

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE INGREDIENTES DERIVADOS DE CAUPÍ CULTIVADO EN EL NEA

Tesis doctoral



TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE INGREDIENTES
DERIVADOS DE CAUPÍ CULTIVADO EN EL NEA**

Tesista: Lic. Andrea Gisella Gómez

Directora: Dra. M. Victoria Avanza

Co-Directora: Dra. Claudia Carolina Gay

Sub-Directora: Dra. Valeria Anahí Tironi



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Año 2024

Dedicado a mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, la Dra. María Victoria Avanza, Dra. Claudia Carolina Gay y Dra. Valeria Anahí Tironi, por su permanente apoyo durante todo el trabajo de investigación y tenerme tanta paciencia en el proceso de escritura.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura por la formación académica que he recibido tanto en mi carrera de grado como de posgrado.

Al grupo de proteínas del LIDiPA-CIDCA (CONICET-UNLP-CIC), por recibirme de la mejor manera y ayudarme a desenvolverme en el laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio, Mela, Feli, Eli, Cin, Vic, Bety, Rocío, Fer, Andre F, Guada, Marga, Belén, Adri, Victoria, Gonzalo, Karina, Ariel, Virgi y Sonia.

A mi familia, quienes me apoyaron y siempre estuvieron conmigo en cada lugar de trabajo.

A Carlos, por el día a día, por la paciencia, y mucho más.

Finalmente, gracias a Catalina.

Los resultados de este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados un artículo de revista con referato y en seis comunicaciones a congresos:

Gómez, Andrea; Gay, Carolina; Tironi, Valeria; Avanza, María Victoria. Structural and antioxidant properties of cowpea protein hydrolysates. Food bioscience. 2021 v.41 pp. 101074. ISSN: 2212-4292.

Gomez AG, Gay C, Avanza MV. “Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de caupí (variedad Cuarentón) obtenidos por digestión enzimática”. XXIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes. 2018. **PREMIO AL MEJOR TRABAJO.** y XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Mendoza. 2018. **DISTINCIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA EXACTAS.**

Gomez AG, Gay C, Tironi V, Avanza MV. Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de caupí. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba. 2018.

Gomez AG, Gay C, Avanza MV. “Caracterización Estructural y Funcional de Aislados e Hidrolizados Proteicos de Caupí”. XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes. 2019.

Gomez. AG, Gay C, Tironi V, Avanza MV. Efecto de la hidrólisis en las propiedades físicoquímicas de aislados de *Vigna unguiculata*. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos & XXII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires. 2019.

Gomez, Andrea G; Gay, Claudia C; Tironi, Valeria; Avanza, María V. Actividad antioxidante de harina y aislado proteico de caupí sometidos a digestión gastrointestinal simulada. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC 2022). Cordoba. 2022.

Gomez, Andrea G; Gay, Claudia C; Tironi, Valeria; Avanza, María V. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de harina y aislado proteico de caupí (*Vigna unguiculata*). XXIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires. 2023.

INDICE

RESUMEN	6
ABREVIATURAS	12
CAPÍTULO I.....	16
INTRODUCCIÓN.....	16
I.1. El caupí. Historia y situación actual.....	18
I.2. Características generales y usos	21
I.3. Proteínas del caupí.....	23
I.4. Oxidación en sistemas biológicos.....	24
I.4.1. Mecanismo de defensa antioxidante.....	28
I.4.2. Mecanismos generales de acción de los antioxidantes	30
I.5. Compuestos antioxidantes presentes en legumbres	33
I.5.1. Actividad antioxidante de péptidos	33
I.5.2. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos.....	36
Hipótesis	40
CAPÍTULO II.....	42
OBJETIVOS.....	42
CAPÍTULO III.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS	46
III.1. Preparación de la harina.....	48
III.2. Preparación de aislados proteicos de caupí	48
III.2.1. Cálculo del rendimiento en peso y de proteínas totales	48
III.3. Tratamientos de hidrólisis	49
III.3.1. Hidrólisis con alcalasa	49
III.3.2. Hidrólisis con pepsina-pancreatina	50
III.3.3. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS)	50
III.4. Caracterización fisicoquímica y estructural.....	57
III.4.1 Contenido de proteínas.....	57
III.4.2. Preparación de dispersiones solubles	57
III.4.2.1 Método de Lowry	57
III.4.2.2 Determinación del grado de hidrólisis	57
III.4.3. Electroforesis	58
III.4.3.1. Electroforesis SDS-PAGE	58
III.4.3.2. Electroforesis Tricina - SDS - PAGE	59

