



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE PECTINAS NEUTRAS DE COSETA
AGOTADA DE REMOLACHA, MODIFICADAS ENZIMÁTICAMENTE, SOBRE LA
LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

INGRID BEATRIZ ARENAS VERGARA

Director de tesis: Dra. Jacqueline Concha O.

Co-director de tesis : Dra. Caroline Weinstein O.

Valparaíso – Chile

2015

Dedicado

A todos mis seres queridos,

A mi familia,

A mis amigos,

Y a mis profesoras.

AGRADECIMIENTOS

Durante esta etapa de mi vida, he conocido a muchas personas y generado hermosos lazos de amistad. Es por ello que agradezco a Cote, Vale, Karime, David, Dani, Pauli, Mayo, Rosa, Katy, Mauri, Klau, Claudia, y muchos más, por brindarme cariño y aprecio, compartir el día a día, no solo en la Facultad, sino también fuera de ésta, y por estar ahí cuando más lo necesitaba.

Quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres por el apoyo que me brindaron y compartir esos buenos y malos momentos, a mi hermana, “huesitos” gracias por hacerme reír y escucharme. También a mi abuelita y tía Teresa, gracias por darme cariño y comprensión.

A mi tío abuelito Juan, gracias por brindarme siempre su apoyo, cariño, consejos y su constante alegría frente a la adversidad. Nunca lo olvidaré, siempre estará en mis recuerdos y en mi corazón.

Muchas gracias a mis profesoras, Jacqueline y Caroline, por enseñarme más allá de la biología la química y la farmacología, gracias a ambas por sus consejos cuando me sentía más frustrada.

Gracias a todos los chicos del Laboratorio 5, a Pame, Romi, Andrea, Meme, Cristian, Sol, gracias por compartir conmigo en la investigación y en esas tardes de sushis, completos, pizzas, permitieron que esta actividad se hiciera más amena.

Andrea, muchas gracias por compartir conmigo esas tardes y noches de trabajo, pese al cansancio. En estos meses pude conocerte mejor y formar una linda amistad, que espero perdure en el tiempo.

Quiero agradecer a las 3 Claudias del QUIFAC, a Natalia Romo, Marcela Vasconcelo, a Don Boris, Juan y Luis por estar disponibles a todas las necesidades que se presentaron durante mi trabajo de tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Epidemiología del Cáncer	1
1.3. Tratamiento del Cáncer.....	2
1.4. Pectinas	3
1.4.1. Estructura Química y Clasificación	3
1.4.2. Fuentes de Obtención	5
1.4.3. Extracción de Pectinas.....	7
1.4.4. Pectinas y Cáncer	8
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo General	12
3.2. Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIALES Y METODOS	13
4.1. MATERIA PRIMA.....	13
4.2. REACTIVOS	13
4.3. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	13
4.4. OBTENCIÓN DE LAS PECTINAS	14
4.4.1. Tratamientos Previos.....	14
4.4.2. Tratamientos Enzimáticos	16
4.5. CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS	17
4.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés).....	17
4.5.2. Contenido de Ácido Galacturónico	17

4.5.3. Determinación de Proteínas por Kjeldhal	18
4.5.4. Azúcares Totales (CHO)	18
4.5.5. Azúcares Reductores (DNS)	18
4.5.6. Determinación de Proteínas Solubles por Bradford.....	18
4.5.7. Sólidos Solubles.....	18
4.6. SEPARACIÓN DE PECTINAS NEUTRAS POR PESO MOLECULAR.....	19
4.7. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINAS NEUTRAS	19
4.8. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA.....	20
4.8.1. Mantenición de cultivos celulares.....	20
4.8.2. Actividad antiproliferativa mediante ensayo resazurin.....	20
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. Obtener pectinas neutras de coseta agotada de remolacha, mediante el tratamiento enzimático con preparados comerciales de distinta actividad hidrolítica (Rohapect® DA6L, Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L).	22
5.2. Seleccionar el preparado enzimático que origina pectinas con la mejor actividad antiproliferativa sobre las células de cáncer de mama MCF-7.....	33
5.3. Analizar el efecto del fraccionamiento por membrana de la pectina neutra seleccionada sobre la actividad antiproliferativa.....	34
5.4. Comparar la actividad antiproliferativa de las pectinas neutras antes y después de la hidrólisis enzimática con Rohapect® DA6L sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.....	37
6. CONCLUSION	39
7. REFERENCIAS.....	40
8. ANEXOS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Estructura esquemática de las pectinas neutras.....	5
Figura 1-3. Composición química de coseta agotada de remolacha.....	6
Figura 1-4. Lugar de acción de las pectinasas.....	7
Figura 1-5. Representación de mecanismo de acción de MCP.....	10
Figura 4-1. Tratamientos previos de coseta agotada de remolacha.....	15
Figura 4-2. Esquema de obtención de pectinas neutras a partir de coseta agotada de remolacha desmineralizada y desproteinizada.....	16
Figura 4-3. Resumen de análisis de productos obtenidos a partir de la extracción.....	17
Figura 4-4. Esquema de separación de pectinas neutras según peso molecular.....	19
Figura 5-1. Espectro FT-IR de pectinas ácidas de coseta agotada de remolacha obtenida con Corolase PP al 2% E/S.....	23
Figura 5-2. Actividad antiproliferativa de pectinas ácidas originales de coseta sobre células de la línea MCF-7.....	24
Figura 5-3. Balance de masa general en la obtención de sustancias pécticas a partir de coseta agotada de remolacha.....	25
Figura 5-4. Actividad antiproliferativa de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7, obtenidas a partir de Rohapect® DA6L.....	26
Figura 5-5. Espectros por FT-IR de extractos de pectinas obtenidas a partir del tratamiento enzimático.....	27
Figura 5-6. Espectro por FT-IR de extracto de pectina obtenida con Rohapect® DA6L.....	30
Figura 5-7. Espectro por FTIR en absorbancia pectina neutra de coseta obtenida con pectinasas.....	31
Figura 5-8. Actividades Antiproliferativa de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7 recuperadas con las enzimas.....	33
Figura 5-9. Distribución por tamaño molecular (%) después de la separación física a partir de 1 g de pectina neutra.....	34
Figura 5-10. Actividad antiproliferativa de pectinas neutra y ácida de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7.....	35
Figura 5-11. Actividad antiproliferativa de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L sobre la línea celular MCF-7.....	36
Figura 5-12. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Rohapect® DA6L.....	36
Figura 5-13. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 6 horas.....	37

Figura 5-14. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 12 horas.....	38
Figura 8-1. Análisis químico-proximal de coseta agotada de remolacha.	48
Figura 1-2. Curva de Calibrado para estimar % grado de esterificación.	50
Figura 1-3. Curva de Calibrado AGA.....	53
Figura 1-4. Curva de Calibrado Azúcares Totales.....	54
Figura 1-5. Curva de Calibrado DNS.....	55
Figura 1-6. Curva de Calibrado Bradford.....	56
Figura 8-7. Espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha después de tratamiento con MPE.....	59
Figura 8-8. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Rohapect® DA6L (razón E/S 2%) y posterior tratamiento con MPE.	59
Figura 8-9. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Viscozyme® L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE.	60
Figura 8-10. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Rohapect® DA6L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE.	60
Figura 8-11. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Pectinex® Ultra SP-L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE.....	61
Figura 8-12. Espectros FT-IR de modelos de polisacáridos de las paredes celulares	62
Figura 8-13. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Viscozyme® L.....	63
Figura 8-14. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón 24% E/S).	63
Figura 8-15. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón 2% E/S).	64
Figura 8-16. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 6 horas	65
Figura 8-17. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 12 horas.....	65
Figura 8-18. Comparación de espectros FT-IR en absorbancia de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4-1. Enzimas utilizadas en los procedimientos experimentales.	13
Tabla 5-1. Porcentaje de Sólidos Solubles de las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.	27
Tabla 5-2. Contenido de proteínas en pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático.	28
Tabla 5-3. Contenido de ácido galacturónico de las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.	32
Tabla 5-4. Contenido de azúcares reductores y totales de las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.	32
Tabla 8-1. Pectinas utilizadas para realizar la curva para estimar el grado de esterificación.	50
Tabla 8-2. Serie de diluciones para la curva estándar de ácido D-(+)-Galacturónico.	52
Tabla 8-3. Grado de esterificación de pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón E/S al 2%) antes y después del tratamiento con MPE.	58
Tabla 8-4. Grado de esterificación de pectinas ácidas obtenidas a partir de tratamientos previos.	58
Tabla 8-5. Contenido de ácido galacturónico de pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático y fraccionamiento físico.	67
Tabla 8-6. Contenido de ácido galacturónico de pectinas neutras obtenidas a partir Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L. Tiempo de hidrólisis: 6 horas (control 1 y 2 y muestra 1 y 2); 12 horas (control 3 y 4 y muestra 3 y 4).....	67
Tabla 8-7. Contenido de ácido galacturónico de pectinas ácidas obtenidas a partir de tratamientos previos.....	67
Tabla 8-8. Prueba ANOVA de pectinas ácidas.	68
Tabla 8-9. Test de comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP, Agua Alcalina y EDTA.	68
Tabla 8-10. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP y Agua Alcalina.....	68
Tabla 8-11. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP y EDTA.	69
Tabla 8-12. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Agua Alcalina y EDTA.....	69
Tabla 8-13. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L a 24% y 2%.....	70
Tabla 8-16. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas por extracción enzimática.	70
Tabla 8-17. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L, Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L.	71

Tabla 8-18. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y Rohapect® DA6L	71
Tabla 8-19. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L	71
Tabla 8-20. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L	72
Tabla 8-21. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectina neutra obtenida a partir de Viscozyme® L y pectina ácida de coseta.	72
Tabla 8-22. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L de distinto tamaño molecular.....	73
Tabla 8-23. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L. Sin fraccionar, >100 kDa y < 100 kDa	73
Tabla 8-24. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y Viscozyme® L > 100 kDa	73
Tabla 8-25. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y Viscozyme® L < 100 kDa	74
Tabla 8-26. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L > 100 kDa y Viscozyme® L < 100 kDa	74
Tabla 8-27. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L de distinto tamaño molecular.....	75
Tabla 8-28. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar, >100 kDa y < 100 kDa.....	75
Tabla 8-29. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar y Rohapect® DA6L > 100 kDa.	75
Tabla 8-30. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar y Rohapect® DA6L < 100 kDa.	76
Tabla 8-31. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L > 100 kDa y Viscozyme® L < 100 kDa.	76
Tabla 8-32. Prueba ANOVA de pectinas neutras tratadas enzimáticamente por 6 horas	77
Tabla 8-33. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 6 horas.....	77
Tabla 8-34. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 1, sin precipitar con etanol.	78

Tabla 8-35. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 1, tratada con Rohapect® DA6L por 6 horas y sin precipitar con etanol.....	78
Tabla 8-36. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 2 precipitado con etanol.	78
Tabla 8-37. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 2, tratada con Rohapect® DA6L por 6 horas y precipitado con etanol.	79
Tabla 8-38. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente por 12 horas.....	80
Tabla 8-39. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 12 horas.....	80
Tabla 8-40. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 1, sin precipitar con etanol.	81
Tabla 8-41. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 1, tratada con Rohapect® DA6L por 12 horas y sin precipitar con etanol.....	81
Tabla 8-42. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 2 precipitado con etanol.	81
Tabla 8-43. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 2, tratada con Rohapect® DA6L por 12 horas y precipitado con etanol.	82

RESUMEN

La búsqueda de nuevas sustancias bioactivas como potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer es un área de gran interés, debido a la necesidad de nuevas entidades químicas más efectivas y con menores efectos adversos. Entre estas moléculas las pectinas, polisacáridos de estructura compleja presentes en fuentes vegetales, se visualizan como potenciales agentes quimioterapéuticos. Su actividad antiproliferativa ha sido ampliamente estudiada en pectinas ácidas (homogalacturonanos y arabinogalactanos I y II), pero existe escasa evidencia de la acción de las pectinas neutras (arabinanos, galactanos y arabinogalactanos I y II). Además, se ha demostrado que las pectinas ácidas modificadas presentan una mejor acción inhibitoria sobre el crecimiento de células tumorales que las sin modificar, debido principalmente a la disminución de su peso molecular. Por lo tanto, en este trabajo se plantea que *“la modificación de pectinas neutras de coqueta agotada de remolacha, mediante tratamiento enzimático con pectinasas, genera pectinas de menor grado de polimerización lo que aumenta su actividad antiproliferativa sobre las células del cáncer de mama MCF-7”*.

Para validar la hipótesis planteada, se llevaron a cabo los siguientes procesos: 1) extracción y caracterización de pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático, utilizando pectinasas (Rohapect® DA6L, Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L) a una razón E/S de un 24%, a 45°C, pH 4,5 por 15 h y posterior separación por peso molecular; 2) hidrólisis enzimática a 6 y 12 h usando la enzima comercial Rohapect® DA6L, de acción arabanasa y poligalacturonasa; 3) medición de la actividad antiproliferativa sobre células MCF-7 de las pectinas neutras originales, su fracciones físicamente separadas según su peso molecular (sobre y bajo 100 kDa) e hidrolizadas enzimáticamente. Los resultados obtenidos indican que las pectinas neutras separadas físicamente no mejoran su actividad antiproliferativa al disminuir su tamaño. Sin embargo, aquellas extraídas por tratamiento enzimático, sin hidrólisis posterior, poseen actividad antiproliferativa que puede alcanzar un 50% a una concentración de 5 mg/mL. Estos promisorios resultados permiten visualizar este proceso como un método de recuperación de pectinas neutras de interesante potencial farmacológico.

ABSTRACT

The search for new bioactive substances as therapeutic alternatives for the treatment of cancer is an area of great interest due to the great need of more effective and safer new chemical entities. Among these molecules pectins, polysaccharides with complex structure, present in vegetable sources are envisioned as potential chemotherapeutics. Their antiproliferative activity has been widely studied for acidic pectins (homogalacturonans and rhamnogalacturonans I and II), but there is scarce evidence about the action of neutral pectins (arabinans, galactans or arabinogalactans I and II). Also, it has been shown that modified acid pectins show a better inhibitory action on tumor cell growth than the unmodified ones, mainly due to a reduced molecular weight. Therefore, in this research it is proposed that *"the modification of neutral pectins in exhausted sugar beet pulp by enzymatic treatment with pectinases generates pectins with a lower degree of polymerization which increases their antiproliferative activity on breast cancer MCF-7 cells"*.

To validate this hypothesis, the following procedures were performed: 1) extraction and characterization of neutral pectins obtained by enzymatic treatment, using pectinase (Rohapect® DA6L, Viscozyme® L and Pectinex® Ultra SP-L) at a rate E/S of 24%, 45 ° C, pH 4.5 by 15 h and subsequent separation by molecular weight; 2) enzymatic cleavage at 6 and 12 h using the commercial enzyme Rohapect® DA6L with an action arabanase and poligalacturonase actions; 3) measurement of the anti-proliferative activity on MCF-7 cells for the original pectin, its physically separated fractions according to molecular weight (over and under 100 kDa) and enzymatically hydrolyzed neutral pectin. The results indicate that neutral pectins physically fractionated do not improve their antiproliferative activity as they reduce their size. However, the ones extracted by an enzymatic treatment, with no further hydrolysis, possess antiproliferative activity which can reach 50% at a concentration of 5mg/mL. These promising results allow to envision this process as a method that recovers neutral pectins with an interesting pharmacological potential.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades, que comprende la transformación progresiva de células normales en células malignas, las cuales sufren varias mutaciones hasta la formación de un tumor (Macdonald *et al.*, 2004). Esta transformación es iniciada por factores endógenos (genéticos) y exógenos (ambientales), que alteran genes involucrados en la mantención del equilibrio entre la proliferación y muerte celular (Pelengaris & Khan, 2006; Weinberg, 2014).

1.2. Epidemiología del Cáncer

Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), esta enfermedad es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial y se le atribuyen 8,2 millones de defunciones en todo el mundo en el año 2012. Se estima que alcanzará los 22 millones en las próximas dos décadas (Ferlay *et al.*, 2014).

Chile, al igual que otros países del mundo, ha presentado un incremento en la morbilidad y mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles, debido al aumento en el nivel de condiciones de vida, al envejecimiento poblacional, a los avances en los servicios de diagnóstico y a los cambios en el estilo de vida poco saludables como el alto consumo de tabaco y alcohol, bajo consumo de frutas y verduras, sedentarismo y obesidad (Díaz *et al.*, 2012). Según los indicadores del año 2013, la primera causa de muerte en Chile son las enfermedades cardiovasculares, y en segundo lugar los tumores malignos, cuya tasa observada fue de 142,5 por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta y Araucanía el cáncer pasa a ser la primera causa de muerte (Itriago, Silva & Cortes, 2013).

Los cánceres que presentan una mayor incidencia son cáncer de próstata (28%) y mama (20%), mientras que los que generan un mayor porcentaje de muertes son cáncer de estómago (17%) y mama (12%), este último, a partir de los 45 años de edad, incrementa su mortalidad, concentrando el 91% de defunciones totales por este tipo de neoplasia (Itriago *et al.*, 2013).

1.3. Tratamiento del Cáncer

En los últimos años, el cáncer de mama se ha consolidado como uno de los principales problemas de Salud Pública en América Latina. Actualmente, el tratamiento se realiza de acuerdo a la evaluación del estadio de la enfermedad, edad y según la mujer sea pre o post menopáusica. El tratamiento consiste en el uso de terapia de reemplazo hormonal (tamoxifeno), uso de inhibidores de aromatasas, uso de anticuerpos monoclonales que actúan sobre la proteína HER-2 (trastuzumab), radioterapia y cirugía (mastectomía), los cuales pueden ser combinados. El tratamiento puede ser de dos tipos: adyuvante y neoadyuvante. El tratamiento adyuvante se realiza después de la terapia principal, y su objetivo es aumentar la supervivencia sin recurrencia.

En el caso de un cáncer no metastásico se utiliza CA (Ciclofosfamida + Adriamicina), FAC (5-Fluorouracilo + Adriamicina + Ciclofosfamida), Paclitaxel, Trastuzumab o Ixabelipona y posterior a la quimioterapia el paciente siempre debe recibir radioterapia. Por otra parte, el tratamiento neoadyuvante se realiza antes de una cirugía o terapia principal con el objetivo de disminuir el tumor (Torres *et al.*, 2010).

Sin embargo, la terapia anticancerígena tradicional (radioterapia y quimioterapia) posee reacciones adversas severas, que disminuyen la calidad de vida del paciente, implica altos costos económicos y afecta su entorno familiar y social. Además, muchas veces la terapia convencional es inefectiva generando el fracaso terapéutico o la recurrencia temprana de la enfermedad. Por ejemplo, en el cáncer de mama un 9% de mujeres presentan recaída después de la radioterapia, en el cáncer de colon-rectal la recurrencia aumenta a un 20% después de la cirugía curativa en estadios tempranos y el cáncer gástrico presenta una recurrencia de hasta un 54% después de 5 años de terminado el tratamiento antineoplásico (Bartelink *et al.*, 2001; Maehara *et al.*, 2000, Overgaard *et al.*, 1997; Reimers *et al.*, 2014).

Frente a esta realidad, hoy en día se buscan nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer, entre estas los polisacáridos, cuya eficacia anticancerígena fue reconocida por primera vez en 1946 (Nauts, Swift & Coley), al observar una completa remisión en los pacientes con cáncer. Dentro de este grupo se encuentran las pectinas cítricas modificadas (MCP, por sus siglas en inglés). La administración oral de MCP en ratas con cáncer prostático y colon-rectal, permite la inhibición de la metástasis y crecimiento tumoral, al impedir la adhesión de las células cancerosas al endotelio (Liu *et al.*, 2008; Pienta *et al.*, 1995).

1.4. Pectinas

Las pectinas son un grupo complejo de heteropolisacáridos que constituyen el 35% de la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas y plantas no gramíneas, y un 5% de la pared celular primaria de plantas gramíneas (Azcón & Talón, 2000; Levinge *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2013).

1.4.1. Estructura Química y Clasificación

Las sustancias pécticas, según su estructura química, se clasifican en ácidas y neutras. Las pectinas ácidas están constituidas por restos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces glicosídicos α -(1,4). Dentro de este grupo, los polisacáridos más comunes son homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos I (RGI) y ramnogalacturonanos II (RGII), mientras que xilogalacturonanos (XG) y apiogalacturonanos (AG), se presentan en menor proporción (ver **Figura 1-1**) (Mohnen, 2008).

Los HG, conocidos como la “región lisa” predominante de las pectinas, están compuestos por homopolímeros de ácido D-galacturónico (GalA) unidos por enlaces α -(1,4), cuyos grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metil-esterificados en la posición C6 y posiblemente parcialmente O-acetilados en la posición C2 y/o C3 (Ridley *et al.*, 2001).

Los RGI, conocidos como la “región rugosa”, están constituidos por un esqueleto de disacáridos repetidos $[-4) \alpha$ -D-GalA-(1,2)- α -L-Rha-(1)]_n, compuestos por GalA O-acetilados en la posición C2 y/o C3 y residuos de ramnosa (Rha) intercalados y unidos por enlaces α -(1,2). Además, los RGI se encuentran altamente ramificados con azúcares neutros (α -L-arabinosa y β -D-galactosa) y unidos a cadenas laterales de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos por residuos de Rha (Ridley *et al.*, 2001).

Los RGII están formados por una cadena lineal de GalA unidos por enlaces α -(1,4), nonasacárido (cadena B), octasacárido (cadena A) compuestos por L-ramnosa, D-galactosa y azúcares poco comunes, unidos a la posición C2 del esqueleto principal (Ridley *et al.*, 2001).

En menor proporción, se encuentran los xilogalacturonanos (XG) y los apiogalacturonanos (AG). Los XG presentan residuos β -D-xilosil unidos a la posición C3 de su esqueleto principal, mientras que los AG poseen residuos β -D-apiofuranosil en la posición C2 y C3 de su cadena principal (Ridley *et al.*, 2001).

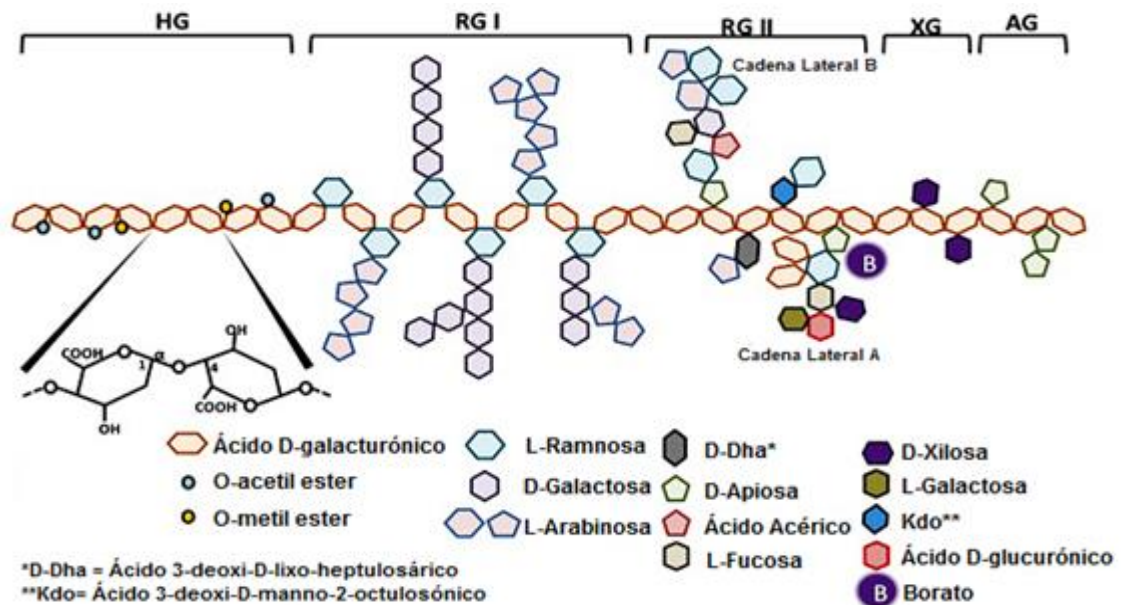


Figura 1-1. Representación esquemática de la estructura de una pectina. HG: Homogalacturonano, RG: Ramnogalacturonano, XG: Xilogalacturonano y AG: Apiogalacturonano (Leclere *et al.*, 2013, adaptado)

Las pectinas neutras están constituidas por azúcares neutros de L-galactosa (L-Galp) y/o L-arabinosa (L-Araf). Dentro de este grupo se encuentran galactanos, arabinanos y arabinogalactanos I y II (**Figura 1-2**) (Azcón & Talón, 2000).

El galactano está formado por L-galactosas unidas mediante enlaces glicosídicos β -(1,4). El arabinano está constituido por L-arabinosas unidas por enlaces α -(1,5) y usualmente se encuentran sustituidas por residuos α -L-Araf-(1,2)- y α -L-Araf-(1,3)- y/o α -L-Araf-(1,3)- y α -L-Araf-(1,3). Tanto los galactanos como arabinanos se unen al ácido ferúlico mediante enlace éster. El arabinogalactano I está formado por residuos D-Galp unidos mediante enlaces β -(1,4), y sustituidos en la posición O3 y O6 con α -L-Araf y β -Galp, respectivamente. El arabinogalactano II presenta un esqueleto formado por D-Galp unidos por enlaces β -(1,4) y posee cadenas laterales cortas de residuos L-Araf unidos por enlace α -(1,3) y puede asociarse a proteínas (Voragen *et al.*, 2009).

