



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

HARINA DE CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius*) UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA ACEITERA, COMO FUENTE DE PROTEÍNAS DE BAJO PESO MOLECULAR CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Piñuel, L.¹, Torreta J.¹ & Barrio, D.A.¹

Universidad Nacional de Río Negro. CIT-Río Negro-CONICET. Viedma-Argentina

RESUMEN

El aprovechamiento de nuevas oportunidades de mercado requiere del desarrollo de cadenas de valor de algunos productos, aptos para su cultivo y transformación. El cártamo (*Carthamus tinctorius*) es un cultivo herbáceo y anual que se lo explota actualmente en la Norpatagonia para la obtención de aceites, los cuales presentan propiedades benéficas para la salud. Durante la extracción del aceite se genera un subproducto (pellet o torta) que generalmente se descarta o se lo reutiliza para la elaboración de alimento animal. Este trabajo tuvo como objetivo la obtención de un aislado proteico con actividad biológica a partir de harina obtenida luego de la extracción de aceite de las semillas de cártamo. La harina desgrasada con acetona en una relación de 1:5 se utilizó para extraer proteínas con dimetilsulfóxido. El extracto proteico fue dializado en buffer fosfato 10 mM pH 7. Las proteínas fueron caracterizadas mediante SDS-PAGE. Las actividades biológicas evaluadas fueron: actividad antioxidante a través del método ABTS; actividad hemoaglutinante (AH), a partir de la observación de la aglutinación de eritrocitos humanos O(+) y actividad antitumoral, utilizando el modelo del pez cebra (*Danio rerio*). La caracterización fisicoquímica del aislado confirmó que se logró aislar proteínas de bajo peso molecular en un rango de 15-30 kDa, las mismas han sido descriptas para esta especie como ricas en los aminoácidos metionina y cisteína. El aislado proteico mostró actividad antioxidante de 0,84 μ moles equivalente de Trolox/mg de proteína y una actividad hemoaglutinante específica de 133 U/mg de proteína. Por último, se evaluó la potencial actividad antitumoral del aislado durante 48 h y se observó que una concentración de proteínas de 180 μ g/ml inhibió el desarrollo normal del embrión del pez cebra. Los resultados de las actividades biológicas evaluadas resultan prometedores para la utilización de estas proteínas en la formulación de nuevos alimentos funcionales.

Palabras clave: Proteínas alimentarias, actividad antioxidante, hemoaglutinante, antitumoral, *Danio rerio*.

INTRODUCCIÓN

Hay una tendencia global en el desarrollo de aislados y concentrados proteicos que ayuden a cubrir los déficit nutricionales de la población mundial. En este contexto, la búsqueda y evaluación de nueva fuentes de proteínas y péptidos bioactivos ayudará a mejorar la salud humana y contribuirá en la prevención de enfermedades crónicas. La elección de la fuente de proteína puede evaluarse ya sea, considerando propiedades biológicas de interés para la salud humana o por la necesidad de agregar valor a proteínas subutilizada. Este enfoque proporciona la oportunidad de diversificar el uso de los cultivos agrícolas más allá de los propósitos básicos de nutrición y biocombustibles. Especies como *Carthamus tintorius* L. (cártamo) han sido introducido como cultivos alternativo en la zona de la Patagonia Norte. El mismo es un cultivo que se adapta a suelos poco fértiles, diferentes climas y necesita poca agua. Estas características agronómicas hace que sea una especie altamente adaptada a condiciones de aridez de zonas de la Patagonia Norte y sea utilizada para la obtención de aceite (Composición de la semilla: aceite: 35-50 %, proteínas: 15-20 %, carbohidratos: 35-45 %) (Rahamatalla et al., 2001). Luego de la extracción de aceite, el remanente sólido o torta es usado para la alimentación animal dado su alto contenido de proteínas. Este subproducto de la obtención de aceite de cártamo puede ser empleado para la obtención de aislados proteicos con el fin de ser incluidos en alimentos para mejorar sus propiedades nutricionales y aprovechar más eficientemente las proteínas de cártamo (Betschart, 1979; Sridhara & Prakash, 1987). Las proteínas de las semillas del cártamo están constituidas predominantemente por una fracción 12S y otras tres componentes cuyos valores de coeficiente de sedimentación son: 2S, 7S y 17S (Latha & Prakash 1984). Estas fracciones, contienen una mezcla de albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal) y proteínas de glutelinas (solubles en álcalis). La fracción 2S consta de ocho cadenas de polipéptidos, con pesos moleculares que varían de 10,000 a 18,000 Da; dos de estas cadenas tienen niveles de metionina (16 %) y cisteína (8 %) superiores a lo normal (Kortt y Caldwell, 1990). Este alto nivel de aminoácidos que contienen azufre puede ser importante para el valor nutricional y funcional de los aislamientos resultantes. Aislados obtenidos de semillas de cártamo han exhibido actividades biológicas, incluyendo inmunomodulación, anti-infarto, anti-alérgicos, efectos anti-inflamatorios y anti-estrogénicos (Chang et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento no se han descrito estudios con propiedades antitumorales y antioxidante de sus aislados proteicos. El objetivo de este trabajo fue obtener un aislado de proteínas de