III.4.4. Cromatografía de exclusión molecular	60
III.4.5. Método de Lowry modificado.....	61
III.5. Caracterización estructural	61
III.5.1. Hidrofobicidad superficial	61
III.5.2. Espectroscopia infrarroja	62
III.5.3. Fluorescencia intrínseca	62
III.5.4. Solubilidad en función del pH.....	63
III.6. Actividad antioxidante	63
III.6.1. Inhibición del radical ABTS⁺	63
III.6.2. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).....	64
III.6.3. Ensayo HORAC	65
III.6.4. Ensayo FRAP (Capacidad antioxidante para reducir el ion férrico).....	66
III.6.5 Actividad antioxidante frente a células intestinales.....	66
III.6.5.1. Acondicionamiento de las muestras y línea celular utilizada	66
III.6.5.2. Citotoxicidad de las muestras: determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH)	67
III.6.5.3. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	68
III.6. Caracterización de las secuencias peptídicas	69
III.7. Caracterización de la fracción polifenólica	70
III.7.1. Extracción de compuestos fenólicos	70
III.7.2. Determinación de fenoles totales	72
III.8.3. Propiedades antioxidantes	73
III.8.3.1. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)	73
III.8.3.2. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).....	73
III.8.3.3. Ensayo FRAP	73
III.9. Preparación de muestras de carne a partir de carne picada molida, harina, aislados e hidrolizados de proteínas	74
III.9.1. Elaboración de hamburguesas.....	75
III.9.1.1. Elaboración de hamburguesas de carne de pescado.....	75
III.9.2. Rendimiento	76
III.9.3. Medición de pH	76
III.9.4. Oxidación lipídica	76
III.9.5. Color.....	76
III.9.6. Análisis del perfil de textura	77
III.10. Análisis estadístico de los datos	78
CAPÍTULO IV.....	79
HIDRÓLISIS CON ALCALASA DE AISLADOS PROTEICOS DE CAUPÍ.....	79
IV. 1. Caracterización fisicoquímica y estructural.....	81

IV.1.2. Caracterización físico-química y estructural de hidrolizados y aislados proteicos.....	83
IV.1.3. Cromatografía de exclusión molecular	85
IV.1.4. Perfil de solubilidad de proteínas en función del pH.....	88
IV.1.5. Espectroscopia infrarroja.....	90
IV.1.6. Fluorescencia intrínseca	92
IV.1.7. Hidrofobicidad Superficial.....	94
IV.2. Actividad antioxidante.....	95
IV.3. Caracterización de secuencias peptídicas de fracción antioxidant de caupí.....	102
CONCLUSIONES	109
CAPÍTULO V.....	111
EFFECTO DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINA Y AISLADO PROTEICO DE CAUPI.....	111
V.1 Digestión con pepsina/pancreatina (PP) de aislado proteico de caupí (A10)	114
V.1.1. Grado de hidrólisis	114
V.1.2. Perfiles electroforéticos/cromatográficos de A10PP	115
V.1.2. Actividad antioxidant medida por ABTS	117
V.2. Simulación de la digestión gastrointestinal (DGIS)	118
V.2.1. Perfil electroforético de HD y A10D	118
V.2.2. Caracterización de las fracciones cromatográficas de HD y A10D.....	120
V.2.3. Actividad antioxidant de HD y A10D	122
V.2.4. Actividad antioxidant de las fracciones cromatográficas de HD y A10D	126
V.2.5 Actividad antioxidant en cultivos celulares de HD y A10D	127
V.2.6. Citotoxicidad en células Caco2-TC7	128
V.2.7. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células intestinales Caco2- TC7	130
V.2.8. Caracterización de secuencias peptídicas de fracción antioxidant de caupí	132
CONCLUSIONES	141
CAPÍTULO VI	143
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE HARINA Y AISLADO PROTEICO DE CAUPI: EFECTO DE LA DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA	143
VI.1. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos	145
VI.2. Identificación de compuestos fenólicos	150
VI.3. Efecto de la DGIS en el perfil de compuestos fenólicos	153
VI.4. Actividad antioxidant.....	162
CONCLUSIONES	165
CAPÍTULO VII	167
EVALUACIÓN DEL USO POTENCIAL DE HIDROLIZADOS DE CAUPI COMO INGREDIENTES FUNCIONALES (ANTIOXIDANTES) EN PRODUCTOS CÁRNICOS	167

VII.1. Preparados de carne de pescado picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de caupí	169
VII.1.1. Formulación	170
VII.1.1.2 Parámetros de calidad de preparados de carne de pescado picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de caupí.....	171
VII.1.1.2.1 Mediciones de pH	171
VII.1.1.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	172
VII.1.1.4. Color	174
VII.1.1.5. Textura	176
VII.2. Preparados de carne vacuna picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes proteicos derivados de caupí	177
VII.2.1. Formulación	178
VII.2.2. Parámetros de calidad de preparados de carne vacuna picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes proteicos derivados de caupí.....	179
VII.2.2.1 Rendimiento de cocción	179
VII.2.2.2 Mediciones de pH	180
VII.2.2.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	181
VII.2.2.4 Color	183
VII.2.2.5 Textura	186
CONCLUSIONES	189
CAPÍTULO VII	191
CONCLUSIONES GENERALES	191
BIBLIOGRAFÍA.....	197

RESUMEN

El caupí (*Vigna unguiculata* [L.] Walp., sinónimo: *Vigna sinensis* [L.]) es una legumbre perteneciente a la familia Fabaceae y en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Este cultivo se utiliza para la alimentación humana y animal, como cultivo de cobertura y rotación y como abono verde. Sus semillas son consideradas un alimento con un elevado contenido de proteínas (23-27%), de buena calidad nutricional y fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas del complejo B y minerales.