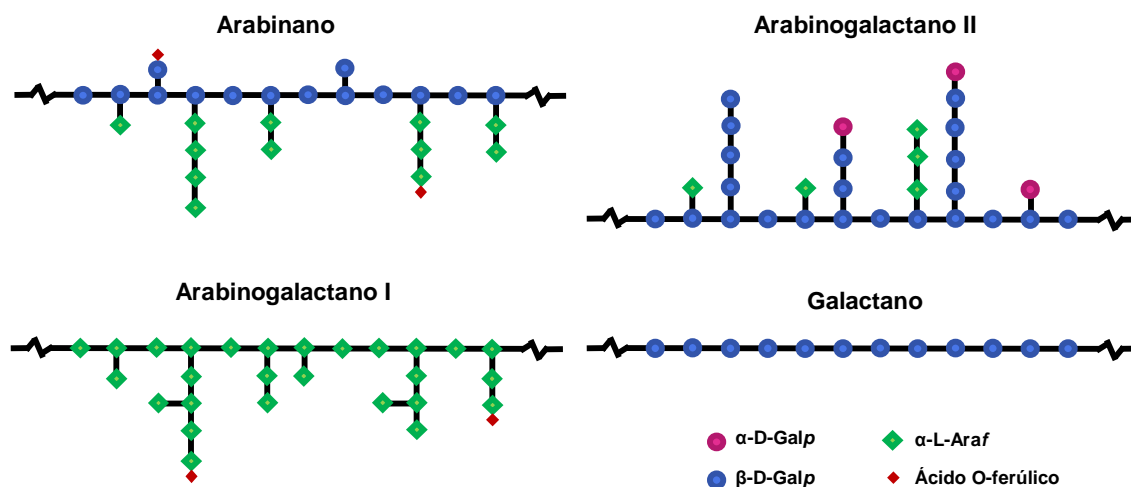


Figura 1-2. Estructura esquemática de las pectinas neutras (Voragen *et al.*, 2009, adaptado)

Otra forma de clasificación de los polisacáridos pécticos es a través del grado de esterificación (DE), en pectinas de alto grado de metoxilación (LM), cuyo DE se encuentra entre 60 – 75% y pectinas de bajo grado de metoxilación (HM), las cuales presentan un DE entre 20 – 40% y corresponden a moléculas desmetiladas o amidadas. Esta diferencia en el DE influye directamente en la capacidad formadora de geles de las pectinas. De esta manera, las pectinas de HM requieren un pH 3 para formar geles y un dispersante (dextrosa) para evitar la formación de grumos. Por otra parte, las pectinas de LM son independientes del pH, presentan propiedades emulsionantes y solo requieren un control de la cantidad de iones de calcio y otros iones divalentes para el proceso de gelificación (Sriamornsak, 2003).

Tanto la estructura, grado de esterificación y propiedades fisicoquímicas y funcionales de las pectinas dependerá de la materia prima y del tipo de extracción (Yapo *et al.*, 2007a).

1.4.2. Fuentes de Obtención

Las sustancias pécticas se obtienen a partir de distintas fuentes vegetales, pero se extraen principalmente de la pulpa de la manzana y de la cáscara de frutas cítricas como naranja y limón. Sin embargo, existe la posibilidad de ser extraídas a partir de residuos agroindustriales ricos en polisacáridos pécticos como el raps (Cobs, 2013), generado en la producción del aceite de canola o como la coseta agotada de remolacha, generada en el proceso de la producción industrial del azúcar (Martínez *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013).

La remolacha es una hortaliza de raíz redonda, perteneciente a la familia de las *quenopodiáceas*. Su raíz principal se ramifica en cotiledones, de los cuales se desarrollan hojas ovaladas y lampiñas de color verde oscuro o pardo rojizo. Su raíz de forma globular, presenta en su parte central zonas opacas fibrosas (ricas en azúcar) y zonas transparentes (rica en agua) y material nitrogenados (pobre en azúcar). Tradicionalmente, la industria azucarera utiliza la remolacha para la extracción de azúcar, generando subproductos como la coseta, utilizada para la alimentación de mascotas, equinos, bovinos y engorda del ganado lechero (Sepúlveda, 2013).

Según Oosterverld (1997), la coseta de remolacha está formada principalmente por un 19% de pectinas, 20% de arabinanos, 23% de celulosa y en menor proporción de grasa, lignina y otros componentes detallados en la **Figura 1-3**.

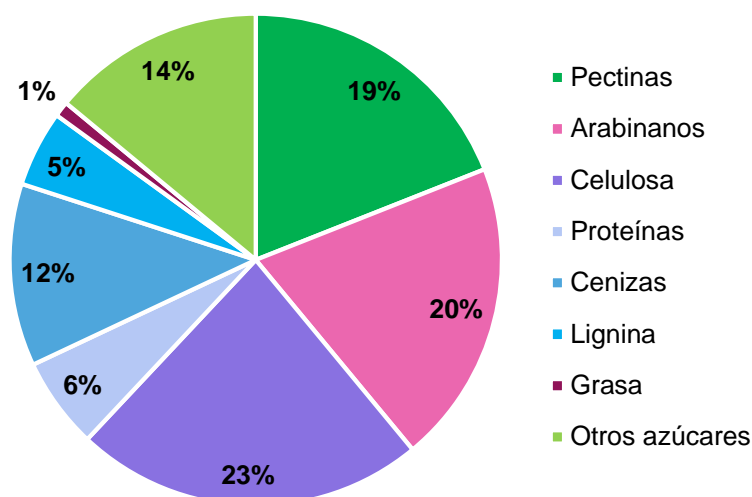


Figura 1-3. Composición química de coseta agotada de remolacha. (Oosterverld, 1997, adaptado)

Con respecto a la proporción de las pectinas de coseta, esta puede variar alcanzando una proporción cercana al 15 – 25% (Sun & Hughes, 1998), hasta un 30% (Kirby, MacDougall & Morris, 2008), variación que se debe principalmente al método de extracción utilizado.

1.4.3. Extracción de Pectinas

Existen metodologías de extracción variadas, sin embargo, los principales son métodos químicos y enzimáticos. La extracción química consiste en tratar la materia prima con ácidos diluidos calientes (HCl o H₂SO₄), agentes quelantes o soluciones frías de NaOH, con un pH 1 – 3, a una temperatura de trabajo 50 – 90 °C y en un rango de trabajo de 3 a 12 horas (Yapo, 2009). La recuperación se realiza mediante precipitación alcohólica (Levigne *et al.*, 2002; Yapo *et al.*, 2007b), para luego secar, granular y tamizar (Seggiani *et al.*, 2009).

Debido al uso de reactivos tóxicos en la extracción química, una alternativa más amigable con el medioambiente y más eficaz en términos de rendimiento, es la extracción por hidrólisis enzimática (Jeong *et al.*, 2013), la cual utiliza enzimas con actividad pectinolítica (Jayani *et al.*, 2005). Estas enzimas se clasifican en:

- Poligalacturonasa (PGU): degrada la pectina no esterificada rompiendo el enlace glicosídico α -(1,4) (ver **Figura 1-4**).
- Pectilmetilesterasa (PME): cataliza la hidrólisis de los ésteres metílicos de la pectina, disminuyendo el %DE, la adhesión intracelular y la rigidez. (ver **Figura 1-4**).
- Pectinliasa (PL): produce la degradación rápida y completa de la pectina, rompiendo el enlace glicosídico, disminuyendo el grado de polimerización (ver **Figura 1-4**).

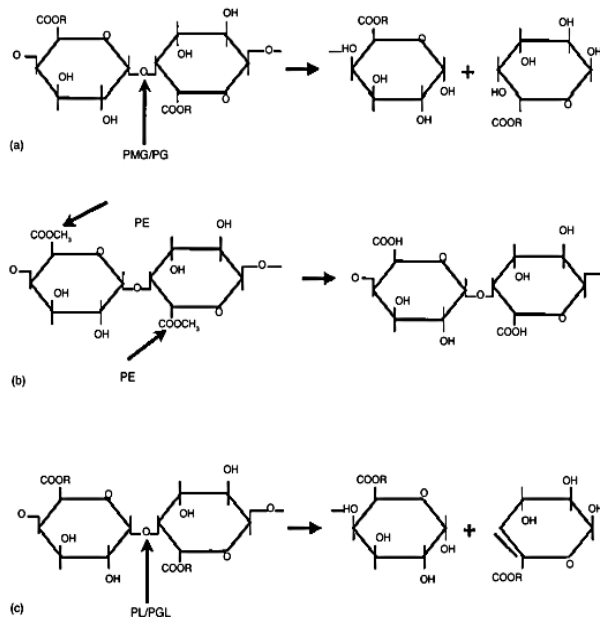


Figura 1-4. Lugar de acción de las pectinasas. (a) PMG, (b) PME o PE y (c) PL (Jayani *et al.*, 2005)

De acuerdo a los estudios disponibles de pectinas de pulpa de azúcar de remolacha, la capacidad de hidrólisis de las pectinasas con actividad endo-poligalacturonasa (endo-PG), pectinliasa y pectinmetilesterasa utilizadas para su extracción, se ve disminuida por el alto contenido de grupos acetilos (Remoroza *et al.*, 2014), el cual alcanza un 30% (Buchholt *et al.*, 2004; Levigne *et al.*, 2002; Yapo *et al.*, 2007a).

Recientemente, se han obtenido pectinas neutras a partir de residuos agroindustriales de raps (Cobs, 2013) y de coqueta agotada de remolacha (Concha & Zuñiga, 2012) por métodos enzimáticos. Éstas han demostrado tener actividad antiproliferativa sobre células de cáncer de mama y colon. No obstante, los mecanismos de acción han sido poco estudiados; se ha propuesto, en el caso de las pectinas ácidas, la unión e inhibición de galectina-3 (Niture & Refai, 2013).

De acuerdo a lo planteado por Arancibia (2014), las pectinas ácidas de coqueta agotada de remolacha presentan una mejor inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama a menor peso molecular, lo que sirve de fundamento para postular que las pectinas neutras de pequeño tamaño molecular presentarían el mismo comportamiento sobre la línea celular MCF-7.

1.4.4. Pectinas y Cáncer

En la industria alimentaria, las pectinas son utilizadas como agentes gelificantes y espesantes. De acuerdo al comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimenticios (JEFCA) de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que las pectinas son aditivos alimenticios de consumo seguro con distintivo GRAS (Generally Recognized As Safe).

Además de considerarse seguros, se le atribuyen los roles terapéuticos a las pectinas, tales como su participación en los procesos de inmunomodulación y efectos anticancerígenos (Niture & Refai, 2013).

Jackson *et al.* (2007), demostró que la pectina cítrica modificada por cambios de pH y temperatura llamada PectaSol® C, comercializada como suplemento nutricional, presenta actividad sobre células de cáncer de próstata al inducir la apoptosis de células tumorales. Las pectinas tratadas con temperatura y PME no pierden su actividad citotóxica, pero los HG, RGI y RGII por separado si la pierden. Los fragmentos ricos en HG y tratados térmicamente presentan una mayor actividad antiproliferativa, por inducción de la apoptosis, activación de la enzima caspasa-3 e inhibición de la vía de señalización MAPK / ERK (Jackson *et al.*, 2007).

Un alto peso molecular dificulta la absorción de las sustancias pécticas, es por ello que se ha postulado que se requiere pectinas de bajo peso molecular o de bajo grado de polimerización para alcanzar la circulación y los órganos blanco (Khotimchenko *et al.*, 2012). Se han realizado estudios de pectinas modificadas por método químico, térmico o enzimático. La modificación química, a través de un tratamiento ácido-térmico y un tratamiento alcalino, produce reacciones de β -eliminación y genera pectinas de bajo peso molecular (~10 kDa) desesterificadas (Morris *et al.*, 2013). Por otra parte, el tratamiento enzimático genera fragmentos pécticos con un peso molecular entre 5 a 10 kDa. De acuerdo a las investigaciones realizadas, las MCP presentaron actividad anticancerígena sobre líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Liu *et al.*, 2003), asociada a inhibición de la angiogénesis y de la expresión de la proteína nm23 relacionada con la metástasis, activación de las caspasas 3 y 8 y al antagonismo de la galectina 3 (Maxwell *et al.*, 2012).

La galectina 3 (Gal 3) es una proteína de la familia de las lectinas de pequeño peso molecular (14,5 – 38 kDa). Ésta se caracteriza por tener un tramo de 130 aminoácidos conservados, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Makker, Balan & Dwek, 2012). Esta proteína se expresa en el núcleo, citoplasma y membrana plasmática de las células cancerígenas. La diversa localización de la Gal 3 permite participar en una amplia gama de procesos biológicos que incluyen la adhesión celular heterotípica y homotípica, la migración, invasión, la activación, el crecimiento y la diferenciación. Por otra parte, participa en la angiogénesis, apoptosis, la progresión tumoral y la metástasis, a través de la unión con galacto-oligosacáridos presentes en la superficie celular y matriz extracelular (Morris *et al.*, 2013).

De acuerdo a las investigaciones de Satelli y sus colaboradores (2008), se determinó que los residuos galactósidos presentes en las MCP, interactúan con la galectina 3 de las células cancerosas, formando un complejo galectina-MCP, permitiendo que se genere la apoptosis de las células tumorales (ver **figura 1-5**).

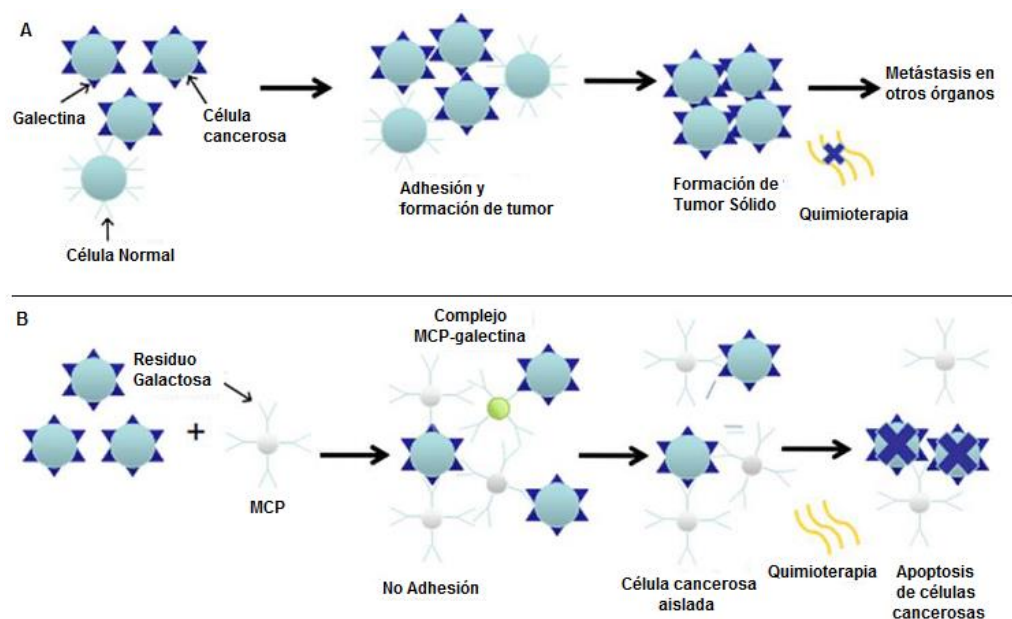


Figura 1-5. Representación de mecanismo de acción de MCP. A, Mecanismo de formación de tumor y posterior metástasis en otros órganos.; B, Mecanismo de acción de MCP propuesto y su rol relacionado al bloqueo de galectina-3, detención de metástasis y proliferación celular, y actividad quimiosensibilizante (Niture & Refai, 2013, adaptado).

Dado que las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha corresponden a polisacáridos de tipo arabinano, galactano y/o arabinogalactano, en esta investigación se evaluó la actividad antiproliferativa de fragmentos de bajo peso molecular, obtenidos por modificación física y enzimática, sobre células MCF-7 de cáncer de mama.

2. HIPÓTESIS

La modificación de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha mediante tratamiento enzimático con pectinasas genera pectinas de menor grado de polimerización lo que aumenta su actividad antiproliferativa sobre las células de cáncer de mama MCF-7.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa de pectinas neutras modificadas enzimáticamente sobre células de cáncer de mama MCF-7.

3.2. Objetivos Específicos

1. Obtener pectinas neutras de coqueta agotada de remolacha, mediante tratamiento enzimático con preparados comerciales de distinta actividad hidrolítica (Rohapect® DA6L, Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L).
2. Seleccionar el preparado enzimático que origina pectinas con la mejor actividad antiproliferativa sobre las células de cáncer de mama MCF-7.
3. Analizar el efecto del fraccionamiento por membrana de la pectina neutra seleccionada, sobre la actividad antiproliferativa.
4. Comparar la actividad antiproliferativa de las pectinas neutras antes y después de la hidrólisis enzimática con Rohapect® DA6L, sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada fue coseta agotada de remolacha donada por la empresa azucarera IANSA S.A. Este residuo agroindustrial fue caracterizado según la metodología descrita en A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists), para la determinación de humedad, cenizas, fibra cruda, proteínas, extracto etéreo y extracto no nitrogenado (ver Anexo A). Los valores se presentan en el Anexo B. Mientras que el contenido de pectina total en la pared celular de la materia prima se determinó por medio del método Van Soest *et al.*, (1991) (ver Anexo C).

4.2. REACTIVOS

Los productos químicos utilizados en este trabajo son de grado analítico (p.a.), con un porcentaje de pureza superior al 99%. Fueron adquiridos a Bio-Rad®, CalBiochem®, Corning Cellgro®, Gibco®, Lofken®, Merck®, Sigma-Aldrich® y Winkler LTDA. Sólo el etanol al 95% empleado es un reactivo de grado técnico.

Por otra parte, las enzimas comerciales utilizadas fueron proporcionadas por Novozymes® y AB Enzymes® (ver **Tabla 4-1**).

Tabla 4-1. Enzimas utilizadas en los procedimientos experimentales.

Enzima	Actividad principal	Proveedor
Corolase® PP	Proteasa	AB Enzymes®
Pectinex® Ultra SP-L	Pectinliasa/ Endopoligalacturonasa	Novozymes®
Viscozyme® L	Endo-β-glucanasa	Novozymes®
Rohapect® DA6L	Arabanasa/Pectinasa	AB Enzymes®
Rohapect® MPE	Pectin metil esterasa	AB Enzymes®

4.3. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La materia prima fue lavada con abundante agua destilada y luego secada al vacío a 60°C hasta completar el secado. Posteriormente, la coseta fue molida utilizando un molinillo eléctrico (IKA, A11 Basic) y almacenada en una bolsa plástica hermética (Ziploc®) a temperatura ambiente (Concha & Zuñiga, 2012).

4.4. OBTENCIÓN DE LAS PECTINAS

Se aplicó el protocolo de obtención de pectinas neutras según lo descrito en Concha *et al.*, (2012). Este se organiza en dos etapas: tratamientos previos y enzimáticos (**Figura 4-1** y **Figura 4-2**) que se describen a continuación.

4.4.1. Tratamientos Previos

La materia prima fue tratada con agua alcalinizada con NaOH (pH 7,5-8,0) en una razón sólido/líquido (S/L) 1:10 e incubada a 30°C por 2 h a 120 rpm (Shaking Incubator LabTech®, modelo LSI-3016). El producto sólido fue recuperado por filtración, lavado con etanol al 80% y finalmente con agua destilada para dejar secar en estufa a 40°C.

El producto del paso anterior fue tratado con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,01M en una razón S/L 1:10 e incubado a 60°C por 3h a 120 rpm. Luego se realizó el mismo proceso de filtración, lavado y secado del paso anterior, obteniéndose un residuo sólido libre de minerales. Este material sólido desmineralizado, fue desproteínizado por tratamiento con Corolase® PP al 2% razón enzima/sustrato (E/S) a pH 6,0 en una razón S/L 1:10 e incubado a 60°C por 4 h a 120 rpm. Luego se filtró por gravedad para la recuperación del sólido, el cual fue lavado con agua destilada a 100°C y secado a 40°C.

Cada una de las fracciones líquidas obtenidas (**Figura 4-1**), fueron precipitadas con tres volúmenes de etanol a 4°C por 12h, para la obtención de pectinas ácidas. Se recuperó un pellet por centrifugación (Hermle® modelo Z300) el que fue secado en estufa a 40°C, hasta peso constante.

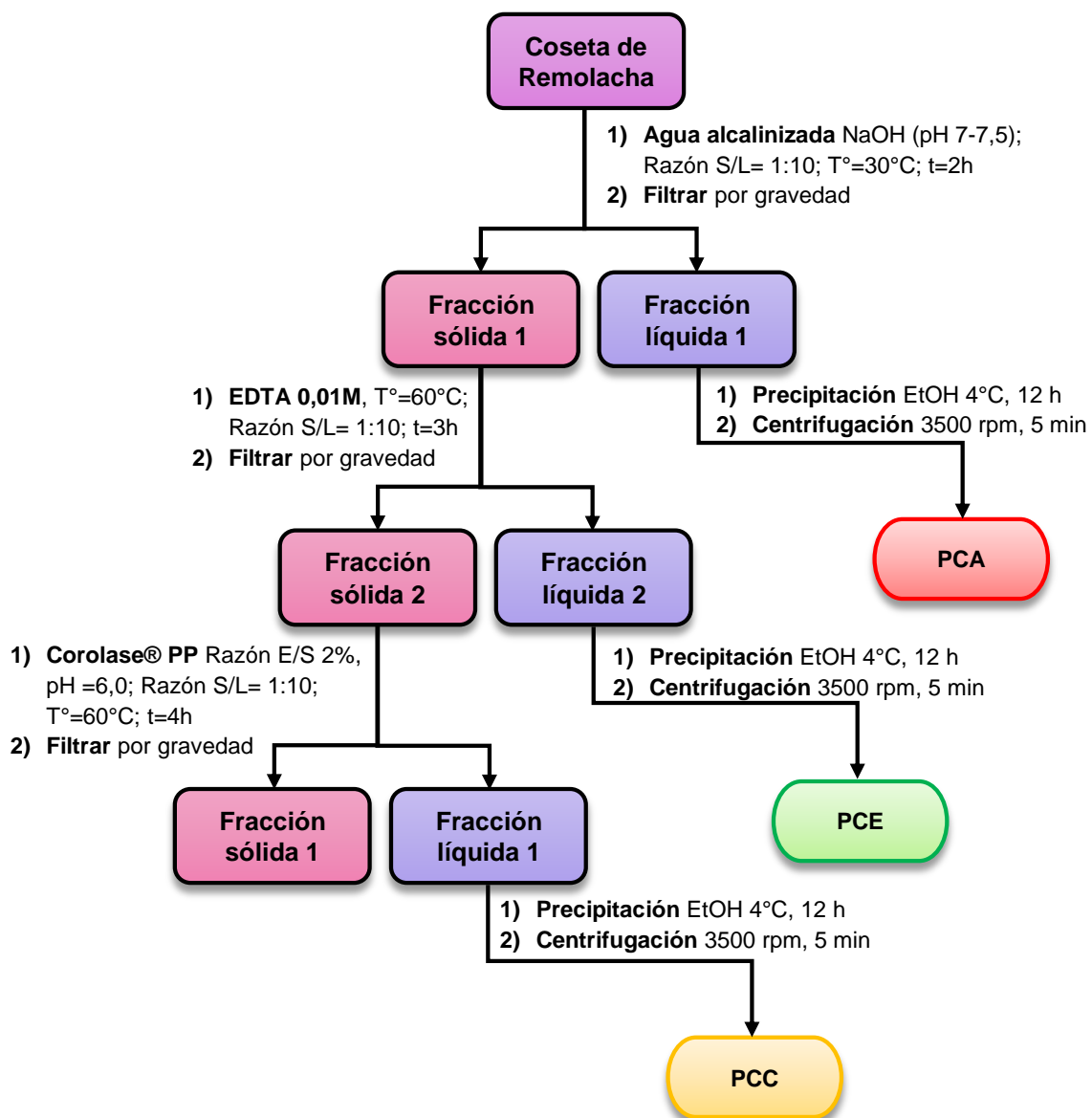


Figura 4-1. Tratamientos previos de coseta agotada de remolacha. Pectina por agua alcalinizada (PCA), pectina por EDTA (PCE) y pectina por Corolase® PP (PCC).

4.4.2. Tratamientos Enzimáticos

El residuo sólido remanente, obtenido en el paso anterior, fue incubado individualmente con 3 preparados enzimáticos comerciales (Viscozyme® L, Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L) para obtener pectinas neutras. Las condiciones de tratamiento aplicadas corresponden a una razón E/S de 24%, razón S/L 1:10, incubación a 45°C por 15 h a 120 rpm. Terminado el tiempo de hidrólisis, se filtró por gravedad y la parte sólida fue secada a 40°C en estufa y guardada en bolsa hermética (Ziploc®).

Las fracciones líquidas obtenidas (**Figura 4-2**) de los tratamientos enzimáticos, fueron precipitadas con tres volúmenes de etanol a 4°C por 12 h y posteriormente centrifugadas. Los pellet obtenidos de los tratamientos con pectinasas fueron secados por liofilización (equipo Iishin, modelo FD5512).

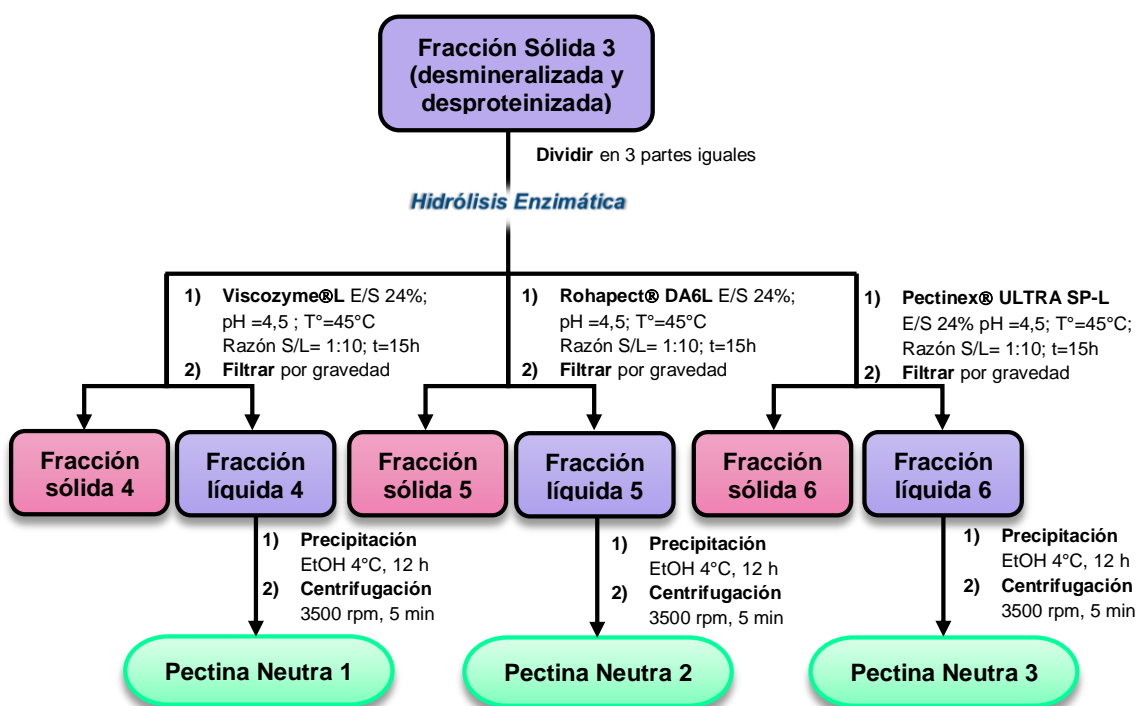


Figura 4-2. Esquema de obtención de pectinas neutras a partir de coseta agotada de remolacha desmineralizada y desproteínizada. Pectina neutra por Viscozyme® L (PC-NV); pectina neutra por Rohapect® DA6L (PC-NR); pectina neutra por Pectinex® Ultra SP-L (PC-NP).