bajo peso molecular con actividad biológica, a partir de la torta obtenida luego de la extracción de aceite de las semillas de cártamo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y caracterización de aislados proteicos

Con el objeto de estudiar las propiedades biológicas de las proteínas de cártamo es necesario obtener aislados proteicos a partir de harina desgrasada e identificar características físico-químicas de los péptidos activos.

1.1. Obtención de aislado de proteínas de bajo peso molecular

Con el objetivo de obtener un aislado con proteínas de bajo peso molecular a partir de harina proveniente de semillas de cártamo, se utilizó como medio de extracción dimetilsulfoxido (DMSO) al 100 %. La extracción se llevó a cabo en una relación 1:10, a temperatura ambiente durante 3 h. El aislado fue dializado con una membrana con cut off de 14 kDa en buffer fosfato 10 mM pH: 7,0 durante 24 h a 8 °C. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford.

1.2. Caracterización fisicoquímica de aislados proteicos

Las proteínas obtenidas fueron caracterizadas mediante electroforesis desnaturizante y reductora por el método SDS-PAGE de Laemmli (1970) usando geles de separación de 10 % y 16 % de acrilamida.

2. Actividades biológicas

2.1. Determinación de lectinas o hemoaglutininas

Las hemoaglutininas son proteínas que tienen la capacidad característica de aglutinar los glóbulos rojos de una manera similar a los anticuerpos. Para su determinación, células rojas de la sangre fueron resuspendidas en solución fisiológica (NaCl 0,9 %) a una concentración final de 4 %. Por otro lado, se prepararon diferentes diluciones seriadas del aislado proteico y 50 µl de estas se agregan en platos multipocillo donde previamente se agregó la suspensión de glóbulos rojos (50 µl). Luego de 1 h se observó si hay hemoaglutinación a 37 °C. Una unidad de hemoaglutinación se define como la mínima cantidad de lectina capaz de aglutinar células y es equivalente a una concentración de 2 pg/ml de lectina (Rinderle, 1990).

2.2. Determinación de actividad antioxidante *in vitro*

La determinación de la actividad antioxidante del aislado proteico fue evaluada mediante los métodos de DPPH y de ABTS según Brand-Williams et al. (1995) y Re et al. (1999) respectivamente. Brevemente, una solución de 1 mg/ml de proteínas fue

utilizada para evaluar la actividad antioxidante por los métodos mencionados. Se utilizó Trolox como antioxidante sintético de referencia ($y = 0,8503 X - 0,0373$, $R^2 = 0,9914$) y los resultados se expresaron en μ moles de equivalente de Trolox/mg de proteína.