Los radicales libres se forman en el organismo debido a una combinación de factores ambientales y biológicos. Entre los factores ambientales se encuentran la exposición a radiaciones, humo de cigarrillo, ozono, drogas químicas y pesticidas. En cuanto a los factores biológicos, durante las reacciones metabólicas endógenas en las células aeróbicas, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^{2-}), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radical peroxilo (ROO^{\cdot}), radical hidroxiperoxilo (HOO^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxidos orgánicos, que son productos normales de la reducción biológica del oxígeno molecular. La producción de radicales libres es un proceso natural que puede ocurrir con o sin la intervención de enzimas, y sólo representa un problema de salud cuando los mecanismos de defensa del organismo no son capaces de neutralizarlos adecuadamente.

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos, unido a la creciente preocupación por los efectos tóxicos producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la preservación de alimentos; esto refuerza la urgencia de obtener sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. En este sentido, el caupí constituye una potencial fuente de compuestos debido a que posee gran variedad de metabolitos secundarios como respuesta a estímulos o condiciones ambientales, entre ellos, sustancias con capacidad captadora de radicales libres tales como los compuestos fenólicos y que a partir de sus proteínas se pueden generar péptidos antioxidantes que pueden limitar también el daño oxidativo, tanto en alimentos preparados (usándolos como antioxidantes naturales), así como al proteger de la oxidación a las células del organismo cuando éstos son ingeridos en la dieta.

El objetivo general de esta tesis fue generar nuevos conocimientos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas antioxidantes de ingredientes derivados de caupí, de sus proteínas, péptidos y compuestos fenólicos, a efectos de poder incorporarlos como suplemento o ingrediente en productos alimentarios fabricados para fines específicos o bien su uso como potenciales componentes benéficos para la salud. A partir de la harina de las semillas de caupí,

se obtuvieron aislados proteicos por extracción alcalina (a pH 8,0 y 10,0) y posterior precipitación isoeléctrica. Los aislados proteicos obtenidos se nombraron A8 y A10, de acuerdo con el pH de extracción utilizado.

En primer lugar, se utilizaron dos relaciones diferentes de alcalasa y aislados para obtener hidrolizados de proteínas de caupí con bajo (LH) o alto (HH) grado de hidrólisis (GH). Los hidrolizados proteicos obtenidos se nombraron A8LH, A10LH, A8HH y A10HH. A efectos de determinar los cambios estructurales de las proteínas como consecuencia de la hidrólisis enzimática, se estudiaron el perfil polipeptídico y las características conformacionales de las estructuras secundaria y terciaria. Los resultados obtenidos por electroforesis, cromatografía de exclusión molecular, espectroscopias de fluorescencia e infrarrojo muestran que el tratamiento con alcalasa para obtener un bajo GH afectó en mayor medida a A10 que a A8. Mientras que para obtener un alto GH, se evidenciaron cambios fisicoquímicos y estructurales donde no se evidenció incidencia del pH inicial de extracción de las proteínas. Además, los hidrolizados LH presentaron un incremento de la solubilidad en la zona del punto isoeléctrico de las proteínas.

Las moléculas antioxidantes pueden reaccionar mediante múltiples mecanismos, por lo que fue importante evaluar la actividad antioxidante de los derivados del caupí utilizando diferentes métodos (ABTS, ORAC y HORAC). A8LH y A10LH presentaron un aumento similar de la actividad de eliminación de radicales (contra los radicales ABTS^{•+} y peroxilo) y de la capacidad de prevenir la formación de radicales OH[•], respecto a A8 y A10, respectivamente. La capacidad antioxidante fue mayor a mayor GH alcanzado y se debió principalmente a la presencia de péptidos de entre 1,8 y 6,5 kDa, obtenidos por fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular, los cuales mostraron elevada actividad de eliminación de radicales peroxilo. De la fracción cromatográfica de A10HH que presentó mayor actividad antioxidante, se identificaron por espectrometría de masas péptidos trípticos provenientes de cuatro proteínas de caupí. Consultando bases de datos de péptidos bioactivos y teniendo en cuenta la especificidad de corte de la alcalasa, se lograron proponer secuencias de péptidos antioxidantes provenientes de su hidrólisis.

Considerando que ambos aislados presentaron similar comportamiento en la solubilidad y en las propiedades antioxidantes luego de la hidrólisis y, que la extracción a pH 10 de las proteínas (más desnaturalizadas que a pH 8) facilitó la hidrólisis con alcalasa a bajas concentraciones, se decidió continuar con la digestión gastrointestinal simulada (DGIS) del aislado A10 y la harina de caupí. Se utilizó el método internacionalmente consensuado por la acción COST INFOGEST (2019). La DGIS ocasionó menor grado de proteólisis en la harina

(HD) que en el aislado proteico (A10D). Los perfiles electroforéticos y cromatográficos mostraron una disminución o desaparición de las fracciones de mayor tamaño molecular, generándose péptidos más pequeños y aminoácidos libres, cambios que se notaron en mayor medida en A10D.