El rendimiento de pectinas neutras obtenido se calculó a partir de la materia prima libre de impurezas (M) y el peso de la pectina neutra (PE), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{PE}}{\text{M}} \times 100$$

4.5. CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS

Las pectinas neutras y sus fracciones líquidas (**Figura 4-2**) fueron caracterizadas (Gavera y López, 2005) mediante los análisis descritos a continuación:

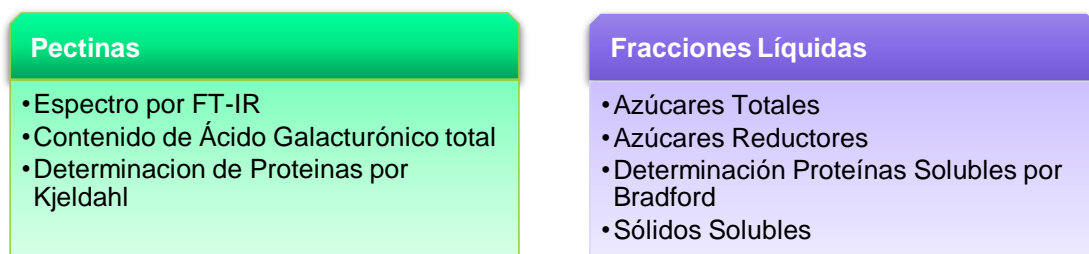


Figura 4-3. Resumen de análisis de productos obtenidos a partir de la extracción

4.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)

Los espectros de los compuestos pécticos, se obtuvieron a partir de la espectroscopia utilizando un espectrofotómetro infrarrojo de Fourier (Rayleigh, modelo WQF-510A) acoplado a un ordenador con software de análisis MAIN FTOS versión 2.0. Se elaboraron comprimidos a partir de una mezcla de pectina con KBr (al 5%) y se registró en transmitancia a una resolución de 4 cm^{-1} con 64 exploraciones acumuladas en el rango $4000 - 500\text{ cm}^{-1}$. Se utilizó KBr como blanco.

Esta técnica permitió obtener espectros infrarrojos que representan un perfil de los compuestos hidrolizados, los que fueron comparados con los espectros infrarrojos de muestras estándar de pectinas comerciales de distinto grado de esterificación, arabinosa, galactosa, arabinogalactanos y ácido ferúlico (Sigma ®).

Para determinar el grado de esterificación, se utilizó la curva de calibrado grado de esterificación (%DE) versus la relación $A_{1747\text{ cm}^{-1}} / [A_{1637\text{ cm}^{-1}} + A_{1747\text{ cm}^{-1}}]$ (Manrique & Lajolo, 2002). La curva se construyó a partir de pectinas comerciales con grado de esterificación conocidos (Anexo D).

4.5.2. Contenido de Ácido Galacturónico

El contenido de ácido galacturónico se determinó mediante espectrofotometría UV-vis, mediante el método descrito por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) y Ahmed & Labavitch (1977). La curva de calibrado se preparó con estándar de ácido galacturónico (Ver Anexo E).

4.5.3. Determinación de Proteínas por Kjeldhal

La cuantificación de proteínas se realizó según el método Kjeldahl (AOAC, 960.52), que consiste la digestión de la muestra con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores y temperatura, para transformar el nitrógeno en sulfato de amonio. La mezcla se neutraliza con base y posteriormente se destila. El destilado se recogió en una solución de ácido bórico con indicador de Tashiro y se tituló con HCl (0,1N), previamente estandarizado (ver Anexo A).

4.5.4. Azúcares Totales (CHO)

La cuantificación de azúcares totales se realizó según el método descrito por Dubois *et al.*, (1956). La curva de calibrado se preparó con estándar de manosa (ver Anexo F).

4.5.5. Azúcares Reductores (DNS)

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó según el método descrito por Miller (1959). Se utilizó glucosa como estándar para preparar la curva de calibrado (ver Anexo G).

4.5.6. Determinación de Proteínas Solubles por Bradford

Para verificar la pureza de las pectinas en cuanto a contenido de proteínas, se aplicó el método descrito por Bradford (1976). Se utilizó un estándar de albúmina de suero bovino al 98 % (Albumin, Bovine Serum, Fraction V. Low Heavy Metal), para preparar una curva de calibrado (ver Anexo H).

4.5.7. Sólidos Solubles

A una placa Petri, previamente pesada (p_1), se agregó 5 mL de muestra (v) y se dejó en estufa a 104 °C hasta peso constante. Se registró el peso final (p_2) y se calculó los sólidos solubles según la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos Solubles } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{p_2 - p_1}{v} \times 1000$$

4.6. SEPARACIÓN DE PECTINAS NEUTRAS POR PESO MOLECULAR

Las pectinas neutras seleccionadas se fraccionaron, utilizando dispositivos de ultrafiltración de 100, 50 y 30 kDa (**Figura 4-4**), Para ello, la pectina neutra se disolvió en agua destilada con agitación magnética y a 40°C de temperatura. Luego la solución se filtró aplicando vacío con membranas de 0,45 y 0,22 μm . Para la separación por tamaño, se realizaron filtraciones sucesivas usando secuencialmente filtros de 100, 50 y 30 kDa. En cada ocasión se almacenó el líquido no filtrado y el filtrado correspondiente a pectinas de tamaño inferior al filtro utilizado. Se liofilizó cada una de las soluciones, se registró el peso recuperado y se efectuó un análisis por FT-IR.

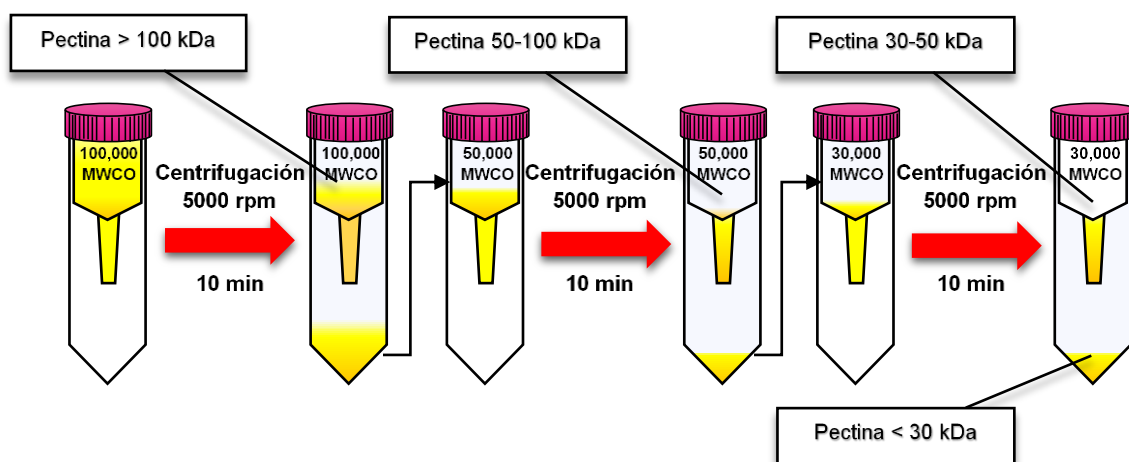


Figura 4-4. Esquema de separación de pectinas neutras según peso molecular

4.7. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINAS NEUTRAS

Con el fin de obtener pectinas de menor tamaño, las pectinas neutras originales seleccionadas (sin fraccionamiento) se sometieron a una hidrólisis enzimática con Rohapect® DA6L, razón E/S 24%, relación S/L 1:10, temperatura de 45°C y pH 4,5, a tiempos de 6 horas (M1 y M2) y 12 horas (M3 y M4). La enzima fue inactivada por shock térmico. Las muestras M1 y M3 y sus respectivos controles fueron directamente liofilizados, mientras que las muestras M2 y M4 y sus respectivos controles, previo a la liofilización, fueron precipitados con etanol a 4°C por 2 h y centrifugados a 3500 rpm por 5 min. A todos los controles y muestras se les determinó el contenido de ácido galacturónico y se analizaron mediante FT-IR.

4.8. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

4.8.1. Mantención de cultivos celulares

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 fue utilizada en estos ensayos. Estas células fueron mantenidas en frascos (BD Falcon™) con medio de cultivo DMEM (Medio Eagle Modificado por Dubelcco) enriquecido con un 10 % de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de glutamina, 100 UI/mL de Penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Corning Cellgro®), a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % CO₂ en un incubador (Thermo Forma Direct Heat CO₂ Incubator). El medio de cultivo y sus suplementos fueron Cornign Cellgro®.

La recuperación de las células desde los frascos de cultivo, fue realizada con tripsina-EDTA (0,05% p/p) por 5 min, seguida por medio de cultivo para inactivar la tripsina. Se obtiene una suspensión celular que se puede utilizar experimentalmente o para pasar las células a un frasco de cultivo nuevo.

4.8.2. Actividad antiproliferativa mediante ensayo resazurin

Para medir el efecto de las pectinas neutras originales, fraccionadas y modificadas, sobre la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7, se utilizó el método de Resazurin (Resazurin Sodium Salt, grado cultivo celular, Sigma Aldrich®), que se fundamenta en la capacidad de las células viables para reducir esta molécula y formar un producto fluorescente que exhibe una excitación a 544nm y una emisión a 590nm que se lee en espectrofotómetro de placas (Appliskan Thermo Scientific).

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con 5.000 células en cada pocillo y 200 µL de medio de cultivo DMEM. A las 24 h de sembradas las células se expusieron a concentraciones definidas de pectinas. Cada condición fue analizada por triplicado (Anexo I). Transcurridas 48 h, se reemplazó el medio de cultivo por medio que contiene 4 mg/L de resazurin. Luego de 4 h, se midió la fluorescencia. La supervivencia se calculó a partir de la relación de unidades de fluorescencia relativa (RFU) de las células expuestas al tratamiento con pectinas y células expuestas a medio de cultivo celular (Ahmed *et al.*, 1994).

$$\text{Proliferación celular (\%)} = \frac{\text{RFU células tratadas}}{\text{RFU células control}} \times 100$$

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La caracterización de las pectinas extraídas se realizó por duplicado y triplicado. Los resultados son expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Las diferencias en la proliferación celular entre las distintas pectinas neutras son determinadas mediante ANOVA y post-test de comparaciones múltiples Turkey y Bonferroni. La diferencia es considerada significativa con un valor de $p < 0,05$. Los datos se analizaron con el software GRAPHPAD PRISM, versión 5.04.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados y discusión, de acuerdo a su contribución al cumplimiento de cada objetivo específico.

5.1. Obtener pectinas neutras de coqueta agotada de remolacha, mediante el tratamiento enzimático con preparados comerciales de distinta actividad hidrolítica (Rohapect® DA6L, Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L).

La obtención de pectinas neutras consideró tres etapas previas:

1. Tratamiento con agua ligeramente alcalina (pH 7,0 - 7,5), el que permitió la remoción de las proteínas, carbohidratos y pectinas solubles;
2. Tratamiento con EDTA, el que permitió la remoción de los minerales y algunas pectinas solubles, y
3. Tratamiento con Corolase® PP, para eliminar las proteínas presentes en la coqueta agotada de remolacha.

Los tratamientos mencionados tienen como finalidad la remoción de compuestos interferentes, los cuales afectan negativamente la hidrólisis enzimática de pectinasas y la pureza del producto final.

En este proceso previo se obtuvieron tres fracciones líquidas, donde las dos primeras corresponden a pectinas catalogadas como ácidas, y la tercera también es una pectina ácida, sin embargo, contaminada con proteínas. Esto último, se manifiesta en el espectro infrarrojo, el que permite visualizar las bandas características de una pectina ácida y una pectina ácida libre de proteínas luego de ser sometida a una filtración por membrana para la remoción de las proteínas presentes, cuyo máximo característico es a los 1539 cm^{-1} (**Figura 5-1**).

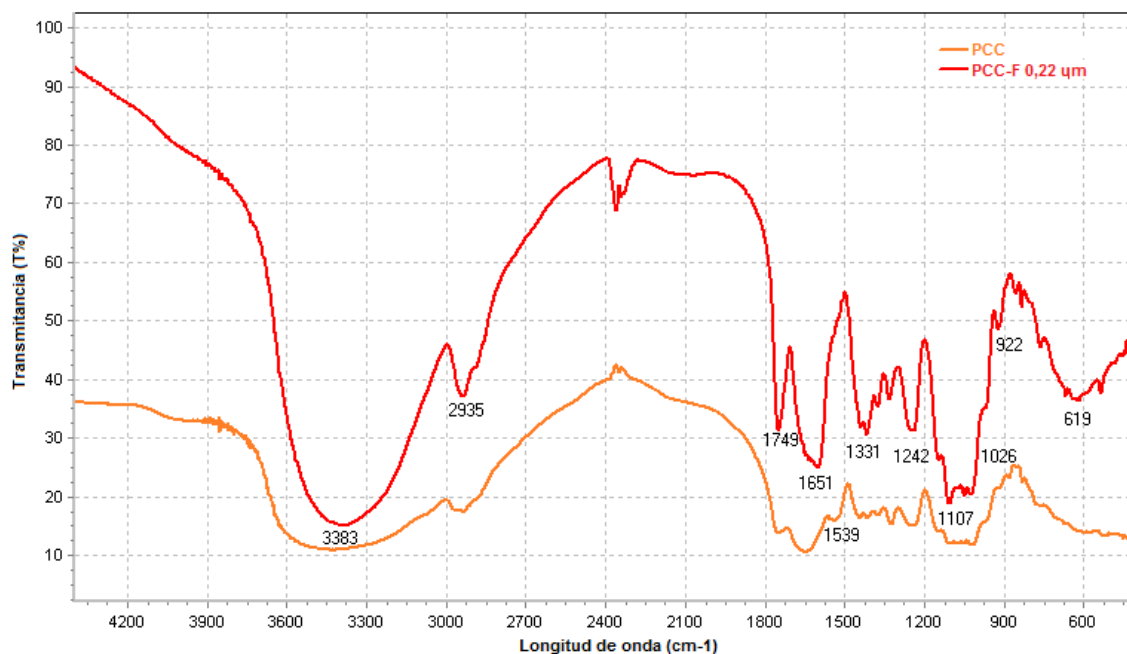


Figura 5-1. Espectro FT-IR de pectinas ácidas de coqueta agotada de remolacha obtenida con Corolase PP al 2% E/S. Pectina ácida sin fraccionar (■), pectina ácida filtrada por membrana de 0,22 μm (■).

Cabe destacar, que la capacidad inhibitoria de la proliferación celular de las pectinas puede ser influenciada de manera positiva por la presencia de proteínas (Kravtchenko *et al.*, 1992; Oosterveld, Voragen & Schols, 2002). Esto se puede observar en la gráfica de proliferación celular (**Figura 5-2**). En ésta se aprecia que, a bajas concentraciones (0,31 – 0,63 mg/mL), las pectinas obtenidas mediante un tratamiento con proteasa son más activas que aquellas obtenidas con agua alcalinizada ($p < 0,001$) y EDTA ($p < 0,05$). En ésta resalta una mayor actividad antiproliferativa lo que se asociaría a que además son pectinas ácidas de bajo metoxilo, con un grado de esterificación menor a 50% (ver Anexo J).

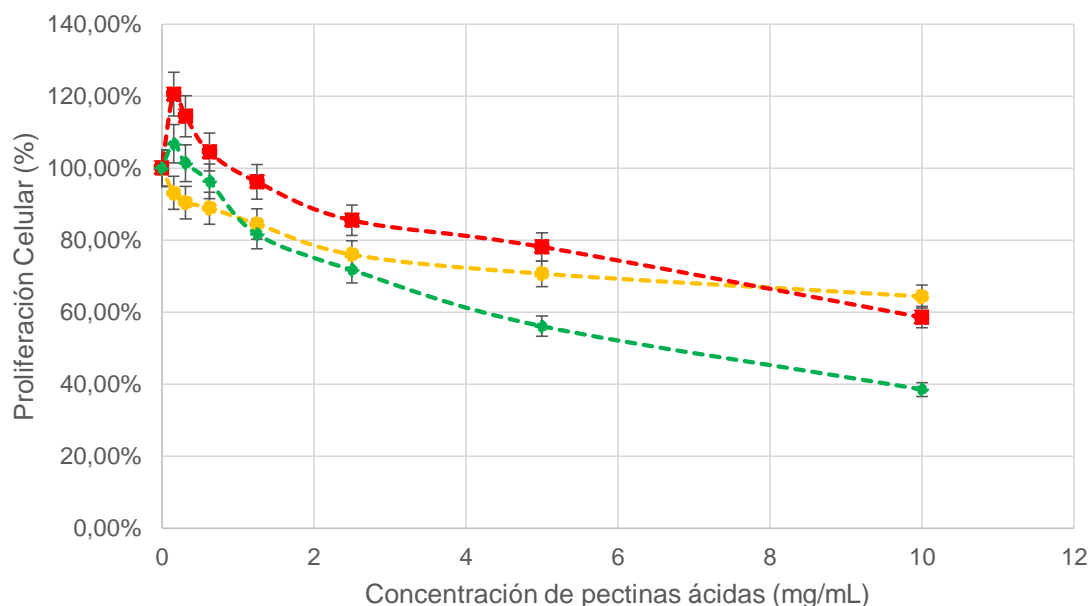


Figura 5-2. Actividad antiproliferativa de pectinas ácidas originales de coseta sobre células de la línea MCF-7. Agua Alcalinizada (■); EDTA (◆); Corolase® PP (●)

En lo que respecta al balance de masa (**Figura 5-3**), el mayor porcentaje de compuestos solubles fueron obtenidos con agua alcalina, seguido de EDTA y Corolase® PP, alcanzando un total de un 4,07% de pectinas ácidas extraídas, rendimiento que fue superior al conseguido por Arancibia (2014) quien obtuvo pectinas ácidas a partir de coseta agotada de remolacha mediante un tratamiento químico, con rendimiento inferior al 1%. Sin embargo, cabe destacar que los procedimientos realizados en esta investigación tienen como finalidad remover las impurezas, entre ellas minerales y proteínas solubles.

Por otra parte, el rendimiento general de pectinas neutras fue de un 8,02%, alcanzando un total de rendimiento de un 12,09%, ligeramente superior al obtenido en la caracterización química de la materia prima ($9,8 \pm 0,2\%$), lo que sugiere que en la extracción enzimática se extrajeron una pequeña cantidad de sustancias no pécticas de la envoltura de la pared celular, como celulosa o hemicelulosa, sustancias abundantes en la coseta agotada de remolacha (Oosterverld, 1997). No obstante, la extracción de tipo enzimática genera un mayor rendimiento de productos pécticos, en comparación al rendimiento logrado por extracción química (Jeong *et al.*, 2013), antecedente que se corroboró en este estudio.

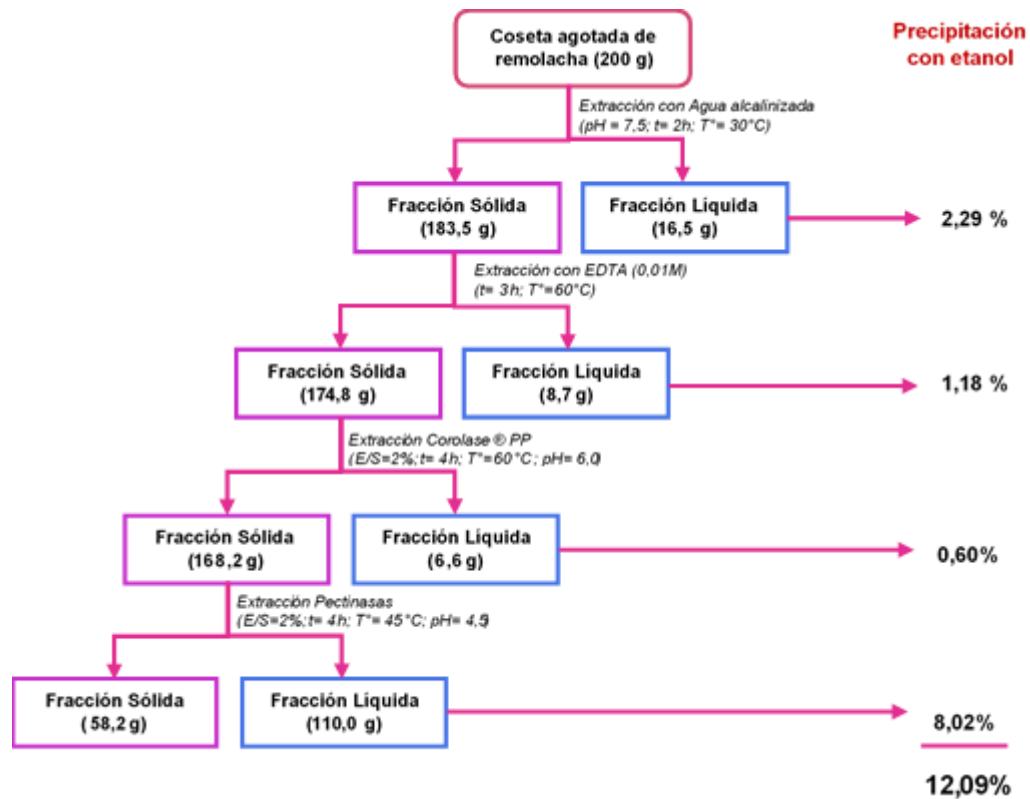


Figura 5-3. Balance de masa general en la obtención de sustancias pécticas a partir de coseta agotada de remolacha

Posterior a la remoción de minerales, carbohidratos y proteínas solubles, el residuo insoluble purificado fue sometido a un tratamiento individual con tres enzimas pectinolíticas de distinta acción hidrolítica: Rohapect® DA6L, Pectinex® Ultra SP-L, y Viscozyme® L. Si bien, cada enzima posee sus propias condiciones óptimas de trabajo, se decidió trabajar bajo las mismas condiciones, para poder evaluar la actividad y las sustancias pécticas (pectinas neutras) generadas por cada una de los preparados enzimáticos comerciales. Se trabajó a una razón E/S de 24%, razón S/L 1:10, incubación a 45°C por 15 h a 120 rpm. Aunque desde el punto de vista económico la razón E/S es elevada, se decidió utilizar este valor para asegurar una hidrólisis efectiva sobre el material sólido tratado. Esto sobre la base de lo informado por Remoroza *et al.*, (2014) quien trabajó con valores de 10% E/S y no observó una hidrólisis efectiva, situación atribuible a la presencia de grupos acetilos presentes en la coseta agotada de remolacha que impiden la acción enzimática efectiva de las pectinasas (Buchholt *et al.*, 2004).

Con el objetivo de contrastar el rendimiento de obtención de pectinas neutras asociado a la razón E/S, se evaluó el tratamiento con Rohapect® DA6L al 2% y 24%, preparado enzimático citado por su actividad en arabanosas (Concha *et al.*, 2012). En el primer caso, el porcentaje de recuperación de pectinas fue de un 15,37% respecto al peso seco del residuo insoluble purificado, mientras que para el segundo de un 11,40%. Si bien, el mayor rendimiento se obtuvo con la razón E/S del 2%, la mejor actividad se obtuvo con aquella razón E/S al 24% ($p < 0,001$), aspecto que puede sugerir la obtención de fragmentos obtenidos por la acción enzimática influye positivamente en la actividad antiproliferativa, cuyos resultados son presentados en la **figura 5-4**.

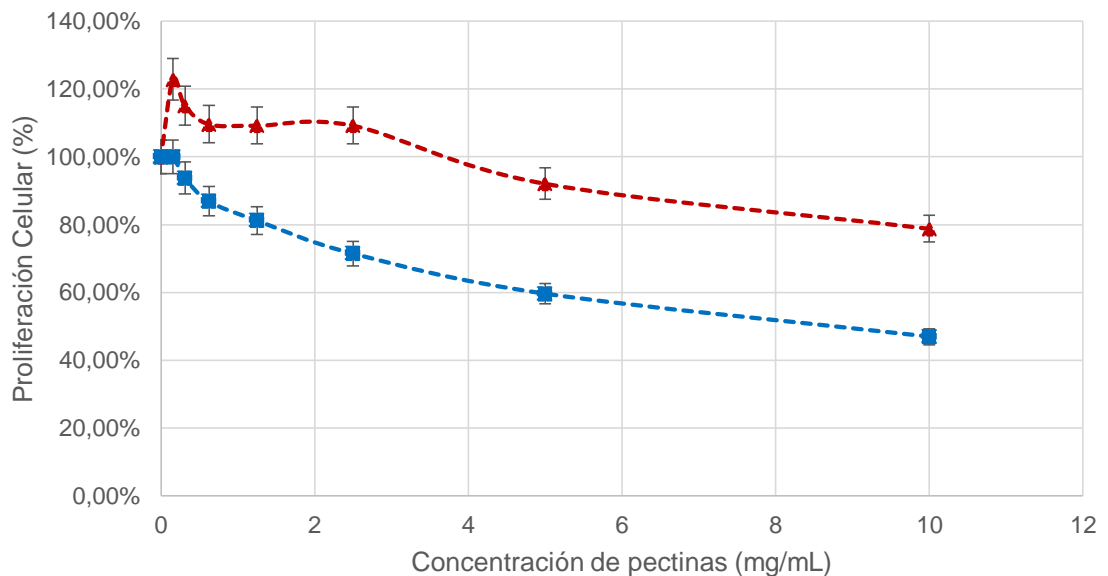


Figura 5-4. Actividad antiproliferativa de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7, obtenidas a partir de Rohapect® DA6L. Razón E/S al 2% (▲); Razón E/S al 24% (■).

En lo referente al porcentaje de rendimiento promedio de las pectinas neutras, Rohapect® DA6L presentó el mayor rendimiento (11,40%), seguido por Viscozyme® L (6,52%) y Pectinex® Ultra SP-L (6,14%). No obstante, las pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L mostraron una mejor actividad antiproliferativa seguida por Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L, aspecto que se presentará y discutirá posteriormente (**Figura 5-8**). Estos resultados se correlacionan con los porcentajes de sólidos solubles obtenidos (**Tabla 5-1**), en el cual, los extractos pécticos conseguidos con Rohapect® DA6L presenta el mayor porcentaje, cercano a un 41%.

Tabla 5-1. Porcentaje de Sólidos Solubles de las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.

