated by FPLC for each peptide fraction. Cytotoxic activity was evaluated in transformed L5178Y mouse lymphoma cells, where the B5, B7, C5, C12 and D10 peptide fractions showed a cytotoxic effect of 99% at 10 μ g protein/mL. The mitogenic effect of these peptides was evaluated on splenocyte cell proliferation in BALB/c mice, where peptide C5 showed activity at 5 μ g protein/mL.

These results provide the basis for carrying out more detailed studies to determine the benefits that annatto seeds can offer as a functional food.

INTRODUCCIÓN

El achiote o *Bixa orellana* L. es también conocido como urucú, anato, onoto, entre otros nombres; es un árbol o arbusto que llega a tener entre 2 y 4 m de alto y posee un follaje denso. Esta especie pertenece a la familia botánica *Bixaceae* y es de origen americano, específicamente de la región de la Amazonia; crece desde climas secos hasta climas muy húmedos; el nombre científico de esta especie se debe a su descubridor Francisco de Orellana. Su cultivo es ancestral y se ha extendido hacia otros continentes como Asia, África y Europa. Actualmente Perú es uno de los principales exportadores de achiote del mundo con una participación del 35% del total, compitiendo con Costa de Marfil, Kenya y Guatemala (Fredy *et al.*, 2010).

Su colorante natural bixina es el segundo colorante natural de más uso en la industria después del caramelo (Mercadante y Pfander, 1998), así como en la industria cosmética, textil y farmacéutica y esto se debe al pigmento localizado con abundancia en las semillas (Smith *et al.*, 1992).

Las semillas de achiote son consumidas enteras en las dietas tradicionales y en la industria de los alimentos y su colorante, la bixina, proporciona su valor comercial (Mercadante y Pfander, 1998). Sin embargo, se sabe poco sobre su contenido proteico y peptídico, y aún menos, sobre las funciones biológicas; ya que estos péptidos podrían poseer cualidades aún más atractivas para el consumo de este producto natural, aumentando potencialmente su valor por su posible función antioxidante, disminuyendo el daño causado por los radicales libres y, a su vez, podría participar en la prevenir el cáncer.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El cáncer no sólo es una enfermedad, es el nombre de una variedad de, por lo menos, cien enfermedades muy distintas entre sí y que se producen por el crecimiento anormal y desordenado de las células en el cuerpo humano o animal. Esto es causado por alteraciones celulares ocurridas a nivel genético ya que el ADN ha sido alterado, por lo que las células reciben mensajes erróneos. Por lo tanto, la célula cancerígena pierde control de su propio desarrollo de modo que se divide en más células con mayor velocidad que el resto de los tejidos a los que pertenece, sin cumplir las funciones para las que ha sido creada.

En la mayor parte de los cánceres existen múltiples acciones de iniciación y promoción. El cáncer nace en el momento en que una célula sufre la llamada transformación neoplásica. Se trata de un acontecimiento que se inicia a nivel del ADN, el que componen los genes. Consiste en una alteración genética heredable por lo general en células somáticas, pero también puede ocurrir en células germinales (ovarios y testículos), de tal manera que sus descendientes se agrupan formando un tumor maligno. Cabe destacar la diferencia entre un tumor maligno y uno benigno. La diferencia consiste en que los tumores malignos invaden y destruyen los tejidos circundantes. Por lo tanto, una célula correspondiente a un tumor maligno, puede invadir el torrente circulatorio sanguíneo o linfático. Dicha célula puede, así, desplazarse por todo el organismo e invadir otro tejido, estableciéndose en cualquier lugar y formando así un nuevo tumor o metástasis. Se destaca que los tumores benignos no metastatizan. Los tumores malignos se desarrollan más rápidamente que los benignos, se pueden dividir en carcinomas y sarcomas. Los primeros se producen en las células epiteliales, es decir, básicamente en piel y mucosas, y son los más numerosos. Los segundos se producen en las células mesentéricas (hueso, músculo, cartílago, tejido adiposo y endotelios). Como el tumor maligno puede extenderse desde un sitio local hasta otros sistemas del cuerpo, el tratamiento es más difícil y el tumor es inmortal después de que la metástasis ha ocurrido (Jetta, 2002).

1.1.2. CÁNCER EN EL MUNDO

En el principio del siglo XX la población europea y norteamericana así como poblaciones asiáticas como Japón entraron en envejecimiento mientras que poblaciones africanas y latinas empezaron a emigrar de zonas rurales a zonas urbanas causando con esto conglomeraciones cada vez más densas y complejas (Ferlay *et al.*, 2000). Todo esto genera desigualdad, pobreza y por ende mala nutrición seguida por la industrialización de alimentos sobretodo de la comida chatarra que es por lo general más económica, el ejercicio de la sexualidad con escasas precauciones, tabaquismo y alcoholismo fueron factores que aumentaron el desarrollo de cánceres (OMS, 2004).

Por todo esto en el siglo XX fue cuando el cáncer se convirtió en una “nueva epidemia” que en la actualidad se mide en términos de incidencia.

En el siglo XXI el problema con el cáncer se ha afianzado de forma generalizada por la transición económica, los rápidos procesos de urbanización y los modos de vida actual (trabajos en oficina), y las dietas malsanas, así como la inactividad física han agudizado este problema.

Según el Programa Nacional de lucha contra el Cáncer de la OMS (Organización Mundial de la Salud) en Ginebra: “En 2011, el cáncer es la causa del 12% de las defunciones a escala mundial. Actualmente viven con cáncer unos 20 millones de personas, y es probable que en 2020 la cifra supere los 30 millones. Esto hace pensar que el cáncer es una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial. Por lo tanto la OMS estimó en 2008 que la principal causa de muerte en el mundo es el cáncer (7.6 millones de casos), localizados en su mayoría en pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011).

1.1.3. CÁNCER EN LATINOAMÉRICA Y MÉXICO

La Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2011), reporta que de 2007 a 2009 en Latinoamérica la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de cáncer es de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes. Las tasas más altas en la región se localizan en Uruguay (168.4 por cada 100 mil habitantes), Cuba (143.3) y Perú (136.6); México, como resultado de los esfuerzos que se han llevado a cabo en materia de prevención, atención oportuna y sensibilización, tiene la tasa más baja de Latinoamérica (75.4 por 100 mil habitantes).

En México, con el fin de conmemorar el día mundial contra el cáncer (4 de febrero) el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), presentó las siguientes estadísticas:

- En 2010, 57 de cada 100 menores de 20 años con tumores malignos, lo padecen en órganos hematopoyéticos.
- En 2010, 36.5% de los niños y jóvenes con leucemia hospitalizados, tienen entre 5 y 9 años.
- El 86.3% de las defunciones por tumores en la población menor de 20 años en México durante 2011, es debida a tumores malignos.
- De cada 100 mujeres de 20 años y más con tumores malignos en 2010, 24 tienen cáncer de mama.
- En 2011, 8 de cada 100 hombres de 20 años y más con cáncer, presentan neoplasia de próstata.
- En 2011 de cada 100 defunciones por tumores malignos en hombres de 20 y más años, 17 fallecen por cáncer de próstata, 13 de bronquio y pulmón y 9 de estómago.
- Las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres de 20 y más años en 2011 son por cáncer de mama (13.8%) y cervicouterino (10.4 por ciento).

1.1. NUTRACÉUTICOS

El proceso de la carcinogénesis es complejo y no es fácil de eliminar. Esto incluye la aparición inicial de alteraciones genéticas que pueden conducir a la inactivación de los genes supresores de tumores y a una mayor acumulación de alteraciones genéticas durante la progresión tumoral. Los componentes de la comida y los alimentos con propiedades biológicas, llamados colectivamente nutraceuticos, pueden obstaculizar dichas alteraciones y prevenir la inactivación de genes supresores de tumores, y esta es una prometedora área para la prevención del cáncer (González *et al.*, 2010)

Actualmente se ha puesto énfasis en el desarrollo de alimentos funcionales, definidos como "alimentos que han demostrado que afectan benéficamente una o más funciones en humanos, más allá de efectos nutricionales adecuados, de una manera que es relevante para incrementar su estado de salud y prevenir y/o reducir el riesgo de enfermedades" (Henson *et al.*, 2008). Con base en esto, la nutrición se ha concentrado en los constituyentes dietarios menores como son: las vitaminas y microelementos, compuestos fitoquímicos (carotenoides, flavonoides, indoles, isotiocianatos), zooquímicos (ácido linolénico conjugado y ácidos grasos ω 3), fungoquímicos y bacterioquímicos (formados durante la fermentación por la flora microbiana).

Actualmente se tienen nuevos conocimientos de las funciones de los micronutrientes, se están estudiando tanto de alimentos de origen vegetal como las plantas tradicionales y extractos herbales o derivados de frutas y vegetales comunes que contienen componentes activos llamados fitoquímicos o fitonutrientes (definidos como "metabolitos secundarios de las plantas, los cuales protegen a la planta contra diversos tipos de estrés") (Holst y Williamson, 2008). Algunas funciones de acción biológica en el organismo que intervienen son: evitar el estrés oxidativo, regular la función genética, realizar modulación hormonal e inmune, inducción de enzimas e inhibidores en la ruta metabólica capaces de erradicar y/o disminuir carcinomas.

Actualmente la "nutrición óptima" ha recibido gran énfasis mediante el uso de alimentos funcionales para promover el buen funcionamiento del cuerpo humano mediante la administración de nutrientes necesarios para el cuerpo, no sólo para la sobrevivencia, si no también para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos crónicos

(enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, cataratas, osteoporosis, infecciones del tracto urinario y el cáncer), llegándose a considerar estos alimentos como nutraceuticos (Malaspina, 1996; Vasconcelos, 2001; Morales *et al.*, 2002).

Con todo esto se corrobora el gran principio “deja que el alimento sea tu medicina y tu medicina tu alimento”, definido por Hipócrates (460-377 a.C.), padre de la medicina moderna, que hizo incapié en la asociación entre nutrición y la salud humana, conceptualizando la relación entre la utilización de alimentos apropiados para la salud y sus beneficios terapéuticos (Preza *et al.*, 2010).

1.2.1. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS NUTRACÉUTICOS EN LA APOPTOSIS, LA ANGIOGÉNESIS Y LA METÁSTASIS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

Las proteínas y los péptidos han demostrado ser un grupo de nutraceuticos que ya mostraron resultados potenciales en la prevención de las diferentes etapas de desarrollo del cáncer, incluyendo la iniciación, promoción y progresión. Los estudios se han centrado en el papel de los inhibidores de proteasas de origen vegetal; lactoferrina y lactoferricina, el cartílago de tiburón, las lectinas de plantas y lunasina de semillas, en la apoptosis, angiogénesis y la metástasis de las células cancerígenas (González y Vermont, 2010).

Las proteínas de los alimentos son considerados no sólo como nutrientes para el mantenimiento adecuado de las funciones del cuerpo, sino también como una fuente de péptidos con importantes actividades biológicas ya conocidas. Péptidos y proteínas biológicamente activos que se producen ya sea por digestión enzimática o fermentación natural. Los péptidos y proteínas de tipo Bowman-Birk, o tipo Kunitz inhibidor de tripsina son ejemplos de proteínas naturales con funciones nutraceuticas muy conocidas (Kunitz, 1945; Meykens, 2001; Grimble, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2005; Clemente y Domoney, 2006; Saito *et al.*, 2007; Losso, 2008; Fang *et al.*, 2010) debido a los derivados de proteínas hidrolizadas por enzimas digestivas que son fuentes de péptidos biológicamente activos o péptidos bioactivos. Por otra parte, ciertos aminoácidos como arginina y glicina han demostrado actividades nutraceuticas. Además, al producirse digestión gastrointestinal de las proteínas en los alimentos, pueden generar péptidos con

ciertas actividades biológicas. De hecho, no todas las proteínas de la dieta se convierten en aminoácidos individuales, la mayoría de las proteínas ingeridas son pequeños péptidos formados principalmente por dipéptidos y tripéptidos. Además, pequeñas cantidades de péptidos y proteínas se absorben por el sistema digestivo (Grimble, 1994). Por lo tanto, las proteínas pueden ser consideradas como una fuente de productos nutracéuticos como péptidos y aminoácidos que pueden ejercer funciones biológicas para promover la salud y prevenir la enfermedad, incluyendo cáncer (González *et al.*, 2010).

1.3. PROTEÍNAS

Entre todos los compuestos químicos, ciertamente hay que considerar a las proteínas como las más importantes; ya que ocupan un lugar sobresaliente entre las moléculas constituyentes en los seres vivos. Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia y/o actividad de este tipo de sustancias. Son proteínas casi el 99% de todas las enzimas (1% ribosomas, RNA con función catalítica). Las enzimas son los catalizadores biológicos de reacciones químicas en los organismos vivos. Las proteínas son polímeros constituidos por aminoácidos y resultan de la expresión de genes dentro de las células. Varían en tamaño, en la longitud desde pocos aminoácidos (hormonas de tipo peptídico) hasta 100.000 aminoácidos (proteínas del músculo). Las proteínas debido a su gran tamaño, cuando se dispersan en un disolvente adecuado, forman disoluciones coloidales, con características que las distinguen de las disoluciones de moléculas más pequeñas. Todas las proteínas contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y casi todas poseen también azufre. Las proteínas pueden formar disoluciones estables debido a las cargas de hidratación de sus moléculas y de sus cargas eléctricas. Los grupos polares de las proteínas (-OH, -OOH, NH₂, NH, NO) se enlazan con el agua mediante puentes de hidrógeno.

Existen muchas clases de proteínas, cada una de ellas especializada en una función biológica diferente. Además, la información genética es expresada en su mayor parte por las proteínas. Es por esto que se examina también la naturaleza general de la relación genética entre el ácido desoxirribonucleico y la estructura de las proteínas, así como el efecto de las mutaciones sobre la estructura proteica.

1.3.1. PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

Los aminoácidos formados como productos de asimilación de nitrato se almacenan como proteínas. Estos son proteínas de almacenamiento, que no tienen actividad enzimática y son a menudo depositados en la célula dentro de los cuerpos proteicos los cuales están encerrados por una sola membrana y se derivan del sistema endomembranal del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi o las vacuolas. En los tubérculos de patatas, las proteínas se almacenan en la vacuola.

Proteínas de almacenamiento pueden estar depositadas en varios órganos de la planta, tales como hojas, tallos y raíces. También se almacenan en tubérculos, en los troncos de árboles durante el invierno y en semillas para permitir la rápida formación de hojas durante la germinación. Las proteínas de almacenamiento se encuentran en el endospermo de las semillas de cereales y en los cotiledones de la mayoría de las semillas de leguminosas.

Mientras que en los cereales el contenido de proteína equivale a 10 a 15% de peso seco, en algunas leguminosas (por ejemplo, soya) es tan alta como 40 a 50%. Cerca del 85% de estas proteínas son proteínas de almacenamiento. La concentración de proteínas en las semillas de *Bixa orellana* es variable según diferentes autores, que va de 11 a 17.8% (Córdoba, 1987; Jaramillo, 1992, Laboratorio de Química Agrícola CENTA).

A nivel mundial, aproximadamente el 70% de la demanda humana de proteínas se cumple gracias al consumo de semillas, ya sea directa o indirectamente, por la alimentación a los animales para la producción de carne. Por lo tanto, las proteínas de almacenamiento de plantas es la base para la nutrición humana. Sin embargo, en muchas proteínas de almacenamiento de la planta, el contenido de ciertos aminoácidos esenciales para la nutrición de seres humanos y animales es demasiado bajo. En los cereales, por ejemplo, las proteínas de almacenamiento son deficientes en treonina, triptófano, y en particular lisina; mientras que en las leguminosas hay una deficiencia de metionina. Puesto que estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por el metabolismo humano, los seres humanos dependen del consumo de estos aminoácidos suministrados en la dieta. Los seres humanos con una dieta totalmente vegetariana pueden tener deficiencia de

aminoácidos, lo cual puede provocar daños físicos y mentales irreparables, sobre todo en los niños. Puede ser un problema serio en cerdos y aves de corral. Un objetivo de la investigación en ingeniería genética de plantas es la mejora de la composición de aminoácidos de las proteínas de almacenamiento en productos cosechados (Walter, 2005).

Los científicos durante mucho tiempo han tenido interés en las proteínas vegetales. En 1745 el italiano J. Beccari ya tenía proteínas aisladas de trigo. En 1924, en la Estación Experimental Agrícola de Connecticut, las proteínas vegetales fueron clasificadas por Osborne en función de su solubilidad. Las proteínas vegetales fueron fraccionadas en albúminas (solubles en agua pura), globulinas (solubles en disoluciones salinas), glutelinas (solubles en disoluciones diluidas de álcali y ácidos) y prolaminas (solubles en etanol). Cuando las estructuras de estas proteínas se determinaron, resultó que las glutelinas y las prolaminas estaban estrechamente relacionadas estructuralmente. Por lo tanto, en la literatura más reciente, las glutelinas son consideradas como miembros del grupo de las prolaminas (Walter, 2005).

1.3.1.1. LAS GLOBULINAS SON LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO MÁS ABUNDANTES

Las globulinas de almacenamiento se producen en cantidades variables en prácticamente todas las plantas. Las globulinas más importantes pertenecen a los grupos legumina y vicilina. Ambas globulinas son codificadas por una familia multigénica. Estas familias multigénicas descienden de un ancestro común. Legumina es la principal proteína de almacenamiento de semillas de las leguminosas (Walter, 2005). Por ejemplo; en la haba el 75% del total de las proteínas de almacenamiento consiste en legumina que es un hexámero con una masa molecular de 300 a 400 kDa (Walter, 2005). Los monómeros contienen dos cadenas de péptidos diferentes (α , β), y están unidos por un puente disulfuro. La cadena α es grande, suele tener una masa molecular de aproximadamente 35 a 40 kDa, y la cadena β tiene una pequeña cadena molecular con masa de aproximadamente 20 kDa (Walter, 2005).

Los hexámeros pueden estar compuestos de diferentes monómeros (α , β). Algunos contienen metionina, mientras que otros no lo poseen. Estos hexámeros están dispuestos en un paquete muy regular y que se pueden depositar en los cuerpos proteicos, que en algunas cadenas de proteínas no se pliegan correctamente y no se ajustan a este paquete, por lo cual son degradadas por peptidasas.

Las prolaminas se forman como proteínas de almacenamiento en gramíneas. Las prolaminas se encuentran en las gramíneas, como los cereales. Están presentes como una mezcla polimórfica de muchas subunidades diferentes de 30 a 90 kDa; cada una de estas subunidades contiene residuos de cisteína y están unidos por puentes S-S. También en glutelinas, que se producen en los granos de trigo y centeno, están unidos por puentes S-S. Las moléculas de glutelinas difieren en tamaño. La idoneidad de harina para realizar un buen pan depende del contenido de glutelinas de alto peso molecular, y por lo tanto, las harinas procedentes de cebada, avena o maíz carecen de glutelinas, por lo cual no es adecuado para un buen pan, dado que el contenido de glutelinas es un factor crítico en la determinación de la calidad del pan.

1.3.1.2. LAS PROTEÍNAS 2S PRESENTES EN LAS SEMILLAS DE PLANTAS DICOTILEDÓNEAS

Las proteínas 2S también son proteínas de almacenamiento de amplia distribución. Representan un grupo heterogéneo de proteínas, de las cuales la única definición es su coeficiente de sedimentación de alrededor de 2 Svedberg (S). Las investigaciones de su estructura han revelado que la mayoría de las proteínas 2S tienen una estructura interrelacionada y se derivaron posiblemente, junto con las prolaminas, a partir de un ancestro común. Napina, la proteína predominante de almacenamiento en semilla de colza, es un ejemplo de una proteína 2S. Esta proteína es de muy alta importancia económica, ya que, después de que se ha extraído el aceite, el resto de la semilla de colza se utiliza como forraje. Napina y otras proteínas 2S se componen de dos pequeñas cadenas de polipéptidos de 9 kDa y 12 kDa, que están unidos por puentes S-S. Hasta ahora, poco se sabe sobre el ensamblaje de las prolaminas y proteínas 2S.

Los cuerpos proteicos de algunas semillas contienen otras proteínas, aunque actúan

como proteínas de almacenamiento, también protegen a las semillas de ser ingeridas por animales y/o insectos. Para dar algunos ejemplos: la vicilina, proteína de almacenamiento, tiene una función de defensa mediante la unión a la matriz de quitina en los hongos y en los insectos. Las semillas de algunas leguminosas contienen lectinas, que se unen a residuos de azúcar o componentes de glucolípidos o glucoproteínas; estas lectinas al ser consumidas por los animales, se unen a las glicoproteínas en el intestino y por lo tanto interfieren con la absorción de nutrientes, con esto, las lectinas causan la muerte por desnutrición. Las semillas de algunas leguminosas y otras plantas también contienen inhibidores de proteasas, que bloquean la digestión de las proteínas en el tracto digestivo de los animales. Debido a su contenido de lectinas e inhibidores de proteasas, muchos frijoles y otros vegetales sólo son aptos para el consumo humano después de la desnaturalización por cocción. Las semillas de ricino contienen ricina, proteína extremadamente tóxica, ya que si es inhalada o inyectada puede matar a un humano con una dosis letal de apenas 500 microgramos.

1.3.1.3. SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

Las proteínas de reserva de las semillas son sintetizadas por los ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Estas proteínas recién sintetizadas se producen en el lumen del RER, y se almacenan en los cuerpos proteicos. En el caso de proteínas 2S y prolaminas, los cuerpos proteicos se acumulan de la membrana del RER. Las globulinas generalmente son trasladadas en forma de vescículas del RER al aparato de Golgi. La proteína formada por el ribosoma contiene en su extremo N-terminal una sección hidrofóbica denominada "peptido señal" (Walter, 2005). Después de la síntesis de esta secuencia señal, la traducción se detiene, y la secuencia señal forma un complejo con tres componentes:

1. Una partícula de reconocimiento de señal,
2. Una proteína de unión que se encuentra en la membrana del RER,
3. Una proteína presente en los poros de la membrana RER.

La formación de este complejo da como resultado la apertura de un poro en la membrana del RER; la traducción de la proteína continúa y la cadena recién formada (por ejemplo,

pre-pro- legumina) alcanza el lumen del RER y se ancla al ribosoma en la membrana del RER durante la síntesis de la proteína (Walter, 2005).

1.3.1.4. PROTEÍNAS MOVILIZAN LOS AMINOÁCIDOS DEPOSITADOS EN LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

El conocimiento acerca de la movilización de los aminoácidos desde las proteínas de almacenamiento, se deriva principalmente de las investigaciones de los procesos que ocurren durante la germinación de la semilla en plantas (Robinson y Hinz, 1999).

En la mayoría de los casos, la germinación es inducida por la absorción de agua, causando que los cuerpos proteicos formen una vacuola. La hidrólisis de las proteínas de almacenamiento está catalizada por proteinasas, que son en parte, depositadas como proformas inactivas en las semillas, junto con las proteínas de almacenamiento en los cuerpos proteicos. Otras proteasas se sintetizan *de novo* y se transfieren a través del lumen del RER y el aparato de Golgi a las vacuolas. Estas enzimas se sintetizan inicialmente como proformas inactivas. La activación de estas preproteinasas procede por proteólisis limitada, en la que una sección de la secuencia es eliminada por una peptidasa específica. El resto del polipéptido representa la proteinasa activa.

La proteinasa específica elimina primero pequeñas secciones de secuencias en las proteínas, lo que resulta en un cambio en la conformación de la proteína de almacenamiento.

En los granos de cereales, los puentes S-S de proteínas de almacenamiento, son escindidos por la reducción causada por la tiorredoxina. La proteína desplegada es entonces susceptible a hidrólisis por varias proteinasas.

De esta manera, las proteínas de almacenamiento son completamente degradadas en la vacuola y los aminoácidos liberados se proporcionan como material para el anabolismo durante la germinación de la planta.

1.3.2. FUNCIÓN

Las proteínas tienen múltiples funciones en los seres vivos tanto en las plantas como en los animales (Kerstetter *et al.*, 2005); actúan como hormonas, proteínas de transporte (hemoglobina), como anticuerpos, receptores en las células, en el músculo (actina y miosina), en el colágeno, etc. La función depende de la conformación y ésta viene determinada por la secuencia de aminoácidos.