2.3. Modelo antitumoral de inhibición de la proliferación celular en huevos del pez cebra

El pez cebra es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento como la búsqueda de nuevas drogas antitumorales (Nagel, 2002; Hill, 2005). El mantenimiento de los peces cebra para la producción de huevos (embriones) se realizó de acuerdo a lo descrito por Westerfield (2000). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Murphey & Zon (2006). Brevemente, en un plato multipocillo se agregaron las diferentes diluciones de los aislados a ensayar (45, 90, 120, 180, 257, 360 y 900 μ g de proteína/ml). Se reservarán pocillos para los controles sin el agregado de ninguna sustancia. Los huevos fertilizados fueron colocados en los pocillos del plato con la asistencia de una pipeta Pasteur. Luego, a las 8, 24 y 48 h de exposición fueron evaluadas las siguientes características (*apical endpoints*): número de huevos coagulados, irregularidades en la formación de *somites* y no despegado de la cola. En los pocillos control a las 48 h no deberá haber más del 10 % de los huevos con las características antes mencionadas para que el ensayo sea válido. Los peces serán considerados muertos si una de las características descriptas es observada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de aislados de proteínas de bajo peso molecular

Los aislados proteicos previamente dializados fueron caracterizados por electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10 % y 16 % (figura 1a y 1b, respectivamente). En el gel de 10 % se pueden observar 2 bandas intensas menores a los 37 kDa, las cuales no pueden ser resueltas en este gel. Sin embargo, cuando el mismo aislado proteico es separado en un gel de 16 %, se pueden observar 4 bandas bien definidas por debajo de 37 kDa (36; 33; 31,8 y 29 kDa), una banda intensa a 20 kDa, seguida de una de 18 kDa y una de 13 kDa. En este sentido, la extracción con 100% de DMSO favoreció la solubilización de proteínas de bajo peso molecular como la bien caracterizada fracción 2S descrita previamente en cártamo (Latha & Prakash 1984). Por otro lado, ha sido descrita en girasol (*Helianthus annuus L*) otra especie de la familia de las Asteraceae dos bandas de 17 y 18,5 kDa en geles de 12% SDS-PAGE, correspondiente a

subunidades de una lectina de 72 kDa con afinidad a D-manosa (Suseelan et al., 2002). Sin embargo, aún no ha sido descrita la presencia de lectinas en aislados de *Carthamus tinctorius*.

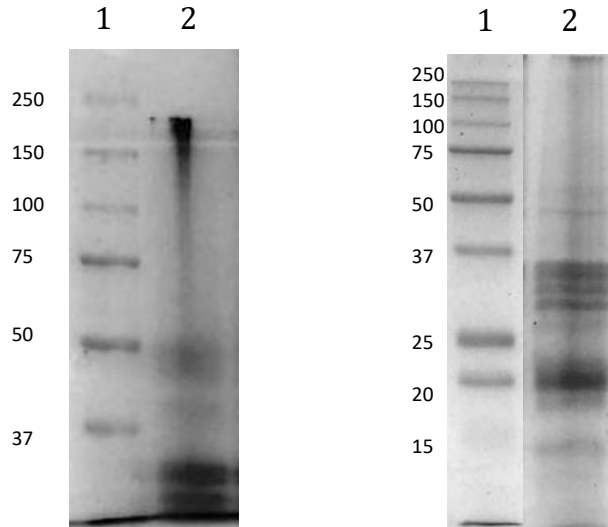


Figura 1: SDS-PAGE de aislados proteicos de *Carthamus tinctorius* a) Gel de poliacrilamida al 10 %. Calles: 1: Marcador de peso molecular; 2: aislado proteico de harina de Cártamo en 100 % v/v DMSO. b) Gel de poliacrilamida al 16 %. Calles: 1: Marcador de peso molecular; 2: aislado proteico de harina de Cártamo en 100 % v/v DMSO.