El proceso de DGIS produjo en HD y A10D un importante aumento de la capacidad de eliminación de radicales (ABTS y peroxilo) y en la prevención de la oxidación del Fe²⁺ (FRAP). Si bien HD y A10D mostraron la capacidad de prevenir la formación de radicales OH• (HORAC), la harina antes de la DGIS tuvo una actividad superior, indicando el aporte de algunos componentes solubles activos (ausentes en el aislado). Adicionalmente, para estudiar la actividad antioxidante intracelular en células Caco-2 TC7, se recurrió al uso de la resina colestiramina a fin de remover previamente las sales biliares y obtener fracciones bioaccesibles no citotóxicas de HD y A10D. Se demostró la inhibición del contenido de ROS en un 77% para ambos digeridos, mostrando A10D una mayor actividad a una concentración 3 veces menor, respecto de HD.

Los digeridos se sometieron a cromatografía de exclusión molecular para obtener fracciones enriquecidas en péptidos con alta actividad antioxidante. En HD dos fracciones (rango de PM entre 1,09 y 0,17 kDa) presentaron elevada actividad por ORAC mientras que en A10D, la fracción con PM entre 1,1 y 0,68 kDa, mostró la mayor actividad por ABTS y ORAC. A partir de las fracciones con PM entre 0,68 y 2,5 kDa que presentaron la mayor actividad por el método de ORAC, se lograron identificar por espectrometría de masas, secuencias de péptidos trípticos que provenían de la digestión de 11 y 24 proteínas de caupí, halladas en los picos cromatográficos 3_D de A10D y 4_D A10D, respectivamente.

Para estudiar los compuestos fenólicos (CF) presentes en H y A10 y sus digeridos por DGIS (HD y A10D) se obtuvieron extractos con distintos solventes: mezcla metanol:agua 70:30 (MA), metanol:HCl 1,2 M 50:50 (MH), y a partir de la mezcla de extracción metanol-acetona-agua 7:7:6 (MAA) se obtuvieron las fracciones CFL (CF libres), CFE (CF esterificados) y CFLP (CF ligados a proteínas). Se observó que el tipo y cantidad de CF extraídos estuvo influenciado por los métodos de extracción. El contenido de CF totales cuantificados por el método de Folin y la cantidad de CF identificados por RP-HPLC presentaron diferencias ya que en H y en A10 existen otros compuestos no fenólicos capaces de reaccionar con el reactivo Folin. En A10 hay mayor proporción de péptidos o aminoácidos (respecto a H) que podrían reaccionar. En este sentido, si bien el contenido de CF totales no presentó diferencias significativas respecto a la H en el extracto MA, se observó la pérdida de algunos ácidos fenólicos y flavonoides solubles durante la preparación de A10 y, la cantidad

cuantificada por RP-HPLC fue menor. Esto podría atribuirse a su solubilización o modificación química en un medio alcalino, y/o a su absorción en la fracción insoluble.

Luego de la DGIS, la cantidad total de CF detectados por RP-HPLC presentó modificaciones en H y A10 con todas las extracciones realizadas. Se presentaron incrementos en HD con las extracciones MA, MH y CFE de MAA y en A10D con las extracciones de CFL y CFLP del extracto MAA. Estos cambios se debieron principalmente a aumentos de ácido gálico y quercetina-3-galactósido en el sistema MA de HD, de (-)-epigalocatequina en el sistema MH de HD y de quercetina-3-glucósido en CFE y quercetina-3-galactósido en CFLP en el extracto MAA de A10D. La actividad antioxidante medida por ABTS y ORAC presentó incrementos luego de la DGIS para los extractos MA y MH de HD y A10D y para la extracción con mezcla MAA, se observó aumento en la actividad antioxidante para los extractos de CFE de ambos digeridos.

Finalmente, se evaluó el efecto de la incorporación de H, A10 y A10LH en formulaciones cárnicas tipo hamburguesa, en la estabilidad del pH, la inhibición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, el color y los parámetros de textura durante su almacenamiento refrigerado. Los mejores resultados fueron los obtenidos con formulaciones con carne vacuna con la incorporación de A10 y A10LH al 4%, ya que durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración inhibieron la oxidación de lípidos, y presentaron cambios beneficiosos en los parámetros de color y textura.

En este trabajo de tesis se han logrado generar nuevos conocimientos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas antioxidantes de ingredientes derivados de caupí variedad Cuarentón: harina, aislados e hidrolizados proteicos, péptidos y compuestos fenólicos. Se espera que estos conocimientos puedan ser transferidos a efectos de ser incorporados como suplementos o ingredientes funcionales en productos alimentarios fabricados para fines específicos o bien su uso como potenciales componentes benéficos para la salud.