En los animales una función muy importante de las proteínas es la de actuar como transporte y almacenamiento de iones, como la transferrina de la sangre y la ferritina del hígado. También son el soporte para la acción de estos movimientos, tanto dentro como fuera de la célula: el colágeno de la matriz y los microfilamentos del citoesqueleto, respectivamente, tienen una misión muy importante, que es el desplazamiento de los cromosomas a lo largo del huso acromático durante la mitosis y la meiosis.

Otras funciones desarrolladas por las proteínas son la transmisión del impulso nervioso (son los receptores de los neurotransmisores en la neurona post-sináptica), la regulación y el control del crecimiento celular mediante receptores y la modulación de la expresión génica a cualquier nivel de síntesis o de degradación. Otra función, es la defensa del organismo frente a infecciones, mediada tanto por los anticuerpos como por los receptores de las células T. Hay más funciones desarrolladas por proteínas; tantas como sean necesarias para llevar a cabo todas las funciones de un organismo vivo.

1.3.3. PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

El primer modelo de estudio en el que se determinó una actividad anticancerígena fue en semillas de soya (*Glycine max*), que es una leguminosa consumida en todo el mundo, pero más comúnmente en los países asiáticos, puesto que sus alimentos son ricos en soya como el tofu, miso y el tempeh entre otros. Estos alimentos han generado mucho interés debido a sus efectos benéficos sobre la salud y la nutrición ya que se ha demostrado que las poblaciones asiáticas que consumen grandes cantidades de productos de soya tienen un menor riesgo de sufrir osteoporosis y algunas enfermedades crónicas, sobre todo cardíacas y cancerígenas (McCue *et al.*, 2004). Todo esto ha sido

apoyado en estudios epidemiológicos en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los estudios han demostrado que el consumo de los productos de soya se asocian con un menor riesgo para desarrollar el cáncer de próstata (Jacobsen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003), mama (Wu *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003) y de cánceres de endometrio (Goodman *et al.*, 1997).

La soya contiene una variedad de fitoquímicos con actividad anticancerígena ya demostrada, incluyendo las proteasa inhibidoras, hexafosfato de inositol (ácido fólico), β -sitosterol, saponinas e isoflavonas (Messina y Barnes, 1991).

Las sustancias más ampliamente estudiadas con actividad bioactiva en la soya son el inhibidor de proteasas Bowman-Birk (BBI) y las isoflavonas. BBI es un inhibidor de las proteasas de serina con una buena capacidad para inhibir la tripsina y la quimotripsina (enzimas digestivas pancreáticas que hidrolizan proteínas). El inhibidor BBI ha demostrado que tiene efecto anticancerígeno en diferentes líneas celulares (Yavelow *et al.*, 1985; Billings y Habres, 1992; Kennedy, 1998 a, b; Zhang *et al.*, 1999; Meyskens, 2001; Kennedy y Wan, 2002). Su capacidad para prevenir o suprimir los procesos cancerígenos ha sido demostrada en una amplia variedad de ensayos *in vitro* y en sistemas de modelos animales *in vivo*. La proteína supresora BBI ha demostrado impedir de manera eficaz el desarrollo de los tumores inducido por carcinógenos químicos como en el pulmón o gastrointestinales, sobre todo esto en ratones (Witschi y Kennedy, 1989.; Clair *et al.*, 1990.; Kennedy *et al.*, 1996), el esófago y el colon en las ratas (von *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 2002) y la cavidad oral en hámster (Messadi *et al.*, 1986). Como resultado de esta evidencia, BBI adquirió el estado de un "nuevo fármaco en investigación" de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos en 1992 y en la actualidad se está evaluando en ensayos con seres humanos a gran escala como agente anticancerígeno en forma de BBI concentrado (BBIC).

Las propiedades quimiopreventivas de las isoflavonas de soya (fitoestrógenos) han sido atribuidas a diferentes actividades biológicas, principalmente a sus efectos estrogénicos a largo plazo y sus actividad antioxidante (McCue y Shetty, 2004).

Se ha planteado la posibilidad de que en la matriz de proteínas de isoflavonas en la soya se encuentren otras proteínas que contribuyan al efecto preventivo (Pollard y Wolter,

2000). Estas observaciones dieron especial importancia para el descubrimiento del péptido lunasina, denominado como el “perro guardián” y con propiedades preventivas contra el cáncer.

1.4.1. PÉPTIDOS

La unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces amida origina los péptidos. Estos enlaces son el resultado de la reacción entre el grupo carboxilo de un ácido y el grupo amino de otro, con eliminación de una molécula de agua. En los péptidos y en las proteínas, estos enlaces amida reciben el nombre de enlaces peptídicos.

Cuando son pocos los aminoácidos que forman el péptido (menos de 10) se trata de un oligopéptido (dipéptido, tripéptido, etc.). Cuando el número de aminoácidos está comprendido entre 10 y 50 se trata de un polipéptido y si el número de aminoácidos es mayor de 50, se habla de proteínas (Vasudevan *et al.*, 2012).

Los péptidos son estructuras intermedias entre los aminoácidos y las proteínas. Sus propiedades físicas y químicas suelen reflejar en mayor o menor medida las de los aminoácidos. Al desaparecer los grupos hidrofílicos (carboxilo y amina) implicados en la formación de los enlaces peptídicos, el carácter polar o apolar de los péptidos depende de la naturaleza de los grupos presentes en las cadenas laterales.

1.4.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas que se ingieren a través de la dieta aportan al organismo los aminoácidos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de un organismo.

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos (Korhonen, 2002). Puesto que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales, hay que ser críticos en cuanto a su utilización, pese a que en algunos casos su funcionalidad no es algo novedoso, puesto que la existencia de proteínas en la leche materna que contribuyen a la maduración y la función del sistema inmune en el neonato es un hecho conocido desde hace más de 50 años (Lonnerdal *et*

al., 2003; Diehl *et al.*, 2004; Field *et al.*, 2005).

Los péptidos bioactivos o péptidos funcionales se definen como secuencias de aminoácidos que ejercen actividades biológicas tras su liberación en un sistema biológico, mediante hidrólisis enzimática digestiva, química y fermentativa (Meisel, 1998).

Generalmente, son péptidos de tamaño pequeño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud, que son liberados durante el procesado durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto, 2000; Shahidi *et al.*, 2008). Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso (Fitzgerald y Meisel, 2000; Korhonen *et al.*, 2003). La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Robert *et al.*, 1994).

1.4.3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS

Los péptidos bioactivos no son más que una pequeña secuencia de aminoácidos encriptados en proteínas; debido a la amplia gama de alimentos existentes en la naturaleza y sobre todo en el mercado, que su ingesta esté asegurada con una alimentación equilibrada. Sin embargo, su indisponibilidad no está tan clara, ya que han de ser liberados de las proteínas en las que se encuentran tras sufrir la acción de las proteasas gástricas e intestinales y han de poder atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea para poder ejercer su acción (Robert *et al.*, 1994; Korhonen *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2004; Vermeirssen *et al.*, 2004; Rutherfurd *et al.*, 2005.).

En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos y por lo tanto han obtenido un nuevo valor en el mercado, por esto y más, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Rutherfurd *et al.*, 2005). Es más, en estudios recientes se han obtenido péptidos

modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (Martinez y Martinez, 2006). De esta manera, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos (Pihlanto *et al.*, 2003; Dziuba *et al.*, 2005; Rutherford *et al.*, 2005) siendo interesante destacar que dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos es distinta (Wang *et al.*, 2005). Entre las proteínas de origen vegetal de las que se han aislado péptidos bioactivos encontramos las proteínas de soya, de trigo, de maíz, de arroz, de cebada y de girasol (Wang *et al.*, 2005). En cuanto a las proteínas de origen animal, la leche y otros productos lácteos son los precursores de los péptidos bioactivos más estudiados, aunque también se han identificado estos péptidos en la albúmina de huevo (Rutherford *et al.*, 2005), en la carne (Rutherford *et al.*, 2005), en el músculo de pescado (sardina, atún, anchoas, bonito) (Yamamoto *et al.*, 2003) y en la jalea real (Matsui *et al.*, 2002).

1.4.4. PROPIEDADES DE LOS PÉPTIDOS

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica son producidos, por lo general, durante la digestión gastrointestinal de los alimentos, que pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, por lo cual se sugiere su uso potencial como nutracéuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción de padecer enfermedades. En los últimos años se han destinado muchos esfuerzos al estudio de las diferentes actividades benéficas que estos péptidos bioactivos que pueden tener sobre el organismo, incluyendo su actividad antihipertensiva, antitrombótica, hipocolesterolemiante, antioxidante, antimicrobiana y antitumorales, así también, beneficios en el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. Así mismo, se están destinando esfuerzos en investigación para la detección de fuentes alimentarias de péptidos bioactivos en su presencia bioactiva.

1.4.5. PÉPTIDOS CON PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS

La asociación entre la nutrición y la inmunidad es un hecho reconocido desde hace tiempo. Existen estudios que demuestran que péptidos bioactivos derivados de diferentes fuentes de proteínas ejercen efectos inmunomoduladores *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en la evaluación del efecto de los péptidos hidrolizados de proteínas específicas en el sistema inmunológico y sólo un número limitado de investigaciones examinan su impacto en la inmunidad. Los péptidos inmunomoduladores son liberados de las proteínas que los contienen de manera natural durante el proceso de la digestión en el tracto gastrointestinal, lo que afecta a la respuesta inmunológica y a la función celular en el mismo.

Los péptidos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras más estudiados son aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos (Gauthier *et al.*, 2006).

1.4.6. PÉPTIDOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Este efecto parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos, que se organizan estructuralmente y provocan la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos (Agawa *et al.*, 1991), alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular (Bellamy *et al.*, 1992).

En la leche y también en el huevo se encuentran la lactotransferrina y la ovotransferrina. Ambas transferrinas poseen actividad antibacteriana frente a gran variedad de microorganismos. Esta actividad puede ser ejercida, por al menos, tres mecanismos distintos (Farnaud *et al.*, 2003; Orsi 2004; Kovacs *et al.*, 2005):

- Secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias.
- Produciendo alteraciones en la pared bacteriana.
- Mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

Los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos blancos, también mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la

división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana (Cudic *et al.*, 2002).

Péptidos derivados de las caseínas de la leche muestran también actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un amplio rango de microorganismos, entre los que se incluyen *Staphylococcus* spp y *Streptococcus pyogenes*. Estudios *in vivo* muestran efectos protectores de la israicina (derivado de la caseína) frente a *S. aureus* y *Candida albicans* en ratones y frente a mastitis en vacas y ovejas (Clare *et al.*, 2000; Marshal *et al.*, 2004).

Otros alimentos, aunque no tan estudiados como los lácteos, también contienen péptidos con actividad inmunomodulante, como es el caso de la jalea real de la que se han aislado péptidos que estimulan la proliferación de monocitos humanos (Schmitzova *et al.*, 1998), péptidos derivados de las proteínas del arroz y la soya que estimulan los sistemas de inmunidad no específica (Kitts *et al.*, 2003).

1.4.7. ACTIVIDAD ANTIHIPERCOLESTEROLÉMICA

La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Recientemente se ha demostrado que los péptidos de la soya pueden ser responsables, al menos en parte, de su actividad hipocolesterolémica, ya que se ha observado que hidrolizados de proteína de soya indujeron un mayor descenso del colesterol plasmático que la proteína de soya intacta o no hidrolizada (Nagaoka *et al.*, 1999).

Este efecto hipocolesterolemizante de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones:

- Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol (Nagaoka *et al.*, 2001).
- Algunos péptidos pueden regular al alza los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta (Sirtori *et al.*, 1995).

Además de los péptidos derivados de la soya, otros péptidos bioactivos con efecto hipocolesterolémico han sido obtenidos a partir de β -lactoglobulina, hidrolizado de proteína de carne de cerdo (Morimatsu *et al.*, 1992; Morimatsu *et al.*, 1996) y proteína

vegetal (*Brassica carinata*) (Pedroche *et al.*, 2007).

1.4.8. ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y está mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) del fibrinógeno. Es concebible, por lo tanto, que los péptidos que contienen la secuencia RGD puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación de plaquetas. En la secuencia RGD, una unidad catiónica, en este caso el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido carboxílico de la Asp, es requerida para la actividad inhibitoria. Además, la distancia entre estos grupos funcionales catiónicos y aniónicos es un factor importante en potencia. El fibrinógeno enlaza sitios de la GPIIb/IIIa, la cual tiene un número de residuos de Asp, y a causa de esto el grupo guanidino de la Arg, en el caso de compuesto tipo RGD, se piensa que puede estar involucrado en la ligadura iónica con el grupo carboxílico del Asp en la GPIIb/IIIa (Miyashita *et al.*, 1999). Por lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos.

Los principales péptidos aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de la κ -caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con trombina.

Péptidos derivados de la lactoferrina presentan también actividad antitrombótica a través de otro mecanismo distinto al de la caseína, inhibiendo, mediante dosis dependiente, la agregación plaquetaria inducida por ADP, debido a la homología con el fragmento f (572-575) de la cadena del fibrinógeno (Mazoyer *et al.*, 1990). Se ha comprobado *in vivo* que este fragmento inhibe la formación de trombos en la arteria coronaria de perros (Shebuski *et al.*, 1989) y prolonga el tiempo de sangrado en la arteria mesentérica del hámster (Cook *et al.*, 1980).

1.4.9. PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS

Los péptidos antihipertensivos son los péptidos bioactivos más estudiados de los alimentos, ya que éstos muestran actividad por la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), la cual está relacionada con la regulación de la presión arterial por la modulación del sistema renina-angiotensina (Wang y González de Mejía, 2005). Ferreira (1965) fue el primero en aislar del veneno de la cobra brasileña (*Bothrops jararaca*) pequeños péptidos que exhibían una fuerte actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), siendo denominados como factores potenciadores de bradikinina. Cheung y Cushman (1973) estudiaron la inhibición de la ECA de esos péptidos, concluyendo que la inhibición es de tipo competitivo y que los inhibidores se ligan a la enzima de la misma manera que ésta se liga al sustrato. De igual forma enfatizaron la importancia de los tres últimos residuos de aminoácidos en el grupo C-terminal tanto para los sustratos como para los inhibidores. Con respecto a los inhibidores observaron que todos presentaron un residuo de prolina (P) en la penúltima posición de la molécula del grupo C-terminal. Sin embargo, esto no es una regla general para establecer que los péptidos antihipertensivos deben su actividad a la presencia de este aminoácido (P), ya que se han aislado aminoácidos e identificado las secuencias de de diferentes péptidos que provocan la inhibición de la ECA (Cuadro 1.1.).

Cuadro 1.1. Principales péptidos con actividad antihipertensiva obtenidos de diferentes fuentes naturales.

Secuencia del péptido	Fuente	Proteasas empleadas	Clasificación fisiológica	Referencias
YAEERYPIL	Huevo	Pepsina	I-ECA	Miguel <i>et al.</i> , 2006
LIY	Plasma humano	Tripsina	I-ECA	Nakagomi <i>et al.</i> , 2000
MIFPGAGGPEL	Pescado aleta amarilla	α -Quimotripsina	I-ECA	Jung <i>et al.</i> , 2006
VY	Músculo de sardina	Proteasa alcalina	I-ECA	Matsui <i>et al.</i> , 2002
FVNPQAGS	Girasol	Pepsina-Pancreatina	I-ECA	Megías <i>et al.</i> , 2004
VPP y IPP	Leche agria	<i>L. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	I-ECA	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
IPL y WL	Tofuyo alimento de soya fermentado	Pepsina, quimotripsina y tripsina	I-ECA	Kuba <i>et al.</i> , 2003
LRPVAA	Lactoferrina de bovino	Pepsina, quimotripsina y tripsina	I-ECA	Lee <i>et al.</i> , 2006
LSP	α -Zeína	Termolisina	I-ECA	Das <i>et al.</i> , 2006

(Torruco *et al.*, 2008)

1.4.10. PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico, ya que protegen al organismo contra los radicales libres. Los radicales libres son moléculas que están en continua formación en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de estos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades degenerativas (Bray *et al.*, 2000). Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres.

Muchas proteínas e hidrolizados de proteínas se han probado con diferentes métodos antioxidantes encontrando que las actividades antioxidantes son relativamente fuertes, como las proteínas de soya, caseínas y proteínas de yema de huevo. La actividad antioxidante de estas proteínas estaba directamente relacionada con el contenido de sulfhidrilo (SH) o su actividad antioxidasa (tales como SOD, CAT, POD, GSH-Px) (Vioque *et al.*, 2005; Korhonen *et al.*, 2006; Arcan *et al.*, Huang *et al.*, Tironi *et al.*, del 2010).

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos (Davalos *et al.*, 2004; Gibbs *et al.*, 2004) y en derivados de ellos, como hidrolizados de gelatina (Kim *et al.*, 2001), hidrolizados de clara de huevo (Graszkievicz *et al.*, 2007) y productos lácteos (Gobetti *et al.*, 2002), entre otros. Estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar y/o interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente ya sea membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venereo *et al.*, 2002).

1.4.11. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

El cáncer sigue siendo una fuente importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, a pesar de recientes avances en el tratamiento. La quimioterapia sigue siendo el tratamiento de elección para la enfermedad avanzada y células metastásicas (Espinosa *et al.*, 2003), como en el carcinoma hepatocelular (HCC por sus siglas en inglés), que es la quinta causa más común de cáncer humano, con un alta tasa de mortalidad y que ocupa el tercer lugar a nivel mundial. Aunque la fase temprana de HCC se cura con cirugía, el HCC avanzado es de fácil recaída y se convierte en fatal, incluso si los pacientes reciben quimioterapia de combinación (Chung *et al.*, 2007). Además, muchas evidencias han demostrado que las actividades antitumorales de muchos agentes quimioterapéuticos pueden resultar en toxicidad para las células normales, además, del daño a órganos sanos (Drake y Antonarakis, 2010).

Las células cancerosas proliferan lentamente en reposo, o son refractarias para el efecto citotóxico de los fármacos que interfieren con la síntesis de ADN (Naumov *et al.*, 2003) y, con frecuencia, cambios celulares afectan la sensibilidad a la quimioterapia con drogas ya sea por el aumento de expresión de enzimas causada por desintoxicación de las drogas y el aumento en la capacidad para reparar los daños en el ADN, esto causa efectos negativos en la vía apoptótica (Gatti y Zunino, 2005).

El desarrollo de una nueva clase de medicamentos contra el cáncer que carezcan de toxicidad para las células sanas y no sean afectadas por los mecanismos de resistencia comunes, sería un avance importante en el tratamiento de la quimioterapia en varios tipos de cánceres. En la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, que es una tarea de nunca acabar, se ha tenido información con los péptidos bioactivos que son productos derivados de plantas naturales, mayoritariamente de semillas, que pueden inducir la apoptosis en las células tumorales (Xue *et al.*, 2010). Con esto, los péptidos bioactivos son candidatos prometedores para tratamientos antitumorales.

Estos péptidos pueden exhibir citotoxicidad directa a las células tumorales, actuar como inmunomoduladores o como factores antiangiogénicos. Estos péptidos inhiben o matan a

las células susceptibles por diversos mecanismos, tal como la inducción de la apoptosis (Xue *et al.*, 2010), el bloqueo de la generación tumoral intermedia (Blanca *et al.*, 2009), así como la inducción de los canales selectivos de cationes de iones en el plasma, así como la interferencia en el ciclo celular (arresto G1, G1 / S, S), y en la síntesis del ADN cromosómico (Klassen *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Schmitt y Breinig, 2006; Jablonowski y Schaffrath, 2007).

Existen oligopéptidos con actividad proapoptótica con masas moleculares muy pequeñas de 1,050 Da y con tan sólo nueve aminoácidos (Ala-Trp-Lys-Leu-Phe-Asp-Asp-Gly-Val) en semillas de *Cycas revoluta*; este péptido muestra efectos nocivos contra el cáncer epidermoide humano (Hep2) y en células de carcinoma de colon (HCT15), induciendo la apoptosis mediante la unión directa del ADN (Santi *et al.*, 2012).

La presencia de péptidos hidrofóbicos, con residuos de prolina, lisina, o arginina en las proteínas de soya han mostrado actividad anticancerígena. Aunado a esto, lunasina, péptido de 43 aminoácidos con un peso de 5.5 kDa proveniente de la albúmina 2S, contiene en su extremo C-terminal ocho residuos de Asp (D) (Jeong *et al.*, 2003) responsable del efecto antimitótico, el cual, una vez que se ha unido a las regiones de la cromatina hipoacetilada, la cual se encuentra en el centrómero, detiene la mitosis con la eventual muerte celular.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de la lunasina a suprimir tanto la transformación química como la causada por oncogenes en células de mamíferos. Las propiedades quimiopreventivas de lunasina en cáncer de la piel de ratón ha demostrado suprimir la transformación posterior a la carcinogénesis (Galvez. *et al.*, 2001). La actividad biológica propuesta de las regiones de lunasina se muestra en la Figura 1.1.

El péptido lunasina es uno de los agentes recién descubiertos, con prometedoras propiedades quimiopreventivas contra el cáncer y su actividad ya ha sido demostrada en modelos de cultivos celulares de mamíferos y cultivos de cáncer de piel de ratón contra los carcinógenos químicos, oncogenes e inactivadores de proteínas supresoras de tumores (Lumen *et al.*, 2005). La lunasina también inhibe el cáncer de mama humano en la proliferación células MDA-MB-231, suprime la progresión del ciclo celular e induce la apoptosis de estas células cancerígenas (Hsieh *et al.*, 2010).

Un mecanismo propuesto para definir la actividad anticancerígena de manera selectiva es el modelo de E1A-RB-HDAC (Fig. 1.2.) que demuestra cómo la lunasina mata selectivamente las células que se están transformando mediante la unión a sustratos de histonas desacetiladas expuestas por la transformación y mediante la inhibición de la acetilación catalizada por la histona acetil transferasa. Esto altera la dinámica de acetilación-desacetilación de histonas, que se percibe como anormal por la célula y conduce a la muerte celular. En células anormales y líneas celulares cancerígenas, está ausente debido a que las histonas desacetiladas no son accesibles funcionalmente y/o físicamente. Una analogía es que una lunasina es denominada "perro guardián", un agente que se encuentra en el núcleo y que efectivamente no hace nada a las células cuando no hay transformación de eventos sobre las histonas. Cuando se produce un evento de transformación, la lunasina dispara una acción y se une al núcleo desacetilado de las histonas expuesta por el evento de transformación, lo que lleva a la muerte selectiva de células que se transforman por una oncoproteína.

Varios trabajos citan la importancia de la ingesta de este péptido por medio del consumo de productos naturales, especialmente de semillas como la de soya y que está asociada con el conjunto de bajas tasas de mortalidad por cáncer de la próstata, mama, colon, entre otros (Jacobsen *et al.*, 1998; Moyad *et al.*, 1999). Inicialmente, la lunasina se encontró en la soya, en concentraciones de 0.5-8.1 mg/g (Mejia *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2007). Pero en búsqueda de más fuentes naturales de lunasina, además de la soya, ya se ha llevado a cabo utilizando diferentes granos y plantas a base de hierbas (Cuadro 1.2.). La lunasina se ha encontrado en cebada, trigo y centeno, cereales conocidos por sus efectos positivos en la salud (Jeong *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2009). Varias semillas de plantas medicinales ya han sido analizadas, a partir del descubrimiento de lunasina, la cual está presente en la totalidad de la familia de las solanáceas, excepto *Capsicum chinensis* L., pero no en cualquiera de los granos de *Phaseolus* spp. analizados (Jeong *et al.*, 2007). Lunasina ha sido también identificada en amaranto, llamada el "grano de oro" por los aztecas, ya que proporciona granos y hojas con un alto valor nutricional y propiedades fisiológicas (Silva *et al.*, 2008). Una búsqueda más rigurosa y sistemática de lunasina y homólogos en diferentes semillas está siendo llevada a cabo para establecer una relación entre la presencia de este péptido y las propiedades taxonómicas de las plantas.