Pectina Neutra	Sólidos Solubles (%)
Rohapect® DA6L	40,53 ± 0,31
Pectinex® Ultra SP-L	20,27 ± 0,15
Viscozyme® L	23,37 ± 0,27

La precipitación con etanol en frío es una de las técnicas más usadas para la recuperación de pectinas ácidas, sin embargo, algunos autores señalan que genera sustancias pécticas de menor pureza en comparación a las obtenidas por ultrafiltración (Yapo *et al.*, 2007b). Asimismo, se ha señalado que se pierden oligosacáridos pécticos que pueden ser más activos. Por este motivo en este trabajo se aplicó etanol para obtener una pectina neutra original y ultrafiltración para obtener fragmentos.

Para evaluar la pureza de los extractos pécticos obtenidos se realizó la caracterización de las pectinas. El análisis de los espectros por FT-IR, representados en la **figura 5-5**, permitió analizar la estructura química de las pectinas neutras obtenidas a partir de los tres tratamientos enzimáticos.

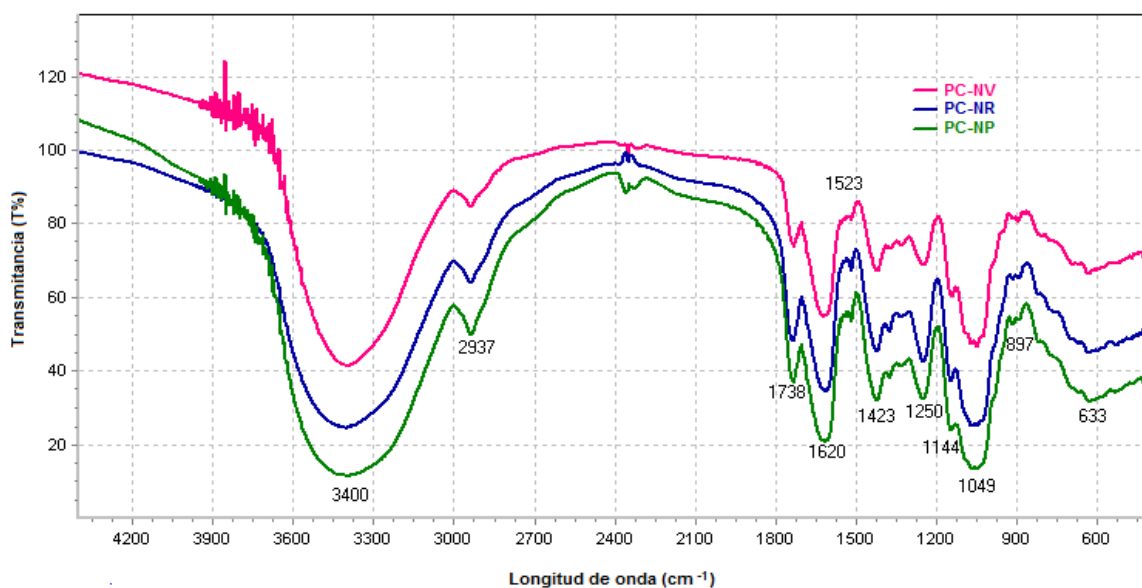


Figura 5-5. Espectros por FT-IR de extractos de pectinas obtenidas a partir del tratamiento enzimático. Condiciones de hidrólisis enzimática, 45°C, pH 4,5, razón S/L 1:10, razón E/S 24% y tiempo de hidrólisis de 15 horas. Viscozyme® L (■); Rohapect® DA6L (■); Pectinex® Ultra SP-L (■).

En los tres espectros, se observa una banda en la región comprendida entre los 3300 y 3400 cm^{-1} correspondiente a grupos hidroxilos (OH); la banda cuyo máximo es cercano a 2930 cm^{-1} corresponde al C-H del grupo metoxilo (O-CH₃); la banda cuya región se encuentra entre los 1700 y 1750 cm^{-1} corresponde a las vibraciones que generan los grupos acetilos (COCH₃) y metil éster (COOCH₃); la banda que se encuentra en la región entre los 1600 y 1640 cm^{-1} y la banda con un máximo cercano a 1420 cm^{-1} corresponde a los grupos carboxilos libres (COO⁻), que se asocian a la presencia de ácido galacturónico (Kacurakova *et al.*, 2000; Manrique & Lajolo, 2002).

Además, se encuentran presentes las bandas correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-OH, C-O-C, C-C, incluyendo a los enlaces glicosídicos, entre 1300 y 600 cm^{-1} (Concha *et al.*, 2012). Lo anterior, permite corroborar que las muestras obtenidas por tratamiento enzimático corresponden a sustancias pécticas.

Las bandas entre 1540 – 1560 cm^{-1} y 1500 – 1600 cm^{-1} corresponden a la presencia de proteínas. En el espectro se observa una pequeña banda con un pico a 1523 cm^{-1} , correspondiente a una amida secundaria perteneciente proteína de coseta agotada de remolacha que podría estar unida principalmente a azúcares neutros de arabinosa y galactosa de las pectinas neutras (Funami *et al.*, 2011). Para corroborar esto, se realizó la determinación de las proteínas por método Bradford y Kjeldhal, resultados que se presentan en la **tabla 5-2**.

Tabla 5-2. Contenido de proteínas en pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático.

Pectina Neutra	% Proteínas (Kjeldhal)	Proteínas Solubles por Bradford (Prom. ± DE (g/L))
Viscozyme® L	5,67	0,05 ± 0,01
Rohapect® DA6L	4,89	0,03 ± 0,02
Pectinex® Ultra SP-L	5,13	0,04 ± 0,01

También se realizó la determinación de proteínas a las pectinas obtenidas de la segunda extracción (Rohapect® DA6L al 2% E/S sin tratar con proteasas), por método Kjeldhal y Bradford, se obtuvo como resultado 10,89% y 0,10 ± 0,05 g/L, respectivamente.

Aunque existe un porcentaje de proteínas presente en los tres productos pécticos, este se debe a pectinas neutras unidas a proteínas (pectinas amidadas), que no pudieron ser separadas con proteasas y que solo fueron liberadas al realizar un tratamiento enzimático con pectinasas de mayor tiempo de hidrólisis (Funami *et al.*, 2011). También el pico en esa zona puede corresponder a la pectinasa agregada, ya que es de naturaleza proteica. Sin embargo, el porcentaje de contenido nitrogenado determinado por el método de Kjeldahl entre 5 – 6 %, no implicaría una mayor influencia en la actividad antiproliferativa sobre las células cancerosas, ya que las pectinas cítricas comerciales obtenidas por tratamiento enzimático tienen un porcentaje de proteína total cercano a un 5% (Remoroza *et al.*, 2014). Sin embargo, al comparar las pectinas neutras obtenidas sin tratamiento con proteasas, se observa que el contenido de proteínas es cercano un 11%. Por lo tanto, el tratamiento con proteasas, previo a la hidrólisis con pectinasas permite generar pectinas neutras con menor contaminación proteica.

Según la literatura, la obtención de pectinas neutras por métodos enzimáticos permite generar pectinas desesterificadas (Voragen *et al.*, 2009). Sin embargo, las pectinas de coqueta de remolacha presentan un alto contenido de grupos acetilos con grado de acetilación cercano al 30% (Buchholt *et al.*, 2004), los cuales pueden impedir que las pectinasas con actividad endopoligalacturonasa, pectiniliasas y pectin metil estererasas actúen de manera eficiente sobre sus blancos (Remoroza *et al.*, 2014). No obstante, el pico de los grupos acetilos es el mismo que el de los grupos ésteres (1740 cm^{-1}). Frente a esta situación, para descartar la esterificación de las pectinas neutras, se realizó el tratamiento a las tres pectinas con Rohapect® MPE a un 25% razón E/S (tratamiento fuerte), por 1 hora y posteriormente se determinó su espectro FT-IR.

Las áreas de la banda en cuestión se mantuvieron inalteradas (ver Anexo K) en las pectinas de la primera extracción, por lo tanto, se puede afirmar que las pectinas neutras se encuentran desesterificadas, pero posiblemente o-acetiladas. Sin embargo, las pectinas de la segunda extracción obtenidas a partir de un 2% de razón E/S, disminuyeron su grado de esterificación, hasta un 14,12% (ver Anexo J), por lo tanto, la cantidad de pectinasa utilizada fue insuficiente para desesterificar completamente a la pectina final. Esta observación apoya el concepto propuesto de que una mayor cantidad de enzima pectinolítica permite obtener una pectina desesterificada.

El espectro de las pectinas neutras a partir de Rohapect® DA6L de la segunda extracción (**Figura 5-6**), presenta las mismas bandas al compararlo con los espectros de la primera extracción. Sin embargo, el pico cercano al 1740 cm^{-1} , presenta una banda mucho más pronunciada que sus contrapartes.

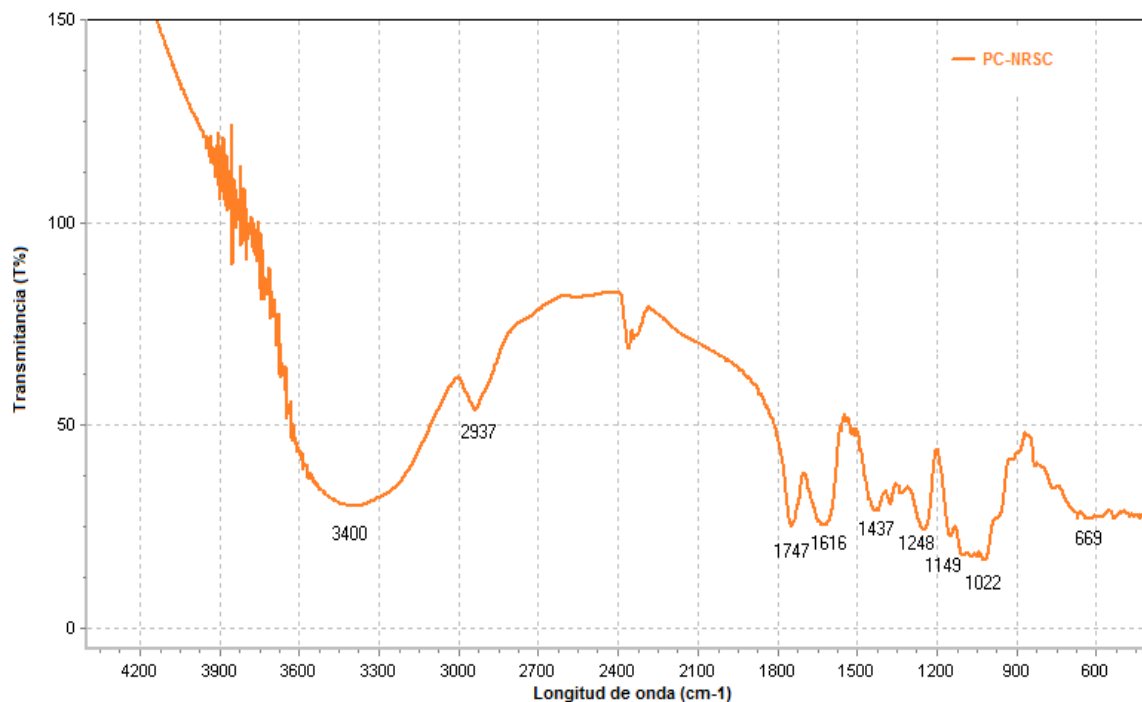


Figura 5-6. Espectro por FT-IR de extracto de pectina obtenida con Rohapect® DA6L. Condiciones de hidrólisis enzimática, 45°C , pH 4,5, razón S/L 1:10, razón E/S 2% y tiempo de hidrólisis de 15 horas, sin tratamiento con Corolase® PP.

La comparación del espectro IR entre los $1300 - 900\text{ cm}^{-1}$, de los extractos pécticos obtenidos de la extracción 1 y 2 (**Figura 5-7**), con los espectros informados por Kacurakova (ver Anexo L), se puede determinar que la hidrólisis enzimática generó pectinas neutras de tipo arabinanos, ya que el espectro muestra picos cercanos a 1141, 1097, 1070, 1049 y 918 cm^{-1} correspondiente a este tipo de pectina neutra.

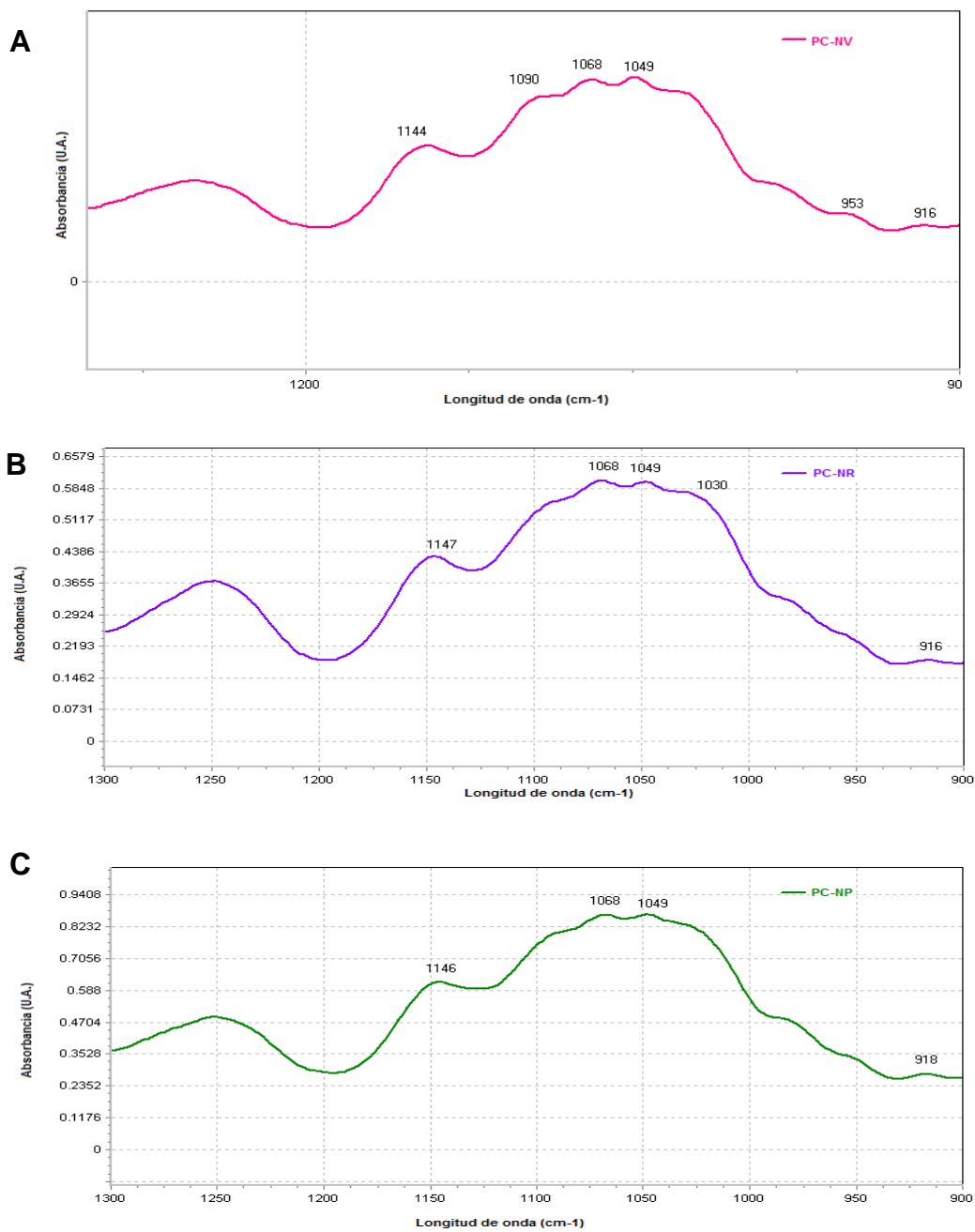


Figura 5-7. Espectro por FTIR en absorbancia pectina neutra de coseta obtenida con pectinasas. A: Viscozyme® L; B: Rohapect® DA6L; C: Pectinex® Ultra SP-L. Condiciones de hidrólisis enzimática, 45°C, pH 4,5, razón S/L 1:10, razón E/S 24% y tiempo de hidrólisis de 15 horas.

Con respecto al contenido de ácido galacturónico, éste depende del tipo de extracción (química o enzimático), de las condiciones experimentales (pH, T°, tiempo, tipo de enzima) y de las características químicas de la materia prima (Yapo, 2007a). A continuación se presenta el contenido de AGA de las pectinas neutras recuperadas en este estudio (**Tabla 5-3**).

Tabla 5-3. Contenido de ácido galacturónico de las pectinas neutras de coqueta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.

Pectina Neutra	AGA (% p/p, Prom. ± DE %)
Rohapect® DA6L	44,57% ± 8,19%
Pectinex® Ultra SP-L	35,66% ± 4,00%
Viscozyme® L	59,17% ± 1,64%

Los resultados indican que las pectinas obtenidas con Viscozyme® L poseen un mayor porcentaje de ácido galacturónico, seguido por Rohapect® DA6L y luego Pectinex® Ultra SP-L. Si bien, el contenido de ácido galacturónico (AGA) en pectinas neutras es mayor a lo referenciado para pectinas ácidas (Arancibia, 2014), esto puede ser producto de un alto contenido de azúcares neutros (ver **Tabla 5-4**), los cuales interferirían en el método de análisis, sobreestimando los valores de AGA (Yapo, 2012). Se recomienda en próximos estudios elegir otro tipo de técnica, por ejemplo HPLC-IR, para determinar ácido galacturónico, azúcares neutros y grupos acetilos.

Tabla 5-4. Contenido de azúcares reductores y totales de las pectinas neutras de coqueta agotada de remolacha obtenidas a partir de tratamientos enzimáticos.

Pectina Neutra	Azúcares Reductores (g/L)	Azúcares Totales (g/L)
Rohapect® DA6L	1,39 ± 0,01	3,11 ± 0,10
Pectinex® Ultra SP-L	1,21 ± 0,04	2,28 ± 0,40
Viscozyme® L	1,50 ± 0,05	3,65 ± 0,38

Además, el tratamiento enzimático a una razón del 2% E/S con Rohapect® DA6L, generó pectinas neutras con un AGA de 19,89 ± 5,08%, cifra que se correlaciona con una menor presencia de azúcares neutros (0,60 ± 0,01 g/L), producto de una menor eficiencia en la hidrólisis enzimática.

5.2. Seleccionar el preparado enzimático que origina pectinas con la mejor actividad antiproliferativa sobre las células de cáncer de mama MCF-7.

El efecto de las pectinas neutras originales de la primera extracción sobre la proliferación celular de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se presenta en la **figura 5-8**. Las tres pectinas neutras exhibieron actividad antiproliferativa. Las células expuestas a pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y Rohapect® DA6L alcanzan una proliferación celular cercana a 48% a 10 mg/mL, lo que implica una inhibición mayor al 50%. A bajas concentraciones (0,16 – 2,5 mg/mL) las pectinas neutras obtenidas con Viscozyme® L producen una considerable disminución de la proliferación por sobre la pectina neutra extraída con Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L ($p < 0,001$), descartando una toxicidad debida a un proceso de choque osmótico como podría ocurrir a altas concentraciones.

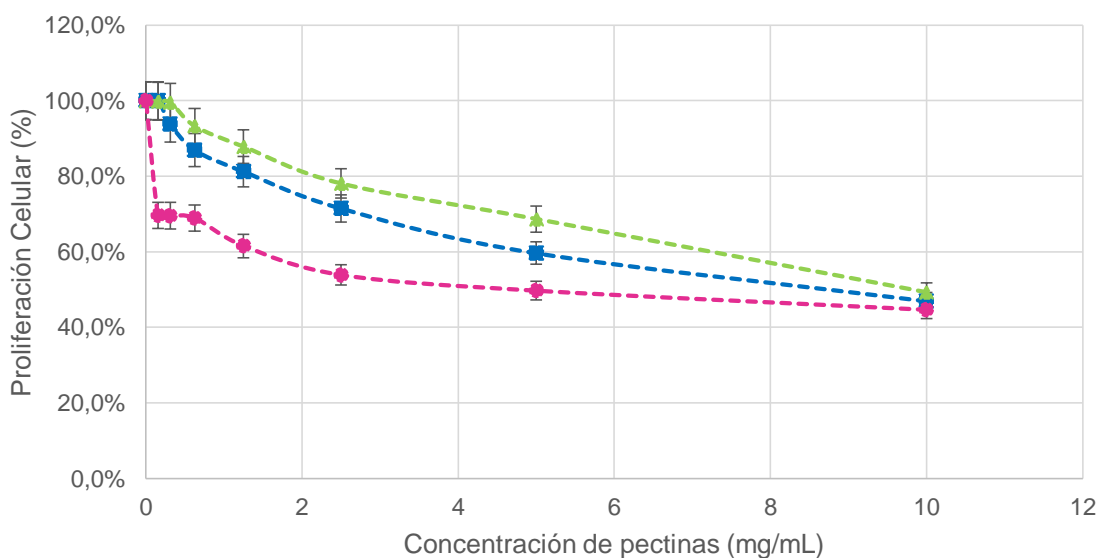


Figura 5-8. Actividades Antiproliferativa de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7 recuperadas con las enzimas. Viscozyme® L (●), Rohapect® DA6L (■) o Pectinex® Ultra SP-L (▲)

Sobre la base de los resultados anteriores, se descartó el tratamiento con Pectinex® Ultra SP-L, ya que el rendimiento de pectinas es menor y su actividad antiproliferativa también resultó inferior a sus contrapartes. Luego al comparar los tres preparados enzimáticos se selecciona Viscozyme® L para la etapa de obtención de pectinas neutras, mientras que para el fraccionamiento por hidrólisis enzimática se elige Rohapect® DA6L, debido a su actividad arabanasa. Ambos preparados enzimáticos se consideran adecuados en la obtención de pectinas neutras con potencial actividad antiproliferativa.

5.3. Analizar el efecto del fraccionamiento por membrana de la pectina neutra seleccionada sobre la actividad antiproliferativa.

Una vez caracterizadas químicamente las pectinas neutras obtenidas en la primera etapa (Viscozyme® L al 24% E/S), se procedió a la separación por tamaño. Los resultados son presentados en la **figura 5-9**, donde se compara la distribución por tamaño entre las pectinas neutras seleccionadas y las pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (24% razón E/S), las cuales presentaron la segunda mejor actividad antiproliferativa (**Figura 5-8**).

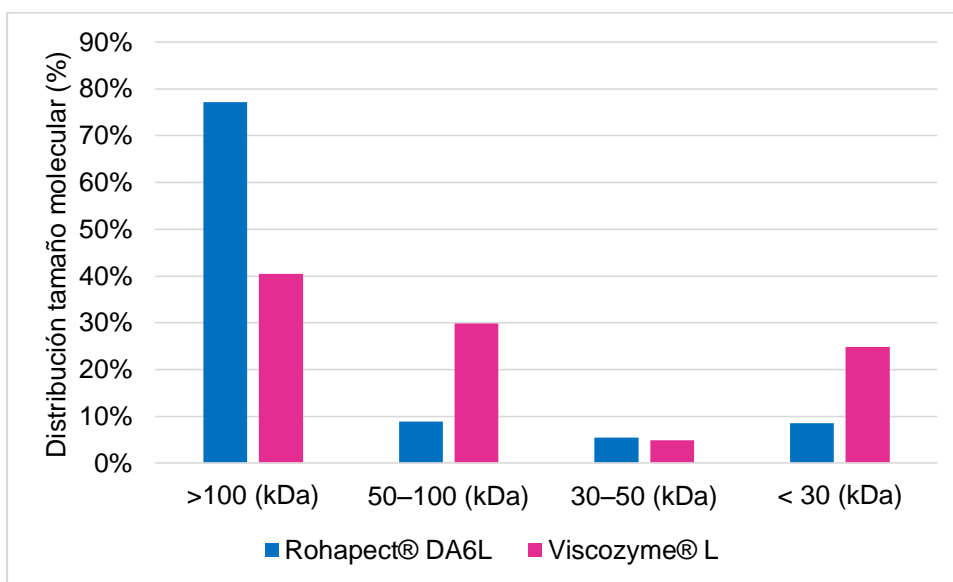


Figura 5-9. Distribución por tamaño molecular (%) después de la separación física a partir de 1 g de pectina neutra.

Los resultados confirman que la capacidad hidrolítica de Viscozyme® L es mayor en comparación a Rohapect® DA6L y se condice con el hecho que las pectinas neutras obtenidas a partir de la primera enzima poseen una mejor actividad antiproliferativa que la segunda. Si bien no existen antecedentes referentes al tamaño molecular y actividad antiproliferativa para pectinas neutras, los resultados de este estudio sugieren que las pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático tienen un comportamiento similar o superior a las pectinas ácidas modificadas enzimáticamente, para las que se ha informado que fragmentos pécticos con un peso molecular menor a 30 kDa poseen una acción antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Maxwell *et al.*, 2012).

Por otra parte, al comparar la actividad antiproliferativa de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas por tratamiento enzimático con Viscozyme® L y pectina ácida de coseta obtenida por tratamiento químico (Arancibia, 2014), se puede señalar que las pectinas neutras presentan una mejor actividad antiproliferativa a bajas concentraciones ($p < 0,001$) (**Figura 5-10**). La actividad antiproliferativa de pectinas neutras a bajas concentraciones, permiten abrir una nueva alternativa terapéutica para el cáncer.

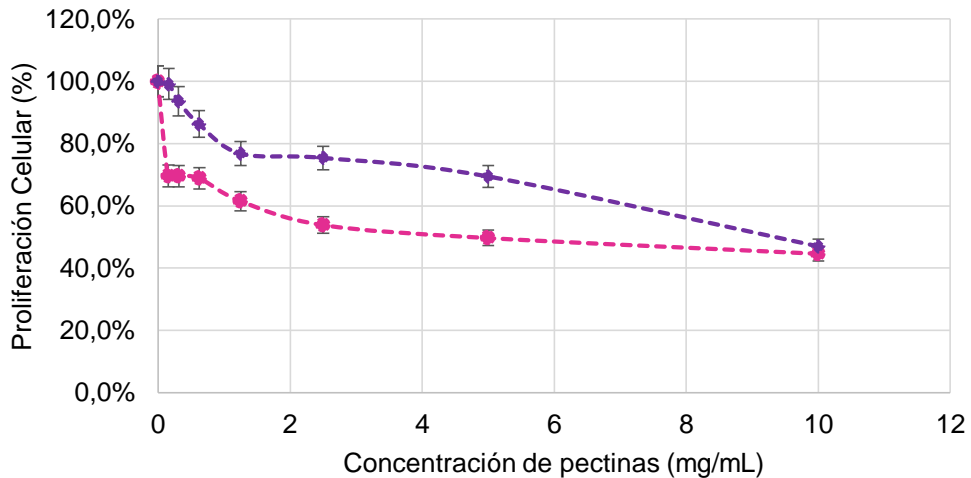


Figura 5-10. Actividad antiproliferativa de pectinas neutra y ácida de coseta agotada de remolacha sobre células de la línea MCF-7. Pectina neutra obtenida a partir de Viscozyme L (●), pectina ácida obtenida a partir de tratamiento químico (◆)

En la **figura 5-11** se presenta la curva de la actividad antiproliferativa de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y fraccionadas por separación física. Se puede observar que los polisacáridos sin fraccionar poseen una mejor acción inhibitoria sobre el crecimiento celular en comparación a las fracciones mayores a 100 kDa y menores a 100 kDa ($p < 0,0001$). Estas últimas presentan una disminución considerable en su acción antiproliferativa, disminución que puede ser debida al fraccionamiento por ultrafiltración que podría romper enlaces débiles que le otorguen la actividad biológica a la pectina neutra de coseta agotada de remolacha. Otra posible causa sería la retención de sustancias relevantes para la bioactividad en los filtros, sin embargo, al observar los espectros infrarrojos de las pectinas originales y sus fracciones, éstas presentaron perfiles espectrales similares (ver Anexo M), similitud que se mantiene incluso, posterior a la hidrólisis enzimática (ver Anexo N), la cual se discutirá más adelante. Estos resultados permitirían especular que se requiere de la co-existencia de pectinas de grado de polimerización intermedio y bajo para que se manifieste la actividad antiproliferativa.