ABREVIATURAS

A10	Aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción
A10D	Aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción sometido a digestión gastrointestinal simulada
A10D	Aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción sometido a digestión gastrointestinal simulada
A10HH	Hidrolizado de aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción, de alto grado de hidrólisis
A10LH	Hidrolizado de aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción, de bajo grado de hidrólisis
A10PP	Aislado proteico de caupí obtenido a pH 10,0 de extracción sometido a hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina
A8	Aislado proteico de caupí obtenido a pH 8,0 de extracción
A8HH	Hidrolizado de aislado proteico de caupí obtenido a pH 8,0 de extracción, de alto grado de hidrólisis
A8LH	Hidrolizado de aislado proteico de caupí obtenido a pH 8,0 de extracción, de bajo grado de hidrólisis
AAPH	2,2' Azo bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro
Abs	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2 '-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)-Método de determinación de actividad antioxidante
AGE	Ácido gálico equivalente
ANS	1,8-anilina naftaleno-sulfonato
ATCA	Ácido tricloroacético
bR	Blanco de reactivos de digestión
BS	Base seca
CFE	Compuestos fenólicos esterificados
CFL	Compuestos fenólicos libres
CFLP	Compuestos fenólicos ligados a proteínas
CFT	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales
DCF	Dicloro-dihidro-fluoresceina
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceina diacetato
DGIS	Digestión gastrointestinal simulada
ϵ	Coeficiente de extinción molar
FGS	Fluido gástrico simulado

FIS	Fluido intestinal simulado
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power-Método de determinación de actividad antioxidante
FSS	Fluido salival simulado
GH	Grado de hidrólisis proteica
H	Harina desgrasada de caupí
HAT	Mecanismo antioxidante - Hydrogen Atom Transfer
HD	Harina desgrasada de caupí sometido a digestión gastrointestinal simulada
H_o	Hidrofobicidad superficial
HORAC	Hydroxyl Radical Averting Capacity-Método de determinación de actividad antioxidante
IC₅₀	Concentración de una sustancia que produce un 50% de inhibición de un proceso biológico dado
MA	Sistema solvente extracción con metanol:agua (50:50)
MH	Sistema solvente extracción con metanol:HCl 1,2 M (50:50)
MAA	Sistema solvente extracción con metanol:acetona:agua (7:7:6)
MDA	Malonaldehído
ORAC	Oxygen Radical Absoprtion Capacity-Método de determinación de actividad antioxidante
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RSN	Especies reactivas al nitrógeno
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SET	Mecanismo antioxidante-Single Electron Transference
TAME	Éster metílico de <i>p</i> -toluen-sulfonil-L-arginina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TPTZ	Tripiridil-triazina férrica (Fe ³⁺ -TPTZ)
U TAME	Unidades TAME, unidad de actividad proteolítica de tripsina
UA	Unidades Anson, unidad de actividad proteolítica de pepsina
USP	Unidades de la Farmacopea de USA
λ	Longitud de onda

Nomenclatura de aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. El caupí. Historia y situación actual

El caupí (*Vigna unguiculata* [L.] Walp., sinónimo: *Vigna sinensis* [L.]) pertenece a la familia Fabaceae (Duke 1981). La taxonomía del caupí ha sido establecida por Pasquet (1993) como Dicotyledonea, perteneciente al orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae, género *Vigna*, y sección Catjang. (Verdcourt, 1970; Maréchal y col. 1978). El caupí es conocido por varios nombres en todo el mundo; en Argentina también se lo denomina poroto del ojo negro, alubia, poroto señorita, chícharo o frijol y su nombre en lengua guaraní es “kumanda”; en Brasil se lo conoce como “feijão macasar” o “feijão de corda”; en las regiones angloparlantes de África se le conoce como "cowpea", mientras que en las regiones francófonas, se lo conoce con el nombre "niébé"; en Estados Unidos, se lo llama "blackeye beans", "blackeye peas" y "southern peas". (Timko y Singh, 2008; Garay y col., 2015)

Es una leguminosa originaria de África (Vaillancourt y Weeden, 1992), que en la actualidad se encuentra difundida en todas las áreas tropicales y subtropicales. Según la Base de Datos Estadísticos Corporativos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (www.fao.org/faostat/en/#data/QCL), el caupí es la cuarta legumbre más cultivada en el mundo (Figura I.1). África presenta la mayor producción mundial (96,76%) de caupí. Con respecto al cultivo de caupí, Nigeria es el mayor productor mundial (~4,1 millones de toneladas en 2022, FAOSTAT) mientras que, en América, Brasil es el mayor productor (~630 mil toneladas en 2022, IBRAFE, Instituto Brasileño del Frijol, Legumbres y Cosechas Especiales).

En el Nordeste Argentino (NEA) el mercado regional se abastece de caupí producido en las provincias de Corrientes, Formosa, Chaco y Catamarca (Jover, 2003). La producción de caupí, como grano para consumo humano o alimentación animal, está bastante difundida entre los pequeños productores del NEA, donde también se lo siembra como abono verde y mejorador de suelos por la fijación biológica de nitrógeno que realiza en simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium* (Jover, 2006).