2. Actividades biológicas de proteínas de bajo peso molecular

Actividad antioxidante *in vitro*

Cuando se evaluó la actividad antioxidante del aislado proteico (1mg/ml) por los métodos de DPPH y ABTS, se obtuvo una actividad de 0,17 y 0,84 μ moles equivalente de Trolox/mg de proteína. Estos valores equivalen a 170 y 840 μ moles ET/g de proteína y representan una actividad antioxidante de 2-3 veces mayor que la actividad de aislados de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) y quinua (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) descritas por nuestro grupo de trabajo (Piñuel et al., 2019a, Piñuel et al., 2019b). Los aminoácidos presentes en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres estabilizando electrones mostrando así la actividad antioxidante. Los más reactivos incluyen los azufrados metionina y cisteína, los aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina y los que contienen anillo imidazol como la histidina. Sin embargo, los aminoácidos libres en general no son efectivos como antioxidantes. La mayor actividad de los péptidos y proteínas de bajo peso molecular comparada con los aminoácidos libres se debe a las propiedades fisicoquímicas conferidas por sus secuencias de

aminoácidos que contribuyen a estabilizar electrones. La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes alimentarias incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos como valina o Leucina en el amino terminal, así como prolina, histidina, tirosina, triptófano, metionina y cisteína en sus secuencias (Saito et al., 2003). Los péptidos de bajo peso molecular descritos en cártamo presentan una alta proporción de aminoácidos azufrados y aromáticos que podría contribuir con la actividad antioxidante descrita (Kortt y Caldwell, 1990; Mansouri et al., 2018).

Actividad hemoaglutinante (AH)

En la tabla 1 se muestra la AH del aislado proteico obtenido. Como puede observarse la última dilución que presenta actividad es 1:8, esto es equivalente a 1,125 mg de proteína/ml y la actividad hemoaglutinante específica fue de 133 U/mg de proteína. De esta manera se sugiere la existencia de lectinas en el aislado proteico. La capacidad de aglutinar eritrocitos de la sangre se debe a la interacción con azúcares, propiedad que dio origen a su denominación como hemoaglutininas. Se evaluó la inhibición de la AH en presencia de 200 mM de glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, manosa, trealosa, galactosamina, N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina para una concentración de 4,5 mg/ml de proteína sin detectar inhibición por competición. En girasol se ha descrito una hemoaglutinina con afinidad a D-manosa (Suseelan et al., 2002) y en pseudocereales como amaranto las aglutininas descritas presentan afinidad por N-acetil-glucosamina (Hernandez et al., 2002). Es necesario aislar e identificar el péptido activo y secuenciarlo para demostrar la presencia de lectinas en cártamo como así también evaluar el mecanismo de hemoaglutinación.

Tabla 1. Actividad aglutinante sobre eritrocitos del grupo sanguíneo humano “0” factor Rh +. “+++” alta, “++” moderada, “+” leve y “-“ nula aglutinación.

Dilución (9 mg/ml)	Actividad hemoaglutinante
1:2	+++
1:4	++
1:8	+
1:16	-

Inhibición de la proliferación celular en huevos del pez cebra

Las primeras etapas del desarrollo del embrión del pez cebra incluye una actividad proliferativa celular acelerada que puede ser utilizada para evaluar compuestos activos