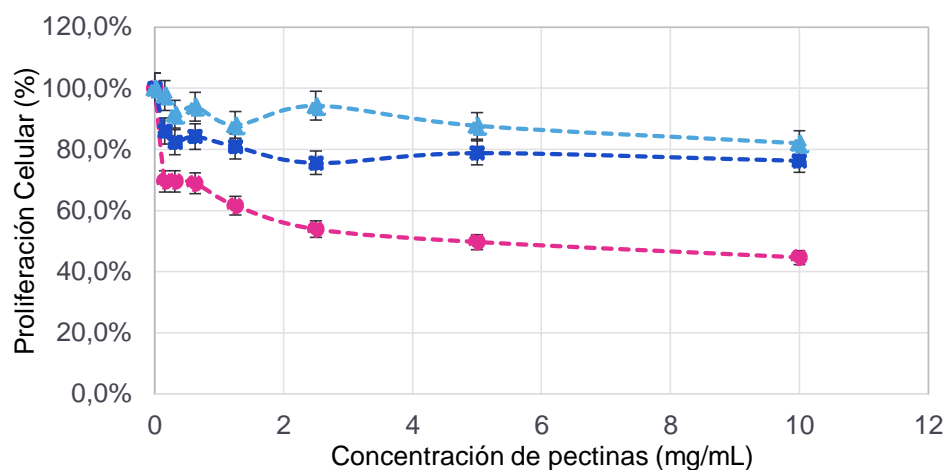


Figura 5-11. Actividad antiproliferativa de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L sobre la línea celular MCF-7. Sin fraccionar (●), fracciones >100 kDa (■) y <100 kDa (▲).

Para confirmar estos resultados, se comparó la actividad antiproliferativa de las pectinas neutras extraídas con Rohapect® DA6L originales y fracciones mayor y menor a 100 kDa (**Figura 5-12**), las cuales presentaron el mismo comportamiento que las pectinas anteriores, siendo la pectina original sin fraccionar la que presenta mejor actividad ($p < 0,01$). Además, las pectinas neutras menores a 100 kDa favorecieron la proliferación de las celular en un rango de concentración de 0,16 – 2,50 mg/mL.

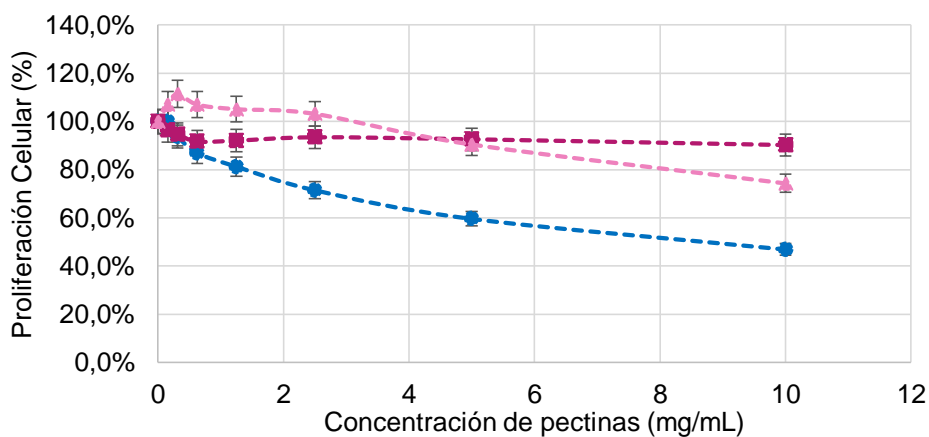


Figura 5-12. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Rohapect® DA6L. Sin fraccionar (●), fracciones >100 kDa (■); <100 kDa (▲).

5.4. Comparar la actividad antiproliferativa de las pectinas neutras antes y después de la hidrólisis enzimática con Rohapect® DA6L sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Las pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L se sometieron a hidrólisis enzimática con Rohapect® DA6L (arabanasa), a una razón E/S de 24%, por 6 y 12 horas. A continuación se muestran las curvas de proliferación celular en las **figura 5-13 y 5-14**.

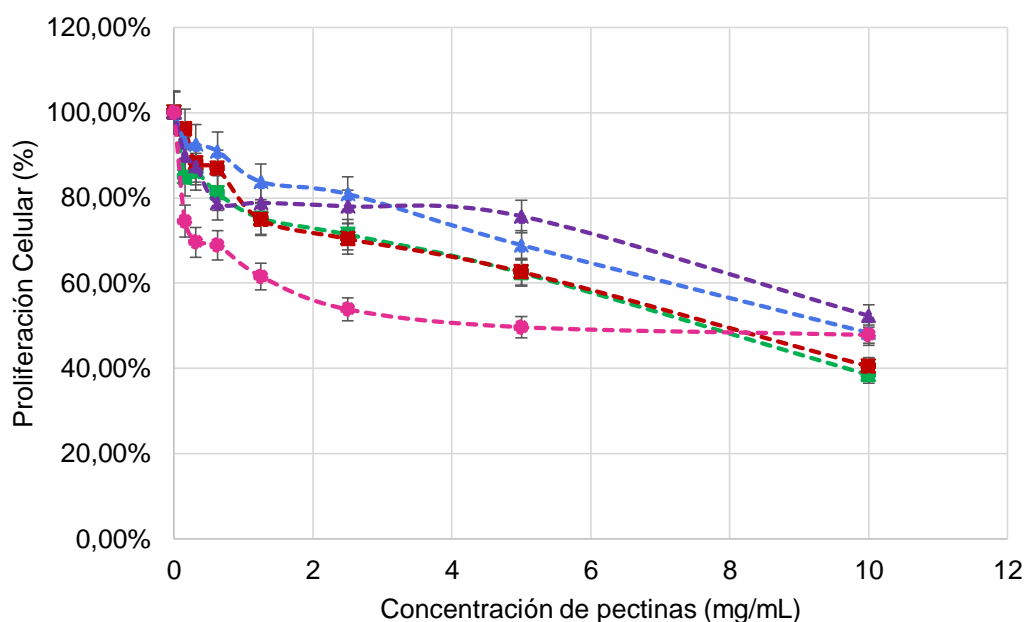


Figura 5-13. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 6 horas. Pectina neutra sin fraccionar (●), control 1 (sin precipitar) (■), control 2 (precipitado) (▲), muestra 1 (sin precipitar) (■) y muestra 2 (precipitada) (▲).

La pectina neutra original presenta una mejor actividad que las pectinas neutras hidrolizadas por 6 horas con Rohapect® DA6L entre 0,16 – 5 mg/mL de concentración ($p < 0,001$). Se observa que la actividad entre control y muestra son similares ($p > 0,05$), lo que significa que el tiempo empleado para la hidrólisis fue insuficiente. Además, el utilizar el etanol como medio para la recuperación de las pectinas hidrolizadas, generó una leve disminución de la actividad comparándolas con las directamente liofilizadas.

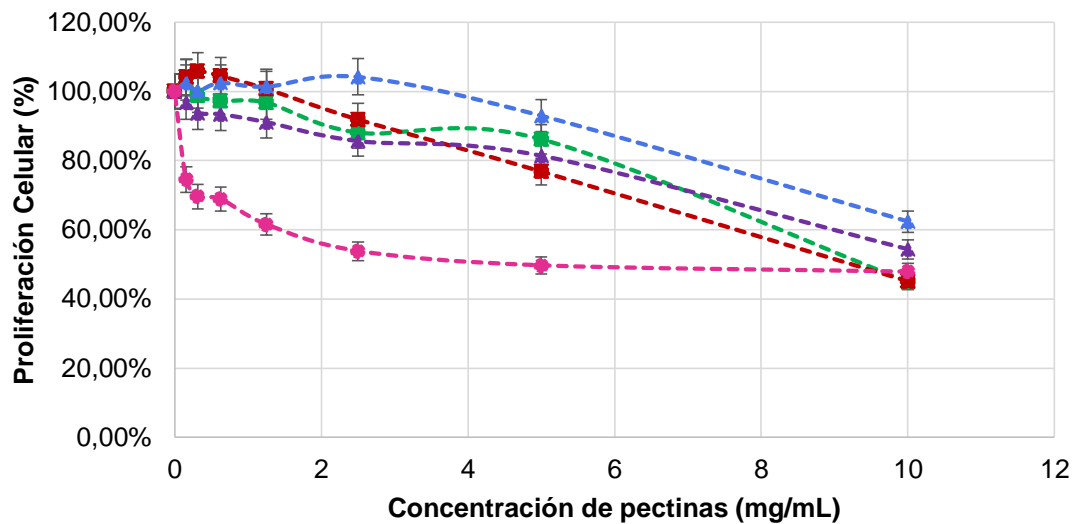


Figura 5-14. Actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 12 horas. Pectina neutra sin fraccionar (●), control 3 (sin precipitar) (■), control 4 (precipitado) (▲), muestra 3 (sin precipitar) (■) y muestra 4 (precipitada) (▲).

De acuerdo a las curvas de la **figura 5-14**, se puede inferir que el aumento del tiempo de hidrólisis a 12 horas, produce una disminución considerable de la actividad antiproliferativa de la pectina neutra al ser comparada con la pectina neutra sin fraccionamiento de tipo enzimático en un rango de 0,16 – 5 mg/mL de concentración ($p < 0,0001$). La proliferación aumentada a concentraciones de 0,16 – 2,50 mg/mL se debe posiblemente a que la enzima pectinolítica hidroliza las pectinas hasta la formación de monosacáridos de tipo arabinosa, los cuales, según la literatura, no presentan una acción inhibitoria, sino que por el contrario, favorecen la proliferación y crecimiento de células tumorales (Concha *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la hidrólisis enzimática parece ser innecesaria y contraproducente para recuperar pectinas neutras con actividad antiproliferativa. Esto indica que es más promisorio abordar la optimización del método de obtención de pectinas neutras sin posterior hidrólisis enzimática.

Estos resultados se contraponen con los conseguidos por Jackson *et al.*, (2007), autor que indica que las fracciones menores a 10 kDa del Pectasol® C, pectina ácida obtenida por tratamiento químico y tratada, posteriormente con enzimas hidrolíticas, presentan una mejora en la actividad antiproliferativa sobre células de cáncer de próstata. Esto quiere decir, que los resultados conseguidos con pectinas ácidas no necesariamente se pueden extrapolar a pectinas neutras. De acuerdo a los antecedentes entregados, las pectinas neutras se visualizan con un potencial más promisorio como agentes antiproliferativos.

6. CONCLUSION

La hipótesis planteada en este estudio *“La modificación de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha mediante tratamiento enzimático con pectinasa genera pectinas de menor grado de polimerización lo que aumenta su actividad antiproliferativa sobre las células del cáncer de mama MCF-7”*, se valida parcialmente debido a que:

1. Las pectinas neutras recuperadas con Viscozyme® L producen un mayor porcentaje de pectinas de pequeño tamaño con respecto a Rohapect® DA6L, lo que se correlaciona con una actividad antiproliferativa superior.
2. Las pectinas neutras originales (sin fraccionar) obtenidas a partir de tratamiento enzimático, presentan una mayor actividad antiproliferativa que las pectinas fraccionadas según tamaño por medio de ultrafiltración.
3. Las pectinas neutras sometidas a hidrólisis enzimática no presentaron mejoras en su actividad antiproliferativa, incluso un mayor tiempo de hidrólisis generó un producto que favoreció la proliferación de células tumorales.

Se concluye que existe un tamaño crítico para que las pectinas neutras de coseta agotada de remolacha inhiban la proliferación de células MCF-7.

7. REFERENCIAS

Ahmed A., Labavitch J. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal Food Biochemistry*, 1, 361-365.

Ahmed S., Gogal R., Walsh J. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal Immunology Methods*, 170, 211-224.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official methods of Analysis of the AOAC. 18th Ed. Washington, D.C. US Government Printing Office.

Arancibia, P. (2014). Efecto del grado de metoxilación y peso molecular de pectinas ácidas de coseta agotada de remolacha sobre la proliferación de células que poseen distinto grado de expresión del receptor de galectina-3. Tesis para optar al título de químico farmacéutico. Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso.

Azcón, J. y Talón M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. (1ra ed.). Barcelona, España: McGraw-Hill Interamericana.

Bartelink, H., Horiot, J., Poortmans, P., Struikmans, H., Bogaert W., Barillot, I. Borger, J. (2001). Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *The New England Journal of Medicine*, 345(19), 1378 – 1387.

Bradford 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.

Buchholt, H., Christensen, T., Fallesen, B., Ralet, M. & Thibault, J. (2004). Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. *Carbohydrate Polymers*, 58, 149 –161.

Cobs, M. (2013). Aplicación de sustancias pécticas obtenidas a partir de harina desgrasada de raps como agentes antiproliferativos en líneas celulares cancerígenas. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Bioquímico Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2013.

Concha J. & Zúñiga M. E. (2012). Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates. *Chemical Engineering Journal*, 192, 29–36.

Díaz N., Galaz J., Jofré A., Moya J., Umaña M., Vallebouna C., Galceran J. (2012). Primer informe de registros poblacionales de cáncer en Chile. Quinquenio 2003-2007. Unidad de vigilancia de enfermedades no transmisibles y estudios, departamento de epidemiología, división planificación sanitaria, Subsecretaría de Salud Pública, Ministerio de Salud, Chile.

Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Roberts P., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. & Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 1 – 76.

Filisetti-Cozzi T. & Carpita N. (1991). Measurement of uronic acid without Interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.

- Funami, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R., Inoue, T. & Phillips, G. (2011). Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 25, 221 – 229.
- Gavera N. y López L. (2005). Extracción a escala laboratorio de la pectina del maracuyá y escalado preliminar y a planta piloto. Universidad Eafit, Departamento de ingeniería de procesos, Medellín, 23 – 50.
- Itriago, L., Silva, N. & Cortes, G. (2013). Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Revista Clínica las Condes*, 24(4), 531 – 552.
- Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17, 805–19.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931–2944.
- Jeong, H., Kim, H., Ahn, S., Oh, S., Yang, I. & Choi, I. (2013). Effects of combination processes on the extraction of pectins from rapeseed cake (*Brassica napus* L.). *Food Chemistry*, 139, 9-15.
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195–203.
- Khotimchenko, M., Kovalev, V., Kolenchenko, E., & Khotimchenko, Y. (2012). Acidic method for the low molecular pectin preparation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 5–9.
- Kirby, A., MacDougall, A. & Morris, V. (2008). Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. *Carbohydrate Polymers*, 71, 640 – 671.
- Kravtchenko, T., Voragen, A. & Pilnik, W. (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*, 18, 17 – 25.
- Leclere, L., Cutsem, P. Van, & Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 1–8.
- Levigne, S., Ralet, M. & Thibault J. (2002). Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49, 145 – 153.
- Liu, H., Huang, Z., Yang, G., Lu, W. & Yu, N. (2008). Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World Journal of Gastroenterology*, 14(48), 7386 – 7391.
- Liu, L., Fishman, M., Kost, J., & Hicks, K. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24(19), 3333 – 3343.
- Macdonald, F., Ford, C. & Casson, A. (2004). *Molecular Biology of Cancer*. (2nd ed.). New York, USA: Garland Science.

- Maehara, Y., Hasuda, S., Koga, T., Tokunaga, E., Kakeji, Y. & Sugimachi K. (2000) Postoperative outcome and sites of recurrence in patients following curate resection of gastric cancer. *British Journal of Sugery*, 87, 353 – 357.
- Makker, P., Balan, V. & Dwek, A. (2012). Galectin-3-Binding and Metastasis. *Methods in Molecular Biology*, 878, 251–266.
- Manrique, G. & Lajolo, F. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 99 – 107.
- Martinez, M., Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. & Pajaro, J. (2009). Direct enzymatic production of oligosaccharide mixtures from sugar beet pulp: experimental evaluation and mathematical modeling. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5510 – 5517.
- Maxwell, E. G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Morris, V. J. (2012). Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 24(2), 64–73.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 266–277.
- Morris, V. J., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Maxwell, E. G. (2013). The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 21–37.
- Nauts, H. C., Swift, W. E., & Coley, B. L. (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, reviewed in the light of modern research. *Cancer Research*, 6, 205-214.
- Niture, S. & Refai, L. (2013). Plant pectin: a potential Source for cancer suppression. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 8 (1), 9 – 19.
- Oftedal O., Eisert R. & Barrell G. (2014). Comparison of analytical and predictive methods for water, protein, fat, sugar, and gross energy in marine mammal milk. *Journal of Dairy Science*, 97, 1 – 20.
- Oosterveld A. (1997). Pectic substances from sugar-beet pulp: structural features, enzymatic modification and gel formation. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda.
- Oosterveld, A., Voragen, A. & Schols, H. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers*, 49 (4), 407 – 413.
- Overgaard, M., Hansen, P., Overgaard, J., Rose, C., Andersson M., Bach, F., Kjaer, M., Gadeberg, C. (1997). Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 337(14), 949 – 955.
- Pelengaris, S. & Khan M. (Eds). (2006). *The Molecular Biology of Cancer*. (1st ed). Oxford, USA: Blackwell Publishing.
- Pienta, K., Harmesh, N., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T., Lerhr, J., & Raz, A. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(5), 348 – 353.

- Reimers, M., Kuppen, P., Lee, M., Lopatin, M., Tezcan, H., Putter, H., Velde, C. (2014). Validation of the 12-Gene Colon Cancer Recurrence Score as a Predictor of Recurrence Risk in Stage II and III Rectal Cancer Patients. *Oxford Journal*, 1 – 8.
- Remoroza, C., Broxterman, S., Gruppen, H. & Schols, H. (2014). Two-step enzymatic fingerprinting of sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers*, 108, 338 – 347.
- Ridley, B., O'Neil, M. & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929 – 967.
- Santos, J., Espeleta, A., Branco, A., & Assis, S. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1997–2001.
- Satelli, A., Rao, P. S., Gupta, P. K., Lockman, P. R., Srivenugopal, K. S., & Rao, U. S. (2008). Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncology reports*, 19 (3), 587–94.
- Seggiani, M., Puccini, M., Pierini, M., Giovando, S., & Forneris, C. (2009). Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 574–580.
- Sepúlveda, B. (2013). Memoria anual de empresa IANSA S.A.: 60 años avanzando hacia el futuro. Santiago, Chile.
- Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutic a uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, 3, 206–228.
- Sun, R., Hughes, S. (1998). Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 36, 293 – 299.
- Torres, S., Paredes, H., Peralta, O., Fernández, M., Castiglione, G. & Prieto, M. (2010) Guía Clínica: Cáncer de Mama 2010. Comisión Nacional Cáncer de Mama, Ministerio de Salud, Chile.
- Van Soest, P., Robertson, J., & Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74 (10), 3583 – 3597.
- Voragen, A., Coenen, J., Verhoef, R. & Schols, H. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20 (2), 263 – 275.
- Weinberg, R. (2014). *The Biology of Cancer*. (2nd ed.). New York, USA: Garland Science.
- Yapo, B.M. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, 42 (8), 1197 – 1202.
- Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86 (2), 373–385.
- Yapo, B.M. (2012). On the Colorimetric-Sulfuric Acid Analysis of Uronic Acids in Food Materials: Potential Sources of Discrepancies in Data and How to Circumvent Them. *Food Analytical Methods*, 5, 195 – 215.

Yapo, B.M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B. & Paquot, M. (2007a). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extract. *Food Chemistry*, 100, 1356 – 1364.

Yapo, B.M., Wathelet, B. & Paquot, M. (2007b). Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids*, 21, 245 – 255.

8. ANEXOS

Anexo A: Análisis Proximal

A.1. Humedad (AOAC, 925.09)

- Registrar peso de crisol seco (m).
- Pesar 2 g de muestra (m_1) en crisol seco y tarado.
- Dejar en estufa a 105 °C hasta peso constante.
- Dejar en desecadora hasta que el crisol se enfríe y pesar (m_2).
- Calcular la humedad de la muestra, expresada en porcentaje, a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(m_2 - m)}{m_1 \times 100}$$

A.2. Cenizas (AOAC, 923.03)

- Registrar peso de crisol seco (m).
- Pesar 2 g de muestra (m_1) en crisol seco y tarado.
- Luego llevar el crisol con muestra a mufla de incineración a 550 °C por 4 h.
- Dejar enfriar en desecador y posteriormente pesar (m_2).
- Calcular el contenido de cenizas de la muestra, expresada en porcentaje, a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(m_2 - m)}{m_1 \times 100}$$

A.3. Extracto Etéreo (AOAC, 963.15)

- Registrar el peso del balón seco del equipo de extracción Soxhlet (m).
- Pesar 3 g de muestra seca (m_1) y envolver en papel filtro n°2 (manipular con guantes).
- Armar el equipo de reflujo Soxhlet sobre una manta calefactora, agregar 100 mL de éter de petróleo e introducir la muestra. Dejar funcionando el sistema durante 4 h.
- Evaporar el solvente que queda en el balón, en estufa a 80 °C por 24 h.
- Dejar enfriar en desecador y registrar el peso del balón con el residuo restante (m_2).
- Calcular el contenido de extracto etéreo (EE), expresado en porcentaje, según la siguiente fórmula:

$$\text{EE(\%)} = \frac{m_2 - m}{m_1} \times 100$$

A.4. Fibra Cruda (AOAC, 962.09)

- Pesar 3 g de muestra desgrasada seca (m) (obtenida del procedimiento descrito en Anexo A.3), hervir con 200 mL de solución de ácido sulfúrico (0,1275 M), por 30 min en un balón conectado a equipo de refrigeración.
- Secar la muestra sólida, luego sacar del balón y filtrar a vacío en embudo Büchner y matraz Kitasato con papel filtro n°2. Lavar con abundante agua caliente destilada para remover el ácido.
- Transferir la muestra sólida a otro balón, agregar 200 mL de NaOH (0,313 M) y llevar a ebullición por reflujo por 30 min. Posteriormente, filtrar nuevamente a vacío en embudo Büchner y matraz Kitasato con papel filtro y lavar con abundante agua caliente para remover el hidróxido.
- Lavar el material sólido con dos porciones de etanol y tres de éter y filtrar nuevamente. Luego llevar a estufa a 100 °C por 12 h, dejar enfriar y registrar peso (m_1).
- Posteriormente, el material se lleva a incineración en mufla a 550 °C por 4 h, se deja enfriar y se registra el su peso (m_2).
- Calcular el contenido de fibra cruda, expresado en porcentaje, según la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra Cruda(\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

A.5. Proteínas por Kjeldahl (AOAC, 963.15)

- Pesar 4,5 g de sulfato de potasio, 0,5 g de sulfato de cobre, 200 mg de muestra y agregar 7 mL de H₂SO₄ concentrado y mezclar en tubos de digestión.
- Llevar los reactivos y muestras mezclados a digerir (Digestor Kjeldahl Velp® Scientifica DK6) en tubos de digestión bajo las siguientes condiciones; 200 °C por 30 min: 300 °C por 40 min: 380 °C por 60 min y 450 °C por 30 min.
- Posteriormente, someter los tubos fríos a destilación en Destilador semi-automático (Velp® Scientifica, modelo UDK 139). Para ello, utilizar 50 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH (32 %).
- El líquido de la destilación es recibido en un matraz Erlenmeyer que contiene 25 mL de ácido bórico 4 % más 4 gotas de indicador de Tashiro. El líquido recuperado en el matraz se valora con HCl 0,1 N estandarizado (v_1) (Ofstedal, Eisert & Barrell, 2014).

- Se aplica la siguiente fórmula para determinar el nitrógeno proteico:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{v_1 \times N \times 14 \times 6,25 \times 100}{m_1}$$

6,25: Factor de conversión correspondiente a Coseta (Concha *et al.*, 2012).

N: Normalidad estandarizada de HCl.

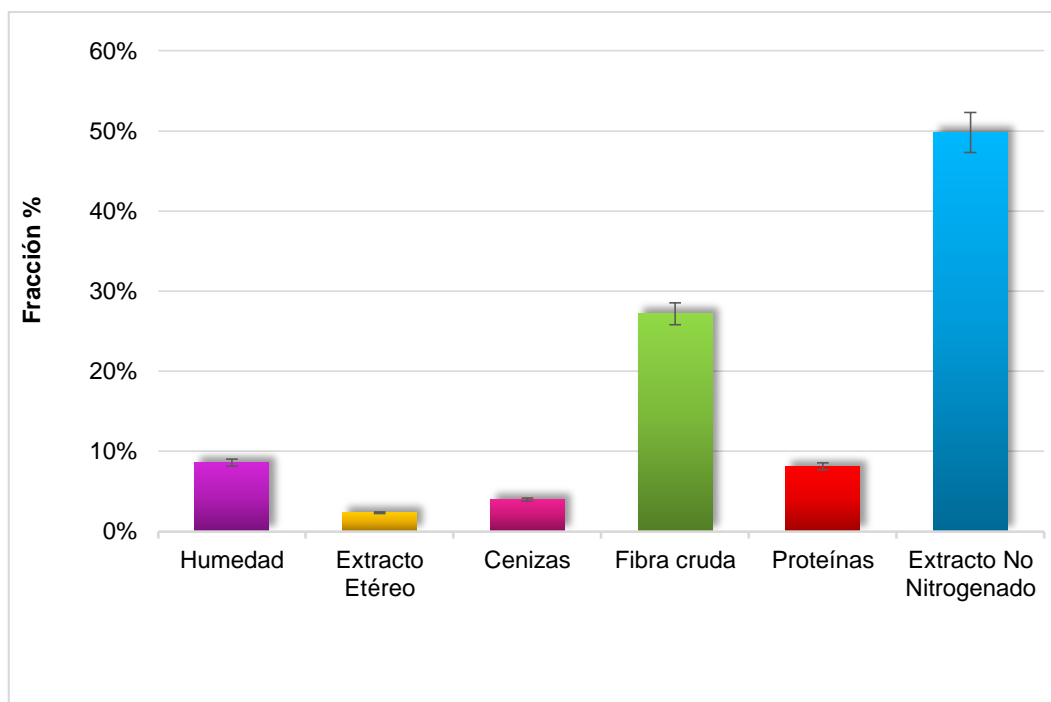
14: Peso atómico del Nitrógeno.

m₁: son los mg de muestra.