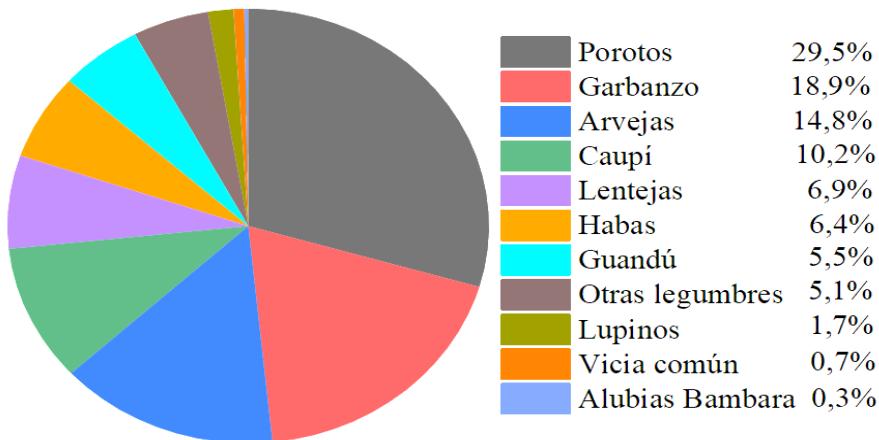


Figura I.1. Producción mundial promedio de legumbres. Fuente: FAOSTAT (2022).

La planta de caupí es una herbácea, anual, con hábito de crecimiento erecto, semi-erecto, postrado, semi-postrado, o trepador según las diferentes variedades cultivadas (Figura I.2). Tiene hojas compuestas por tres folíolos, de forma globosa, sub-globosa, astada o sub-astada, de unos 10 a 25 cm de longitud y de unos 7 a 15 cm de ancho, con bordes simples. Las flores están en racimos sobre pedúnculos largos (lo que determina que en algunos tipos las chauchas se presenten dentro o por arriba de la canopia), son de color violáceo, amarillo, rojizo o blanco y el fruto es una legumbre, lineal o subcilíndrica, bivalva, que contiene varias semillas de diferente tamaño y color según la población o variedad (Parodi y Dimitri, 1972).



Figura I.2. Planta de caupí. Fuente: <http://www.plantillustrations.org/>

Se cultiva en una amplia gama de tipos de suelo y condiciones climáticas. Las temperaturas óptimas para su crecimiento y desarrollo se ubican entre los 20 y 35 °C. Es un cultivo estival que tolera muy bien las altas temperaturas y las condiciones de estrés hídrico (Jover, 2003). La época y densidad de siembra es primavera y verano hasta fines de febrero. El

ciclo del caupí, es de alrededor de 90 a 120 días entre siembra y fin de cosecha, por lo tanto, su época de siembra en la región es amplia lo que asegura la instalación y producción del cultivo en la mayoría de las campañas. En el norte de la región (Formosa) se puede iniciar su siembra en el mes de agosto, mientras que en el sur (norte de Santa Fe) probablemente deberá iniciarse a mediados o fin de octubre, pues requiere alrededor de 18 °C de temperatura de suelo, estabilizada, para germinar sin inconvenientes. El caupí se cultiva principalmente en hileras individuales de 50 cm a 100 cm de ancho con un espaciamiento entre plantas de 8 a 10 cm. Se siembran de 8 a 10 kg de semilla por hectárea y el rendimiento comercial de granos puede alcanzar los 2000 kg por hectárea (Jover, 2003). La cosecha de sus vainas se realiza a mano cuando las chauchas están secas y se procede de inmediato a su total secado al sol. Para obtener las semillas se procede al trillado de las chauchas de forma manual o con máquinas trilladoras o desgranadoras del tipo semi-estáticas. Los restos de vainas pueden ser usados para la alimentación del ganado o para cubrir el suelo en sistemas de huerta orgánica. El caupí se utiliza como un cultivo de rotación. Las referencias más frecuentes del uso de este abono verde estuvieron referidas a rotaciones con cultivos como maíz, arroz, sorgo y algodón.

Las semillas de caupí pesan entre 80 y 320 mg y varían en forma, desde redondeadas hasta con forma de riñón según el tipo cultivado (Timko y Singh, 2008). Las vainas de las semillas contienen entre ocho y dieciocho semillas por vaina y son cilíndricas y curvas o rectas (Figura I.3A). La cubierta de la semilla varía en textura (lisa, rugosa o arrugada), color (blanco, crema, verde, ocre, rojo, marrón, negro) y uniformidad (sólida, moteada o con patrones). Las semillas del caupí, variedad Cuarentón son blancas con un área pigmentada negra de forma irregular que rodea el hilio, lo que da a la semilla la apariencia de un ojo (Figura I.3B).

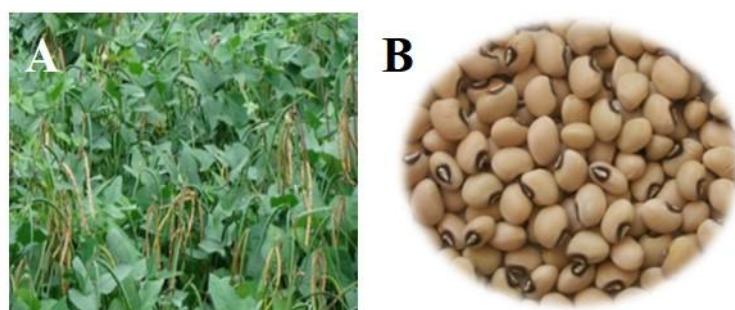


Figura I.3. A) Planta de *Vigna unguiculata* con vainas. B) Semillas de caupí variedad Cuarentón. Estación Experimental El Sombrero, Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA).