con capacidad para frenar los procesos biológicos asociados a la división celular (Moon et al., 2002; Chakraborty et al., 2009). La inhibición de la proliferación celular podría incluir mecanismos específicos relacionados con la iniciación o prolongación del ciclo celular, que adviertan la presencia de potenciales compuestos antitumorales. Los aislados proteicos de bajo peso molecular extraídos con DMSO mostraron efectos antiproliferativos, retardando el desarrollo de los embriones del pez cebra. A partir de concentraciones de proteína de 180 $\mu\text{g/ml}$ se observa el retraso en el desarrollo de los embriones. Es importante destacar que concentraciones más altas de los aislados proteicos (900 $\mu\text{g/ml}$) muestran un marcado retraso en la proliferación celular de los embriones, sin llegar a necrosar los mismos, sugiriendo que el efecto inhibitorio es específico, característico de compuestos que inhiben la proliferación celular con potencial efecto antitumoral. Por otro lado, la extracción de aislados proteicos con DMSO, un solvente de baja polaridad, extrae mayoritariamente proteínas hidrofóbicas, propiedad que favorece su capacidad para atravesar membranas biológicas y de esta manera ingresar a la célula para ejercer su efecto antiproliferativo. El efecto antitumoral de las lectinas estaría asociado con la desorganización de las fibras de actina del citoesqueleto de las células causando la muerte (Barrio & Añón, 2010). Una característica de las células tumorales es la presencia de azúcares extracelulares en la membrana plasmática y dado que las lectinas poseen afinidad por los azúcares presentarían mayor afinidad por las células tumorales (Schoeppner et al., 1995, Yau et al., 2015). Adicionalmente, la especificidad de las lectinas por diferentes azúcares podría determinar su selectividad por distintos tumores.

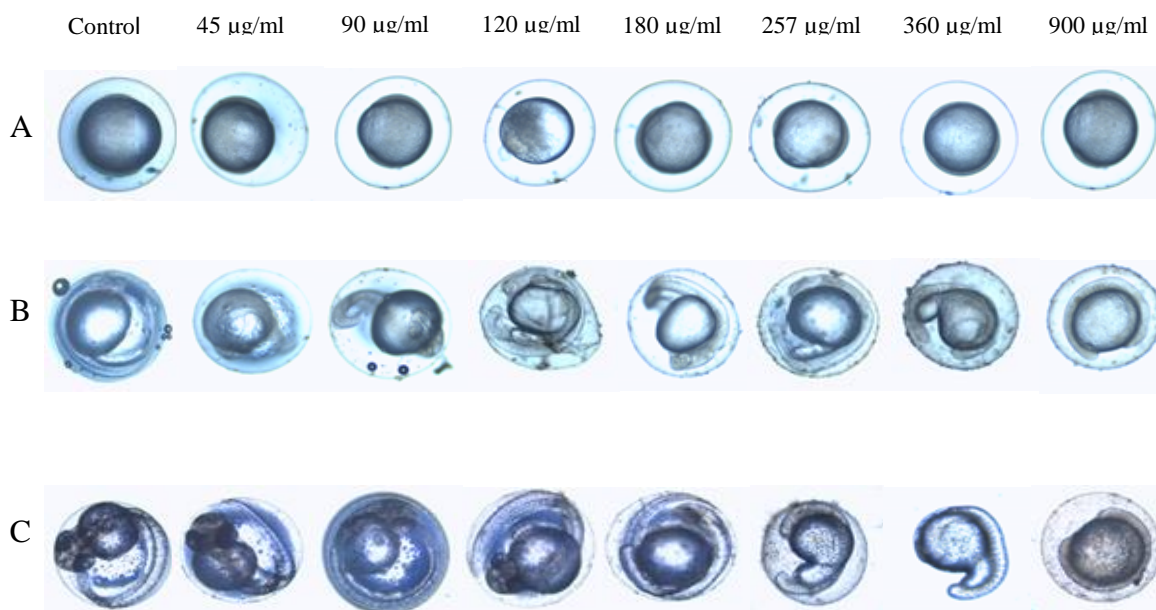


Figura 2. Desarrollo del embrión del pez cebra (*Danio rerio*) expuesto a distintas concentraciones de aislado proteico de cártamo (*Carthamus tinctorius*). A) 8 h, B) 24 h y c) 48 horas post fertilización.