A.6. Elementos no Nitrogenados (AOAC, 963.15)

- El extracto no nitrogenado (ENN) se expresa como porcentaje y se determina por diferencia mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ENN} = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Ceniza} + \% \text{ EE} + \% \text{ Fibra Cruda} + \% \text{ Proteínas})$$

Anexo B: Caracterización Química-Proximal de la Coseta Agotada de Remolacha**Figura 8-1. Análisis químico-proximal de coseta agotada de remolacha.**

Anexo C: Determinación de Pectinas Totales por Método de Van Soest (1991)

- Pesar 2 gramos de harina seca y desgrasada (m).
- Diluir con 300 mL de agua destilada
- Incubar con agitación por 3 horas a 40°C
- Filtrar en papel filtro Whatman 42
- El residuo sólido del paso anterior se seca hasta peso constante
- Trasladar el sólido a balón Soxhlet y extraer los pigmentos con una solución alcohol-benceno (1:2) durante 6 horas
- Los sólidos residuales (m_1) del paso anterior se secan e incuban con 200 mL de una solución de oxalato de amonio al 0.5% p/v, a 50°C por 1 hora
- Transcurrido el tiempo los residuos son filtrados y lavados con agua caliente.
- Se pesan los residuos del paso 8 hasta peso constante (m_2).
- El contenido de pectinas en la coqueta, expresado en porcentaje, se calcula según la fórmula:

$$\% \text{ Pectinas} = \frac{(m_1 - m_2)}{m} \times 100$$

Anexo D. Determinación del % Grado de Esterificación (%DE)

Tabla 8-1. Pectinas utilizadas para realizar la curva para estimar el grado de esterificación.

Grado de esterificación	Pectina comercial
27 %	Pectina de fruta cítrica (Sigma-Aldrich®, P9311)
60 %	Pectina de fruta cítrica (Sigma-Aldrich®, P9436)
74%	Ácido galacturónico esterificado al 74% (Sigma Aldrich®, P9135).

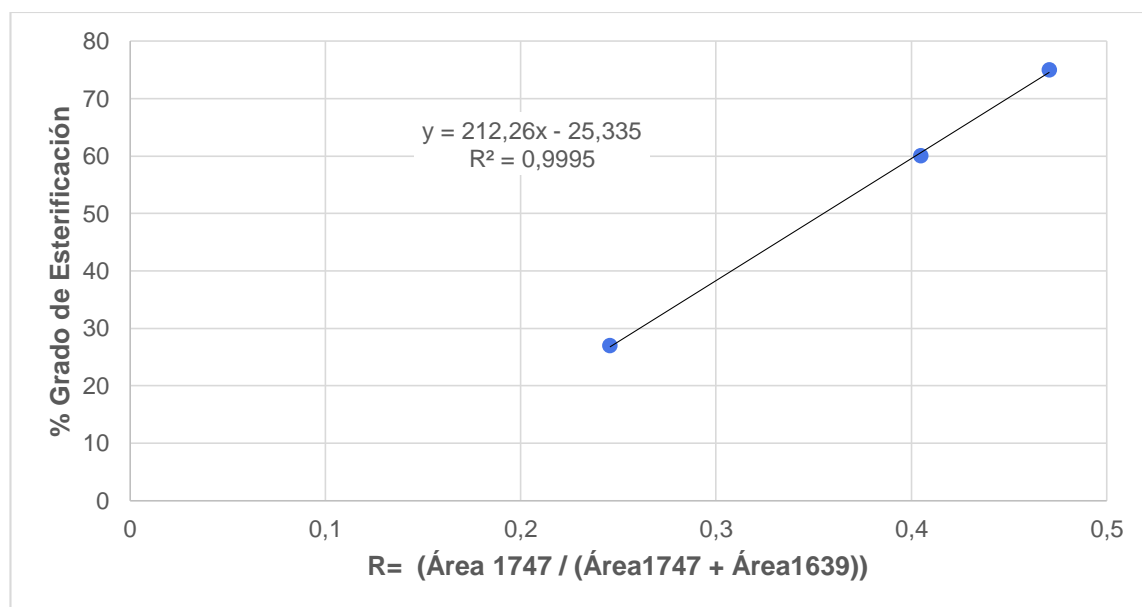


Figura 1-2. Curva de Calibrado para estimar % grado de esterificación.

Anexo E: Determinación de Ácido Galacturónico (AGA)

E.1. Soluciones

- Hidróxido de Sodio 0,5 % (peso/volumen): Pesar 0,5 g de NaOH y se disolver en 20 mL de agua destilada, aforar a 100 mL.
- m-Hidroxidifenil: Pesar 0,15 g de 3-fenilfenol y disolver con NaOH 0,5 % (peso/volumen), llegando hasta un pH de 1,6. Aforar a 100 mL con NaOH 0,5 %. Almacenar a 4 °C protegido de la luz. La solución es estable por un mes.
- Tetraborato de Sodio 75 mM: Pesar 1,501 g de tetraborato de sodio (Bórax anhídrido) y disolver en 90 mL de H₂SO₄ concentrado, dejar durante toda la noche bajo agitación para disolver el tetraborato de sodio. Luego de disuelto aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Ácido sulfámico/Sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6): Pesar 38,84 g de ácido sulfámico y agitar vigorosamente con 50 mL de agua destilada, agregar gotas de una solución de KOH saturado hasta la completa disolución del ácido sulfámico, luego dejar enfriar la solución. Ajustar pH con solución saturada de KOH. Aforar a 100 mL con agua destilada. La solución final se almacena a temperatura ambiente.

E.2. Preparación de Curva de Calibrado AGA

La curva de calibrado se preparó a partir de una solución madre (1) de concentración 20 mg/mL, disolviendo 200 mg de ácido-D-(+)-galacturónico en 5 mL de agua destilada y aforando a 10 mL con agua destilada. Luego se preparó una segunda solución madre (2) de concentración 200 µg/mL.

A partir de la solución madre (1), se sacó una alícuota de 500 µL y se llevó a un matraz aforando a 50 mL con agua destilada. A partir de la solución madre (2), se realizó las siguientes diluciones:

Tabla 8-2. Serie de diluciones para la curva estándar de ácido D-(+)-Galacturónico.

Concentración Final ($\mu\text{g}/400 \mu\text{L}$)	Volumen de Solución madre (2) (μL)	Volumen de Agua Destilada (μL)	Volumen final (mL)
5,0	625	9375	10
10,0	1250	8750	10
15,0	1875	8125	10
20,0	2500	7500	10
30,0	3750	6250	10
40,0	5000	5000	10

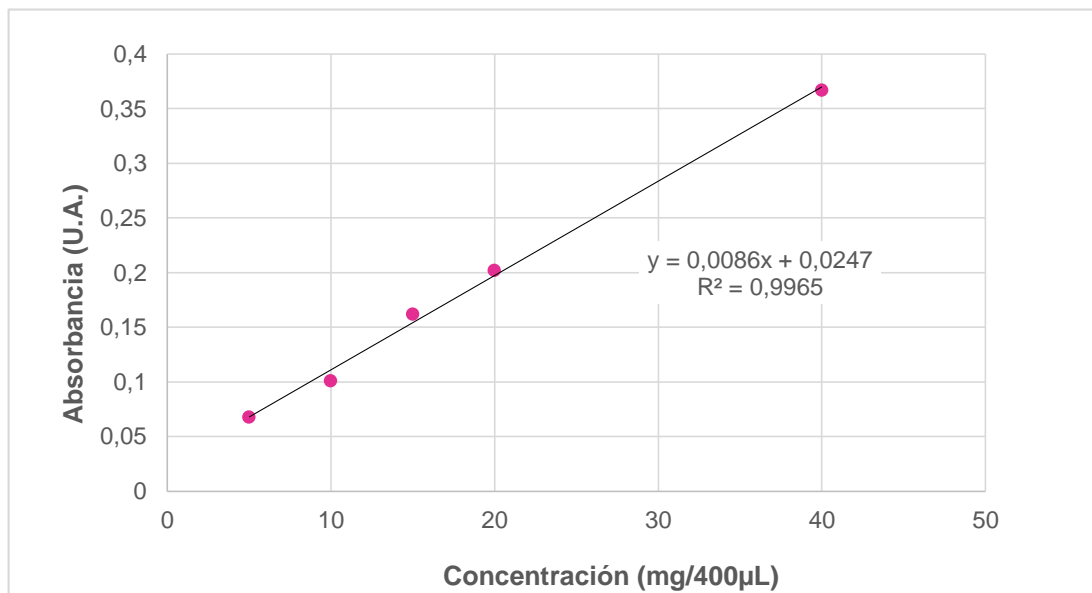
E.3. Procedimiento AGA

Para la hidrólisis de las muestras se realizó lo siguiente: a 7 mg de muestra sólida se le agregó 1 mL de H_2SO_4 concentrado, se llevó a baño hielo por 5 min, agitando constantemente, repitiendo este paso 2 veces. Luego se agregó 0,5 mL de agua destilada y se llevó a baño hielo por 5 min, repitiendo la acción 2 veces. En seguida, la muestra se aforó a 10 mL con agua destilada y fue trasvasijada y centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos (Ahmed & Labavitch, 1977).

Ensayo colorimétrico: en tubos de vidrio se agregaron 400 μL del sobrenadante obtenido anteriormente, y a otro tubo con 400 μL de agua destilada (blanco), se les agregó 40 μL de solución de ácido sulfámico 4 M, se agitó por vórtex y se les agregó 2,4 mL de la solución de tetraborato de sodio 75 mM. Luego la solución resultante se llevó a 100 °C en baño termorregulado por 20 min, luego se dejó enfriar en baño hielo por 15 min (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991).

Luego al tubo con muestra se agregó 80 μL de una solución de m-Hidroxidifenil y al blanco agua se le agregó 80 μL de solución de NaOH al 0,5 %. A los 15 min se leyó la absorbancia a 525 nm en espectrofotómetro (Genesys 10 uv Thermo Election Corporation).

Para el tratamiento de la curva de calibrado se toman 400 μL de cada una de las soluciones preparadas y se sigue el procedimiento descrito por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991).

E.4. Curva de Calibrado AGA**Figura 1-3. Curva de Calibrado AGA**

Anexo F: Determinación de Azúcares Totales (CHO)

F.1. Procedimiento

Tanto a la curva de calibrado como a las muestras, se aplicó lo siguiente: se agregó 1 mL de estándar/muestra, 0,5 mL de fenol al 5 %, 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado, a un tubo de ensayo con tapa, se agitó por vórtex por 5 s y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 uv Thermo Election Corporation).

F.2. Curva de Calibrado

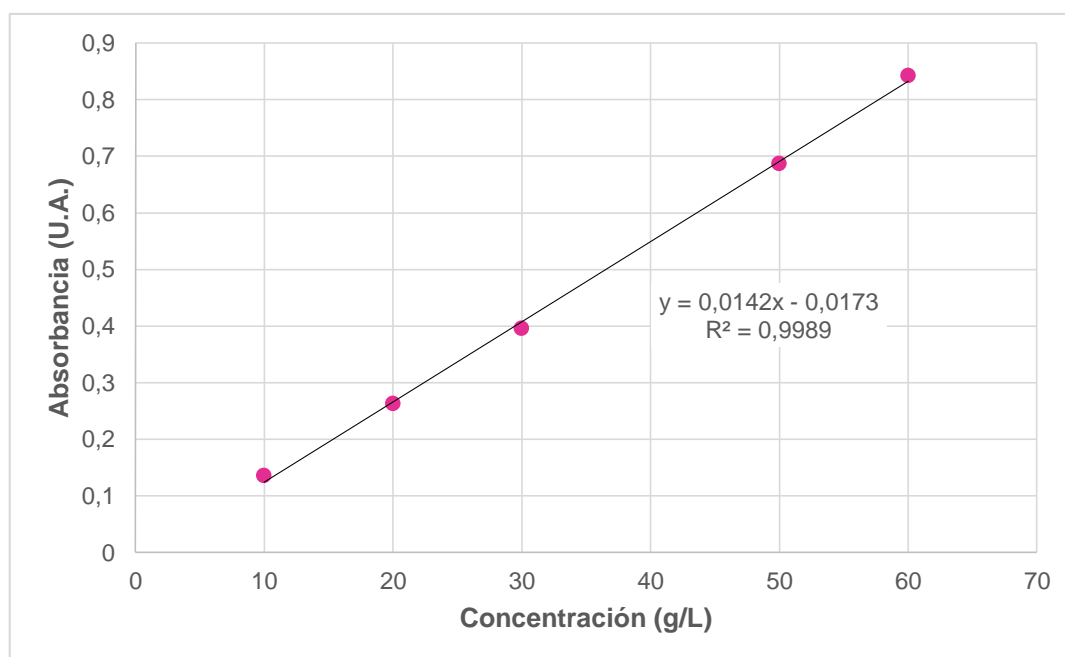


Figura 1-4. Curva de Calibrado Azúcares Totales

Anexo G: Determinación de Azúcares Reductores (DNS)

G.1. Solución

Reactivo DNS: se disolvieron 1,6 g de NaOH en 20 mL de H₂O. Se agregó 1 g de ácido dinitrosalicílico, 30 g C₄H₄KNaO₆·4H₂O (tartrato de potasio y sodio tetrahidratado (Sigma-Aldrich®, grado analítico). Se aforó a 1 L con H₂O. La solución se almacenó a 4 °C y protegida de la luz.

Reactivo de Bradford: agregar 12,5 mL de etanol en un matraz de aforo de 250 mL y adicionar 0,025 g de Azul de Coomasie (Brilliant Blue G) más 25 mL de ácido fosfórico y aforar con agua destilada. Almacenar a 4 °C protegido de la luz.

G.2. Procedimiento DNS

Tanto a la curva de calibrado como a las muestras, se aplicó lo siguiente: en un tubo de ensayo con tapa, se colocó 1 mL de estándar/muestra, se agregó 1 mL de reactivo DNS (Ver anexo A) y se incubó por 5 min a 100 °C en baño termostático. Los tubos se enfriaron en hielo por 2 a 3 min, se agregó 10 mL de agua destilada, se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro.

G.3. Curva de Calibrado

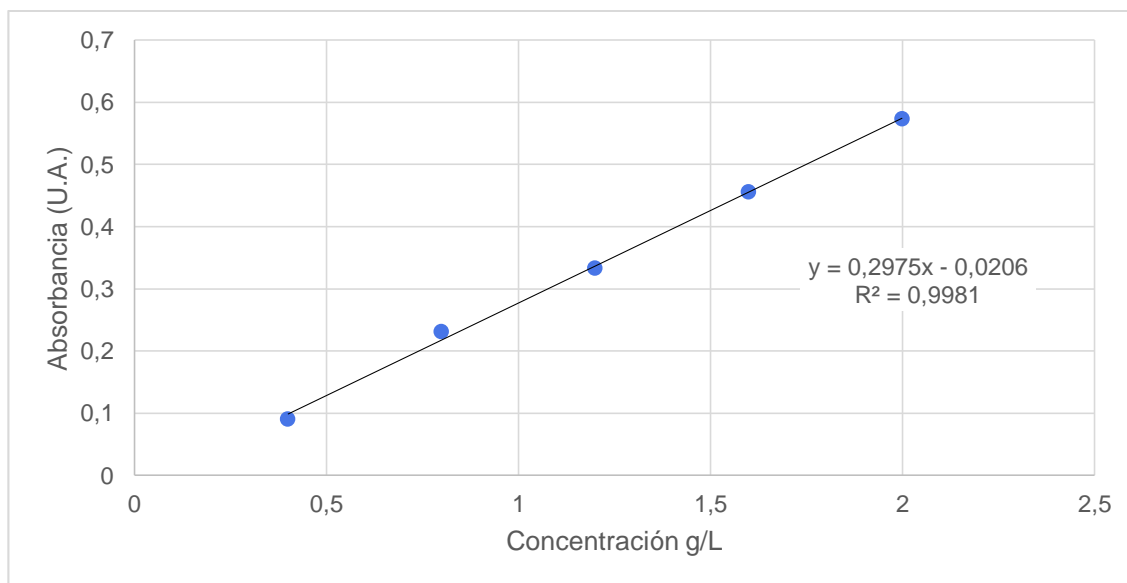


Figura 1-5. Curva de Calibrado DNS

Anexo H: Determinación de Proteínas por Bradford

H.1. Procedimiento

Se colocó 0,1 mL de muestra en un tubo de ensayo con tapa y se agregó 5 mL del reactivo de Bradford (Ver anexo A) se agitó por vórtex 5 s (Boeco Germany, modelo V-1 Plus). Se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda 595 nm en espectrofotómetro (Genesys 10 uv Thermo Election Corporation).

H.2. Curva de Calibrado Bradford

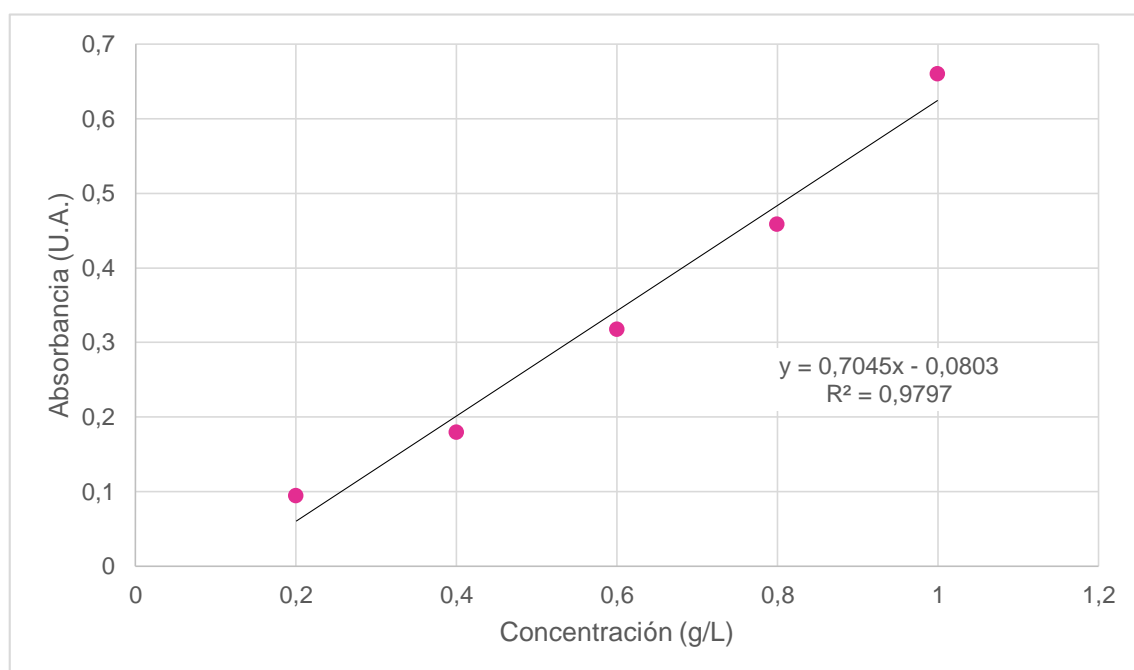


Figura 1-6. Curva de Calibrado Bradford

Anexo I: Método Resazurín (Ahmed, Gogal & Walsh, 1994)

Se recuperan las células desde un frasco pre-confluyente mediante centrifugación y se procede a contar el número de células usando el colorante de viabilidad azul de tripán (Trypan blue stain 0,4 %), en cámara de Neubauer, bajo el microscopio.

Para montar el ensayo se debió sembrar 5.000 células MCF-7 por cada pocillo en placas de cultivos de 96 pocillos (Placa de micropocillo para cultivo de tejidos, Orange Scientific®).

Luego de sembrar los pocillos, la placa se incubó por 24 h, para que las células se adhirieran a la superficie. Entonces, se removió el medio de cultivo y se aplicó la pectina bajo diferentes concentraciones: 10,0 - 5,0 - 2,5 - 1,25 - 0,62 - 0,31 - 0,16 - 0 mg/mL. Se utilizó medio de cultivo DMEM para diluir las pectinas. Se aplicó cada condición en triplicado, incluyendo un set de pocillos con medio de cultivo libre de pectina. Se dejó incubar por 48 h en las diferentes condiciones de evaluación.

A continuación, se retiró el medio condicionado con pectinas y se incubó con una solución de resazurín (Resazurín sodium salt), de concentración 4 mg/mL, disuelta en medio de cultivo. Luego se incubó por 4 h a 37 °C y 5 % de CO₂, se leyó la fluorescencia en el lector de fluorescencia (Thermo ApplisKan Modelo 5230000) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Anexo J: Determinación de % grado de esterificación

Tabla 8-3. Grado de esterificación de pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón E/S al 2%) antes y después del tratamiento con MPE.

Pectina neutra	% Grado de esterificación (Prom. ± DE %)
Original	64,62 ± 0,30
Tratada con MPE	50,50 ± 1,25

Tabla 8-4. Grado de esterificación de pectinas ácidas obtenidas a partir de tratamientos previos.

Pectina ácida	% Grado de esterificación (Prom. ± DE %)
Agua alcalinizada	45,67 ± 0,88
EDTA	31,78 ± 0,86
Corolase® PP	30,80 ± 0,06

Anexo K: Espectros FT-IR (tratamiento enzimático con MPE)

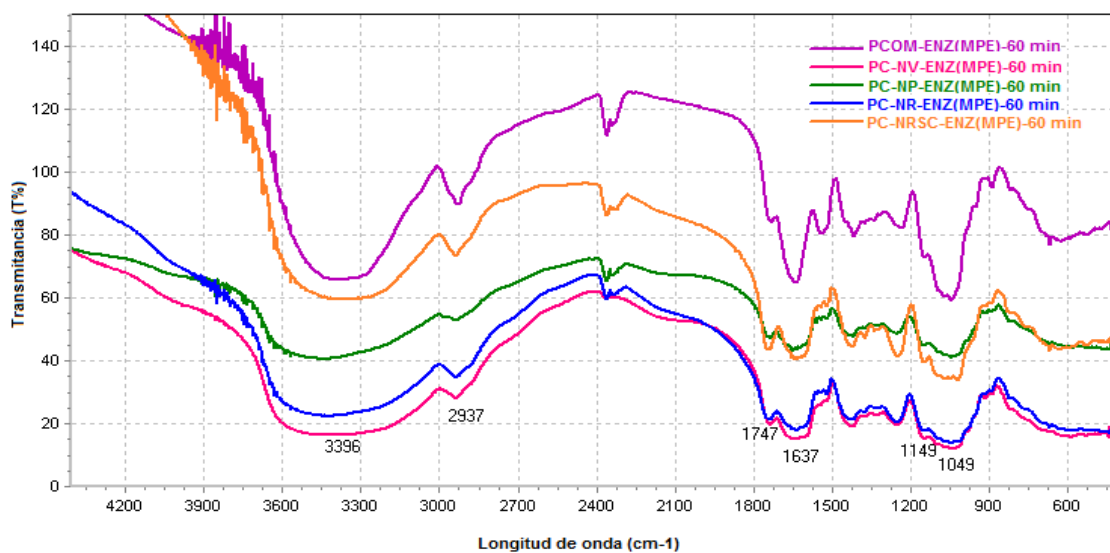


Figura 8-7. Espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha después de tratamiento con MPE. Condiciones: 25% E/S, 60 min, pH 4,5, 120 rpm. Control (pectina cítrica comercial) (■); Primera extracción (razón E/S 24%): Viscozyme® L (■); Rohapect® DA6L (■); Pectinex® Ultra SP-L (■); Segunda extracción (razón E/S 2%): Rohapect® DA6L (■)

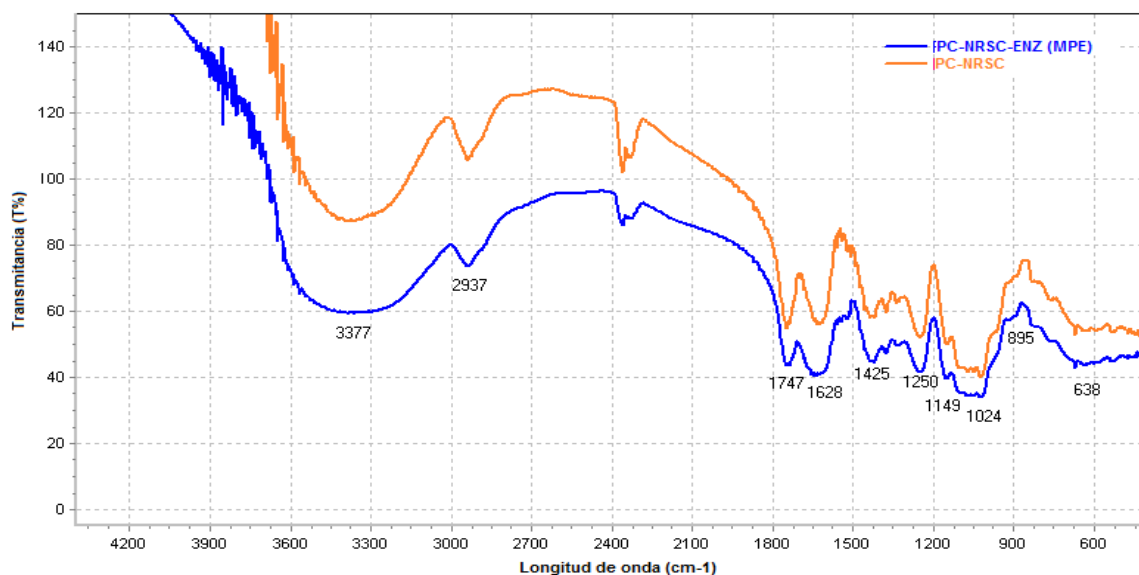


Figura 8-8. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Rohapect® DA6L (razón E/S 2%) y posterior tratamiento con MPE. Condiciones; 25% E/S, 60 min, pH 4,5, 120 rpm. Rohapect® DA6L sin tratar (■); Rohapect® DA6L con MPE (■).