I.2. Características generales y usos

Las legumbres juegan un papel importante en la nutrición humana puesto que son fuentes de proteínas, energía, ciertos minerales y vitaminas (Deshpande, 1992). Las legumbres abarcan aproximadamente 20000 especies y tienen gran importancia tradicional en la dieta. En áreas donde el suministro de proteínas animales es limitado, las legumbres constituyen la principal fuente de proteínas para las personas. Tienen bajo costo y se encuentran fácilmente disponibles. Las principales especies que se explotan son porotos (*Phaseolus vulgaris*), arvejas (*Pisum sativum*), lentejas (*Lens culinaris*), garbanzos (*Cicer arietinum*) y habas (*Vicia faba*).

Para el consumo humano del caupí, la semilla es la parte más importante de la planta. Luego de cosechar las semillas, se secan para su almacenamiento y consumo posterior, ya sea después de cocinarlas enteras hervidas o molidas en forma de harina. El perfil nutricional del grano de caupí es similar al de otras legumbres, con un contenido relativamente bajo de grasa y un contenido total de proteínas que es mayor que el de los cultivos de cereales (trigo 12 - 14%, el arroz 7 - 10%, maíz 9 - 10%) y tubérculos (alrededor de 2%). Avanza y col. (2013) encontraron contenidos de proteínas de 24,3 a 27,1% para harinas de diferentes variedades de caupí. Las proteínas del caupí son fuente de aminoácidos esenciales, contienen 17 de los 20 aminoácidos, varios de los cuales son aminoácidos esenciales, como valina, leucina, fenilalanina, lisina y triptófano en tanto que el contenido de cisteína y metionina es bajo en comparación con las proteínas animales. Las semillas de caupí presentan además un elevado contenido de hidratos de carbono, cercano al 70%, la mayoría fácilmente digestible. Constituyen además una buena fuente de vitaminas del complejo B y minerales (hierro, potasio y zinc) (Souza y col., 2002). La composición porcentual de las semillas de caupí se encuentra resumida en la Tabla 1.

El uso del caupí como alimento presenta algunos problemas como el sabor, compuestos que causan flatulencias, el tiempo de cocción prolongado (Goncalves y col., 2016) y la presencia de factores antinutricionales (polifenoles, taninos y ácido fítico). Se han sugerido diversos tratamientos de remojo y procesamiento para eliminar o reducir significativamente el contenido de antinutrientes sin modificar los componentes nutricionales del caupí (Avanza y col., 2013). Estos métodos de procesamiento son simples y de bajo costo y utilizados cotidianamente en la preparación de alimentos en los hogares, por lo que la incorporación de caupí en platos regionales no sería un impedimento, aumentando el valor nutricional de los mismos.

Las semillas de caupí se encuentran incluidas en el Código Alimentario Argentino, en el artículo 865 que especifica: “Con el nombre de Poroto Tape o Caupí, se entiende la semilla seca del *Vigna sinensis* L Endl o *Vigna unguiculata*”.

Tabla I.1. Composición química de la semilla de caupí.

Composición proximal	
Energía (kcal)	343
Humedad (g)	11,0
Proteínas (g) *	23,8
Lípidos Totales (g) *	2,1
Cenizas (g) *	3,4
Carbohidratos (g) *	59,6
Fibra dietaria total (g) *	10,7
Minerales	
Calcio (mg)	110,0
Hierro (mg)	8,3
Magnesio (mg)	184,0
Fósforo (mg)	424,0
Potasio (mg)	1112,0
Sodio (mg)	16,0
Selenio (mg)	9,0
Zinc (mg)	3,4
Vitaminas	
Vitamina C (mg)	1,5
Niacina (mg)	2,1
Ácido pantotenico (mg)	1,5
Folato total (μg)	633,0
Colina total (mg)	94,7
Vitamina A (μg)	3,0
β-Caroteno (μg)	30,0
Vitamina K (μg)	5,0

*porcentaje en base seca. Fuente: Food Data Central. <https://fdc.nal.usda.gov/> (acceso Julio, 2024). Tiamina, riboflavina, vitamina B₆, y vitamina E: <1.0 mg/100 g en caupí.

I.3. Proteínas del caupí

En las semillas de leguminosas se identifican tres grupos de proteínas según su función: las proteínas estructurales, las proteínas de reserva o almacenamiento, y las proteínas biológicamente activas. Las proteínas de reserva son las predominantes (más del 80%), se sintetizan durante el periodo de formación de la semilla, se almacenan en vesículas membranosas denominadas cuerpos proteicos, para ser utilizadas posteriormente como fuente de carbono y nitrógeno durante el proceso de germinación y crecimiento de la planta (Duranti y Gius, 1997).

Osborne (1924) clasificó las proteínas según su solubilidad en, albúminas (solubles en agua), globulinas (insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas), prolaminas (solubles en alcoholes) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas). Los porcentajes de las distintas fracciones varían de acuerdo a la metodología aplicada para la extracción. Avanza y col. (2015) determinaron el contenido de las fracciones proteicas del caupí Cuarentón del NEA e informaron: globulinas $48 \pm 2\%$, albúminas $33 \pm 2\%$, glutelinas $8 \pm 1\%$ y prolaminas $2 \pm 0\%$ p/p en relación a las proteínas totales.