Cuadro 1.2. Contenido de lunasina en extractos obtenidos de diferentes semillas, granos y plantas medicinales.

Planta (nombre común)	Planta (nombre latín)	Lunasina (mg/g semilla)	Referencia
Soya	<i>Glycine max</i>	0.5-8.1	Mejia <i>et al.</i> , 2004.; Jeong, <i>et al.</i> , 2007.
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	0.013-0.099	Jeong, <i>et al.</i> , 2002 y 2010
Trigo	<i>Triticum vulgare</i>	0.2-0.3	Jeong <i>et al.</i> , 2007
Centeno	<i>Secale cereale</i>	0.045-0.150	Jeong <i>et al.</i> , 2009
Amaranto	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	-	Silva <i>et al.</i> , 2008
Solanáceas negra, hierba mora,	<i>Solanum nigrum L.</i>	1.8	Jeong; Jeong <i>et al.</i> , 2007
Hyyodori - jogo (nombre japonés)	<i>Solanum lyratum</i>	0.4	Jeong; Jeong <i>et al.</i> , 2007
Cereza de invierno	<i>Physalis alkekengi var. francheti</i>	0.1	Jeong; Jeong <i>et al.</i> , 2007
Estramonio, trompeta del diablo.	<i>Datura stramonium</i>	0.3	Jeong; Jeong <i>et al.</i> , 2007

(Hernández *et al.*, 2013)

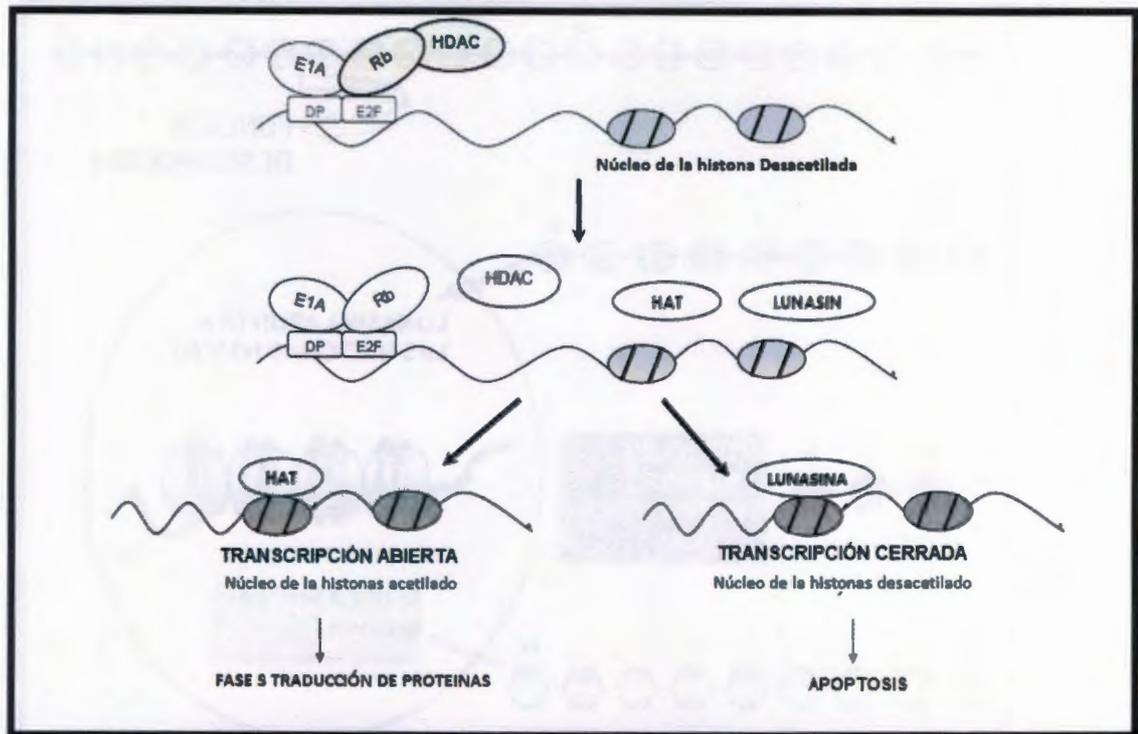


Figura 1.2. Modelo de E1A-Rb-HDAC para explicar la capacidad de lunasina para suprimir la transformación inducida por E1A. Esta figura muestra los controles de Rb en la transcripción de G1/S, que al interactuar con el promotor E2F controlan el HDAC para mantener las histonas en estado desacetilado (reprimido). En la transformación de la célula, el E1A inactiva el complejo Rb causando la disociación del complejo Rb-HDAC, dando como resultado la exposición del núcleo de las histonas desacetiladas por el promotor E2F (diagrama de media). La lunasina compete con la histona acetiltransferasa (HAT) por la unión del núcleo de las histonas desacetiladas. En el diagrama inferior: cuando HAT se une al núcleo y acetila las histonas, girando sobre E2F en factores de transcripción del ciclo celular, conduce a la proliferación celular. En el caso de que lunasina se una, se apaga o desactiva la transcripción, percibida como anormal por la célula, y con esto, da como resultado la apoptosis.

1.5. *Bixa orellana*

La palabra achiote es una castellanización del náhuatl *achiotl*. La etimología del nombre binomial corresponde a *bixa*, latinización del portugués *bixa*; dedicado al explorador español Francisco de Orellana (1490-1546). *Bija* era el nombre dado al vino tinto obtenido de esta planta, en las comunidades Pijaos de Colombia.

El otro nombre por el cual es muy conocido es urucú (palabra que procede tanto del guaraní como del tupi [*uru-ku*], o también *urucum* = "rojo").

Su uso medicinal es bastante amplio en las diferentes etnias como: antidiarreico, antimalárico, antiinflamatorio, diurético, para bronquitis y amigdalitis, malestares de garganta, hígado, riñones y además lo usan como tinte facial. La infusión de las hojas es usada por las mujeres para lavados vaginales, teniendo resultados muy buenos en el control de inflamaciones producidas por hongos y bacterias. Las hojas machacadas o hervidas son consumidas para controlar vómitos, como antídoto contra la intoxicación por el consumo de yuca brava (contiene ácido cianhídrico) y el extracto seco de las hojas o la infusión se usan para controlar y curar la prostatitis frecuente en adultos mayores. Los frutos y semillas en infusión controlan el dolor de cabeza. También tiene propiedades cicatrizantes además actúa como repelente de insectos y protector solar.

1.5.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La familia *Bixaceae* es considerada por varios autores como un género con una especie: *B. orellana* (Sánchez, 1965).

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Violales

Familia: Bixaceae

Género: *Bixa*

Especie: *Bixa orellana* L.

Bixa orellana es un árbol o arbusto que por lo general llega a medir de 2 a 4 metros, o que hay registros de hasta 10 metros, con hojas y frutos compactados. El fruto es abierto (dehisciente) o cerrado (indehisciente) y contiene una cápsula con o sin espinos de dos válvulas y simetría bilateral. Las diferentes combinaciones de tamaño, color, forma y tipo de espinas del fruto permiten reconocer las variedades de la plantas (Juárez *et al.*, 1998).

Existen algunas variantes de *B. orellana* denominadas según su procedencia como: la peruana, la india y la jamaiquina (conafрут, 1976).

En México, esta planta se cultiva principalmente a nivel huerto familiar o con un mínimo manejo agronómico; encontrándose principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz, y Yucatán.

1.5.2. USOS

El onoto o achiote fue domesticado debido a su uso en ceremonias religiosas; podría estar entre las plantas que primero fueran domesticadas en la Amazonia, probablemente durante el paleolítico, luego adoptada y difundida hacia el resto del sur de América, Centroamérica y el Caribe; y de esta manera, los indígenas americanos tendrían una fuente confiable para pintarse el cuerpo; esta práctica fue y continua siendo usada con propósitos decorativos, para repeler insectos, ayudar a la cicatrización de heridas (León, 2000). El uso de colorante para sus comidas, así como, en el teñido de sus cesterías, su alfarería y sus hamacas, tuvo un desarrollo posterior.

Como medicamento, la cocción de los brotes tiernos de la planta es considerada anti disentérica, antiséptica, antivenérea, afrodisiaca, astringente y febrífuga (Smith *et al.* 1992), y para curar dolores del hígado (Delascio, 1985). El follaje es usado para tratar problemas de la piel y de las hepatitis. La corteza produce una resina parecida a la goma arábica y sus tiras son usadas en cestería. Las hojas se aplican sobre las sienes contra el dolor de cabeza; y son consideradas buenas para el sistema digestivo; se cree que las semillas son expectóricas, laxativas (Correa, 1931) y diuréticas (Ruiz, 1793); y las raíces digestivas antitusígenas empleadas para tratar la tos, pues se cree que actúan sobre el sistema nervioso central o periférico para suprimir el reflejo de la tos (Schultes y Raffauf, 1990).

Los pigmentos naturales en las plantas y hojas pueden acelerar el metabolismo de las grasas (Morrison y West, 1985). El colorante es una excelente fuente de vitamina A, de la cual las dietas en los trópicos son deficientes.

Del achiote se extraen los tintes más usados en la industria de los alimentos, repostería, cosméticos y teñidos; con uso amplio en salchichonería, lácteos como quesos, mantequillas o margarinas, maíces expandidos, salsas, conservas de pescado, sopas concentradas y cubitos, productos cárnicos, lápices labiales, betunes para calzado, barnices y tintes para fibras.

1.5.3. LOS PIGMENTOS NATURALES EN *Bixa orellana*

La bixina, éster monometílico del ácido norbixin dicarbónico, fue identificada por vez primera en 1825, pero no ha sido sintetizada, se encuentra en varias partes de la planta; pero en mayor cantidad en el arilo de la semilla (3.4-5.3%) y representa el 90% de los colorantes totales (Smith *et al.*, 1992). La bixina y la norbixina son carotenoides carboxílicos con una estructura básica similar a la del caroteno, con un grupo carboxílico libre y otro esterificado en el caso de la bixina, los cuales le confieren las características de un ácido orgánico, en especial en lo referente a solubilidad y estabilidad.

Gracias al radical esterificado, la bixina es soluble en aceites y grasas, además de disolventes como el cloroformo, piridina, ácido acético glacial y propilenoglicol; bajo condiciones normales tiene gran estabilidad, pero tiende a degradarse en presencia de la luz y de las temperaturas altas; es resistente a ácidos, alcoholes y a la acción microbiana (Ávila, 1983; Wilber y Rodríguez, 1992). La norbixina es soluble en agua.

1.5.4. CAROTENOIDES

Los carotenoides son un subgrupo de compuestos isoprenoides, actualmente comprende más de 700 estructuras. El mayor de los carotenoides lineal deriva del tetraterpeno fitoeno (C₄₀). Los carotenoides pueden ser sintetizados por organismos fototrópicos, pero también por algunas especies no fototrópicas. En las plantas, los carotenoides se sintetizan y se localizan en todos los tipos de plastos. Los cloroplastos se encuentran asociados a las proteínas que forman los complejos fotosintéticos, contribuyendo a la captación de la luz y actuando como antioxidantes esenciales para la fotoprotección. Los isoprenoides

(esteroles y carotenoides) más abundantes en las células vegetales están involucrados en el mantenimiento de la fluidez de la membrana, así como en la estabilización de las membranas tilacoidales y protección de los componentes fotosintéticos contra el daño foto-oxidativo (función desempeñada por los carotenoides) (Hisberg, 2001; Fraser y Bramley, 2004). En algunos tejidos no fotosintéticos los carotenoides se acumulan en plastos especializados llamados cromoplastos. Otros isoprenoides intervienen en procesos de modificación post-traducciona de proteínas como la prenilación (grupos prenil) y la glucosilación (dicoles) y forman parte de las cadenas de transporte electrónico (la cadena lateral de los tocoferoles y de las quinonas, ubiquinonas, plastoquinona y filoquinona), por otro lado, también son componentes esenciales del aparato fotosintético de los organismos fotoautotróficos como los ya mencionados carotenoides y la cadena lateral de las clorofilas son isoprenoides. La mayoría de los isoprenoides presentes en las plantas actúan como metabolitos secundarios en la interacción de las plantas con su entorno. Algunos terpenos como los monoterpenos o los sesquiterpenos, desempeñan un importante papel en la defensa de la planta frente a patógenos y herbívoros. Algunos monoterpenos volátiles son los responsables de participar en la atracción de insectos para favorecer la polinización, siendo la acumulación de carotenoides en flores y frutos la responsable de la atracción de animales para la dispersión de las semillas (Croteau *et al.*, 2000; Cappell, 2002).

Se ha estudiado mucho sobre el pigmento de *B. orellana*, pero se sabe muy poco sobre sus proteínas de almacenamiento, y aún menos, sobre sus funciones biológicas, por lo cual el objetivo es caracterizar las proteínas de almacenamiento, evaluar las actividades antioxidantes y antitumorales de las proteínas de almacenamiento así como obtener péptidos y evaluar su efecto citotóxico en células transformadas de linfoma murino L5178Y, así como el efecto mitogénico en la proliferación celular en esplenocitos de bazo de ratón BALB/c.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Existen péptidos con actividad biológica en semillas de *Bixa orellana* que puedan prevenir o disminuir el crecimiento de células tumorales?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de péptidos bioactivos en semillas de *Bixa orellana* con actividad antioxidante, actividad citotóxica contra células cancerígenas y actividad inhibidora de crecimiento tumoral en ratones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antioxidante de las proteínas de almacenamiento presentes en las semillas de *Bixa orellana*.
2. Evaluar la actividad antitumoral de proteínas de almacenamiento de semillas de *Bixa orellana* en ratones BALB/c inoculados con linfoma murino L5178Y.
3. Obtener los péptidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de almacenamiento en semillas de *Bixa orellana*.
4. Evaluar el efecto citotóxico de los péptidos purificados por FPLC en las células transformadas de linfoma murino L5178Y.

JUSTIFICACIÓN

En estudios recientes se ha encontrado la presencia de proteínas y péptidos bioactivos en varios alimentos de origen natural que poseen efectos benéficos para la salud humana, con diferentes funciones biológicas sobre el organismo, tales como: antihipertensiva, hipocolesterolémica, antimicrobiana, antitrombótica, inmunomoduladora, antioxidante y anticancerígena.

Se tiene un amplio conocimiento referente a estos beneficios en especies como en *Amaranthus hypochondriacus*, *Theobroma cacao* y *Corydalis cava* entre otros, mostrando una inhibición de crecimientos tumorales.

Con estos conocimientos se plantea que en achiote (*Bixa orellana* L.), cuyas semillas poseen el pigmento bixina, un carotenoide de alto consumo en la dieta tradicional en nuestro país (México), sea una fuente probable de péptidos bioactivos, la cual podría evitar o disminuir el daño causado por los radicales libres y a su vez prevenir la aparición del cáncer.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

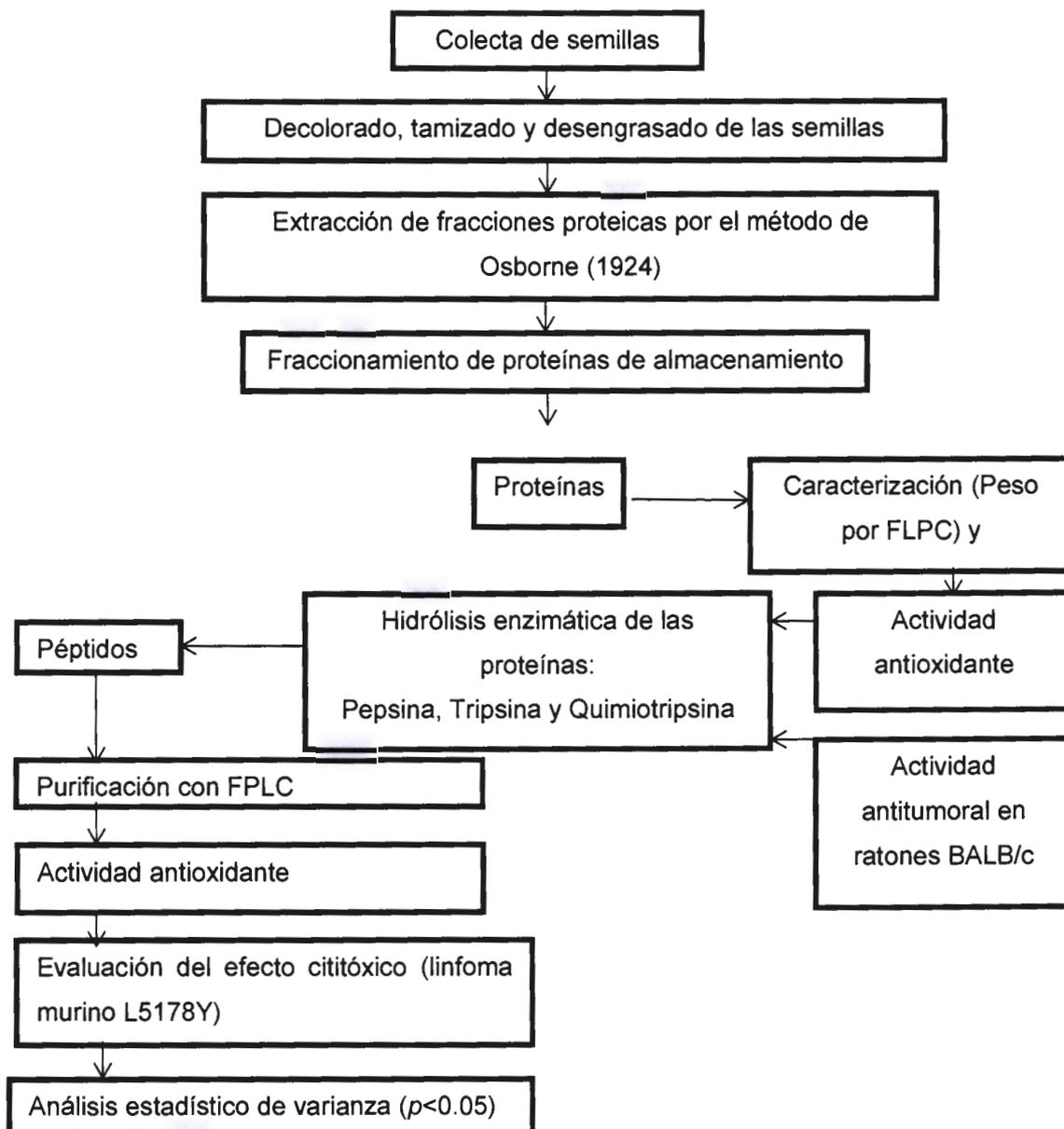


Figura 1.3. Extrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Agawa Y., Lee S., Ono S., Aoyagi H., Ohno M., Tanoguchi T., Anzai K. and Kirino Y. (1991). Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic-helical model peptides of various chain lengths. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 20218-20222.
- Alvírez Morales A., González-Martínez BE. and Jiménez-Salas Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 3, 3.
- Ávila A. (1983). Aspectos Analíticos del Estudio Realizado en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA). Aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica. CATIE, Turrialba, 29-30.
- Blanca H.L., Hsieh C.C. and Lumen B.O. (2009). Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*, 30, 426-430.
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. and Tomita M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 130-136.
- Bramley P.M. and Mackenzie A. (1988). Regulation of carotenoid biosynthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*, 29, 291-343.
- Busch M., Seuter A. and Hain R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128, 439-453.
- Chappell J. (2002). The genetic and molecular genetic of terpene and sterol origami. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 151-157.
- Clemente A. and Domoney C. (2006). Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman – Birk family. *Current Protein & Peptide Science*, 7, 201-216.
- Cheung H.S. and Cushman D. W. (1973). Inhibition of Homogeneous Angiotensin-

Converting Enzyme of Rabbit Lung by Synthetic Venom Peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochim Biophys Acta*, 293, 451-463.

Clare DA and Swaisgood HE. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-95.

Conafrut. (1976). Evaluación de tres variedades de achiote en suelo rojo – aciloso y pedregoso de Úxmal, Yuc. SARH. 35 p.

Correa P. (1931). *Diccionario das plantas Uteis do Brasil*. Ministerio da Agricultura. Rio de Janeiro, vol. 3

Cook JJ, Huang TF, Rucinsky B, Tuma RF, Williams JA. and Niewiarowski S. (1988). Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD peptide, *Circulation*, 78, 1248-1253.

Croteau R., Kutchan T. and Lewis (2000). Natural products (secondary metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Biologists, p 1250-1268.

Cudic M. and Otvos L.J. (2002). Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets*, pp. 101-106(6)

Chung K.Y. and Saltz L.B., (2007). Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future directions. *Cancer Treatment Reviews*, 13, 192-197.

Das Neves M. R. A., Campos T. and Márquez L. U. M. (2006). Modulação da Pressão Arterial por Hidrolisados Protéicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, III, 81-86.

Davalos A, Gomez-Cordoves C, Bartolome and B. Extending (2004). Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

Del Villar - Martínez AA., García-Saucedo PA., Carabez-Trejo A., Cruz-Hernández A. and Paredes-López O. (2005). Carotenogenic gene expresión and ultrastructural

changes during development in marigol. *Plants Physiology*, 162, 1042-1056.

Delascio F. (1985). *Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana*. Jardín botánico. División de Vegetación. Dirección de investigaciones biológicas. Caracas, 186 p.

Diehl Jones WL. and Askin DF. (2004). Nutritional modulation of neonatal outcomes. *AACN Clinical Issues*, 15, 83-96.

Drake C.G. and Antonarakis E.S., (2010). Update: immunological strategies for prostate cancer. *Current Urology Reports*, 11, 202-207.

Dogbo O., Laferrere A., D'Harlingue A. and Camara B. (1988). Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 85, 7054-7058.

Dziuba J., Niklewicz M., Iwaniak A., Darewicz M. and Minkiewicz P. (2005). Structural properties of bioactive animal protein fragments accessible for proteolytic enzymes. *Polimery*, 6, 424-429.

De Lumen B. O. (2005). Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutrition Reviews*, 63 , 16-21.

Espinosa E., Zamora P., Feliu J. and González Baron M. (2003). Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 515-523.

Farnaud S and Evans RW. (2003). Lactoferrina - a Multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395-405.

Fang E. F., Wong J. H., and Ng T. B. (2010). Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase activities from Korean large black soybeans. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 211-217.

-
- Ferlay J., Bray F., Pisani P. and Parkin D. M. (2000). Agencia internacional para la investigación del cáncer, unidad de epidemiología descriptiva. Globocan, versión 1.00.
- Ferreira S. H. (1965). A Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) Present in the Venom of *Bothrops jararaca*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 24, 163-169.
- Fraser F., Schuch P.D. and Bramley P.M. (2000). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts — partial purification and biochemical properties. Planta, 211, 361-369.
- Fraser P.D. and Bramley P.M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in Lipid Research, 43, 228-265.
- Fray R.G. and Grierson D. (1993). Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by tomato by sequencing, complementation and co-suppression. Plant Molecular Biology, 2, 589-602.
- Fredy leal and claret michelangeli de Clavijo (2010). Historia, botanica y usos de *Bixa orellana*. Horticultural Reviews, 39, 78-86.
- Field C.J. (2005). The immunological components of human milk and their effect on immune development of infants. The Journal of Nutrition, 135,1-4.
- Fitzgerald RJ and Meisel H. (2000). Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. British Journal of Nutrition, 84, S33-S37.
- Galvez AF, Chen N, Macasieb J and de Lumen BO (2001). Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. Cancer Research, 61, 7473-7478.
- Grimble G. K. (1994). The significance of peptides in clinical nutrition. Annual Review of Nutrition, 14, 419-447.
- González de Mejía E. and Vermont P. Dia (2010). The role of nutraceutical proteins and

peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis*, 29, 511-528.

Gauthier SF., Pouliot Y. and Saint-Sauveur D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1315-1323.

Gatti L. and Zunino F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods in Molecular Medicine*, 111, 127-148.

Graszkievicz A, Zelazko M, Trziszka T and Polanowski A. (2007). Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 195-199.

Giorio G., Stigliani A.L. and D'Ambrosio C. (2008). Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)-new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *Febs*, 275-535.

Gibbs BF, Zougman A, Masse R and Mulligan C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food research international*, 37, 123-131.