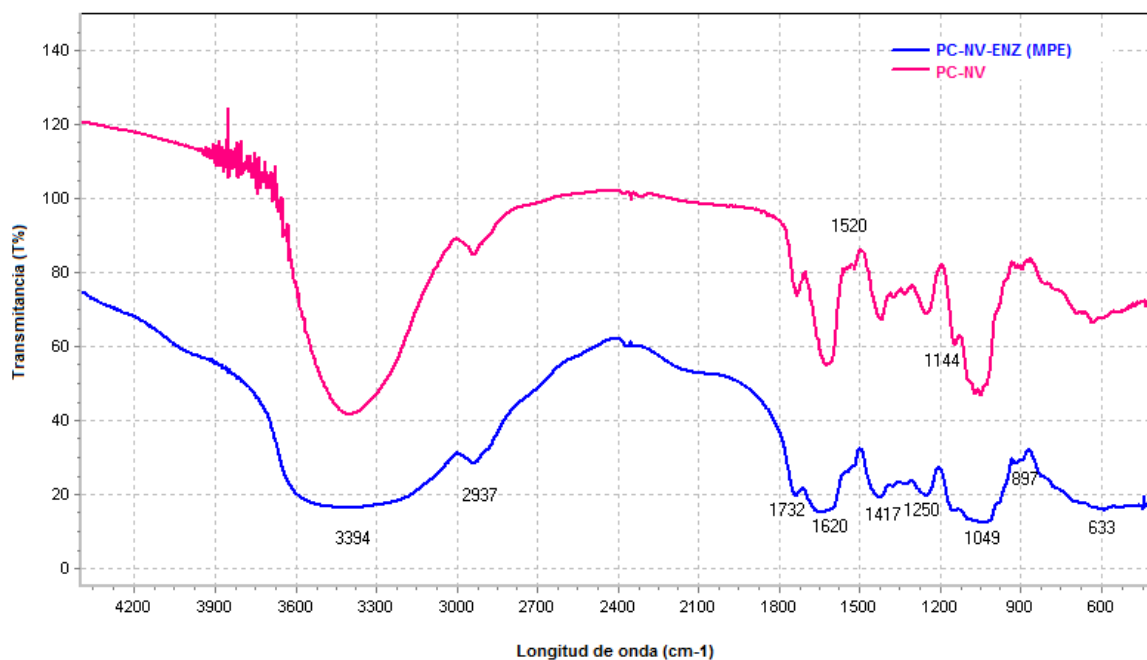


Figura 8-9. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Viscozyme® L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE. Condiciones; 25% E/S, 60 min, pH 4,5, 120 rpm. Viscozyme® L sin tratar (■); Viscozyme® L con MPE (■).

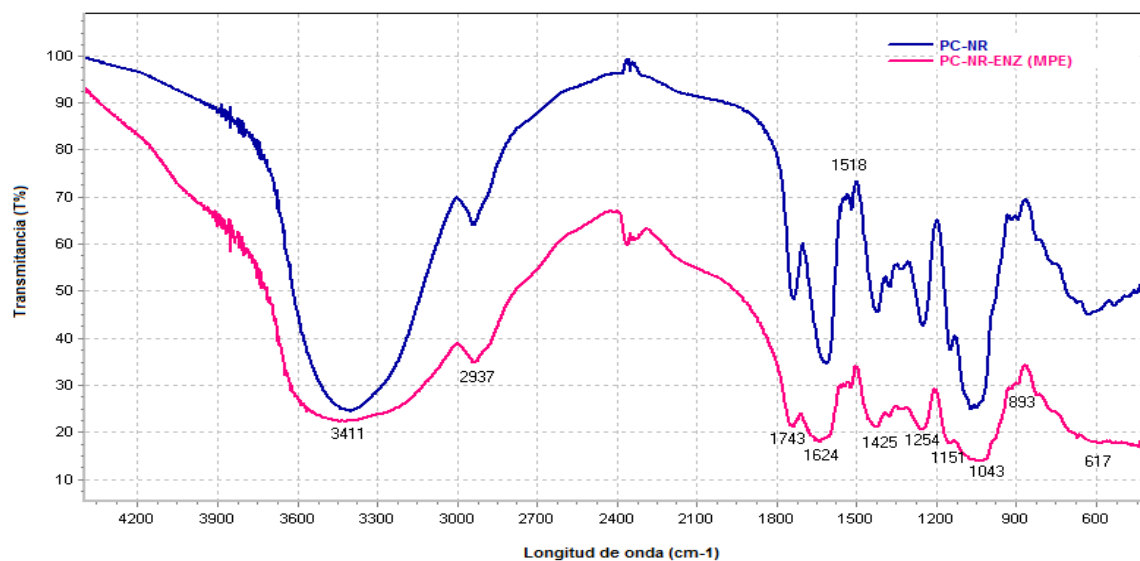


Figura 8-10. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Rohapect® DA6L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE. Condiciones; 25% E/S, 60 min, pH 4,5, 120 rpm. Rohapect® DA6L sin tratar (■); Rohapect® DA6L con MPE (■).

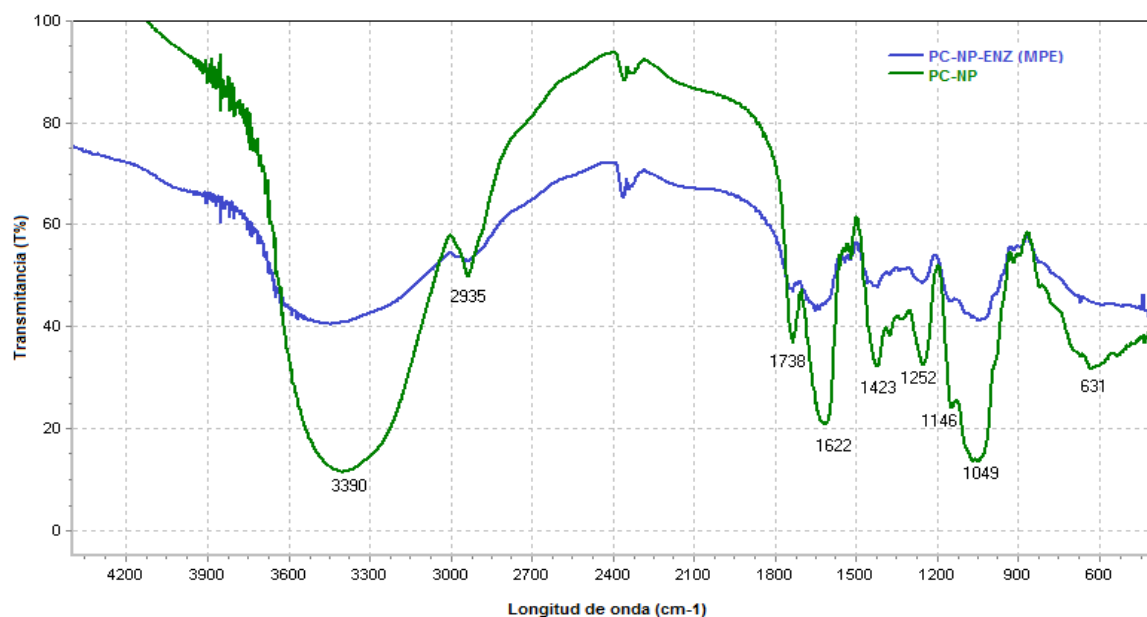


Figura 8-11. Comparación de los espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas con Pectinex® Ultra SP-L (razón E/S 24%) y posterior tratamiento con MPE. Condiciones; 25% E/S, 60 min, pH 4,5, 120 rpm. Pectinex® Ultra SP-L sin tratar (■); Pectinex® Ultra SP-L con MPE (■).

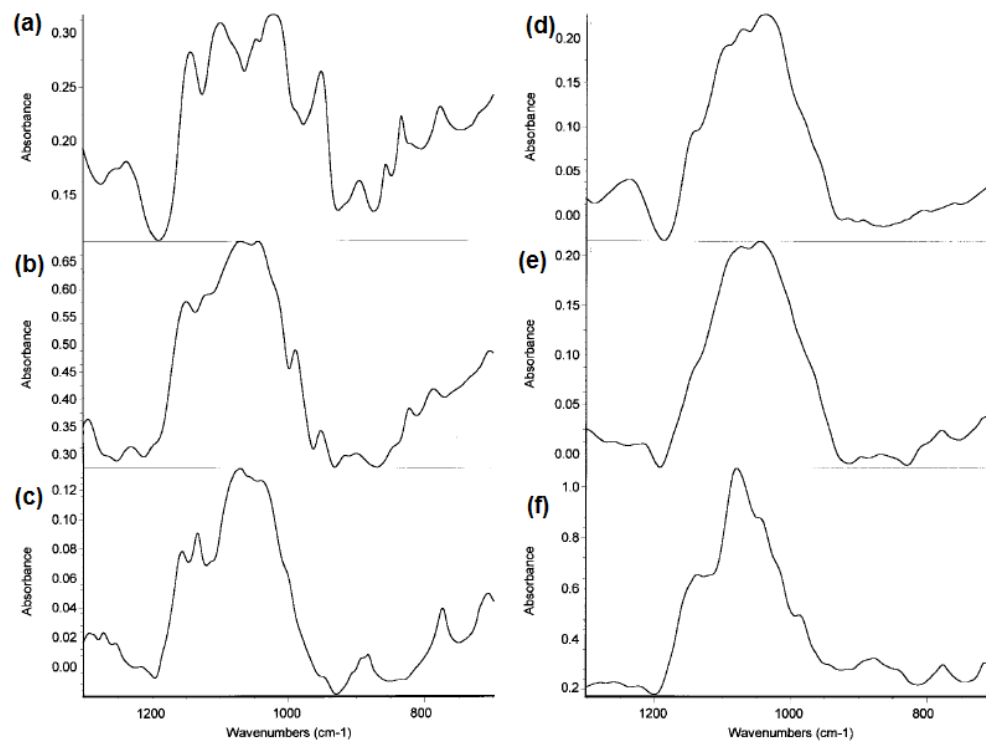
ANEXO L: Espectros IR de pectinas (Kacurakova *et al.*, 2000)

Figura 8-12. Espectros FT-IR de modelos de polisacáridos de las paredes celulares. (a) Pectina, (b) β-galactano, (c) α-arabinano, (d) arabinogalactano, (e) arabinogalactano y (f) arabinogalactano (Tipo II)

Anexo M: Espectro IR de pectinas neutras de distinto peso molecular.

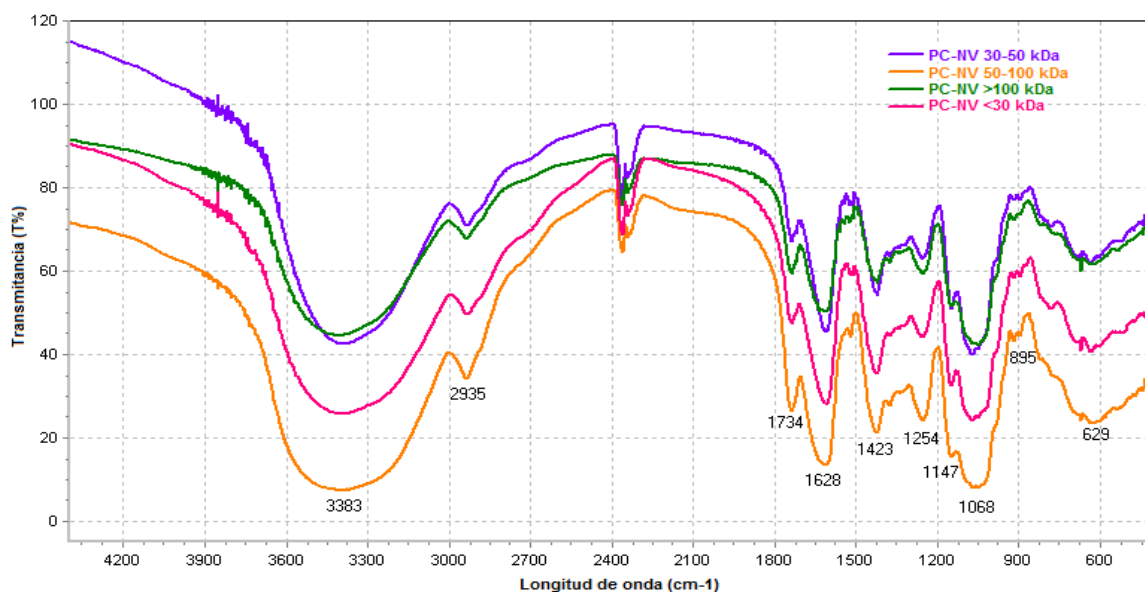


Figura 8-13. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Viscozyme® L. Pectina >100 kDa (■); pectina 50 – 100 kDa (■); Pectina 30 – 50 kDa (■); Pectina < 30 kDa (■).

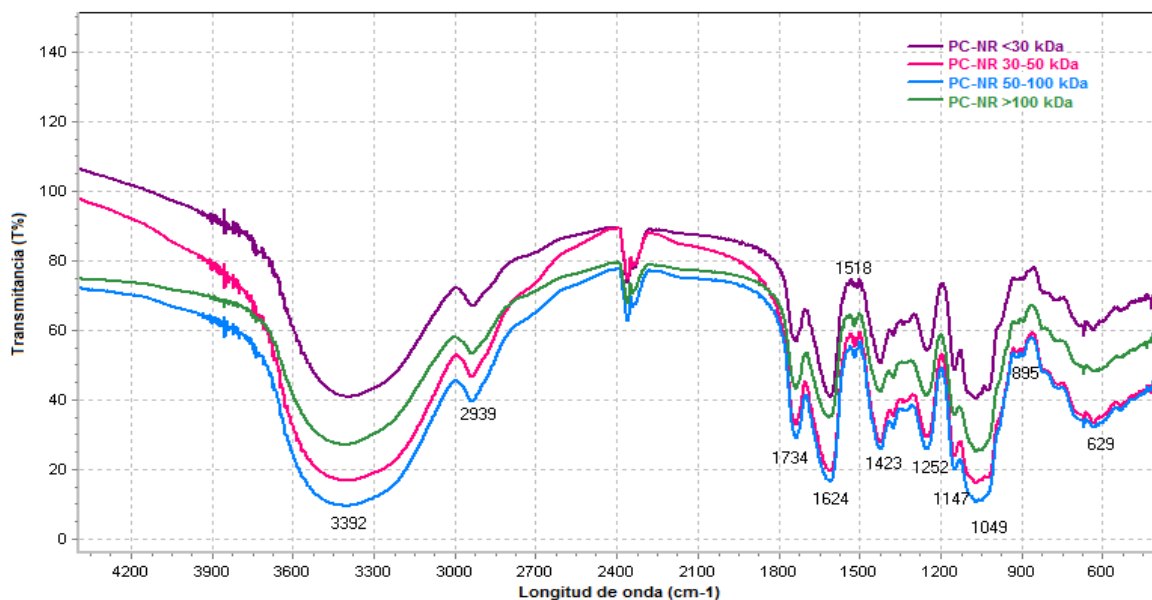


Figura 8-14. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón 24% E/S). Pectina >100 kDa (■); pectina 50 – 100 kDa (■); Pectina 30 – 50 kDa (■); Pectina < 30 kDa (■).

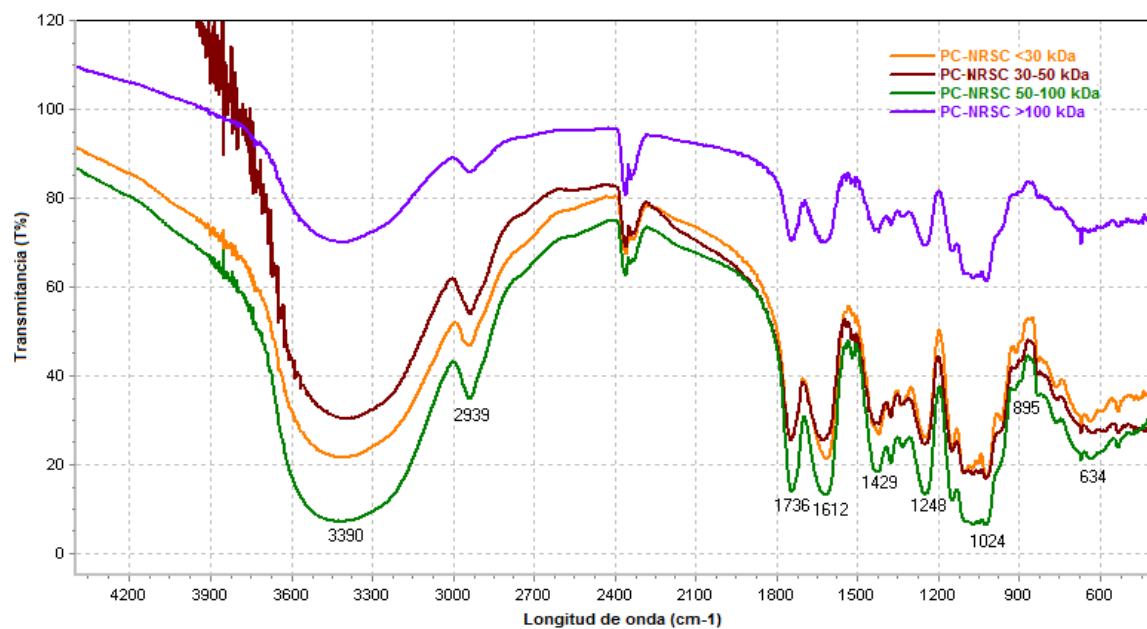


Figura 8-15. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta agotada de remolacha obtenidas a partir de Rohapect® DA6L (razón 2% E/S). Pectina >100 kDa (■); pectina 50 – 100 kDa (■); Pectina 30 – 50 kDa (■); Pectina < 30 kDa (■).

Anexo N: Espectro IR de pectinas neutras tratadas enzimáticamente

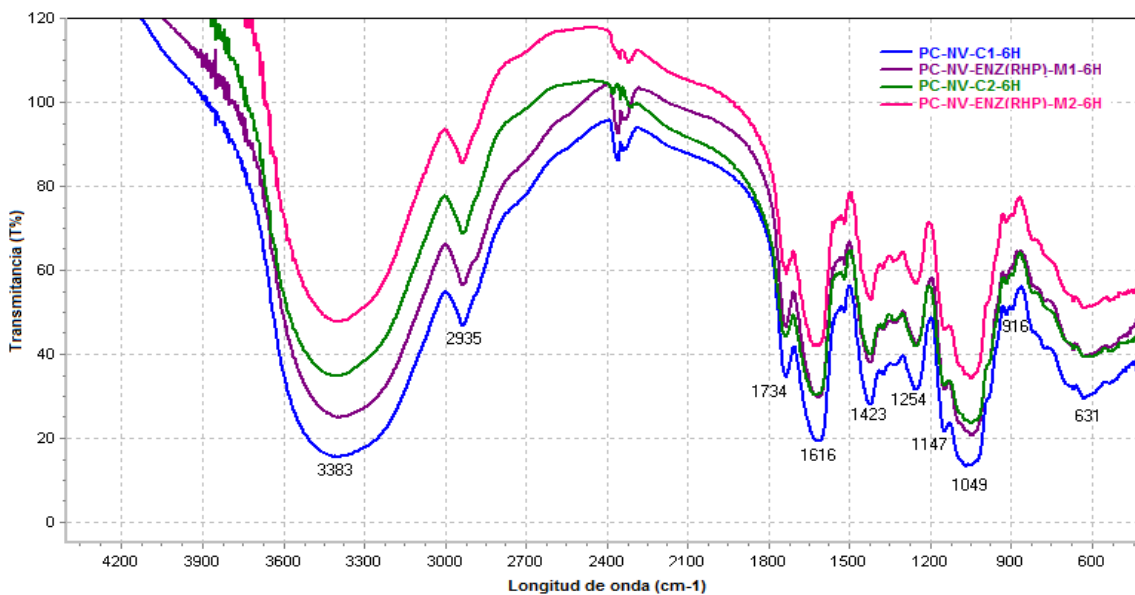


Figura 8-16. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 6 horas. Control 1 (sin precipitar) (■), control 2 (precipitado) (■), muestra 1 (sin precipitar) (■) y muestra 2 (precipitada) (■).

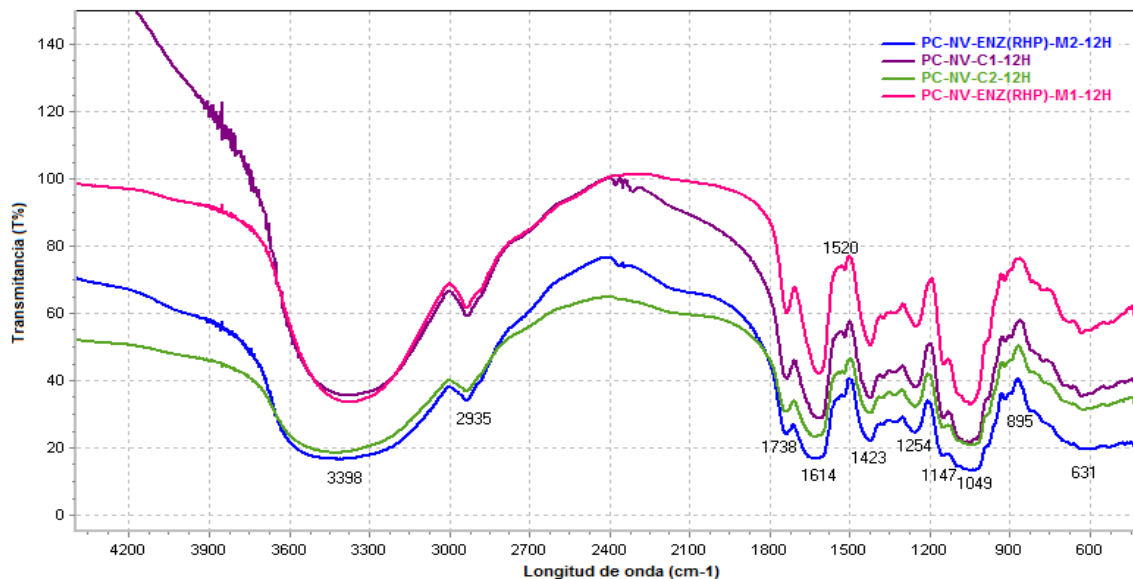


Figura 8-17. Comparación de espectros FT-IR de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L por 12 horas. Control 3 (sin precipitar) (■), control 4 (precipitado) (■), muestra 3 (sin precipitar) (■) y muestra 4 (precipitada) (■).

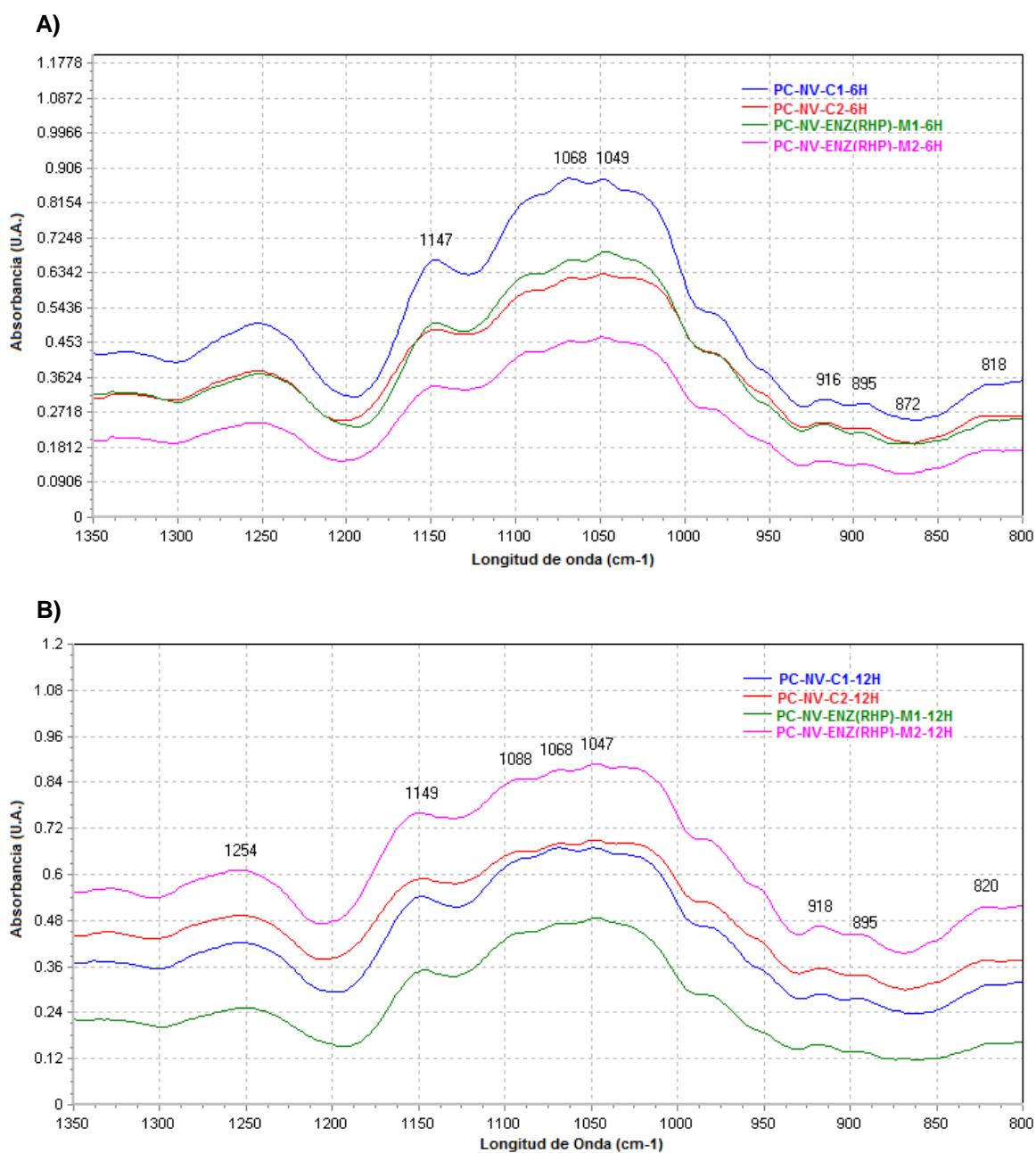


Figura 8-18. Comparación de espectros FT-IR en absorbancia de pectinas neutras de coseta obtenidas con Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L. A) Tratamiento por 6 horas; Control 1 (sin precipitar) (■), control 2 (precipitado) (■), muestra 1 (sin precipitar) (■) y muestra 2 (precipitada) (■). B) Tratamiento por 12 horas; Control 3 (sin precipitar) (■), control 4 (precipitado) (■), muestra 3 (sin precipitar) (■) y muestra 4 (precipitada) (■).

ANEXO O: Contenido de Ácido Galacturónico de Pectinas

Tabla 8-5. Contenido de ácido galacturónico de pectinas neutras obtenidas por tratamiento enzimático y fraccionamiento físico.