CONCLUSIONES

Se logró extraer proteínas de cártamo de bajo peso molecular con actividad hemoaglutinante utilizando DMSO como solvente. El PM de las proteínas se encuentra por debajo de 37 kDa y se identificaron 7 bandas que pertenecerían a la fracción 2 S. Las proteínas de cártamo extraídas presentan actividad antioxidante, hemoaglutinante y antitumoral que podrían ser utilizadas como componentes activos para el desarrollo de alimentos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

A la UNRN por financiar, brindar el espacio y equipos para llevar adelante el presente trabajo.

Este trabajo fue además financiado por ANPCyT (PICT 2015-1698 Préstamo BID).

Los autores pertenecen a la carrera del investigador y becario del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Barrio, D. A., & Añón, M. C. 2010. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European journal of nutrition*, 49(2), 73-82.
- Betschart AA. 1979. Development of Safflower Protein. *J. AM. OIL CHEMISTS' SOC.* 56: 454-457.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier & C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28: 25-30
- Chakraborty, C., Hsu, C. H., Wen, Z. H., Lin, C. S., & Agoramoorthy, G. 2009. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Current drug metabolism*, 10(2), 116-124.
- Chang, Hung, Chyan, Cheng, Wu, 2011. *Carthamus* enhances the antitumor activity of dendritic cell vaccines via Polarization toward Th1 Cytokines and increase of Cytotoxic T lymphocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-10.
- Hernández, P., Debray, H., Jaekel, H., Garfias, Y., del Carmen Jiménez, M., Martínez-Cairo, S., & Zenteno, E. 2001. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycoconjugate journal*, 18(4), 321-329.
- Hill, Teraoka, Heideman, Peterson 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86:6-19.
- Kortt, A.A., Caldwell, J.B., 1990. Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry* 29 (9), 2805-2810.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Latha & Prakash, 1984. Studies on the proteins from Safflower Seed (*Carthamus tinctorius* L). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 32:1412-1416.
- Mansouri, F., Ben Moumen, A., Richard, G., Fauconnier, M. L., Sindic, M., Elamrani, A., & Serghini Caid, H. 2018. Proximate composition, amino acid profile, carbohydrate and mineral content of seed meals from four safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties grown in north-eastern Morocco. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*.
- Moon, H. S., Jacobson, E. M., Khersonsky, S. M., Luzung, M. R., Walsh, D. P., Xiong, W., ... & Rosania, G. R. 2002. A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening. *Journal of the American Chemical Society*, 124(39), 11608-11609.
- Murphey, & Zon, 2006. Small molecule screening in the zebrafish. *Methods* 39:255–261.
- Nagel, 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-28.
- Piñuel, L., Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, D. A., Morales, D., Pinto, A., Moran, R., Samaniego, I. & Carrillo, W. 2019a. Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *J. Appl. Pharm. Sci*, 9, 1-14.
- Piñuel, L., Boeri, P., Zubillaga, F., Barrio, D. A., Torreta, J., Cruz, A., Vasquez, G., Pinto, A. & Carrillo, W. 2019b. Production of White, Red and Black Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants*, 8(8), 257.
- Rahamatalla, AB, Babiker EE, Krishna AG and El Tinay AH. 2001. Changes in fatty acid composition during seed growth and physicochemical characteristics of oil extracted from flour safflower cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56: 385-395.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rinderle, Goldstein, Remsen 1989. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*. 1990. 294: 17253-17255.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674.
- Schoeppner, H. L., Raz, A., Ho, S. B., & Bresalier, R. S. 1995. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer*, 75(12), 2818-2826.
- Sridhara S & V. Prakash. 1987. Isolation and Characterization of Low Molecular Weight
- Suseelan,a, Mitra, R. Pandey K.B. Sainis, & Krishna. 2002. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407: 241–247.
- Westerfield & Monte, 2000. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th Edition. University of Oregon.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C., & Ng, T. 2015. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791-3810.