Giuliano G, Rosati C and Bramley PM (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnology*, 21, 513-516.

Gobetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A and Di Cagno R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 223-239.

Goodman M.T., Wilkens L.R., Hankin J.H. Li-Ching Lyu, Anna H., Laurence N. and Kolonel (1997). Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *American Journal of Epidemiology*, 146, 294-306.

Henson S, Masakure O., and Cranfield J. (2008). The propensity for consumers to offset health risks through the use of functional foods and nutraceuticals: The case of lycopene. *Food Quality and Preference*, 19, 395-406.

-
- Hernandez-Ledesma B, Hsieh C.C., and de Lumen B.O. (2009). Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*, 30, 426-430.
- Hernández-Ledesma B, Hsieh C.C., and de Lumen B.O. (2013). Lunasin, a Seed Peptide with Promising Cancer Preventive Properties, *Bentham Science Publishers*, 20, 4.
- Hirschberg J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 210-218.
- Huang D, O. B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA., and Prior RL (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4437-4444.
- Holst B., and Williamson G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 73-82.
- Hsieh C.C, Hernández-Ledesma B., and de Lumen B.O. (2010). Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to aspirin-arrested cell cycle and induced-apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 186, 127-134.
- Jacobsen BK., Knutsen SF. and Fraser GE (1998). Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes & Control*, 9, 553-557.
- Inagaki K., Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y., Fukuda Y. and Yagyu T. (2005). Suppression of urokinase expression and invasion by a soybean Kunitz trypsin inhibitor are mediated through inhibition of Src-dependent signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 31428-31437.
- Jablonowski D. and Schaffrath R. (2007). Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1533-1537.
- Jacobsen BK, Knutsen SF, and Fraser GE (1998). Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes & Control*, 9, 553-557.

Jetta Fuzy. (2002). Guia de tecnicas para asistentes de enfermería, Hartman Publishing Inc, 163 .

Galvez AF, Chen N, Macasieb J. and de Lumen BO (2001). Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research*, 61, 7473-7478.

Jeong HJ, Park JH, Lam Y. and de Lumen BO (2003). Characterization of lunasin isolated from soybean. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7901-7906.

Jeong JB., Jeong HJ., Park JH., Lee SH., Lee JR., Lee HK., Chung GY., Choi JD. and de Lumen BO (2007). Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10707-10713.

Juárez Morales R. and Chacon E. (1998). Estudio preliminar del cultivo del achiote (*Bixa Orellana* L) en tabasco. XI Reunión científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Tabasco 98, 159-163.

Jung W., Mendis E., Je J.Y., Park P.-J., Son W. B., Kim C. H., Choi K. Y. and Kim S.K. (2006). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94, 26-32.

Kerstetter J. E., O'Brien K. O., Caseria D.M, Wall D. E. and Insogna, K. L (2005). The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metablism*, 90, 26-31.

Kitts DD, Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309- 1323.

Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. and Angiotensin I. (2001). Converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2992-2997.

-
- Kobayashi H., Suzuki M., Kanayama N., and Terao T. (2004). A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clinical & Experimental Metastasis*, 21, 159-166.
- Korhonen H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 79-88.
- Korhonen H. and Pihlanto A. (2003). Food derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-308.
- Korhonen H. and Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. Review. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Kovacs-Nolan J, Phillips M. and Mine Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8421-8431.
- Kuba M., Kumi T., Tawata S., Takeda Y. and Yasuda M. (2003). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolate from Tofuyo Fermented Soybean Food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(6), 1278-1283.
- Kunitz M. (1945). Cystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101, 668-669.
- Lee N.Y., Cheng J.T., Enomoto T. and Nakamura I. (2006). The antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide containing in bovine lactoferrin. *Chinese Journal of Physiology*, 49(2), 67-73.
- Lee M.M., Gomez S.L. and Chang J.S. (2003). Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 12, 665-668.
- León J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. Instituto interamericano de cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica, 522p.
- Lonnerdal B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *American Society for Clinical Nutrition*, 77, 1537S-1543S.

-
- Losso J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman–Birk inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 94-118.
- Malaspina A. (1996). Funtional foods: Overview and introduction. *Nutrition reviews* 54.
- Martinez Augustin O. and Martinez de Victoria M. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 2, 1-14.
- Misawa N., Truesdale M.R., Sandman G., Fraser P.D., Bird C., Schuch W. and Bramley P.M. (1994). Expresion of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in *Escherichia coli*, phytoene formation in vivo and in vitro, and functional analsis of the various truncated gene products. *Journal of Biochemistry*, 116, 980-985.
- Marshal K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Matsui T, Yuki Yoshi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H. and Matsumoto K. (2002). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 80-86.
- Meykens F. L. (2001). Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. *Cancer prevention-molecular mechanisms to clinical applications. Annals of the New York Academy of Sciences*, 952, 116-123.
- Mazoyer E, Levy-Toledano S, Rendu F, Hermant L, Lu H. and Fiat AM. (1990). KRDS, A new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *European Journal of Biochemistry*, 194, 43-49.
- McCue P. and Shetty K. (2004). Health benefi ts of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 361-367.
- Megías C., Yust M. M., Pedroche J., Lquari, H., Girón-Calle J., Alaiz M., Millán F. and Vioque J. (2004). Purificationof an ACE Inhibitory peptide after dydrolysis of

-
- sunflower (*Helianthus annuus* L.) proetin isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1928-1932.
- Mercadante AZ. and Pfander H. (1998). Carotenoids from annatto: a review. The Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2, 79-91.
- Meisel H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. International Dairy Journal 8, 363-373.
- Meisel H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. Biofactors, 21, 55-61.
- Miguel M., Aleixandre A. M., Ramos M. and López-Fandiño R. (2006). Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 726-731.
- Messina M. and Barnes S. (1991). The role of soy products in reducing the risk of cancer. Journal of the National Cancer Institute, 83, 541-546.
- Meyskens F.L. (2001). Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. Annals of the New York Academy of Sciences, 952, 116-123.
- Miyashita M., Akamatsu M., Ueno H., Nakagawa Y., Nishimura K. and Hayashi Y. (1999). Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 63, 1684-1690.
- Morrison E. and West M. (1985). The effect of *Bixa orellana* (annatto) on blood sugar levels in the anaestherized dog. Jamaica. West Indian medical journal, 1, 34-38.
- Nagaoka S., Miwa K., Eto M., Kuzuya Y., Hori G. and Yamamoto K. (1999). Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. The Journal of Nutrition, 129, 1725-1730.
- Nakagomi K., Yamada R., Ebisu H., Sadakane Y., Akizawa T. and Tanimura T. (2000).

Isolation of Casein-2, a Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from a Tryptic Hydrolysate of Human Plasma. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 467, 235-238.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. and Takano T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science* 78, 777-783.

Narváez ZJ. (2001). Estudios moleculares de genes involucrados con la biosíntesis de isoprenoides en *Bixa orellana* L. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán

Norma L. Rodríguez-Ávila, José A. Narváez-Zapata, Margarita Aguilar-Espinosa and Renata Rivera-Madrid (2011). Regulation of Pigment-Related Genes During Flower and Fruit Development of *Bixa orellana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 43-50.

Naumov Gn, Towson JI, Macdonald Ic, Wilson Sm, BramwellVh, Groom Ac. and ChmbersAf. (2003). Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing. *Breast Cancer Research and Treatment*, 82, 199-206.

Orsi N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 7, 189-96.

Percival S., Chin S, Mallak C., Lounds-Singleton A. and Pettit-Moore J. (2006). Neoplastic Transformation of BALB/3T3 Cells and Cell Cycle of HL-60 Cells are Inhibited by Mango (*Mangifera indica* L.) Juice and Mango Juice Extracts. *The Journal of Nutrition*, 136, 1300-1304.

Pihlanto-Leppala A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *trends in Food Science & technology*, 11, 347-56.

Pihlanto A. and Korhonen H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in food and nutrition research*, 47, 175-276.

-
- Robinson D. and Hinz, G. (1999). Golgi-mediated transport of seed storage proteins. *Seed Science Research*, 9, 267-283
- Rodrigo MJ., Marcos JF. and Zacarías LI. (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during Fruit Development and Maturation. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6724-6731.
- Ruiz H. (1998). The journals of Hipólito Ruiz, Spanish botanist in Peru and Chile 1777-1788. Oregon, Timber Press, Portland, 1, 357
- Robert PR. and Zaloga GP. (1994) Dietary bioactive peptides. *New Horizons*. 2, 237-43.
- Rutherford-Markwick KJ. and Moughan PJ. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88, 955-966.
- Saito T., Sato H., Virgona N., Hagiwara H., Kashiwagi K., Suzuki K., Ryuji Asano and Tomohiro Yano (2007). Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer Letters*, 253, 249-257.
- Santi M. Mandal, Ludovico Migliolo, Subhasis Das, Mahitosh Mandal, Octavio L. Franco and Tapas K. Hazra (2012). Identification and Characterization of a Bactericidal and Proapoptotic Peptide From *Cycas revoluta* Seeds With DNA Binding Properties. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 184-193.
- Sanchez M. 1965. El achiote. *Agricultura trop*, 21, 224-227.
- Santos A. and Marquina D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology Research*, 150, 2527-2534.
- Sausville EA., J. IJ., Cragg GM. and Decker S. (2001): Cancer drug discovery and development: new paradigms for a new millennium. In anticancer agents edited by: ACS symposium Series, 796,1-15.
- Schmitzova J., Klaudivy J., Albert S., Schroder W., Schreckengost W. and Hanes J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54,1020-1030.
- Schmitt M.J.and Breinig F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection *Nature Reviews Microbiology*, 4, 212-221.
- Shahidi A. and Zhong B. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91, 914-31.

-
- Shebuski R.J., Berry DE., Romoff R., Storer BL., Ali F. and Samanen J. (1989). Demonstration of Ac-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ as an antiaggregatory agent in the dog by intracoronary administration. *Thromb Haemostasis*, 61, 183-188.
- Smith N., Williams J., Plucknett D. and Talbot J. (1992). *Tropical Forest and their Crops*. Book: *Tropical forests and their crops*, 581 pp.
- Sirtori CR., Lovati MR., Manzoni C., Monetti M., Pazzucconi F. and Gatti EJ. (1995). Soy and cholesterol reduction. Clinical experience. *American Institute of Nutrition*, 125, 598S-605S.
- Schultes R. and raffauf R. (1990). *The healing forest*. Dioscorides press. Portland. Oregon, 484p.
- Tironi VA. and A MC. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43, 315-322.
- Torruco Uco J.G., Domínguez Magaña M.A., Dávila Ortíz G., Martínez Ayala A., Chel Guerrero L.A. and Betancur Ancona D.A. (2008). Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 158-168.
- Vasudevan, Sreekumari S, Kannan and Vaidyanantha (2012). *Texto de Bioquímica para Estudiantes de Medicina / Text of Biochemistry for Medical Students*. Sexta edición, jaypee-highlights, medical publishers, inc, Cuellar Ayala, p 27.
- Venereo JR. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*, 31, 126-133.
- Vermeirssen V., Van Camp J. and Verstraete W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.
- Victor W. Ho, Kelvin Leung, Anderson Hsu, Beryl Luk, June Lai, Sung Yuan Shen, Andrew I. Minchinton, Dawn Waterhouse, Marcel B. Bally, Wendy Lin, Brad H. Nelson, Laura M. Sly, and Gerald Krystal (2011). A Low Carbohydrate, High Protein Diet Slows Tumor Growth and Prevents Cancer Initiation. *Cancer Research*, 71(13), 4484-4493.
- Vioque J., S-V. R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J. and Millán F. (1999). Purification and Partial Characterization of Chickpea 2S Albumin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1405-1409.

-
- Von Hofe E., Newberne P.M. and Kennedy A.R. (1991). Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*, 12, 2147-2150.
- Xue Z.H., Liu Z.W., Wu M.C., Zhuang S.W. and Yu W.C. (2010). Effect of rapeseed peptide on DNA damage and apoptosis in Hela cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 519–523.
- Walter Heldt H. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, 354 p.
- Walter Heldt H. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, 358 p.
- Walter Heldt H. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, 354 p.
- Wang W. and González de Mejía E. (2005). A new Frontier in Soy Bioactive 11 Peptides that May Prevent Age-Related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78.
- Wilber V. and Rodriguez-Amaya D. (1992). Quantificacao dos carotenoides de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) por cromatografia líquida de alta eficiencia (CLAE). *Rev.Bras. Cor. Nat*, 1(1), 145-152.
- Yamamoto N., Ejiri M. and Mizuno S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1345-55.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Se colectó semilla de *Bixa orellana* de la plantación de la “Extra” situada en la población de Chicxulub Pueblo, en el estado de Yucatán.

Las semillas de *B. orellana* se molieron con ayuda de un molino eléctrico (Thomas Scientific 800-345) y se desengrasaron mediante extracción con éter de petróleo (CTR Scientific) a 34 °C durante 24 h, empleando un equipo Soxhlet. La harina resultante se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente fue cribada a través de una malla de aproximadamente 100 µm, para obtener una harina fina y posteriormente se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

2.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana*

El análisis bromatológico fue determinado para cuantificar la concentración de proteínas usando las semillas enteras de *B. orellana*, decoloradas con metanol al 96% a 65 °C durante 48 h, empleando un equipo Soxhlet y posteriormente dejando secar en una campana de extracción a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron enviados 300 g de las semilla a la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, en el área de Química Analítica del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en. Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., unidad Guadalajara). Empleando el método oficial para análisis bromatológico (Official Methods of Analysis, 1990).

2.3. EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE RESERVA Y FRACCIONAMIENTO DE ALBÚMINAS, GLOBULINAS Y GLUTELINAS

Las extracciones se llevaron a cabo por solubilidad para cada fracción proteica por el método de Osborne (1924) y con modificaciones de Grisel (2001) y Robeiro para globulinas totales (2004).

La extracción de las proteínas de almacenamiento se realizó a partir de la harina de achiote, previamente almacenada, con las siguientes condiciones: se tomó en una relación de 1:10 p/v la fracción de albúminas que fue obtenida usando agua destilada como agente extractor, después la disolución se agitó con ayuda de un agitador magnético durante 4 horas a 4 °C, se centrifugó a 11,000 g durante 15 min, el sobrenadante se colectó para análisis posteriores y la pastilla resultante se usó para obtener las globulinas 7S y globulinas 11S, se resuspendió en NaCl 0.1M; K₂HPO₄ 10 mM; EDTA 1 mM a pH de 7.5, agitado y centrifugado como se mencionó anteriormente, la pastilla resultante se resuspendió en NaCl 0.8 M; K₂HPO₄ 10 mM; EDTA 1 mM, a pH 7.5 y está fracción es llamada globulina 11S; la pastilla resultante se resuspendió en isopropanol al 70% se agitó y centrifugó en las condiciones antes mencionadas, esta fracción corresponde a la prolamina y la fracción de glutelinas se extrajo con NaOH 0.1 M, en cada fase de extracción se lavó la pastilla con agua destilada a 4 °C y se centrifugó a 11,000 g a 4 °C 5 min y se desechó el sobrenadante (Morales *et al.*, 2001). Los extractos proteicos fueron congelados para su posterior análisis y liofilizados para tratamiento oral en ratones BALB/c.

2.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para la determinación del contenido proteico se empleó el método de Bradford (Sigma-Aldrich N° B6916); se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (Bradford., 1976).

2.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

Después de obtener las cuatro proteínas de almacenamiento: albúmina, globulinas tipo 7 y 11S y glutelina por el método de Osborne (1924), éstas fueron congeladas y liofilizadas para posteriormente guardar alícuotas en viales de 1 g cada muestra y enviadas al Laboratorio de Proteínas de la Coordinación de Nutrición del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. donde se determinó su composición de aminoácidos por el método de combustión para proteínas crudas (Leco FP 528, Met. 990.03, Vázquez *et al.*, 1995) y así obtener la composición de aminoácidos (g/100 g proteína) de las fracciones proteicas.

2.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE *Bixa orellana* POR FPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS, CLRP)

La caracterización de las fracciones proteicas provenientes de la extracción de las semillas de *B. orellana*, fueron por patrones cromatográficos, así como la separación y purificación de proteínas se llevó a cabo mediante FPLC (Akta purified GE Healthcare), equipada con una columna de exclusión por tamaño Superdex (200 Hiloal 16/60 con un rango de exclusión de 10-600 kDa); se usaron como fases móviles tres diferentes amortiguadores, uno para albúminas que consistió en 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4 a 18 °C, para globulinas 20 mM Tris-HCl, 10% de NaCl pH 7.5 y para glutelinas 25 mM NaOH, 150 mM de NaCl sin ajustar el pH, el flujo fue de 1 mL/min. Con una unidad con detector UV a 280 nm y un colector de fracciones. La adquisición de los datos se llevó a cabo mediante el uso del software UNICORN 5.11. La columna se calibró usando un kit de estándares de peso molecular (Aldrich Sigma, MW-GF-1000).

2.7. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE *Bixa orellana*

La electroforesis SDS-PAGE fue utilizada para la identificación de proteínas e hidrolizados de proteínas producidos a lo largo de la cinética enzimática, así como las fracciones de elución obtenidas por cromatografía de exclusión por FPLC. Los pesos moleculares de hidrolizados serán calculados usando estándares BioRad catálogo 161-0317 para proteínas y 161-0317 para polipéptidos de diferentes pesos moleculares (Schagger y Von, 1987; Laemli *et al.*, 1960).

2.8. ACTIVIDAD ANTITUMORAL SOBRE EL MODELO DE LINFOMA MURINO L5178Y EN RATONES BALB/c

El modelo murino fue empleado para evaluar si la administración oral de fracciones proteicas de *B. orellana* protegen contra el desarrollo de cáncer como pruebas de actividad antitumoral *in vivo* en ratones BALB/c. Utilizando la línea celular de linfoma murino L5178Y, la cual deriva de tumor estirpe tímica (haplotipo H-2d) inducido en ratones DBA/2 mediante tratamiento con metilcolantreno, adaptado a forma ascítica, manteniéndole mediante trasplante intraperitoneal semanal de 10×10^6 células/mL en ratones singénicos BALB/c; el tumor es de alta malignidad ya que con 2×10^7 células inoculadas por vía intraperitoneal (i.p.) mata a los ratones en 15 a 17 días (Beer *et al.*, 1983.; Reynoso *et al.*, 2008).

El modelo murino de linfoma L5178Y se describe en la Figura 2.1 donde 8 días antes de la inoculación se les administra las proteínas de almacenamiento al día 0, los ratones BALB/c fueron inoculados por i.p. con 0.1 mL de disolución fresca de fluido ascítico (células de linfoma 2×10^6 células/mL/ratón) suspendidas en disolución fisiológica NaCl 0.9% (p/v) de uso farmacéutico. Después de 24 h, los ratones fueron divididos en 4 grupos de 5 ratones. El grupo control con linfoma murino sólo se les administró 0.1 mL de disolución fisiológica cada día, mientras que otros 3 grupos fueron tratados con extractos crudos proteicos liofilizados de las fracciones albúmina, globulinas totales y glutelinas; las prolaminas fueron descartadas por su bajo contenido proteico, con dosis de 0.1 mL oral no letal de 25 mg/kg/día disueltas en disolución fisiológica. Al día 17, los ratones fueron

heparinizados (0.1 mL heparina 1,000 UI, Laboratorios Pisa) 30 minutos antes de su sacrificio y anestesiados por inhalación con éter etílico y eutanizados para la recuperación del fluido ascítico para sus estudios.



Figura 2.1. Metodología de evaluación tumoral de linfoma murino L5178Y de proteínas de reserva de semillas en *Bixa orellana*.

2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE LOS MÉTODOS ABTS Y ORAC

La actividad antioxidante fue determinada mediante la evaluación de la capacidad atrapadora de los radicales libres, usando ABTS y APPH como radicales libres (Prior *et al.*, 2005). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.9.1. MÉTODO DEL RADICAL CATIONICO ABTS^{•+}

Este método se basa en la capacidad de un antioxidante para atrapar el catión ABTS. En este ensayo, el ABTS es oxidado por los radicales peróxido u otros oxidantes, el cual posee un intenso color azul-verdoso, la medición se basa en la disminución del color, que reacciona directamente con el radical ABTS, donde los resultados de la prueba se expresan en equivalentes de Trolox (Prior *et al.*, 2005). Se preparó una disolución 7 mM de ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiozoline-6-sulphonic acid diammonium salt) [Sigma-Aldrich N° 11565] en presencia de persulfato de potasio 2.4 mM, 1:1, la mezcla de reacción se mantuvo a 16 horas a temperatura ambiente, protegida de la luz, al cabo de las cuales se diluyó en amortiguador de fosfatos 0.1 mM pH 7.4 en relación 1:45 v/v, hasta dar una absorbancia de 0.7 ± 0.001 a una longitud de onda de 734 nm. El método requiere de microplacas de 96 pocillos, donde se colocó 20 μ L de muestra y 0.2 mL de la disolución del catión ABTS, por triplicado, a temperatura ambiente, la lectura se tomó a tiempo cero y una última lectura a los 6 minutos. La capacidad para atrapar el catión ABTS se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox entre mg de muestra; se usa Trolox (\pm -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) [Sigma-Aldrich N° 238813] para realizar la curva estándar (Prior *et al.*, 2005).

2.9.2. MÉTODO DEL RADICAL OXÍGENO USANDO FLUORESCEÍNA (ORAC-FL)

El método de ORAC-FL mide la inhibición del radical peróxido reflejando la clásica reacción antioxidante por medio de la transferencia del átomo H. El radical peróxido reacciona con la sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente, lo cual puede ser fácilmente cuantificado por fluorescencia. La actividad antioxidante es determinada por la disminución de la fluorescencia a través del tiempo. Esta actividad antioxidante es expresada en equivalentes de Trolox sobre mg de muestra (TEAC/mg de muestra). Se preparó una disolución de amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4 (200 μ L), se preparó una disolución de fluoresceína a una concentración final de 70 nM (120 μ L), se colocó en la microplaca y se incubó a 37 °C durante 15 minutos, se colocaron 60 μ L de disolución de APPH (2,2'-Azo-bis (2-metilpropionamida) diclorhidrato) [Sigma-Aldrich N° 440914] 12 mM y se colocó dentro del lector, la lectura fue tomada a lo largo de 100 minutos, la excitación del fluorómetro [TECAN, serie Infinite® 200 PRO] fue de 485 nm y un filtro de emisión de 538 nm a 37 °C. La curva de calibración a base de Trolox consistió en las siguientes concentraciones de 10-80 μ M, usando como blanco amortiguador de fosfatos Ph 7.4. Los datos fueron normalizados usando los datos del mismo ensayo multiplicando el dato original por el blanco de fluorescencia entre la muestra de fluorescencia y a partir de ahí se calculó el área bajo la curva AUC, esta fue calculada por la siguiente ecuación:

$$AUC = 1 + \sum f_i/f_0.$$

Donde f_0 es la fluorescencia inicial obtenida a tiempo cero y f_i es la fluorescencia obtenida a un determinado tiempo. El área bajo la curva neta se calcula restando el AUC del blanco a cada una de las muestras, los resultados fueron calculados a partir de la curva de calibración a base de Trolox (Prior *et al.*, 2005; Dávalos *et al.*, 2004).

2.10. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SECUENCIAL DE LA FRACCIÓN ALBÚMINA USANDO PEPSINA, TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA

Las fracciones proteicas obtenidas fueron hidrolizadas mediante tratamiento secuencial, usando un reactor de hidrólisis equipado con un agitador, termómetro y electrodo de pH. La digestión de la proteína se realizó con pepsina, tripsina y quimiotripsina. Para hidrolizar la proteína primero se mantuvo la muestra en un amortiguador de HCl 0.02M pH 1.5 y la enzima pepsina fue disuelta en un amortiguador de HCl 1 mM a temperatura de 37 °C con una proporción enzima/sustrato de 1:50 durante un periodo de tiempo determinado hasta encontrar el mejor tiempo de hidrolisis, enseguida se ajustó el pH a 7.5 con NaHCO₃ 0.9M para el tratamiento enzimático con tripsina que fue resuspendida con Tris-HCl 0.02 M pH 7.5 con una concentración enzima/sustrato de 50:1 y se agregó al biorreactor con las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta un tiempo determinado, posteriormente se ajustó el pH a 8 para la enzima quimiotripsina (fue resuspendida con acetato de amonio 0.02 M) con una concentración enzima/sustrato de 50:1 durante un tiempo determinado. En cada fase se tomaron alícuotas durante 180 minutos desactivando la enzima a 95 °C por 5 minutos posteriormente se enfrió a 4 °C y se centrifugó a 10,000 g [Eppendorf, Serie: 5415R] durante 5 minutos posteriormente se tomó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se congeló hasta su uso.