Pectinas neutras	AGA (% p/p, Prom. \pm DE %)
Viscozyme >100	43,76% \pm 3,60%
Viscozyme <100	56,86% \pm 2,21%
Rohapect DA6L >100	64,85% \pm 4,75%
Rohapect DA6L <100	42,37% \pm 2,62%

Tabla 8-6. Contenido de ácido galacturónico de pectinas neutras obtenidas a partir Viscozyme® L y tratadas con Rohapect® DA6L. Tiempo de hidrólisis: 6 horas (control 1 y 2 y muestra 1 y 2); 12 horas (control 3 y 4 y muestra 3 y 4)

Pectinas neutras	AGA (% p/p, Prom. \pm DE %)
Control 1	40,52% \pm 2,13%
Muestra 1	23,37% \pm 0,16%
Control 2	28,58% \pm 3,24%
Muestra 2	56,28% \pm 2,13%
Control 3	58,94% \pm 2,95%
Muestra 3	33,57% \pm 1,06%
Control 4	57,44% \pm 2,13%
Muestra 4	45,15% \pm 3,70%

Tabla 8-7. Contenido de ácido galacturónico de pectinas ácidas obtenidas a partir de tratamientos previos.

Pectinas ácidas	AGA (% p/p, Prom. \pm DE %)
Agua alcalinizada	22,10% \pm 0,98%
EDTA	42,68% \pm 5,74%
Corolase® PP	18,50% \pm 2,79%

ANEXO P: Análisis Estadístico ANOVA

P1) Análisis Estadístico de Pectinas Ácidas

Tabla 8-8. Prueba ANOVA de pectinas ácidas.

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	0,0079**	R cuadrado	0,8141
(P < 0.05)	Si	F	17,47
N° grupos	3	Valor P	< 0,0001
F	6,968		****
R cuadrado	0,4988	(P < 0.05)	si
	SS	df	MS
Tratamiento	832,3	2	416,1
Individual	7305	7	1044
Residual	836,2	14	59,73
Total	8973	23	

Tabla 8-9. Test de comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP, Agua Alcalina y EDTA.

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Corolase vs Agua Alcalina	-11,63	4,255	-21,74 a -1,510	P < 0,05
Corolase vs EDTA	1,583	0,5795	-8,532 ta11,70	P > 0,05
Agua Alcalina vs EDTA	13,21	4,834	3,093 a23,32	P < 0,05

Tabla 8-10. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP y Agua Alcalina.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Coro.	Prom. Agua Alc.	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,35 a 10,35	0	P > 0,05	ns
0,16	93	120,7	27,67	17,32 a 38,01	8,957	P < 0,0001	****
0,31	90,33	114,3	24	13,65 a 34,35	7,77	P < 0,0001	****
0,63	89	104,3	15,33	4,985 a 25,68	4,964	P < 0,001	***
1,25	84,67	98,33	13,67	3,319 a 24,01	4,424	P < 0,01	**
2,5	76	85,67	9,667	-0,6814 a 20,01	3,129	P > 0,05	ns
5	70,67	78,33	7,667	-2,681 a 18,01	2,482	P > 0,05	ns
10	64	59	-5	-15,35 a 5,348	1,619	P > 0,05	ns

Tabla 8-11. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Corolase® PP y EDTA.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Coro.	Prom. EDTA	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,35 a 10,35	0	P > 0,05	ns
0,16	93	106,7	13,67	3,319 a 24,01	4,424	P < 0,01	**
0,31	90,33	104	13,67	3,319 a 24,01	4,424	P < 0,01	**
0,63	89	96,33	7,333	-3,015 a 17,68	2,374	P > 0,05	ns
1,25	84,67	81,67	-3	-13,35 a 7,348	0,971	P > 0,05	ns
2,5	76	71,67	-4,333	-14,68 a 6,015	1,403	P > 0,05	ns
5	70,67	56	-14,67	-25,01 a -4,319	4,748	P < 0,001	***
10	64	38,67	-25,33	-35,68 a -14,99	8,201	P < 0,0001	****

Tabla 8-12. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas ácidas Agua Alcalina y EDTA.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Agua Alc.	Prom. EDTA	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,35 a 10,35	0	P > 0,05	ns
0,16	120,7	106,7	13,67	-24,35 a -3,652	4,532	P < 0,01	**
0,31	114,3	104	13,67	-20,68 a 0,015	3,345	P > 0,05	ns
0,63	104,3	96,33	7,333	-18,35 a 2,348	2,59	P > 0,05	ns
1,25	98,33	81,67	-3	-27,01 a -6,319	5,396	P < 0,001	***
2,5	85,67	71,67	-4,333	-24,35 a -3,652	4,532	P < 0,01	**
5	78,33	56	-14,67	-32,68 a -11,99	7,23	P < 0,0001	****
10	59	38,67	-25,33	-30,68 a -9,985	6,583	P < 0,0001	****

P2) Análisis Estadístico de Pectinas Neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L al 24% y 2% E/S.

Tabla 8-13. Test de comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L a 24% y 2%

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Rhp 24%	Prom. Rhp 2%	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,49 a 10,49	0	P > 0,05	ns
0,16	100	123	23	12,51 a 33,49	6,896	P < 0,0001	****
0,31	93,67	115,3	21,67	11,17 a 32,16	6,496	P < 0,0001	****
0,63	86,67	109,3	22,67	12,17 a 33,16	6,796	P < 0,0001	****
1,25	81	109	28	17,51 a 38,49	8,395	P < 0,0001	****
2,5	72,33	109	36,67	26,17 a 47,16	10,99	P < 0,0001	****
5	59,33	92,33	33	22,51 a 43,49	9,894	P < 0,0001	****
10	47	79	32	21,51 a 42,49	9,594	P < 0,0001	****

P3) Análisis estadístico de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L, Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L.

Tabla 8-16. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas por extracción enzimática.

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	< 0,0001 ****	R cuadrado	0,7213
(P < 0.05)	Si	F	20,39
N° grupos	3	Valor P	< 0,0001 ****
F	20,57	(P < 0.05)	Si
R cuadrado	0,7461	SS	df
		MS	
Tratamiento	1836	2	918,1
Individual	6370	7	910
Residual	624,9	14	44,64
Total	8831	23	

Tabla 8-17. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L, Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L.

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Viscozyme L vs Rohapect DA6L	-15,83	6,703	-24,58 a -7,089	P < 0,001
Viscozyme L vs Pectinex Ultra SP-L	-20,42	8,643	-29,16 a -11,67	P < 0,001
Rohapect DA6L vs Pectinex Ultra SP-L	-4,583	1,94	-13,33 a 4,161	P > 0,05

Tabla 8-18. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y Rohapect® DA6L

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis.	Prom. Rhp	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-9,245 a 9,245	0	P > 0,05	ns
0,16	69	100	31	21,75 a 40,25	10,72	P < 0,0001	****
0,31	69	93,67	24,67	15,42 a 33,91	8,528	P < 0,0001	****
0,63	66,33	86,67	20,33	11,09 a 29,58	7,03	P < 0,0001	****
1,25	61,67	81	19,33	10,09 a 28,58	6,684	P < 0,0001	****
2,5	53,67	72,67	19	9,755 a 28,25	6,569	P < 0,0001	****
5	49,67	59,33	9,667	0,4212 a 18,91	3,342	P < 0,05	*
10	44,33	47	2,667	-6,579 a 11,91	0,922	P > 0,05	ns

Tabla 8-19. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y Pectinex® Ultra SP-L.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis.	Prom. Pec	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-9,245 a 9,245	0	P > 0,05	ns
0,16	69	100	31	21,75 a 40,25	10,72	P < 0,0001	****
0,31	69	99,67	30,67	21,42 a 39,91	10,6	P < 0,0001	****
0,63	66,33	93,33	27	17,75 a 36,25	9,335	P < 0,0001	****
1,25	61,67	87,67	26	16,75 a 35,25	8,989	P < 0,0001	****
2,5	53,67	78,33	24,67	15,42 a 33,91	8,528	P < 0,0001	****
5	49,67	69	19,33	10,09 a 28,58	6,684	P < 0,0001	****
10	44,33	49	4,667	-4,579 a 13,91	1,613	P > 0,05	ns

Tabla 8-20. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L y Pectinex® Ultra SP-L.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Rhp	Prom. Pec	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-9,689 a 9,689	0	P > 0,05	ns
0,16	100	100	0	-9,689 a 9,689	0	P > 0,05	ns
0,31	93,67	99,67	6	-3,689 a 15,69	2,074	P > 0,05	ns
0,63	86,67	93,33	6,667	-3,023 a 16,36	2,305	P > 0,05	ns
1,25	81	87,67	6,667	-3,023 a 16,36	2,305	P > 0,05	ns
2,5	72,67	78,33	5,667	-4,023 a 15,36	1,959	P > 0,05	ns
5	59,33	69	9,667	-0,023 a 19,36	3,342	P > 0,05	ns
10	47	49	2	-7,689 a 11,69	0,6915	P > 0,05	ns

P4) Análisis estadístico entre pectinas neutra y ácida de coseta

Tabla 8-21. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectina neutra obtenida a partir de Viscozyme® L y pectina ácida de coseta.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis	Prom. Ácida	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-11,62 a 11,62	0	P > 0,05	ns
0,16	69	98,67	29,67	18,05 a 41,28	8,033	P < 0,0001	****
0,31	69	93,67	24,67	13,05 a 36,28	6,679	P < 0,0001	****
0,63	66,33	86	19,67	8,049 a 31,28	5,325	P < 0,001	***
1,25	61,67	77	15,33	3,716 a 26,95	4,152	P < 0,01	**
2,5	53,67	75,33	21,67	10,05 a 33,28	5,867	P < 0,001	***
5	49,67	69,33	19,67	8,049 a 31,28	5,325	P < 0,001	***
10	44,33	46,67	2,333	-9,284 a 13,95	0,6318	P > 0,05	ns

P5) Análisis estadístico de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L de distinto tamaño molecular

Tabla 8-22. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L de distinto tamaño molecular

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	< 0,0001 ****	R cuadrado	0,3429
(P < 0.05)	Si	F	5,96
N° grupos	3	Valor P	0,0023
F	32,97		**
R cuadrado	0,8249	(P < 0.05)	Si
	SS	df	MS
Tratamiento	3208	2	1604
Individual	2029	7	289,9
Residual	681	14	48,64
Total	5918	23	

Tabla 8-23. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L. Sin fraccionar, >100 kDa y < 100 kDa

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Vis sin fraccionar vs Vis > 100 kDa	-18,92	7,672	-28,05 a -9,788	P < 0,001
Vis sin fraccionar vs Vis < 100 kDa	-27,71	11,24	-36,84 a -18,58	P < 0,001
Vis > 100 kDa vs Vis < 100 kDa	-8,792	3,565	-17,92 a 0,3367	P > 0,05

Tabla 8-24. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y Viscozyme® L > 100 kDa

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis. s/f	Prom. Vis. >100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-11,01 a 11,01	0	P > 0,05	ns
0,16	69	86	17	5,995 a 28,01	5,175	P < 0,001	***
0,31	69	82,67	13,67	2,662 a 24,67	4,16	P < 0,01	**
0,63	66,33	84,33	18	6,995 a 29,01	5,479	P < 0,001	***
1,25	61,67	81	19,33	8,328 a 30,34	5,885	P < 0,0001	****
2,5	53,67	75,67	22	11,00 a 33,00	6,697	P < 0,0001	****
5	49,67	79	29,33	18,33 a 40,34	8,929	P < 0,0001	****
10	44,33	76,33	32	21,00 a 43,01	9,741	P < 0,0001	****

Tabla 8-25. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y Viscozyme® L < 100 kDa

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis. s/f	Prom. Vis. <100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-11,01 a 11,01	0	P > 0,05	ns
0,16	69	97,67	28,67	17,66 a 39,67	8,726	P < 0,0001	****
0,31	69	91,67	22,67	11,66 a 33,67	6,9	P < 0,0001	****
0,63	66,33	93,67	27,33	16,33 a 38,34	8,32	P < 0,0001	****
1,25	61,67	88,33	26,67	15,66 a 37,67	8,118	P < 0,0001	****
2,5	53,67	94,33	40,67	29,66 a 51,67	12,38	P < 0,0001	****
5	49,67	87,67	38	27,00 a 49,00	11,57	P < 0,0001	****
10	44,33	82	37,67	26,66 a 48,67	11,47	P < 0,0001	****

Tabla 8-26. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L > 100 kDa y Viscozyme® L < 100 kDa

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis. >100	Prom. Vis. <100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-11,01 a 11,01	0	P > 0,05	ns
0,16	86	97,67	11,67	0,6617 a 22,67	3,551	P < 0,05	*
0,31	82,67	91,67	9	-2,005 a 20,01	2,74	P > 0,05	ns
0,63	84,33	93,67	9,333	-1,672 a 20,34	2,841	P > 0,05	ns
1,25	81	88,33	7,333	-3,672 a 18,34	2,232	P > 0,05	ns
2,5	75,67	94,33	18,67	7,662 a 29,67	5,682	P < 0,0001	****
5	79	87,67	8,667	-2,338 a 19,67	2,638	P > 0,05	ns
10	76,33	82	5,667	-5,338 a 16,67	1,725	P > 0,05	ns

P6) Análisis estadístico de pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L de distinto tamaño molecular

Tabla 8-27. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L de distinto tamaño molecular

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	0,0029 **	R cuadrado	0,4519
(P < 0.05)	Si	F	3,79
N° grupos	3	Valor P	0,0162
F	9,09		*
R cuadrado	0,565	(P < 0.05)	Si
	SS	df	MS
Tratamiento	1651	2	825,6
Individual	2409	7	344,2
Residual	1272	14	90,83
Total	5332	23	

Tabla 8-28. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar, >100 kDa y < 100 kDa.

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Rhp sin fraccionar vs Rhp > 100 kDa	-13,88	4,118	-26,35 a -1,401	P < 0,05
Rhp sin fraccionar vs Rhp < 100 kDa	-19,79	5,874	-32,27 a -7,318	P < 0,01
Rhp > 100 kDa vs Rhp < 100 kDa	-5,917	1,756	-18,39 a 6,557	P > 0,05

Tabla 8-29. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar y Rohapect® DA6L > 100 kDa.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Rhp s/f	Prom. Rhp >100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,10 a 10,10	0	P > 0,05	ns
0,16	100	96,33	-3,667	-13,76 a 6,430	1,217	P > 0,05	ns
0,31	93,67	94,67	1	-9,096 a 11,10	0,3318	P > 0,05	ns
0,63	86,67	91,67	5	-5,096 a 15,10	1,659	P > 0,05	ns
1,25	81	91,67	10,67	0,5702 a 20,76	3,539	P < 0,05	*
2,5	72,33	93,67	21,33	11,24 a 31,43	7,078	P < 0,0001	****
5	59,33	92,67	33,33	23,24 a 43,43	11,06	P < 0,0001	****
10	47	90,33	43,33	33,24 a 53,43	14,38	P < 0,0001	****

Tabla 8-30. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Rohapect® DA6L sin fraccionar y Rohapect® DA6L < 100 kDa.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Rhp. s/f	Prom. Rhp. <100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,10 a 10,10	0	P > 0,05	ns
0,16	100	107	7	-3,096 a 17,10	2,323	P > 0,05	ns
0,31	93,67	111,3	17,67	7,570 a 27,76	5,862	P < 0,0001	****
0,63	86,67	107	20,33	10,24 a 30,43	6,747	P < 0,0001	****
1,25	81	105	24	13,90 a 34,10	7,963	P < 0,0001	****
2,5	72,33	103	30,67	20,57 a 40,76	10,18	P < 0,0001	****
5	59,33	90,67	31,33	21,24 a 41,43	10,4	P < 0,0001	****
10	47	74,33	27,33	17,24 a 37,43	9,069	P < 0,0001	****

Tabla 8-31. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L > 100 kDa y Viscozyme® L < 100 kDa.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Rhp. >100	Prom. Rhp. <100	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-10,10 a 10,10	0	P > 0,05	ns
0,16	96,33	107	10,67	0,5702 a 20,76	3,539	P < 0,05	*
0,31	94,67	111,3	16,67	6,570 a 26,76	5,53	P < 0,001	***
0,63	91,67	107	15,33	5,237 a 25,43	5,088	P < 0,001	***
1,25	91,67	105	13,33	3,237 a 23,43	4,424	P < 0,01	**
2,5	93,67	103	9,333	-0,7631 a 19,43	3,097	P > 0,05	ns
5	92,67	90,67	-2	-12,10 a 8,096	0,6636	P > 0,05	ns
10	90,33	74,33	-16	-26,10 a -5,904	5,309	P < 0,001	***

P7) Análisis estadístico de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 6 horas.

Tabla 8-32. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 6 horas.

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	< 0,0001 ****	R cuadrado	0,7126
(P < 0.05)	Si	F	28,33
N° grupos	5	Valor P	< 0,0001 ****
F	12,99		
R cuadrado	0,6499	(P < 0.05)	Si
	SS	df	MS
Tratamiento	2309	4	577,3
Individual	8810	7	1259
Residual	1244	28	44,43
Total	12363	39	

Tabla 8-33. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 6 horas.

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Vis. Control 1 vs Vis. Enz. 1	-5,667	2,405	-15,38 a 4,050	P > 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. Control 2	-9,958	4,226	-19,68 a -0,2414	P < 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. enz. 2	-8,667	3,678	-18,38 a 1,050	P > 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. sin fraccionar	10,88	4,615	1,158 a 20,59	P < 0,05
Vis. Enz. 1 vs Vis. Control 2	-4,292	1,821	-14,01 a 5,425	P > 0,05
Vis. Enz 1 vs Vis. Enz. 2	-3	1,273	-12,72 a 6,717	P > 0,05
Vis. Enz. 1 vs Vis. sin fraccionar	16,54	7,019	6,825 a 26,26	P < 0,001
Vis. Control 2 vs Vis. Enz. 2	1,292	0,5481	-8,425 a 11,01	P > 0,05
Vis. Control 2 vs Vis. sin fraccionar	20,83	8,841	11,12 a 30,55	P < 0,001
Vis. Enz 2 vs Vis. sin fraccionar	19,54	8,292	9,825 a 29,26	P < 0,001

Tabla 8-34. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 1, sin precipitar con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. C-1	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-15,26 a 15,26	0	P > 0,05	ns
0,16	69	84,67	15,67	0,4018 a 30,93	3,391	P < 0,05	*
0,31	69	86	17	1,735 a 32,26	3,68	P < 0,05	*
0,63	66,33	81,33	15	-0,2648 a 30,26	3,247	P > 0,05	ns
1,25	61,67	75,33	13,67	-1,598 a 28,93	2,958	P > 0,05	ns
2,5	53,67	71,67	18	2,735 a 33,26	3,896	P < 0,01	**
5	49,67	62,33	12,67	-2,598 a 27,93	2,742	P > 0,05	ns
10	44,33	39,33	-5	-20,26 a 10,26	1,082	P > 0,05	ns

Tabla 8-35. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 1, tratada con Rohapect® DA6L por 6 horas y sin precipitar con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. Enz-1	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-15,26 a 15,26	0	P > 0,05	ns
0,16	69	100,3	31,33	16,07 a 46,60	6,783	P < 0,0001	****
0,31	69	92,33	23,33	8,068 a 38,60	5,051	P < 0,001	***
0,63	66,33	89,33	23	7,735 a 38,26	4,979	P < 0,001	***
1,25	61,67	79,33	17,67	2,402 a 32,93	3,824	P < 0,01	**
2,5	53,67	75	21,33	6,068 a 36,60	4,618	P < 0,001	***
5	49,67	65,67	16	0,735 a 31,26	3,463	P < 0,05	*
10	44,33	44	-0,3333	-15,60 a 14,93	0,072	P > 0,05	ns

Tabla 8-36. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 2 precipitado con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. C-2	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-15,26 a 15,26	0	P > 0,05	ns
0,16	69	94	25	9,735 a 40,26	5,412	P < 0,0001	****
0,31	69	93,67	24,67	9,402 a 39,93	5,339	P < 0,0001	****
0,63	66,33	92,33	26	10,74 a 41,26	5,628	P < 0,0001	****
1,25	61,67	71	9,333	-5,932 a 24,60	2,02	P > 0,05	ns
2,5	53,67	88,67	35	19,74 a 50,26	7,576	P < 0,0001	****
5	49,67	89,33	39,67	24,40 a 54,93	8,586	P < 0,0001	****
10	44,33	51,33	7	-8,265 a 22,26	1,515	P > 0,05	ns

Tabla 8-37. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 2, tratada con Rohapect® DA6L por 6 horas y precipitado con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. Enz-2	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-15,26 a 15,26	0	P > 0,05	ns
0,16	69	92	23	7,735 a 38,26	4,979	P < 0,001	***
0,31	69	91,67	22,67	7,402 a 37,93	4,907	P < 0,001	***
0,63	66,33	83,67	17,33	2,068 a 32,60	3,752	P < 0,05	*
1,25	61,67	83,33	21,67	6,402 a 36,93	4,69	P < 0,001	***
2,5	53,67	83,67	30	14,74 a 45,26	6,494	P < 0,0001	****
5	49,67	82	32,33	17,07 a 47,60	6,999	P < 0,0001	****
10	44,33	53,67	9,333	-5,932 a 24,60	2,02	P > 0,05	ns

P8) Análisis estadístico de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 12 horas.

Tabla 8-38. Prueba ANOVA de pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 12 horas.

medidas repetidas ANOVA		Fue significativamente efectivo el emparejamiento?	
Valor P	< 0,0001 ****	R cuadrado	0,5714
(P < 0.05)	Si	F	20,74
N° grupos	5	Valor P	< 0,0001
F	20,23		****
R cuadrado	0,7429	(P < 0.05)	Si
	SS	df	MS
Tratamiento	4888	4	1222
Individual	8773	7	1253
Residual	1692	28	60,42
Total	15353	39	

Tabla 8-39. Test de Comparación Tukey de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L y tratadas enzimáticamente con Rohapect® DA6L por 12 horas.

Comparación múltiple de Tukey	Dif. de Medias	q	Df	Valor p
Vis. Control 1 vs Vis. Enz. 1	-1,542	0,561	-12,87 a 9,790	P > 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. Control 2	-6	2,183	-17,33 a 5,332	P > 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. enz. 2	2,542	0,9248	-8,790 a 13,87	P > 0,05
Vis. Control 1 vs Vis. sin fraccionar	25,5	9,279	14,17 a 36,83	P < 0,001
Vis. Enz. 1 vs Vis. Control 2	-4,458	1,622	-15,79 a 6,874	P > 0,05
Vis. Enz. 1 vs Vis. Enz. 2	4,083	1,486	-7,249 a 15,42	P > 0,05
Vis. Enz. 1 vs Vis. sin fraccionar	27,04	9,84	15,71 a 38,37	P < 0,001
Vis. Control 2 vs Vis. Enz. 2	8,542	3,108	-2,790 a 19,87	P > 0,05
Vis. Control 2 vs Vis. sin fraccionar	31,5	11,46	20,17 a 42,83	P < 0,001
Vis. Enz. 2 vs Vis. sin fraccionar	22,96	8,354	11,63 a 34,29	P < 0,001

Tabla 8-40. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 1, sin precipitar con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. C-1	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-17,39 a 17,39	0	P > 0,05	ns
0,16	69	104,3	35,33	17,94 a 52,73	6,712	P < 0,0001	****
0,31	69	98,67	29,67	12,27 a 47,06	5,636	P < 0,0001	****
0,63	66,33	97,33	31	13,61 a 48,39	5,889	P < 0,0001	****
1,25	61,67	97,33	35,67	18,27 a 53,06	6,776	P < 0,0001	****
2,5	53,67	88,33	34,67	17,27 a 52,06	6,586	P < 0,0001	****
5	49,67	86,67	37	19,61 a 54,39	7,029	P < 0,0001	****
10	44,33	45	0,6667	-16,73 a 18,06	0,1266	P > 0,05	ns

Tabla 8-41. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 1, tratada con Rohapect® DA6L por 6 horas y sin precipitar con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. Enz-1	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-17,39 a 17,39	0	P > 0,05	ns
0,16	69	104,3	35,33	17,94 a 52,73	6,712	P < 0,0001	****
0,31	69	106	37	19,61 a 54,39	7,029	P < 0,0001	****
0,63	66,33	104,7	38,33	20,94 a 55,73	7,282	P < 0,0001	****
1,25	61,67	101	39,33	21,94 a 56,73	7,472	P < 0,0001	****
2,5	53,67	92	38,33	20,94 a 55,73	7,282	P < 0,0001	****
5	49,67	77	27,33	9,940 a 44,73	5,193	P < 0,0001	****
10	44,33	45	0,6667	-16,73 a 18,06	0,1266	P > 0,05	ns

Tabla 8-42. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Control 2 precipitado con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. C-2	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-17,39 a 17,39	0	P > 0,05	ns
0,16	69	102,3	33,33	15,94 a 50,73	6,332	P < 0,0001	****
0,31	69	100	31	13,61 a 48,39	5,889	P < 0,0001	****
0,63	66,33	102,3	36	18,61 a 53,39	6,839	P < 0,0001	****
1,25	61,67	101,3	39,67	22,27 a 57,06	7,536	P < 0,0001	****
2,5	53,67	104,3	50,67	33,27 a 68,06	9,625	P < 0,0001	****
5	49,67	93	43,33	25,94 a 60,73	8,232	P < 0,0001	****
10	44,33	62,33	18	0,6066 a 35,39	3,42	P < 0,05	*

Tabla 8-43. Test de Comparación Bonferroni de la actividad antiproliferativa entre pectinas neutras obtenidas a partir de Viscozyme® L sin fraccionar y de Viscozyme® L Enzimático 2, tratada con Rohapect® DA6L por 12 horas y precipitado con etanol.

Conc. Pect. (mg/mL)	Prom. Vis s/f	Prom. Enz-2	Diferencia	DF a IC 95%	t	Valor P	Significativo
0	100	100	0	-17,39 a 17,39	0	P > 0,05	ns
0,16	69	97	28	10,61 a 45,39	5,319	P < 0,0001	****
0,31	69	93,67	24,67	7,273 a 42,06	4,686	P < 0,001	***
0,63	66,33	93,33	27	9,607 a 44,39	5,129	P < 0,0001	****
1,25	61,67	91,33	29,67	12,27 a 47,06	5,636	P < 0,0001	****
2,5	53,67	85,67	32	14,61 a 49,39	6,079	P < 0,0001	****
5	49,67	81,67	32	14,61 a 49,39	6,079	P < 0,0001	****
10	44,33	54,67	10,33	-7,060 a 27,73	1,963	P > 0,05	ns