2.11. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis fue determinado con el porcentaje de enlaces peptídicos rotos. Para determinarlo en los hidrolizados de las fracciones proteicas se usó el método del ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) [Sigma-Aldrich N° P2297], con el cual se conoció la concentración de los grupos de aminoácidos primarios generados durante la hidrólisis. Este método se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo formado durante la reacción del TNBS con las aminas primarias de los aminoácidos generados bajo condiciones alcalinas y detenida mediante la disminución del pH (Alder, 1979).

2.12. FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR FPLC

Los hidrolizados de proteínas fueron purificadas mediante el sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés) [ÄKTA purifier, de GE Healthcare N° 28-4062-71], empleado una columna superdex de exclusión por tamaño G754 HR 10/300 GL con un rango de exclusión de 3-70 kDa, las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm (tamaño de poro) corrieron en amortiguador de Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 nM a pH 7.8 siendo inyectada la muestra al sistema con 500 µL con un flujo de 0.5 mL/min, la corrida fue monitoreada con un detector de ultravioleta a 280 nm y un colector de fracciones. La adquisición de los datos así como su procesamiento fue llevado a cabo empleando el software UNICORN™ 5.11 (GE Healthcare).

2.13. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS SOBRE CÉLULAS TRANSFORMADAS (LINFOMA MURINO L5178Y)

De cada fracción purificada proveniente del FPLC, se prepararon 3 diluciones seriadas utilizando la máxima concentración de 10 µg/mL y la menor de 2.5 µg/mL. Para evaluar la actividad citotóxica, se hicieron cultivos celulares en ausencia (controles) y en presencia de diferentes concentraciones de cada fracción peptídica de los hidrolizados sucesivos de la proteína de reserva albúmina de *B. orellana*.

Primeramente se tomó un ratón BALB/c inoculado con linfoma murino L5178Y, el cual fue sacrificado por medio del uso de éter etílico, posteriormente a este le fue extraído el linfoma usando una jeringa para insulina de calibre 27, el linfoma fue lavado con 3 mililitros de disolución salina fisiológica (0.9%), centrifugado a 1,500 rpm, 5 minutos, dos veces, posteriormente se lavó con Ficoll-Paque PREMIUM [GE Healthcare N° 17544203] con 0% de citotoxicidad, tomando 3 mL y se centrifugaron a 1,250 rpm a 25 minutos, se tomó el anillo formado de células, posteriormente se colocaron 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con aminoácidos, se realizó un conteo celular usando la técnica de azul de tripano en cámara de Neubauer, contando 5 cuadrantes, posteriormente se colocó en una microplaca de 96 pocillos estéril, las muestras controles negativos y positivos en orden descendiente se usó en las siguientes concentraciones de trabajo de las muestras del hidrolizado sucesivo: 10, 5 y 2.5 µg/mL disueltas en amortiguador estéril PBS (amortiguador de fosfato de potasio), pH 7.4. Los controles consistieron en medio de cultivo, medio de cultivo y células de linfoma murino L5178Y, a cada pozo se le añadió 20 µL de muestra, 130 µL de medio de cultivo RPMI suplementado y 50 µL de células de linfoma murino L5178Y. Después la microplaca se incubó a 37 °C por 24 horas en una incubadora con ambiente de CO₂ al 5%.

El método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) [Life Technologies N° M-6494] adicionando a cada pozo 50 µL de MTT (2 mg/mL en PBS pH 7.4 estéril), enseguida el cultivo fue incubado por 4 h a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% CO₂ y 95% aire. Al finalizar, el periodo de incubación fue centrifugado a 3,500 rpm durante 10 min, retirando con esto el sobrenadante con ayuda de una micropipeta con mucho cuidado sin tocar las células precipitadas, para finalizar se adicionó 200 µL/pozo de

DMSO (dimetilsulfóxido) [Sigma-Aldrich N° 472301], se mezcló y esperó 5 min para posteriormente leer la microplaca a 510 nm en un lector de microplaca (Biorad Laboratories). El porcentaje de citotoxicidad (Mosmann 1983, Puebla *et al.*, 1998) fue calculado empleando la siguiente ecuación:

$$\text{(\% Citotoxicidad)} = [1 - (\text{DO}_{510\text{nm}}\text{muestra}/\text{DO}_{510\text{nm}}\text{control de células})]$$

2.14. EFECTO DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS SOBRE ESPLENOCITOS DE RATÓN BALB/c

Primeramente se tomó un ratón BALB/c sano, el cual fue sacrificado por medio del uso de éter etílico, posteriormente a este ratón BALB/c, se le extrajo el bazo, realizando una incisión en el costado izquierdo, recibiendo el bazo en un vial estéril, el cual tenía 1 mL de disolución salina fisiológica, posteriormente se colocó 1 mL de medio RPMI suplementado con aminoácidos y se procedió a homogeneizar, recuperando el líquido, este paso se realizó 5 veces, (si el homogenizador es manual) posteriormente se lavó con 3 mL de medio RPMI, se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos dos veces, posteriormente se hizo un lavado con ficoll con 3 mL y se centrifugó a 1250 rpm 25 minutos, a partir de aquí se tomó el anillo formado por las células, se colocó 3 mL de medio RPMI suplementado con aminoácidos y se colocó en cada pocillo 2×10^5 células por pozo, donde primeramente se realizó un conteo celular usando la técnica de azul de tripano en cámara de Neubauer, contando 5 cuadrantes, posteriormente se colocó en una placa de 96 pocillos muestras de los controles negativos y positivos. Los controles consistieron en medio de cultivo, y células provenientes del bazo, se usó como control positivo concanavalina A (Sigma Aldrich) como agente mitógeno a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 μL), en cada pozo se colocaron 20 μL de muestra, 130 μL de medio de cultivo RPMI suplementado y 50 μL de células provenientes del bazo. Las concentraciones de trabajo de las muestras del hidrolizado sucesivo fueron a 15, 10, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disueltas en amortiguador PBS pH 7.4. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C por 48 horas y posteriormente se determinó el porcentaje de proliferación (Mosmann, 1983, Puebla *et al.*, 1998).

$$\text{\% proliferación} = \frac{(\text{DO}_{510\text{nm}} \text{ muestra} - \text{DO}_{510\text{nm}} \text{ control de células})}{(\text{DO}_{510\text{nm}} \text{ mitógeno} - \text{DO}_{510\text{nm}} \text{ control de células})} \times 100$$

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson N. J. and Reynolds E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme and microbial technology*, 19, 202.
- Alder-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27 (6), 1256–1262.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Billings P.C., and Habres, J.M. (1992). A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 89, 3120-3124.
- Beer J.Z., E. Budzicka Elżbieta Niepokojczycka, Olgierd Rosiek, Irena Szumiel and Malgorzata Walicka (1982). Loss of Tumorigenicity during *in vitro* Growth of L5178Y Murine Lymphoma Cell. *Cancer research*, 43, 4736-4742.
- Cordoba V., and J. A. (1987). "El Achiote: cultivo, Benéfico y posibilidades de exportación". En: revista ESSO Agrícola. 34. (1), 3-7.
- Dai Q., Adrian A. Franke, Herbert Yu, Xiao-ou Shu, Fan Jin, James R. Hebert, Laurie J. Custer, Yu-Tang Gao and Wei Zheng (2003). Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 497-502.
- Grisel Y., Morales-Arellano, Alicia Chagolla-López, Octavio Paredes-López and Ana P. Barba de la Rosa (2001). Characterization of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) Proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1512-1516.
- Jaramillo Moreno, C. A., and Muñoz Moreno, O. A. (1992). Extracción de colorante de

Achiote. Trabajo de grado (ingeniero Químico). Medellín: Universidad Nacional. Facultad nacional de minas. Departamento de procesos químicos.

Jacqmain M, Doucet E, and Despres J-P (2003). Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1448-1452.

Lowry OJ, R NJ, Farr AL, and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin - phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 191, 265-275.

Laemmli U. K. (1960). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* 227, 680:685.

Kennedy A.R. (1998a). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *The American journal of clinical nutrition*, 68, 1406S-1412S.

Kennedy A.R. (1998b). Chemopreventive agents: Protease inhibitors. *Pharmacol. Therapeut*, 78, 167-209.

Kennedy A.R., Y. Beazer-Barclay, Kenneth W. Kinzler, P. M. and Newberne (1996). Suppression of carcinogenesis in the intestines of min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer Research*, 56, 679-682.

Klassen R, Teichert S, and Meinhardt F. (2004). Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Molecular microbiology*, 53, 263-273.

Morales Arellano, D.J. (2001). Estudio hidrosedimentológico de la cuenca del Rio Pastaza y la cuenca del rio Paute. Graduación, UCE - Universidad Central del Ecuador, Quito (Ecuador).

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Moyad MA. (1999). Soy, disease prevention, and prostate cancer. *Seminars in urologic*

oncology. 17, 97-102.

Osborne T. B. (1924). The vegetable proteins. In Monographs in Biochemistry, 2nd ed.; Longmans, Green: New York.

Official methods of analysis (1990). Association of official analytical chemists. 15 th Edition, Volume I. A.O.A.C. Metodo 986.25 Carbohydrates, Determination by difference proximate analysis.

Peterson G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et.al.which is more generally applicable. Analytical Biochemistry. 83, 346-356.

Prior R.L., Wu X. and Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290-4303.

Pollard M. and Wolter W. (2000). Prevention of spontaneous prostate-related cancer in Lobund-Wistars rats by a soy protein isolate/ iso-flavone diet. Prostate, 45, 101-105.

Puebla perez A., G. Rodríguez-Orozco, M. M. Villaseñor-García, M. L. Miranda-Beltrán, A. Celis, and L. Sandoval-Ramírez (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extracts in Mice with L5178Y Lymphoma. Phytotherapy Research, 12: 545-548.

Reynoso Orozco R., J. I. delgado Saucedo, A.M. Puebla-Pérez, C. Calvo-Méndez, D. Carr, S. Velázquez-Magaña and A. Santerre (2008). Difluorometil ornitina y el extracto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178Y en ratones BALB/c: comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. Revista de salud animal, 30(2): 128-132.

Ribeiro A. C., A. R. Teixeira, and R. B. Ferreira (2004). Characterization of Globulins from Common Vetch (*Vicia sativa* L.). Journal Agricultural and Food Chemistry, 52: 4913-4920.

Schagger H. and von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical biochemistry, 166, 368-379.

St. Clair, W.H., Billings, P.C. and Carew, A.J. (1990). Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. Cancer Research, 50, 580-586.

Yamamoto S., Tomotaka Sobue, Minatsu Kobayashi, Satoshi Sasaki and Shoichiro Tsugane (2003). Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. Journal of the National Cancer Institute, 95, 906-913.

Yavelow J., Collins, M., Birk, Y. Satoshi Sasaki and Shoichiro Tsugane (1985). Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 5395-5399.

Vázquez-Ortiz F.A., Caire G., Higuera-Ciapara I. and Hernández G. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. Journal of Liquid Chromatography, 18(19), 2059-2068.

Witschi H. and Kennedy A.R. (1989). Modulation of lung-tumor development in mice with the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. Carcinogenesis, 10, 2275-2277.

Wu A.H., Ziegler R.G., Nomura, A.M. D W West, L N Kolonel, P L Horn-Ross, R N Hoover, and M C Pike (1998). Soy intake and risk of breast cancer in Asian and Asian-Americans. The American journal of clinical nutrition, 68, 1437S-1444S.

Zhang, Lili., Steven Wan, Jeremiah J. Donahue, Jeffrey H. Ware and Ann R. Kennedy (1999). Effects of the Bowman- Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation induced cytotoxicity in human breast, cervical, and head and neck cancer cells. Nutrition Cancer, 33, 165-173

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y MOLIENDA

La producción de semillas de la planta *B. orellana* es de enero a marzo de 2012, por lo cual la cosecha de material biológico (semillas) se realizó en el periodo de enero y febrero, en la plantación de la empresa "La Extra" en Chicxulub Pueblo, en el estado de Yucatán, obteniéndose cuatro costales llenos de frutos secos, los cuales fueron desgranados uno por uno para obtener el material biológico; se obtuvo 5 kg de semillas de *B. orellana* que fueron procesados con la metodología de la sección 2.1.

3.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

El análisis bromatológico se resume en el cuadro 3.1., en donde se aprecia que la concentración de proteína en semilla decoloradas de *B. orellana* Chicxulub Pueblo es de 11.46% en peso húmedo y 13% en peso seco, siendo los carbohidratos totales los compuestos mayoritarios, después las proteínas, seguido por las cenizas, fibra y grasas, respectivamente.

Cuadro 3.1. Análisis bromatológico de las semillas de *Bixa orellana* sin pigmento.

Determinación	Resultados (%)	Resultado en peso seco (%)
Proteínas	11.46	13.07
Grasas	4.4	6.02
Carbohidratos totales	70.05	71.67
Fibra cruda	4.9	6.52

(%) en base a 100 g

3.3. OBTENCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS

Una vez que se obtuvo la harina de achiote desengrasada se procedió a la extracción de las fracciones proteicas usando el método de Osborne (Grisel *et al.*, 2001) obteniendo las fracciones proteicas de albúmina, globulina, prolamina y glutelina. Después de que se obtuvieron estas fracciones se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE 12% en una cámara de electroforesis (miniProtean/Biorad, modelo Mini trans-blot cell), para observar la integridad de la fracción albúmina con diferentes tratamientos ya sea sin β -ME y con β -ME como menciona Grisel en 2001 (Fig. 3.1), esto con el fin de demostrar la estabilidad e integridad de las proteínas, posteriormente se corrieron las diferentes fracciones proteicas como se aprecia en la figura 3.2.

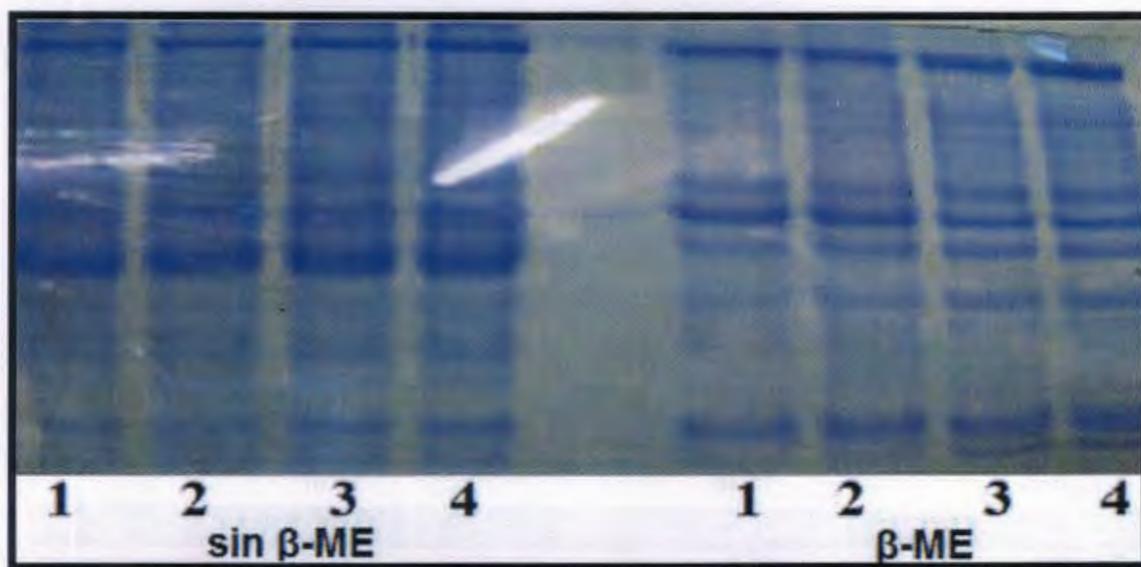


Figura 3.1. Perfil proteico de la fracción albúmina para demostrar su integridad en diferentes condiciones de extracción. Gel SDS-PAGE al 15% desarrollo por 2 horas a 80 volt en Coomassie blue G-250. Se observa la fracción de albúmina con diferentes metodologías para determinar la integridad de la proteína en diferentes condiciones: las 4 primeras sin β -ME las otras 4 con β -ME: 1) albúmina desteñida, con sistema soxhlet 24 h a 11000 g \times 15 min. 2) albúmina con sistema soxhlet con 24 h sin destefir a 11 000g \times 15 min. 3) albúmina sin el sistema soxhlet desteñida a 11000g \times 15 min. 4) albúmina sin soxhlet desteñida a 4500g por 51 min.

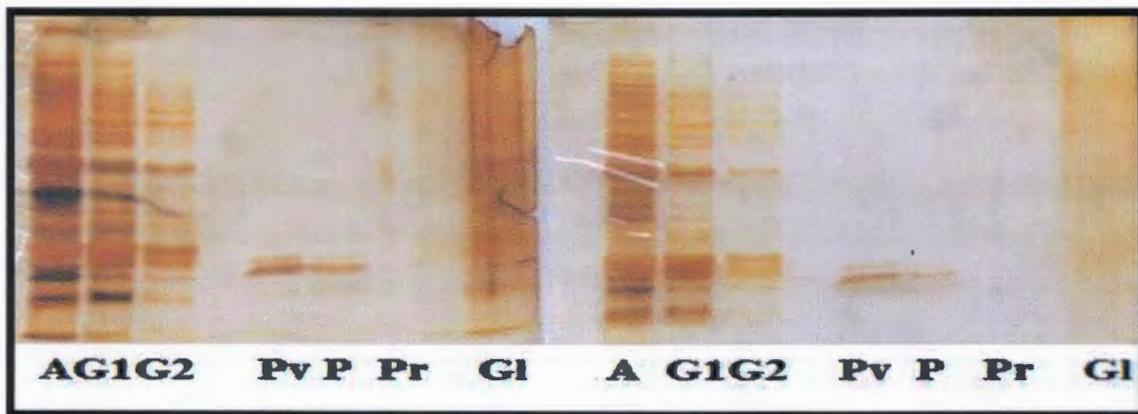


Figura 3.2. Perfiles electroforéticos de las proteínas de almacenamiento de *Bixa orellana*. Gel SDS-PAGE al 15%, desarrollada por 2 horas a 80 volts, teñida con nitrato de plata con el cual se observa la integridad de las fracciones proteicas. Dónde: A corresponde a albúmina; G1 y G2 corresponde a globulinas tipo 7 y 11 S Pv; P y Pr corresponde a la obtención de las fracciones proteicas de prolamina observándose que únicamente la Pv (fase verdosa) posea prolamina ya que la P es una mezcla 1:1 de Pv y Pr (fase roja); por último la GI corresponde a glutelinas.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO EN SEMILLAS DE *Bixa orellana*.

Se cuantificó las concentraciones de las diferentes fracciones proteicas en semillas de *Bixa orellana* con el método de Bradford [Sigma-Aldrich N° B6916], usando albúmina sérica bovina como estándar [Merck KGaA N° 1120180025] (Bradford, 1976), Figura 3.3.

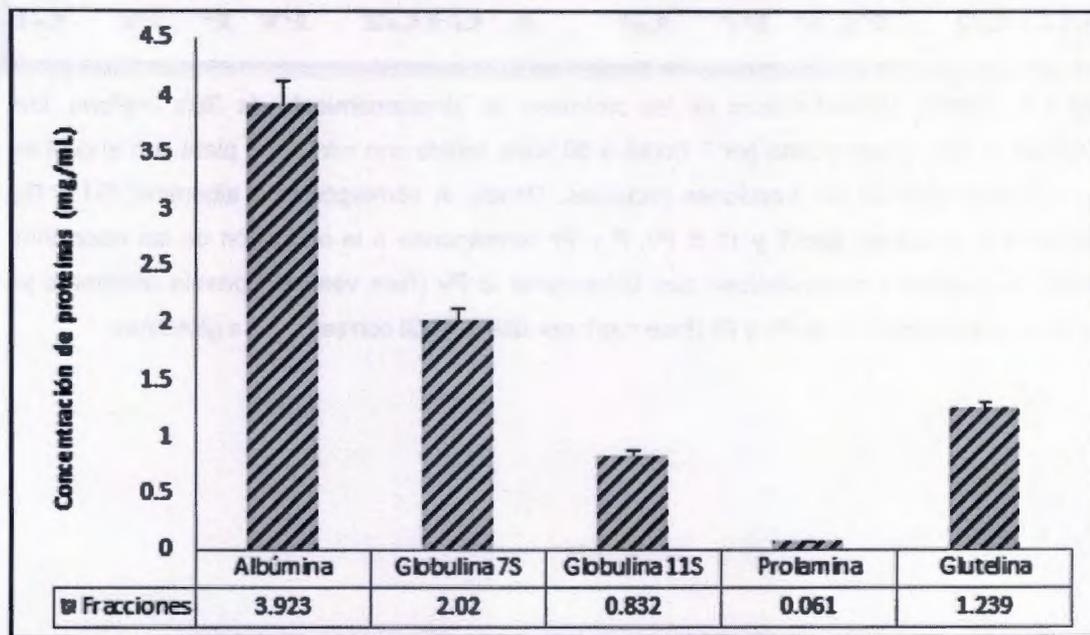


Figura 3.3. Cuantificación de diferentes fracciones proteicas usando el método de Bradford. A una observancia de 595 nm; los resultados obtenidos se encuentran expresados en mg/mL.

Teniendo los resultados de la Figura 6 y al extrapolarlos a base 100% se tiene como resultado lo siguiente: albúmina con 49.07%, globulina tipo 7S con 24.78%, globulina tipo 11S con 10.20%, prolamina con 0.75% (sin evaporación alcohólica) y glutelina con 15.20%, los resultados se aprecian en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Contenido de proteínas de almacenamiento de cada fracción proteica presentes en *Bixa orellana*.

Fracción proteica	(%) proteína/ proteínas totales	g proteína en semilla en base a 13.07g
Albúmina	49.07	6.41
Globulina 7S	24.78	3.24
Prolamina	0.75	0.10
Glutelina	15.2	1.99

El contenido se expresa en porcentaje de proteínas/proteínas totales y la presencia en gramos que se encuentran en 100 g de semillas de *Bixa orellana*.

3.5. PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE ALMACENAMIENTO DE *Bixa orellana*

Después de secuenciar las proteínas se obtuvieron los aminoácidos (aa) de las proteínas de almacenamiento de las semillas de *Bixa orellana* como se puede apreciar en el Cuadro 3.3., en el cual se aprecia que posee 9 de los 10 aa esenciales y 5 de los aa no esenciales. En lo que respecta a los aa esenciales, se tiene un 44% de total de aa, careciendo únicamente de triptófano y predominando leucina y treonina con 8 y 7.87%, respectivamente; en aa no esenciales posee un 55.98% del total de aa, específicamente con ac. aspártico y ácido glutámico con un 20.78% y 9.76%, respectivamente, careciendo de asparagina, glutamina, cisteína, prolina y tirosina.

Cuadro 3.3. Composición de aminoácidos de las diferentes proteínas de almacenamiento de *Bixa orellana*.

Amino ácido	Albúminas	Globulinas 7S	Globulinas 11S	Glutelinas	Total
Ác. aspártico	11.22	5.89	6.29	7.03	11.1225
Ác. glutámico	19.68	13.71	12.54	16.27	23.685
Serina	3.27	2	2.6	3.71	4.75
Histidina*	2.6	1.6	1.88	2.74	3.575
Glicina	4.72	3.17	3.27	4.22	5.955
Treonina*	6.58	4.16	4.62	6.84	8.97
Arginina*	5.09	3.12	3.56	5.33	6.94
Alanina	5.46	3.53	3.76	5.27	7.14
Tirosina	4.16	1.41	1.7	3.16	4.1875
Metionina*	3.21	1.44	1.85	1.98	3.11
Valina*	4.48	3.46	3.38	4.51	6.2125
Fenilalanina*	4.28	3.55	3.41	4.14	5.915
Isoleucina*	4.13	3.49	3.47	4.22	5.9375
Leucina*	5.62	5.15	5.16	6.87	9.135
Lisina*	6.77	3.97	4.29	4.71	7.29

Los valores son el promedio de 3 réplicas expresado como % de proteína cruda (metodología; Vázquez, 1995).

g /100 g proteína

*Aminoácidos esenciales,

3.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LAS FRACCIONES PROTEICAS CON CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE RADICALES LIBRES OBTENIDAS DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana*

En este estudio se usaron dos métodos diferentes para la determinación de actividad antioxidante; ABTS y ORAC, en las fracciones proteicas de *B. orellana* como albúminas globulinas 7s y 11s y glutelinas; no se continuó con la determinación de las prolaminas por su bajo contenido de proteínas, se usó Trolox como control y glutatión reducido como estándar, debido a su alta capacidad donadora de electrones (elevado potencial redox negativo) que genera un gran poder reductor intracelular (Shavan *et al.*, 2005).

3.6.1. MÉTODO DEL RADICAL CATIONICO ABTS^{•+}

Se monitoreó la capacidad captadora de radical libre durante 90 minutos en intervalos de 15 minutos donde la densidad óptica del radical se estabilizó una vez transcurrido los 30 minutos de reacción, independientemente de la muestra ensayada. Este comportamiento sugirió que las fracciones proteicas presentan una actividad antioxidante de efecto prolongado. Pero para fines de comparación, el tiempo de reacción de 6 minutos fue seleccionado para tener el porcentaje de atrapamiento de radicales libres. La máxima capacidad atrapadora de radicales libres, expresada en TEAC, la obtuvo la fracción proteica correspondiente a glutelinas con una concentración de 800 ppm, seguidamente por las fracciones albúmina y globulinas 11s y 7s, respectivamente, como se observa en el cuadro 3.4.

Cuadro 3.4. Actividad antioxidante de las fracciones proteicas en semillas de *Bixa orellana*.

Muestras	ABTS (mMtrolox/g proteina)	ORAC-FL (mMtrolox/g proteina)
Albumina	0.78754479 ±0.0263(800)	5.8705(100)
Globulina (7s)	0.16433917 ±0,0176(800)	0.7915(100)
Globulina (11s)	0.17286183 ±0,0009(800)	3.1176(100)
Glutelina	0.91149808 ±0,0766(800)	1.4217(100)
GHS	0.01743361 ±0.0021(800)	0.0236(100)

TEAC (capacidad antioxidante expresada como equivalentes de trolox), GHS (Glutación reducido).

Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar de dos experimentos realizados por duplicado.

Los datos entre paréntesis indican la concentración ensayada, expresada y dividida entre las ppm de las fracciones proteicas.

3.6.2. MÉTODO DEL RADICAL OXÍGENO USANDO FLUORESCEÍNA (ORAC-FL)

Con el fin de confirmar que todos los compuestos antioxidantes presentes en la muestra reaccionan con los radicales generados al final del proceso oxidativo, se desarrolló este método ya que es el único método que combina y que determina la duración de la inhibición de la acción de radicales libres con los compuestos antioxidantes en una sola medición, ambas de manera simple y sensible (Cao *et al.*, 1996; Cao y Prior, 1998). Considerando la caída de la curva de fluorescencia de fluoresceína (FL), con relación al componente APPH (2,2'azo-bis (2-methylpropionamide) dihydrochloride) [Sigma-Aldrich N°440914] que fue observada en todas las fracciones ensayadas, cuya función de las fracciones proteicas es proteger a la fluoresceína de la oxidación causada por el APPH en un tiempo de 200 minutos, 100 lecturas por cada 2 minutos. El mejor efecto fue mostrado por la fracción proteica albúmina a 100 ppm que incrementó el tiempo de inhibición de la oxidación en todo el periodo de análisis, protegiendo a la fluoresceína contra la oxidación causada por el APPH superando el efecto de GHS a 100 ppm y ácido ascórbico (vitamina C) con una excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 538 nm.

La actividad total antioxidante total determinada como valores de ORAC-FL se expresó como TEAC en las fracciones proteicas de las semillas de *B. orellana* cuyas fracciones albúmina tuvieron mejor efecto inhibitor de la oxidación en comparación con las fracciones glutelinas y globulinas tipo 7s y 11s (Fig. 3.4). Sin embargo, hubo problemas para alcanzar la temperatura de 37 °C de manera constante puesto que el equipo no posee esta opción, por lo cual se recomienda el uso de un equipo con esta opción de temperatura para lograr una curva sigmoidea.

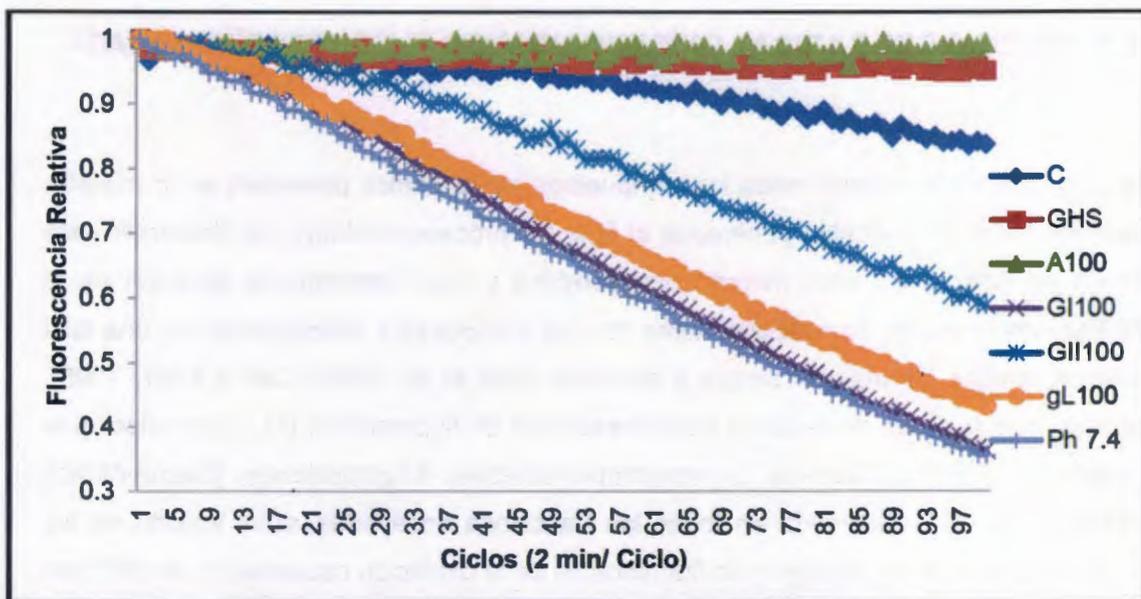


Figura 3.4. Actividad inhibidora de la oxidación causada por las proteínas de almacenamiento de las semillas de *Bixa orellana*. En esta figura se muestra la inhibición oxidativa de las proteínas de almacenamiento que protegen a la fluoresceína frente la actividad oxidativa del APPH, donde C: ácido ascórbico; GHS: glutatión reducido; A100: albúmina a 100 ppm; GI 100: globulina 7s a 100 ppm; GII100: globulina 11s a 100 ppm; gL100: glutelinas a 100 ppm; pH 7.4: amortiguador de fosfato 0.75 mM pH 7.4 que funciona como blanco.

3.7. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana*

Se ha evaluado el efecto antitumoral de la fracción albúmina en *B. orellana* usando el modelo de linfoma murino L5178Y en ratones BALB/c con una dosis no letal de 25 mg/kg /día (0.62 mg/ratón/día) vía oral administrada con cánula, dosis recomendada por su efecto oncostático a bajas concentraciones tras diferentes pruebas realizadas con anterioridad en cacao con dosis de 2.5, 25, 100, 200 mg/kg /día (Preza *et al.*, 2010).

Se realizó la actividad antitumoral con ratones BALB/c; todos los ratones tenían la misma edad de gestación así como el mismo peso y género, así a su vez, para controlar y/o disminuir las variables a los ratones se les aplicó los tratamientos al mismo tiempo con la administración oral de 25 mg/kg/día durante 8 días preventivos antes de la inoculación con linfoma murino L5178Y y se continuó administrando las proteínas de almacenamiento posterior a la inoculación durante 17 días más. Con respecto a los resultados, la administración quimiopreventiva con proteínas de almacenamiento se obtuvieron los mejores resultados con la fracción albúmina con un 17.6% seguida por la fracción de glutelinas con un 11.95%, la fracción correspondiente a globulinas no presentó un efecto positivo sobre el linfoma murino con tratamiento vía oral (Cuadro 3.5.).

Cuadro 3.5. Efecto de la fracción albúmina sobre las semillas de *Bixa orellana* sobre modelo linfoma murino L5178Y.

Grupos	Densidad tumoral	Volumen de ascitis	Densidad celular	Tasa de inhibición
Control (L5178Y)	193.4 ±35.45	1.88 ±0.35	358.4 ±59.41	0
L5178Y + Albúminas	160.0 ±22.44	1.84 ±0.28	295.3 ±68.27	17.6
L5178Y + Globulinas	210.2 ±55.09	1.81 ±0.69	364.6 ±119.9	-1.724
L5178Y + Glutelinas	176.6 ±51.44	1.79 ±0.39	315.6 ±116.1	11.95

Tasa de inhibición (%) = $[(A-B)/A] \times 100$. Donde A es el promedio del tumor del grupo control positivo, y B es el tumor en el grupo tratado.

Dosis no letal de 25 mg/kg/día durante 8 días preventivos y 17 días con linfoma, administración vía oral después de la inoculación de 2×10^4 células L5178Y / mL/ratón.

3.8. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE *Bixa orellana* POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS (FPLC)

Se realizó un patrón cromatográfico entre las tres diferentes proteínas de almacenamiento presentes en las semillas de *B. orellana* empleando una columna superdex hiloal 200 16/60, columna de exclusión molecular para la separación y purificación de proteínas (Figs. 3.5-3.7) correspondientes a albúminas, globulinas y glutelinas.

Usando estándares de peso molecular se pudo determinar el peso aparente de cada pico del cromatograma. En cada fracción proteica para el caso de la albúmina se obtuvo el pico máximo a un volumen de elución de 110 mL; extrapolando estos datos con una curva de estándares de peso molecular, se calculó un peso menor de 29 kDa (estándar anhídrido carbónico). Para el caso de globulinas se obtuvieron 3 picos, el primero con un peso mayor a 669 kDa (estándar tiroglobulina, 669 kDa), el segundo con un peso de 300 kDa y otro menor a 29 kDa. Para la fracción proteica correspondiente a glutelinas su peso fue menor a 29 kDa.

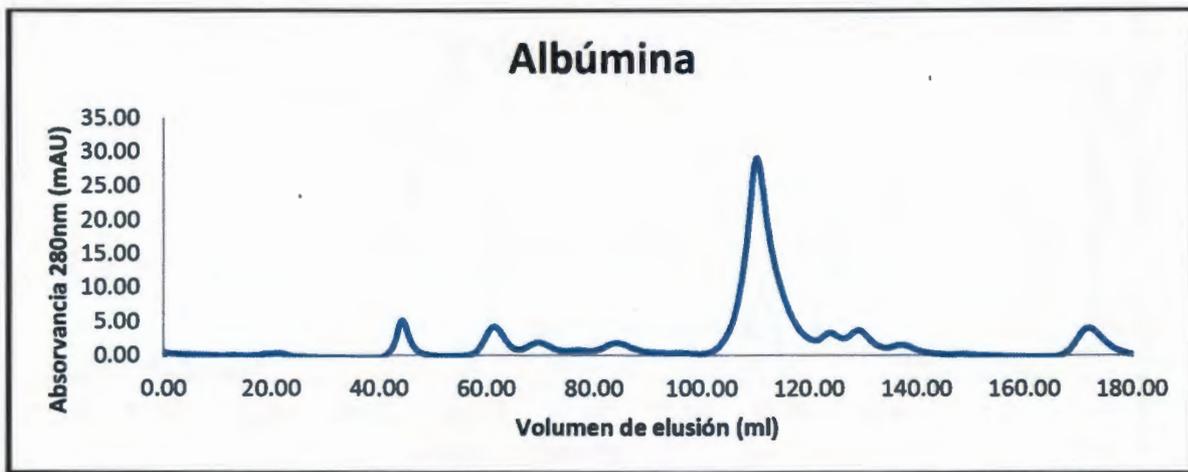


Figura 3.5. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a albúmina de las semillas de *Bixa orellana*. Usando una columna superdex hiload 200 16/60, amortiguador 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, con un flujo de elusión de 1 ml/min. Los datos se analizaron con ayuda del software UNICORNTM 5.11 (GE Healthcare).

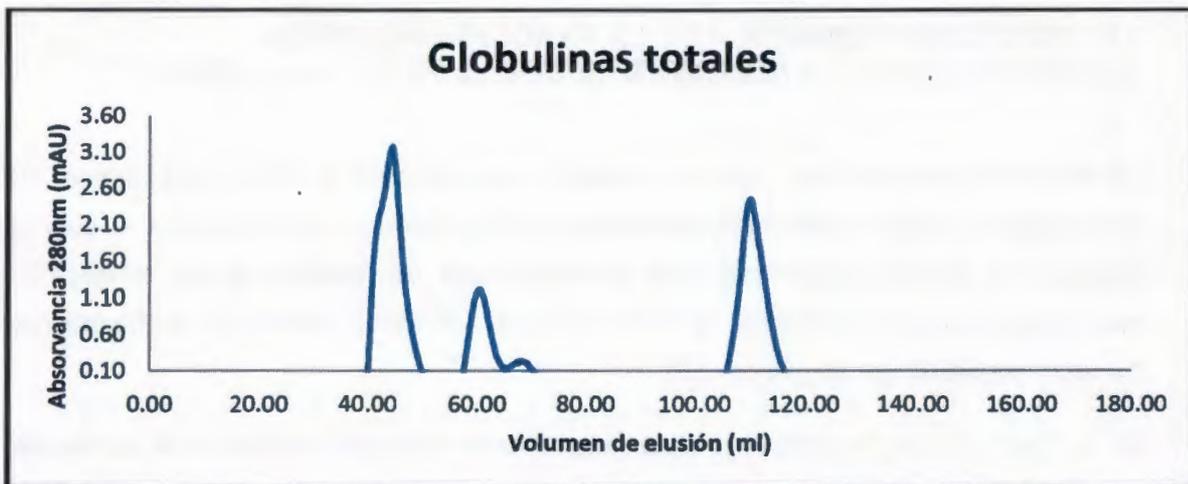


Figura 3.6. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a globulinas totales de las semillas de *Bixa orellana*. Usando una columna superdex hiload 200 16/60, amortiguador 20 mM Tris-HCl, 10% NaCl, pH 7.5, con un flujo de elusión de 1 mL/min. Los datos se analizaron con ayuda del software UNICORNTM 5.11 (GE Healthcare).

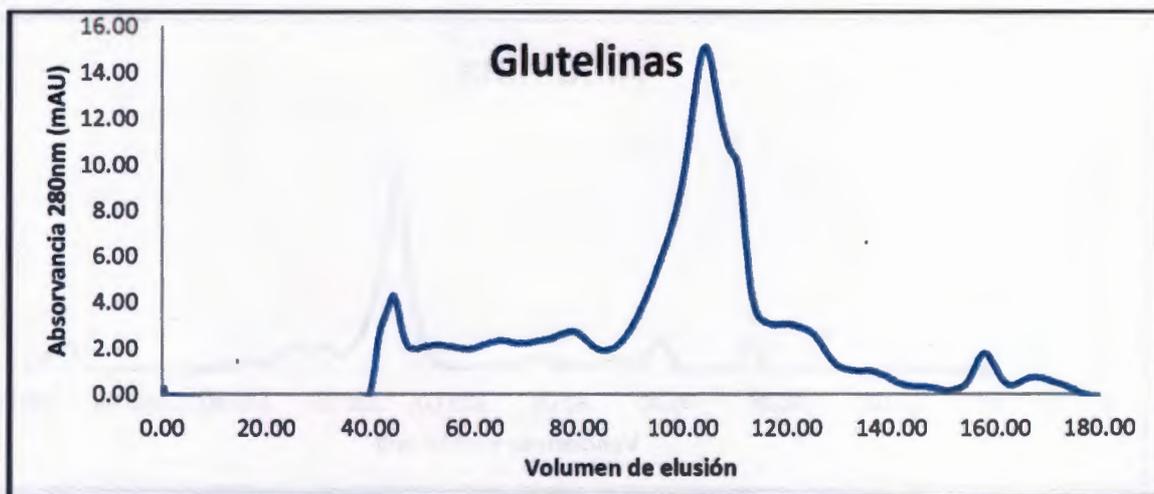


Figura 3.7. Perfil cromatográfico de la fracción proteica correspondiente a glutelinas totales de las semillas de *Bixa orellana*. Usando una columna superdex hiloal 200 16/60, amortiguador 20 mM Tris-HCl, 25 mM NaOH con un flujo de elución 1 mL/ min. Los datos se analizaron con ayuda del software UNICORNTM 5.11 (GE Healthcare).

3.9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN PROTEICA CORRESPONDIENTE A ALBÚMINA DE SEMILLAS DE *Bixa orellana*

La hidrólisis enzimática con pepsina, tripsina y quimotripsina se utilizó para obtener los hidrolizados a partir de albúmina proveniente de las semillas de *B. orellana*, la cual se hidrolizó de manera secuencial para posteriormente ser analizados los hidrolizados resultantes en cultivos celulares de linfoma murino L5178Y y determinar la citotoxicidad de cada hidrolizado purificado por FPLC.

En la Figura 3.8 se muestran las electroforesis de la hidrólisis enzimática de la fracción proteica de albúmina con la enzima pepsina con una relación 1:50 enzima/sustrato (v/v) en el amortiguador HCl 0.2 M, pH 1.5, y una temperatura de 37 °C.

La cinética de hidrólisis de albúmina fue de 120 minutos tomando alícuotas de 0, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 120 minutos desactivando la hidrólisis de la enzima con temperatura como se menciona en la metodología. Posterior a esto se realizó una electroforesis Tris-Tricina SDS-PAGE (16%T 6%C) que mostró un perfil electroforético relacionado de hidrólisis de la proteína a péptidos dependiente del tiempo, determinando

el tiempo óptimo de hidrólisis de 40 minutos donde se podrían apreciar 7 bandas plenamente visibles con un rango aparente de 6 a 26 kDa.

Posterior a la hidrólisis enzimática con pepsina se prosiguió con la enzima tripsina, usando las mismas condiciones de E/S 1:50 y misma temperatura 37 °C, usando bicarbonato de sodio a 0.9 M para ajustar el pH a 7.5 en el medio Tris-HCl 0.02 M y desactivar pepsina para continuar la hidrólisis secuencial, agregándole tripsina. En la cinética enzimática se tomaron alícuotas en los tiempos 0, 10, 20, 40 y 60 min, desactivándolos con temperatura de 95 °C y visualizados en la electroforesis Tris-tricina SDS-PAGE (Fig. 3.9.) con el mejor tiempo en 60 minutos.

La hidrólisis secuencial se finalizó con la enzima quimotripsina con las mismas condiciones E/S y temperatura, pero añadiéndole un amortiguador de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.02M a pH 8 y una cinética de hasta 4 h, encontrando el mejor tiempo a partir de los 20 minutos con péptidos estimados de 14 a 6 kDa (Fig. 3.10.), con un DH de 53.2% (Cuadro 3.6).

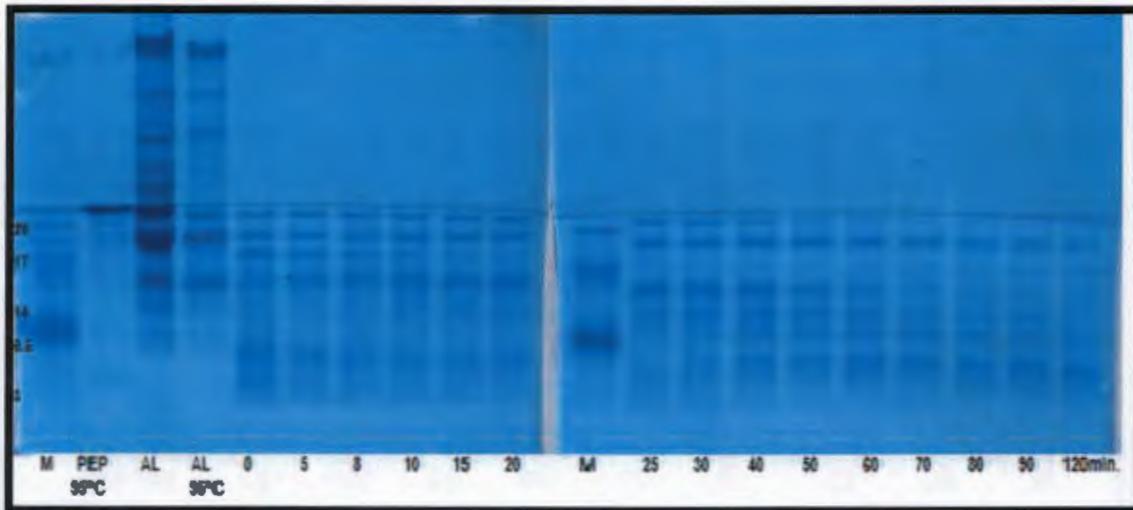


Figura 3.8. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de hidrólisis de albúmina con la enzima pepsina. La hidrolisis enzimática se realizó con pepsina durante 120 minutos donde: M: marcador de peso molecular (Biorad N° 161-0326), PEP: enzima pepsina hervida a 95 °C, A: fracción proteica de semillas de *Bixa orellana* correspondiente a albúmina sin tratamiento térmico, AL: fracción proteica de semillas de *Bixa orellana* correspondiente a albúmina con tratamiento térmico de 95 °C por 5 minutos, 0-120: cinética enzimática en minutos.



Figura 3.9. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de hidrólisis de albúmina con la enzima tripsina. Donde; M: marcador de peso molecular (Biorad N° 161-0326), Try: enzima tripsina hervida a 95 °C, AL: fracción proteica de semillas de *Bixa orellana* correspondiente a albúmina sin tratamiento térmico, AL: fracción proteica de semillas de *Bixa orellana* correspondiente a albúmina con tratamiento térmico de 95 °C por 5 minutos, 0-60: cinética enzimática en minutos.

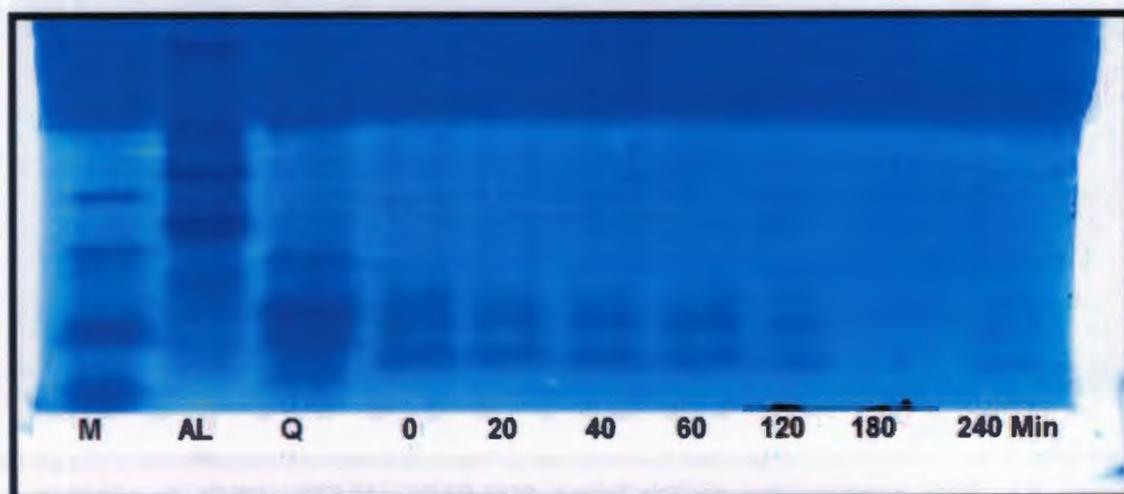


Figura 3.10. Perfil electroforético de Tris-Tricina SDS-PAGE (16.5T%, 6%C) de la hidrólisis de albúmina con la enzima quimotripsina. Donde; M: marcador de peso molecular (Biorad N° 161-0326), Q: enzima quimotripsina, AL: fracción proteica de semillas de *Bixa orellana* correspondiente a albúmina sin tratamiento térmico, 0-4 h: cinética enzimática en minutos.

Cuadro 3.6. Grado de hidrolisis de la albúmina con diferentes enzimas digestivas

Muestras	DH (%)	Muestras	DH (%)
AL 95°C	15.12	AL+PEP 120 min	48.7
AL+PEP 0 min	43.3	AL+PEP+TRY 0 min	48.8
AL+PEP 5 min	43.8	AL+PEP+TRY 10 min	49.2
AL+PEP 8 min	45.4	AL+PEP+TRY 20 min	49.3
AL+PEP 10 min	45.8	AL+PEP+TRY 40 min	49.5
AL+PEP 15 min	46.2	AL+PEP+TRY 60 min	49.8
AL+PEP 20 min	46.6	AL+PEP+TRY+ Q 0 min	51.1
AL+PEP 25 min	46.7	AL+PEP+TRY+ Q 20 min	53.2
AL+PEP 30 min	46.9	AL+PEP+TRY+ Q 40 min	55.6
AL+PEP 40 min	47.1	AL+PEP+TRY+ Q 60 min	58.8
AL+PEP 50 min	47.5	AL+PEP+TRY+ Q 120 min	65.6
AL+PEP 60 min	47.8	AL+PEP+TRY+ Q 180 min	67.7
AL+PEP 70 min	48.1	AL+PEP+TRY+ Q 240 min	68.1
AL+PEP 80 min	48.2		

Donde AL: Albúmina; DH: Grado de Hidrolisis; PEP: Pepsina; TRY: Tripsina; Q: Quimotripsina

3.10. PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POR FPLC

Una vez concluida la hidrólisis secuencial de la fracción proteica correspondiente a albúmina, la fracción resultante fue purificada mediante cromatografía de exclusión molecular [ÄKTA purifier, de GE Healthcare N° 28-4062-71] cuyos perfiles obtenidos eran típicos de hidrolizados de proteínas de reserva; se realizó una cromatografía de la albúmina nativa sin tratamiento enzimático (Fig. 3.11.) en la columna superdex 75 10/300 GL [GE Healthcare Life Sciences, N° 17-5174-01], con un volumen de elución de 8 a 20 mililitros con un rango de peso molecular que va de 67 a 1.3 kDa y posteriormente se realizaron cromatogramas de los hidrolizados con las enzimas pepsina (Fig. 3.12), tripsina (Fig. 3.13.), quimotripsina (Fig. 3.14) y alcalasa (Fig. 3.15), donde en cada pico eluido fue concentrando en un *speed vac* y almacenado para su posterior análisis.

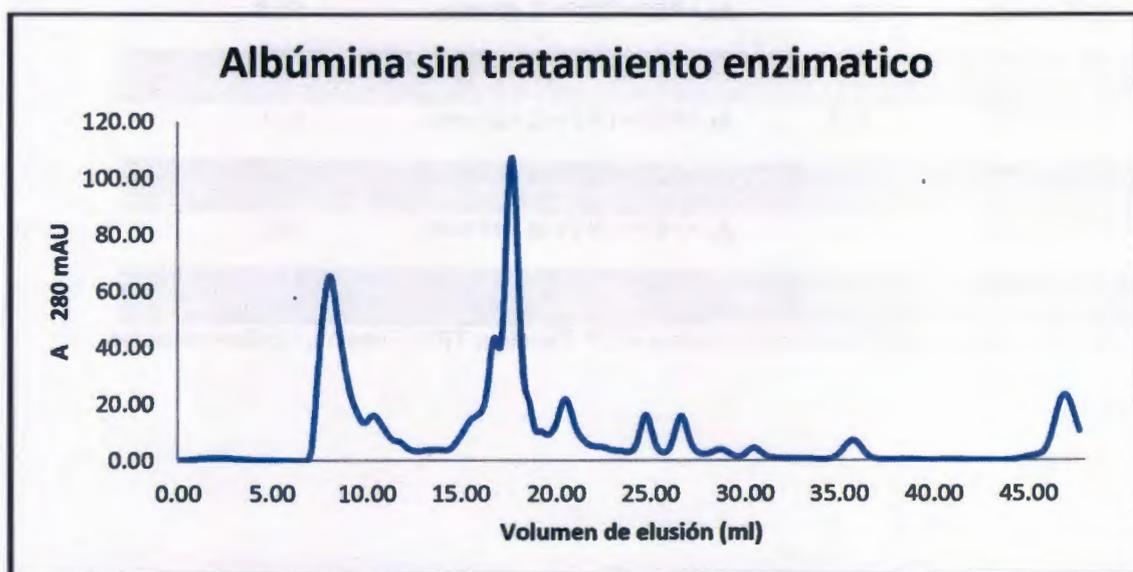


Figura 3.11. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina sin tratamiento enzimático de semillas de *Bixa orellana* (superdex G75 10/300 GL, Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 8. Flujo de 0.5 ml/min).

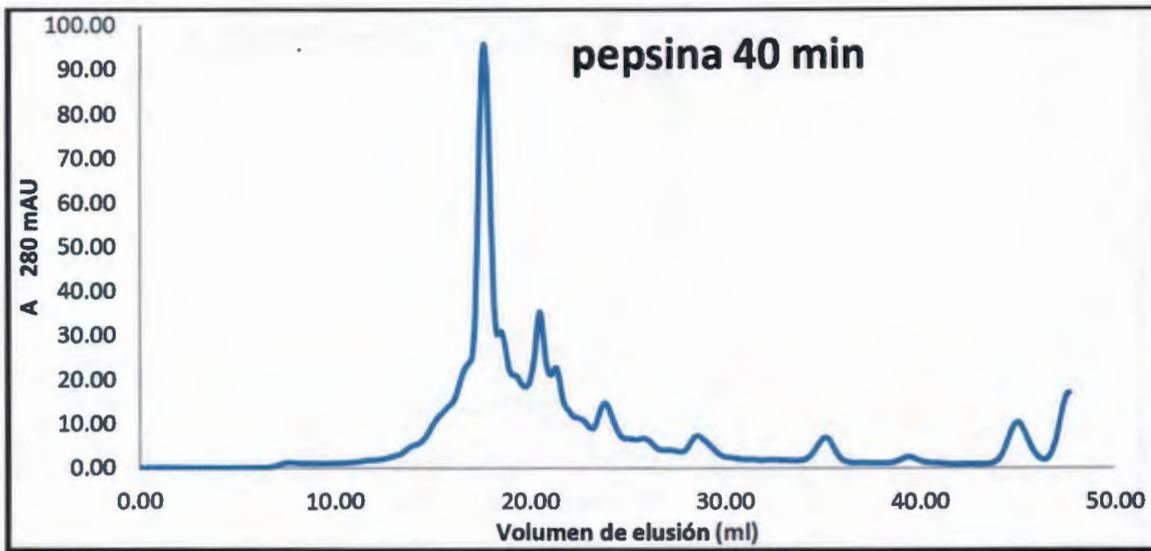


Figura 3.12. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con la enzima pepsina a un tiempo de 40 minutos (superdex G75 10/300 GL, Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8. Flujo de 0.5 ml/min).

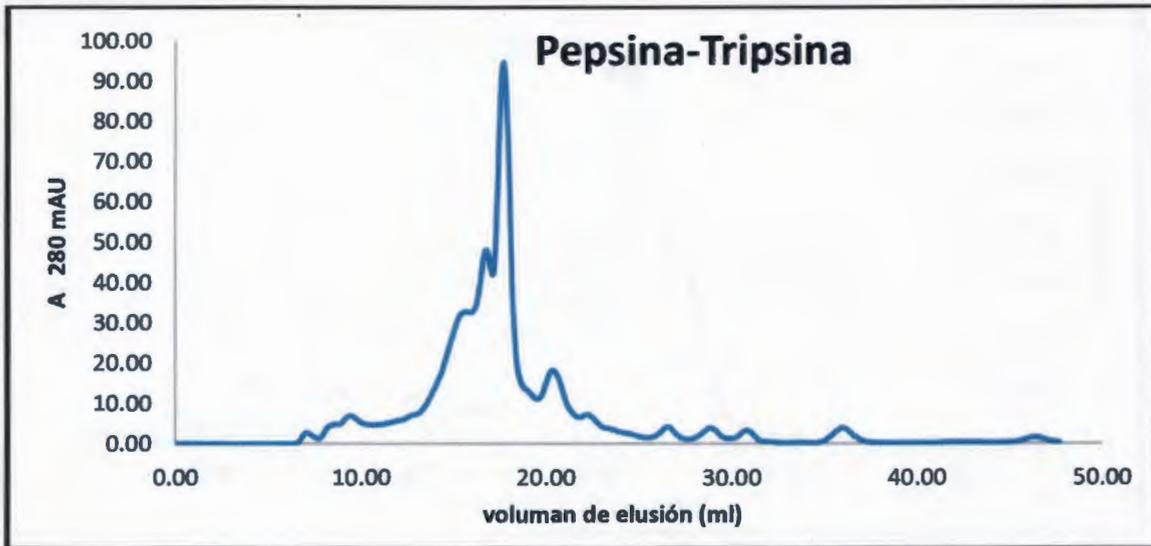


Figura 3.13. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con tratamiento secuencia de pepsina y posteriormente con tripsina. El tiempo de hidrólisis fue de 60 minutos (Superdex G75 10/300 GL, Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 8. Flujo de 0.5 mL/min).

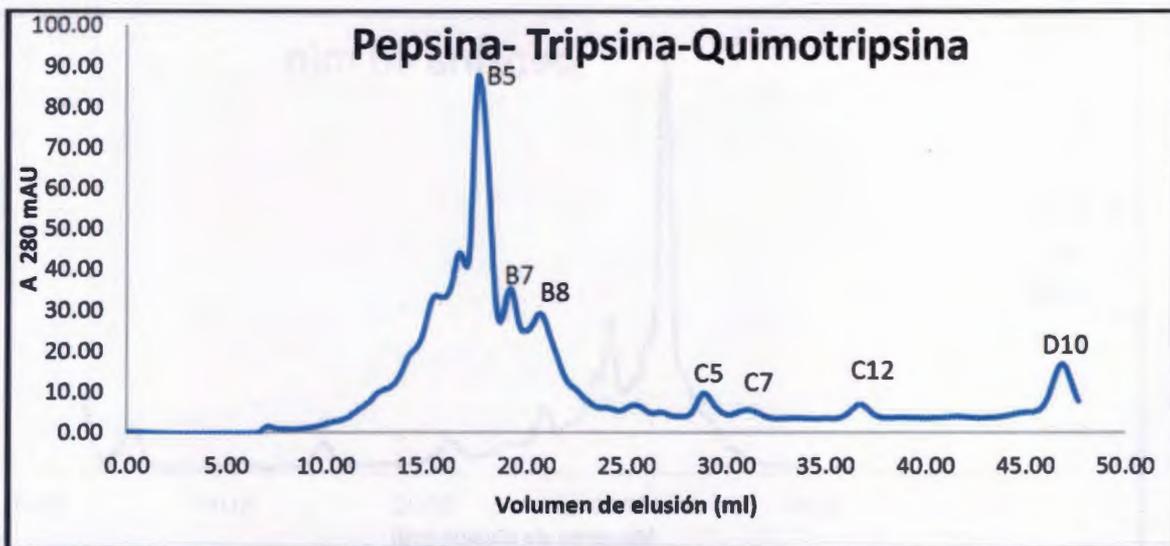


Figura 3.14. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con tratamiento secuencial pepsina-tripsina y posteriormente quimotripsina. El tiempo de hidrólisis fue de 60 minutos (superdex G75 10/300 GL, Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8. Flujo de 0.5 mL/min).

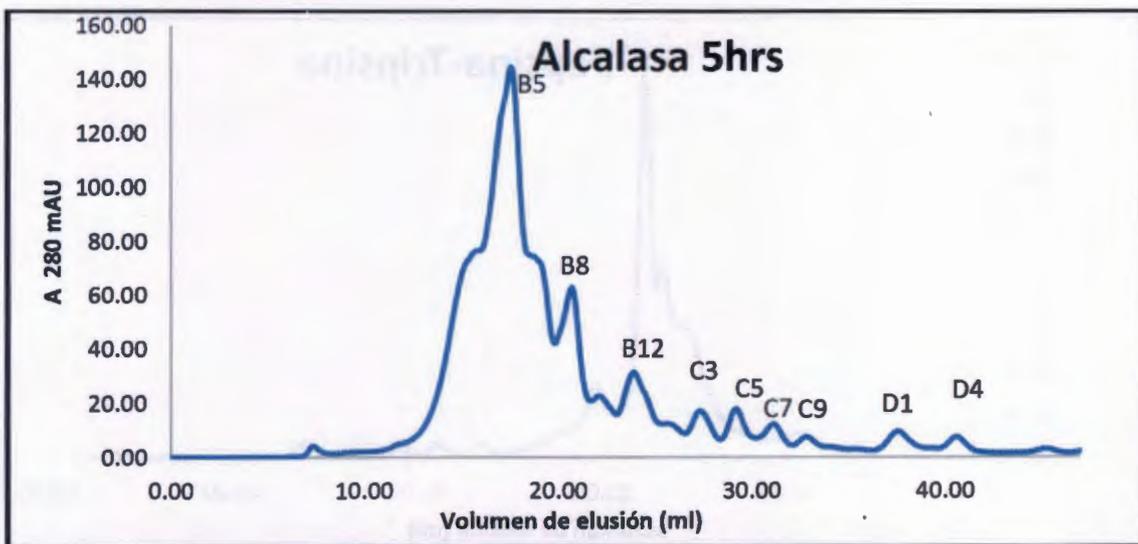


Figura 3.15. Perfil cromatográfico de la fracción albúmina hidrolizada con alcalasa, durante 5 horas (superdex G75 10/300 GL, Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8. Flujo de 0.5 mL/min).

3.11. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES HIDROLIZADAS DE ALBÚMINA Y SU EFECTO SOBRE CÉLULAS TRANSFORMADAS DE LINFOMA MURINO L5178Y

La actividad celular como un indicador de citotoxicidad fue determinada cuando las células transformadas de linfoma murino L5178Y fueron tratadas con la fracción albúmina y los hidrolizados purificados, con el FPLC usando la columna superdex G75 de exclusión molecular a partir de hidrolizados con enzimas digestivas, mediante la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán, evaluando así su actividad metabólica.

Al evaluar el efecto citotóxico de la albúmina sin tratamiento enzimático y albúmina hidrolizada, así como las fracciones purificadas correspondientes a B5, B7, B8, C5, C7, C12 y D10 con concentraciones de 2.5, 5 y 10 μg proteína/mL en las células transformadas de linfoma murino L5178Y (Fig. 3.16).

Después de la incubación por 24 h se determinó que el menor efecto citotóxico fue el de la albúmina sin tratamiento enzimático, ya que no presentó efecto citotóxico estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al ser comparada con el control celular de linfoma murino L5178Y con solamente $6.15\% \pm 0.42$ de inhibición de crecimiento celular, mientras que la albúmina con tratamiento enzimático sí obtuvo inhibición ($p < 0.05$) con un $32.85\% \pm 8.69$, seguida de las fracciones B8 y C7 que presentaron efecto citotóxico ($p < 0.05$) en células transformadas con valores de 85.4 y 32.62%, respectivamente; asimismo, las fracciones con mayor efecto citotóxico ($p < 0.05$) correspondieron a B5, B7, C5, C12 y D10 con 99% de inhibición a 10 μg proteína/mL siendo superior incluso a ciclofosfamina (CF). Resultados similares se obtuvieron con hidrolizados con la enzima alcalasa (Fig. 3.17) exceptuando que el hidrolizado no presentó inhibición ($p < 0.05$) con un $3.41\% \pm 4.87$.

Con lo anterior, quedó de manifiesto que la hidrólisis enzimática con enzimas digestivas mejoró el efecto citotóxico, presentando concordancia con el incremento de la capacidad citotóxica de extractos proteicos sometidos a hidrólisis enzimática, simulando la digestión gastrointestinal en las semillas de amaranto (Barrio *et al.*, 2010).

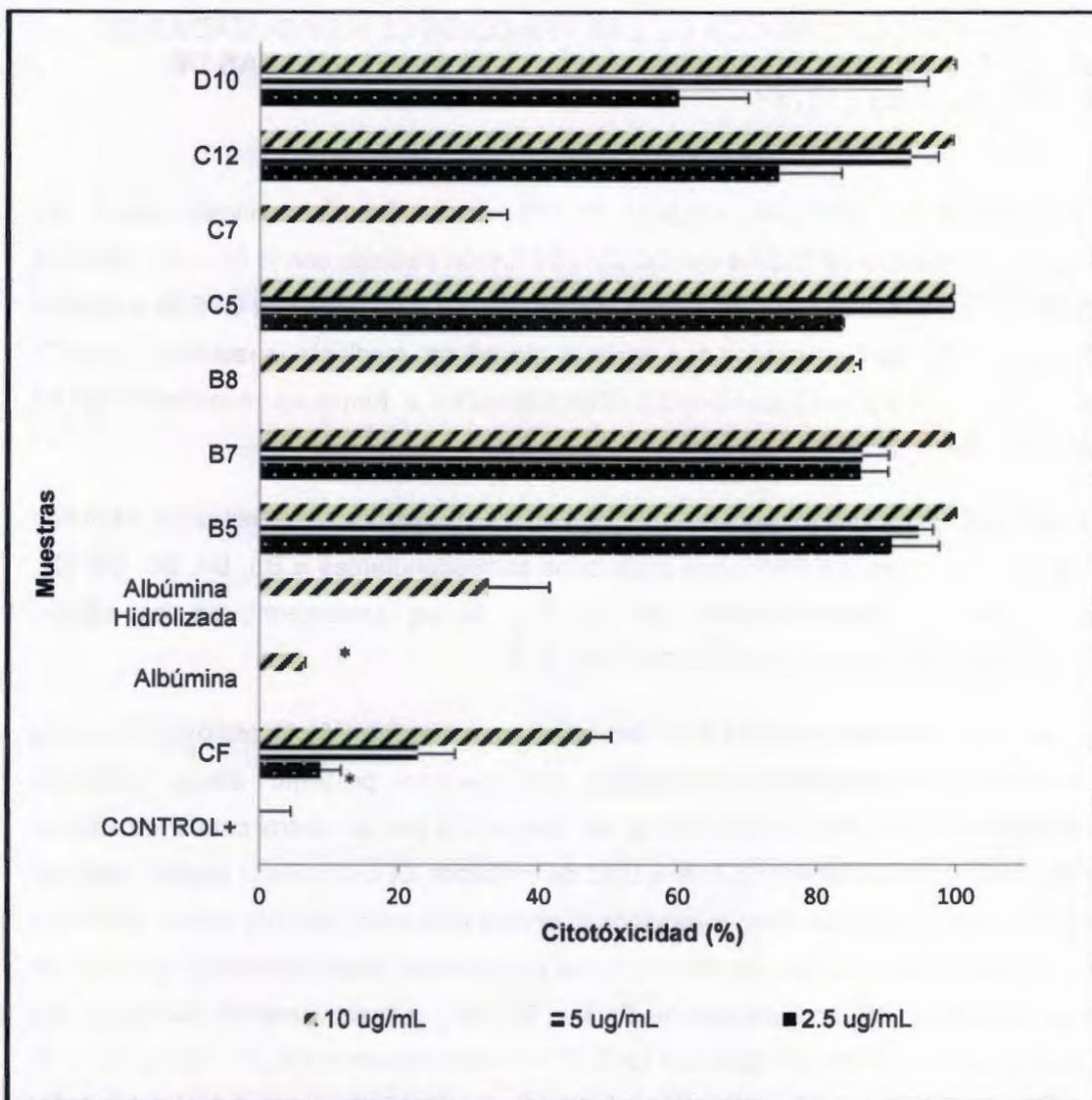


Figura 3.16. Efecto citotóxico de albúmina y los hidrolizados con enzimas digestivas sobre células transformadas de linfoma murino L5178Y.

Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar realizados por triplicado.

* $p < 0.05$ no presentó efecto citotóxico cuando se comparó con el grupo control de linfoma murino L5178Y.

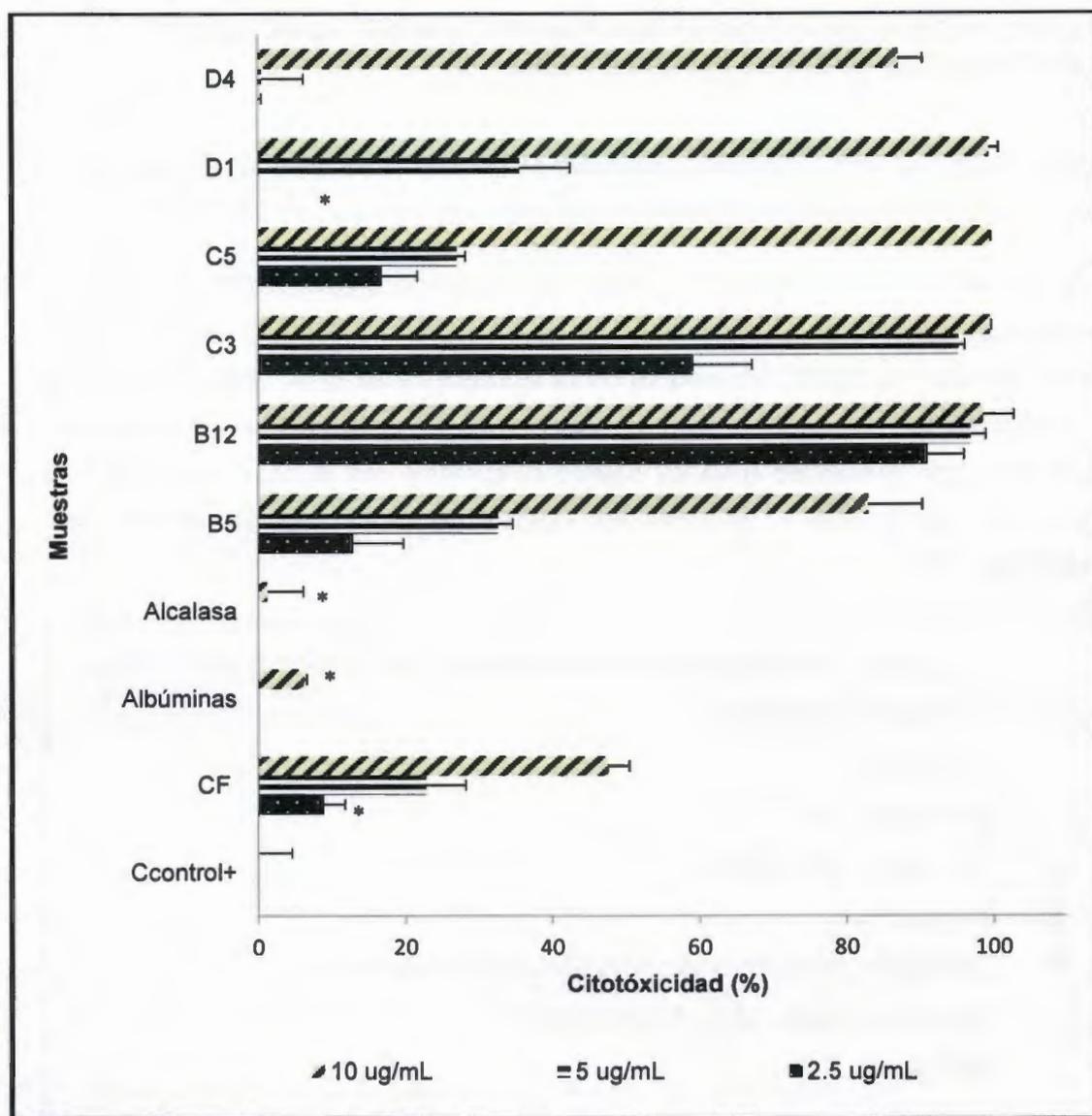


Figura 3.17. Efecto citotóxico de albúmina y los hidrolizados de albúmina con la enzima alcalasa en células transformadas de linfoma murino L5178Y.

Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar realizados por triplicado

* $p < 0.05$ no presentó efecto citotóxico cuando se comparó con el grupo control de linfoma murino L5178Y.

3.12. EFECTO DE LOS PURIFICADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS DEL BAZO DE RATÓN BALB/c

El objetivo fue evaluar la citotoxicidad selectiva de las fracciones hidrolizadas mediante el efecto de la proliferación celular de linfocitos de bazo (esplenocitos) de ratón BALB /c.

En la evaluación por la técnica MTT donde las células de linfocitos reducen el MTT a formazán, se observó que la gran mayoría de los hidrolizados purificados por FPLC, mostró un efecto citotóxico considerable sobre linfocitos de bazo de ratón, exceptuando las fracciones B5, C5 y D1 siendo la fracción C5 la única con efecto mitogénico estadísticamente significativo ($p < 0.05$) cuando se comparó con el grupo control, a 5 μg proteína /mL con un 68% en la proliferación celular de los linfocitos de bazo de ratón BALB/c (Fig. 3.18)

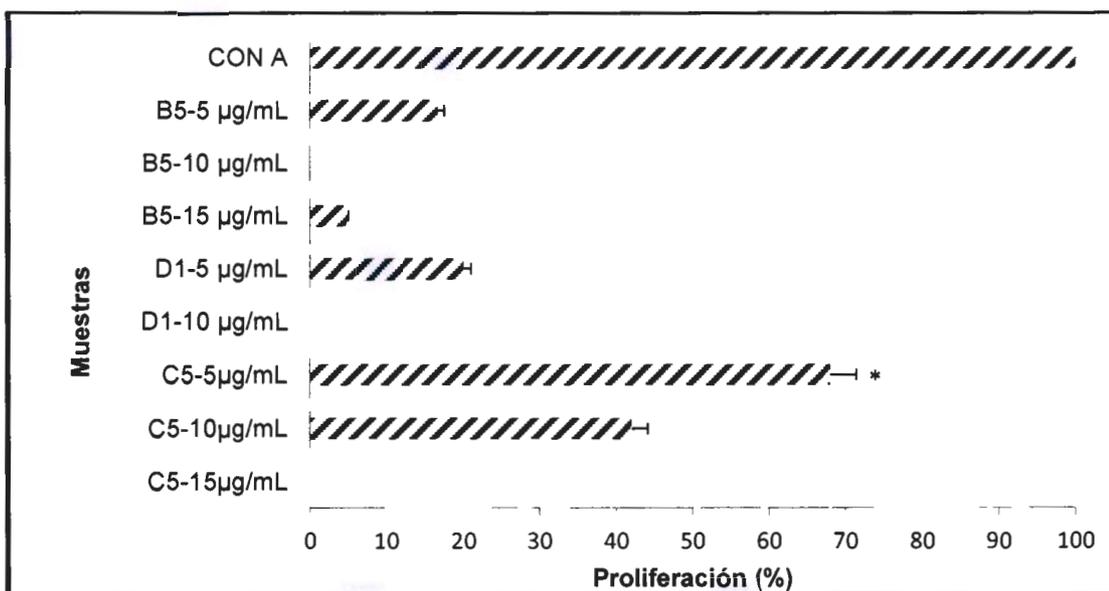


Figura 3.18. Efecto de las fracciones hidrolizadas de albúmina sobre la proliferación de linfocitos de ratón BALB/c. Donde CON A: concanavalina A y el resto las fracciones purificadas con FPLC a diferentes concentraciones.

Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar realizados por triplicado.

* $p < 0.05$ presentó efecto mitogénico cuando se comparó con el grupo control de linfocitos de bazo de ratón BALB/c.

CAPÍTULO IV**DISCUSIÓN**

En la cuantificación de proteínas obtenidas por el método de Bradford (Bradford, 1976) se logró un nuevo conocimiento sobre este tema ya que no hay información publicada sobre las proteínas de almacenamiento en semillas de achiote. En otros estudios relacionados con las proteínas de almacenamiento en otras especies, tales como *Pachyrhizus erosus* (jícama) (Grisel *et al.*, 2001), se encontró un contenido de albúminas de un 52.1%, de globulinas 7S un 20.1%, de globulinas 11S con un 10.6%, prolaminas con 0.8%, glutelinas 3.0% y residuos de proteínas con un 13.3%. Estos resultados presentan cierta homología con los encontrados en las proteínas de reserva del achiote. En otro trabajo realizado con *Theobroma cacao* (cacao) (Preza *et al.*, 2010) los resultados obtenidos fueron diferentes: albúminas con 24.37%, globulinas con 16.39%, prolaminas con 3.21% y glutelinas con 56.02%, que muestra mayor concentración en glutelinas y menor en albúminas en comparación con las proteínas de las semillas de achiote. Estos estudios muestran que la cantidad de proteínas de almacenamiento presentes en semillas de achiote presentan una proporción diferente a las ya analizadas en otras plantas como las antes mencionadas. Esta diferencia es más evidente en el contenido de albúminas, que presentaron una mayor presencia en comparación a otros modelos ya estudiados.

En la caracterización de las proteínas de almacenamiento por FPLC, la fracción denominada albúmina obtuvo un pico de aproximadamente 20 kDa o menos de 29 kDa (estándar: Anhidrasa Carbónica) similar a las proteínas 2 Svedberg (S), que se componen de dos pequeñas cadenas de polipéptidos de 9 kDa y 12 kDa, que están unidas por puentes S-S, esto en las proteínas 2 S de colza (*Brassica napus*). La fracción correspondiente a las globulinas totales presentó tres picos con pesos aproximados para el primer pico de 669 kDa, seguido del pico de 300 kDa y el tercero menor de 29 kDa. Hay que recordar que las globulinas comúnmente son oligómeros hexaméricos con seis subunidades y cada subunidad está compuesta por dos polipéptidos, uno ácido y otro alcalino unidos por puentes de disulfuro, de pesos moleculares de 50 a 60 kDa (Plietz *et al.*, 1987). En nuestro caso, la Figura 3.6 muestra que el segundo pico corresponde al que se menciona en la literatura (Walter, 2005)., y el primer pico probablemente esté

constituido por dos monómeros que hacen que el pico sea mayor a 669 kDa. Ejemplos de esto son la Tiro-Globulina Humana (HTG) que es una glucoproteína de 660 kDa compuesta de dos monómeros idénticos de 330 kDa (Marino y McCluskey, 2000). Con respecto a las glutelinas se obtuvo un pico de 6 kDa o menor a 29 kDa (anhidrasa carbónica). Estos resultados cromatográficos en condiciones nativas indican que las albúminas, globulinas totales y glutelinas pudieran estar unidas por uniones no covalentes o por puentes disulfuro (Preza *et al.*, 2010).

En la secuenciación de aminoácidos de las proteínas de almacenamiento de las semillas de *B. orellana* se encontró que los aminoácidos no esenciales predominantes son: ácido glutámico y aspártico, mientras que en aminoácidos esenciales predominan la leucina y treonina, comparando esto con las leguminosas, donde predominan la lisina y treonina, mientras que en los cereales predominan triptófano, metionina, cisteína y treonina. Con esto se puede deducir que el perfil de aa de las proteínas de almacenamiento de las semillas *B. orellana* no es similar ni a leguminosas ni a cereales, pero sin embargo este perfil sí es similar a la semilla de amaranto silvestre (Subhra Chakraborty *et al.*, 2000), puesto que sus aa mayoritarios son leucina, ácido aspártico y glutámico, respectivamente.

En la actividad antioxidante con los métodos de ABTS y ORAC-FL, las proteínas de almacenamiento de achiote presentaron actividad antioxidante en atrapamiento de cationes con la fracción de glutelina y por el método de ORAC FL, la fracción albúmina presentó la mayor capacidad de absorción del radical oxígeno causado por el AAPH ya que protege a la fluoresceína contra el ataque de este radical libre. Con estos datos se muestra que las fracciones proteicas en achiote sí presentan actividad tanto en radical peróxido como en radical catiónico. Esta capacidad antioxidante puede ser por su secuencia de aminoácidos, ya que en estudios hechos en soya (*Glycine max*), cuya actividad antioxidante en la fracción β -conglucina o globulina 7S, se encontró que poseían los aminoácidos hidrofóbicos valina o leucina en su N-terminal; así también, residuos de histidina y tirosina en su secuencia, lo que le proporciona a la soya actividad antioxidante mediante quelación y atrapamiento de radicales libres; además de que varios aminoácidos como: tirosina, metionina, histidina, triptófano y prolina mostraron actividad antioxidante, pero en concentraciones elevadas estos pueden actuar como pro-oxidantes (Chen, *et al.*, 1995; Chen, Muramoto *et al.*, 1998; Wu, Chen *et al.*, 2003; Pihlanto 2006). Si bien no se encontró la presencia de triptófano y prolina en semillas de achiote, sí

presentaron tirosina, metionina e histidina. La mayoría de estos aminoácidos pudieran darle actividad antioxidante. Las proteínas y/o péptidos de la fracción de albúminas que presentó mayor actividad antioxidante pueden actuar impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar y/o interactuar más rápido con los radicales libres, que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venereo *et al.*, 2002).

Se evaluó la actividad antitumoral en ratones BALB/c con la línea celular de linfoma murino L5178Y, contra tres proteínas de almacenamiento (albúminas, globulinas y glutelinas) de las semillas de *B. orellana* por vía oral con 25 mg/kg/día. La albúmina mostró la mayor actividad antitumoral con respecto al control de L5178Y (grupo de ratones sin tratamiento) puesto que disminuyó el volumen de ascitis y masa tumoral en el 17.6% de los ratones BALB/c. Si bien, no se sabe la secuencia de los péptidos, sí se sabe el perfil de aminoácidos, por lo cual se puede deducir la actividad antitumoral con estudios hechos en soya con una pequeña proteína con actividad inhibidora de proteasas conocida como inhibidor Bowman-Birk (BBI). Este consiste en 71 aminoácidos y siete enlaces disulfuro (Birk, 1985, Clemente *et al.*, 2011, Farinaz *et al.*, 2013). También en soya, en la fracción albúmina 2S se encontró un péptido de 43 aminoácidos nombrado lunasin (lunasina en español) que contiene en su extremo C-terminal nueve residuos de Asp (D) responsable del efecto antimetabólico, que provoca la muerte celular. El péptido lunasina se considera como el mejor candidato que se espera pudiera estar presente en *B. orellana*.

La BBI ya ha mostrado actividad antitumoral en cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata en ratones por su eficiencia contra carcinógenos químicos, oncogenes e inhibidores de proteínas supresoras de tumores (Galvez *et al.*, 2001; González *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009). Si bien, durante la determinación de aminoácidos de *B. orellana* se puede descartar la presencia de BBI por carecer de Cys (C), y con esto carecer de los siete enlaces disulfuro, para lunasina no es el caso, puesto que en *B. orellana* se encontraron los mismos aminoácidos con funciones conocidas que se encuentran en la secuencia del péptido lunasina (ver Figura 1.1) como: los aminoácidos que introducen a lunasina a las células, así como los aminoácidos que apuntan a las histonas y sobre todo la abundancia de Asp (D) característico de lunasina que unen a este péptido al núcleo de las histonas causando la apoptosis (Hernández *et al.*, 2009).

En la hidrólisis enzimática sucesiva con pepsina, tripsina y quimotripsina se obtuvieron diferentes hidrolizados de la fracción albúmina visualizándolo en geles SDS-PAGE de tricina, pero en el perfil cromatográfico por FPLC se pudo apreciar mejor la hidrólisis de estas enzimas, aunque se observó un pico que presentó resistencia a la hidrólisis enzimática por enzimas digestivas, esto podría estar relacionado con sitios de unión a ligandos (Mihalyi, 1972) o la unión de dos átomos de hierro a una molécula de ovotransferrina que hace a la proteína completamente resistente a la proteólisis enzimática (Azari y Feeney, 1958), o posiblemente a proteínas inhibitoras de proteasas, que podrían encontrarse en achiote y que juegan un papel importante en la resistencia a hidrólisis enzimática por enzimas digestivas. Se menciona también que con un simple tratamiento con amilasa podría invertirse este fenómeno puesto que en soya el tratamiento con amilasa ha mejorado significativamente la hidrólisis enzimática (Boonvisut y Whitaker, 1976); también con tratamientos con alcalasa en maíz (Jiang *et al.*, 2013) se logró la liberación de péptidos con funciones biológicas sobre líneas celulares cancerígenas.

Sobre el efecto citotóxico en las líneas celulares transformadas de linfoma murino L5178Y se demostró que las fracciones B5, B7, C5, C12 y D10 poseen efecto citotóxico $p < 0.05$, siendo la fracciones C5 liberadas por acciones de las enzimas digestivas, presentando concordancia con el incremento de la capacidad citotóxica de extractos proteicos sometidos a hidrólisis enzimática, simulando la digestión gastrointestinal, de las semillas de amaranto (Barrio *et al.*, 2010).

En el resultado obtenido en la proliferación celular de linfocito de bazo de ratón BALB/c, se observó que la fracción C5, purificada por FPLC, tuvo un efecto mitogénico estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con el control de células, todo esto a una concentración de 5 μg proteína /mL y no mostró efecto significativo de la proliferación celular con otras concentraciones superiores como 10 y 15 μg proteína /mL. Esto podría explicarse como menciona Wagner (1990) argumentando que las moléculas de bajo peso molecular pueden comportarse como agentes citotóxicos, las cuales son conocidas como agentes antitumorales, recalcando esto en dosis altas, mientras que en dosis bajas pueden ejercer actividad inmunoestimulante. Existen péptidos ampliamente estudiados con actividad inmunoestimulante en lácteos (Korhonen *et al.*, 2003). En arroz también se observó que el péptido oryzatensin obtenido a partir de la fracción de albúmina, cuya

secuencia es Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg, posee una actividad inmunoestimulante como un mediador de la liberación de histamina (Takahashi *et al.*, 1996). También en respuesta anti-inflamatoria a bajas concentraciones (1 ng/mL) como las lectinas desnaturalizadas de las semillas de *Abrus precatorius* presentaron actividad inmunoestimulante produciendo la citocina interleucina-1 (IL-1), la cual está relacionada con la respuesta inflamatoria, así también, la activación de linfocitos promoviendo la maduración y expansión clonal de células B y aumentando la actividad de células NK (asesinas naturales) (Tripathi y Maiti, 2003). En este estudio la dosis aplicada fue de 5 µg proteína/mL, por lo que se puede suponer que la fracción C5 puede actuar como inmunoestimulante en linfocitos de bazo de ratón BALB/c.

BIBLIOGRAFÍA

- Azari P. R. and Feeney R. E. (1958). Resistance of metal complexes of conalbumin and transferrin to proteolysis and to thermal denaturation. *Journal of Biological Chemistry*, 232(1), 293-302.
- Barrio D. and Añón M. C. (2010). Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*” *European Journal of Nutrition*, 49, 73-82.
- Birk Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor-Trypsin and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 25, 113-131.
- Boonvisut S. and Whitaker, J. R. (1976). Effect of heat, amylase and disulphide bond cleavage on the *in vitro* digestibility of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (6), 1130-1135.
- Cao G., Sofic E. and Prior R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Cao G. and Prior R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44 (6), 1309-1315.
- Chen H.M., Muramoto K. and Yamauchi F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578.
- Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K. and Nokihara K., (1998). Antioxidative properties of histidine containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 49-53.
- Clemente A, Sonnante G and Domoney C. (2011). Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives *Current Protein and Peptide Science*, 12, 358-373.

- Farinaz Safavi and Abdolmohamad Rostami (2013). Bowman-Birk Protease Inhibitor as a Potential Oral Therapy for Multiple Sclerosis Soybean - *Bio-Active Compounds: Chapter 5*.
- Galvez A.F., Chen N. and Macasieb J. (2001). Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Research* 61, 7473-7478.
- Grisel Y. Morales-Arellano, Alicia Chagolla-López, Octavio Paredes-López and Ana P. Barba de la Rosa (2001). Characterization of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) Proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 49, 1512-1516.
- González de Mejía E., Vásconez M., de Lumen B.O. and Nelson R. (2004). Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5882-5887.
- Hernández-Ledesma B., Hsieh C.-C. and de Lumen B.O. (2013). Lunasin, a Seed Peptide with Promising Cancer Preventive Properties, *Protein & Peptide Letters*, 20, 1-9
- Hernández-Ledesma B, Hsieh C.-C. and de Lumen B.O. (2009). Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*, 30, 426-430.
- Hernández-Ledesma B., Recio I., Ramos M. and Amigo L., (2002). Preparation of ovine and caprine α -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12, 805-812.
- Jiang-Tao L., Jiu-Liang Zhang, Hui H., Zhi-Li M., Zhi-Kui N., Zhen-Zhen Wang and Xiao-Gen X. (2013). Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. *Food and Chem Toxicology*. 51: 297-305.
- Korhonen H. and Pihlanto A. (2003). Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Marino M. and McCluskey RT (2000). Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *American Journal of Physiology*, 279, 1295-1306.

- Mihalyi E., (1972). Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure Studies, CRC, Press, Cleveland, Ohio.
- Preza A. M., Jaramillo M. E, Puebla A. M., Mateos J C. and Hernández R, Lugo E. (2010). Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao L.*) Seed in relation with *in vitro* antioxidant activity. BMC Complementary and Alternative Medicine, 10, 61.
- Pihlanto A (2006): Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal, 16, 1306-1314.
- Paul Plietz, Bernd Drescher and Gregor Damaschun (1987). Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11S seed globulins. International Journal of Biological Macromolecules, 9, 161-165.
- Ribeiro A. C., Teixeira A. R. and Ferreira R. B. (2004). Characterization of Globulins from Common Vetch (*Vicia sativa L.*). Journal Agricultural and Food Chemistry, 52, 4913-4920.
- Takahashi M., Moriguchi S., Ikeno M., Kono S., Ohata K., Usui H., Kurahashi K., Sasaki R. and Yoshikawa M. (1996). Studies on the ileum-contracting mechanisms and identifications as a complement C3a receptor agonist of oryzatensin, a bioactive peptide derived from rice albumin. Peptides, 17, 5-12.
- Tripathi S. and Maiti T.K. (2003). Stimulation of murine macrophages by native and heat-denatured lectin from *Abrus precatorius*. International Immunopharmacology, 3, 375-381.
- Silva-Sánchez C., Barba de la Rosa AP., León-Galván MF., De Lumen BO., De León-Rodríguez A. and González de Mejía E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. Journal Agricultural and Food Chemistry, 56, 1233-1240.
- Venereo JR. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar, 31, 126-33.

Wagner H. (1990). Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). *Pure & Applied Chemistry*. 62, 1217-1222.

Wu HC, Chen H.M. and Shiao CY (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

De las proteínas de almacenamiento presentes en las semillas de *Bixa orellana* (achiote), se determinó que la fracción proteica de almacenamiento correspondiente a albúminas fue la fracción mayoritaria con un 49%, seguida por globulina tipo 7S con 24.78%, globulina tipo 11S con 10.20%, prolamina con 0.75% y glutelina con 15.20%. La fracción correspondiente a prolaminas fue muy reducida, siendo apenas de un 0.75%, razón por la cual no se continuó trabajando con esta proteína de almacenamiento.

Las fracciones proteicas de albúmina y glutelina mostraron la mayor actividad antioxidante para ambos métodos ORAC-FL y ABTS, respectivamente.

La fracción albúmina mostró actividad antioxidante contra radical peróxido por el método ORAC-FL, mientras que la fracción correspondiente a glutelina mostró mayor actividad antioxidante contra radical catiónico.

La fracción correspondiente a albúmina con una dosis oral de 25 mg/kg/día en ratones BALB/c con linfoma murino mostró la mayor tasa de inhibición de 17.6%.

Las condiciones de hidrólisis enzimática para albúminas fueron: concentración enzima-sustrato (E/S) de 1:50 y temperatura de 37 °C, cambiando únicamente el pH de 1.5, 7.5, 8 y agregando amortiguador de HCl, Tris-HCl y CH₃CONH₄ para las enzimas pepsina, tripsina y quimotripsina, respectivamente, siendo éstas sus condiciones de activación.

Se tuvieron perfiles cromatográficos mediante FPLC de los hidrolizados de albúmina con hidrólisis secuencial de pepsina-tripsina-quimotripsina, que fueron purificadas con este tipo de cromatografía. El cromatograma mostró un pico que tuvo actividad inhibidora de proteasas ya que no fue hidrolizado aun con el transcurso de un tiempo total de 5 h.

La albúmina sin hidrolizar no mostró efecto citotóxico estadísticamente significativo ($p < 0.05$), mientras que la albúmina hidrolizada con enzimas digestivas sí mostró efecto $p < 0.05$ a 10 µg proteína/mL sobre células transformadas de linfoma murino L5178Y.

El resultado de las albúminas hidrolizadas por enzimas digestivas de las fracciones B5, B7, C5, C12 y D10, purificados por FPLC, mostró un efecto citotóxico de 99% a 10 µg/mL sobre células transformadas de linfoma murino L5178Y, resultados similares se obtuvieron con los hidrolizados purificados con la enzima alcalasa a 10 µg proteína/mL.

Las fracciones antes mencionadas posiblemente lleguen a activar más de una vía de muerte celular, provocando apoptosis, necrosis e incluso oncosis.

El efecto citotóxico selectivo de los hidrolizados de albúmina, purificados por FPLC, con un efecto mitogénico estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de la fracción C5 a una concentración de 5 µg proteína/mL sobre la proliferación de linfocitos de ratón BALB/c.

Con todo esto, las proteínas y los péptidos de achiote, específicamente C5, podrían establecerse como un nuevo nutracéutico preventivo contra especies reactivas de oxígeno y el cáncer, con estos resultados se podría establecer al achiote como un alimento quimiopreventivo. Para esto es necesario llevar a cabo más estudios que nos conduzcan a la confirmación de los resultados aquí obtenidos.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se planteó una nueva alternativa de aplicación de *Bixa orellana*, ya que tradicionalmente se utiliza como pigmento con aplicación en la industria alimentaria. En este caso las proteínas y péptidos provenientes de *B. orellana* mostraron actividad antitumoral y citotóxica en la línea celular de linfoma murino L5178Y, sin embargo, es necesario explorar en otras líneas celulares como las de cáncer de colon, pulmón, mama, cervico uterino, etc., para ver si las proteínas o péptidos de achiote pueden tener el mismo efecto que con la cepa BALB/c y células transformadas de linfoma murino L5178Y que se probaron en este trabajo.

El mecanismo de acción en los péptidos de origen vegetal sólo se conoce para soya, sin embargo, es importante conocer si para achiote es el mismo o diferente, por lo que es importante conocer la secuenciación de los péptidos que presentaron actividad biológica para achiote. Una vez definida la secuencia del péptido se podría trabajar en encontrar el mecanismo de acción. También, una vez teniendo la secuencia del péptido, se pueden generar anticuerpos que permitan detectar el péptido en los hidrolizados de la proteína de diversos productos de aplicación en la industria nutracéutica, así como la absorción de estos péptidos en humanos.

RECOMENDACIONES

En el análisis antitumoral con ratones BALB/c, se recomienda determinar la dosis letal vía oral de proteínas, para poder evaluar la dosis IC_{50} y con esto obtener una dosis más adecuada para futuros tratamientos quimopreventivos.

Durante la evaluación de la actividad inhibitoria de la oxidación, se recomienda un fluorómetro con control de temperatura, así como de inyección de muestras automatizada.

La obtención de cantidades mayores de las fracciones peptídicas es primordial para estos ensayos citotóxicos, ya que en la purificación se obtienen cantidades muy bajas de péptidos.

Se requiere de secuenciación de los péptidos con actividad citotóxica para evaluar si es un nuevo péptido bioactivo, o es una secuencia ya conocida.