La fracción albúmina comprende proteínas enzimáticas, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasa y lectinas. En caupí, se caracteriza por ser un grupo heterogéneo de proteínas, formado por polipéptidos cuyos pesos moleculares oscilan entre 99 y 34 kDa (Avanza y col., 2015). En esta fracción proteica, sus polipéptidos no se encuentran unidos por enlaces disulfuro. La fracción albumina es donde se encuentra la mayor actividad inhibidora de tripsina y hemaglutinante de las proteínas de caupí (Vasconcelos y col., 2010 y Freitas y col., 2004).

La fracción globulina comprende proteínas de la clase más abundante, las proteínas de almacenamiento en las leguminosas de grano. Generalmente se clasifican en globulinas 7S y 11S según sus coeficientes de sedimentación (S). Las globulinas 7S y 11S del caupí se denominan vicilina y legumina, respectivamente, de modo que las proteínas correspondientes de otras semillas a menudo se indican como vicilina y globulinas similares a las leguminas. Las proteínas 7S son proteínas oligoméricas (normalmente trímeros). Las proteínas 11S también son oligómeros, pero normalmente forman hexámeros (Duranti y Gius, 1997).

Horax y col. (2004) informaron que en el caupí la fracción de las globulinas está compuesta principalmente por las vicilinas formadas principalmente por polipéptidos de 150 y 50 kDa. En las vicilinas de caupí se identificaron las fracciones α -vignina (globulina mayoritaria, no glicosilada, compuesta de una subunidad mayor de 80 kDa, que, tras la reducción, produce dos polipéptidos de 20 y 60 kDa); β -vignina (globulina mayoritaria,

glicosilada, compuesta de dos polipéptidos principales de 55 y 60 kDa sin enlaces disulfuro) y finalmente, γ -vignina (globulina minoritaria, compuesta por un tipo de subunidad de 22 kDa con puente disulfuro intracatenario (Freitas y col., 2004). Se ha encontrado que las vicilinas de *Vigna unguiculata* contienen residuos de triptófano (Rangel y col., 2003).

La fracción prolamina incluye proteínas solubles en soluciones alcohólicas. Vasconcelos y col., 2010 reportaron un rendimiento de prolaminas de 2,1% usando 70% de etanol para la extracción y esta fracción presentó una única banda de proteína de aproximadamente 13 kDa. Dentro de los aminoácidos esenciales, la fenilalanina y la tirosina son los que se encuentran en mayor proporción en estas prolaminas. Los valores muy bajos para la fracción de prolamina reportados para el caupí son típicos de las especies de *Vigna* (Mohan y Janardhanan, 1993; Gopinathan y col., 1987).

Las glutelinas constituyen la fracción proteica extraída en condiciones alcalinas. Chan y Phillipps (1994) utilizaron una solución alcalina de hidróxido de sodio (0,01 N), fluoruro de fenilmetansulfonilo (0,0002 M) y azida de sodio (0,02%) para la extracción de las glutelinas del caupí y, en presencia de un agente reductor como el 2-mercptoetanol, reportaron polipéptidos de 101, 68, 31 y 29 kDa. Por otra parte, Vasconcelos y col. (2010) realizaron la extracción por separado de las glutelinas ácidas y básicas, reportando un rendimiento total del 24% respecto al total de proteínas de la semilla. Las glutelinas ácidas presentaron predominantemente polipéptidos de 45 a 63 kDa y, en menor medida, polipéptidos de 29 y 20 kDa. Mientras que las glutelinas básicas presentaron bandas polipeptídicas de 57, 25 y 13 kDa.

I.4. Oxidación en sistemas biológicos

En el organismo se llevan a cabo numerosas reacciones químicas. Entre ellas, las reacciones de óxido-reducción (ó redox), son la base de numerosas vías bioquímicas y de la química celular, la biosíntesis y la regulación. También son importantes para entender la oxidación biológica y los efectos de los radicales y antioxidantes. Entre las especies que se generan en nuestro organismo mediante reacciones redox se pueden mencionar los radicales libres (Sarmadi y Ismail, 2010). Un radical libre se puede definir como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia u órbita exterior y es capaz de existir de forma independiente. La presencia de un electrón no apareado en un radical libre lo hace inestable, de corta vida y altamente reactivo, ya que pueden sustraer electrones de otros compuestos para alcanzar la estabilidad. Así, la molécula atacada pierde su electrón y se convierte en un radical libre en sí misma, comenzando una cascada de reacciones en cadena.

Entre estas moléculas podemos destacar a las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las del nitrógeno (RNS) (Tabla I.2). La reactividad de los radicales está influenciada por el entorno fisiológico del organismo, que afecta su vida media (Jomova y col., 2023)

Tabla I.2. Radicales libres y especies no radicalarias más comunes generadas en condiciones fisiológicas.

Especies	Oxígeno	$O_2^{\cdot\cdot}$
radicalarias	Ión superóxido	$O_2^{\cdot-}$
	Radical hidroxilo	OH^{\cdot}
	Radical peroxilo	ROO^{\cdot}
	Radical alcoxilo	RO^{\cdot}
	Radical óxido nitrico	NO^{\cdot}
Especies no	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
radicalarias	Peróxidos orgánicos	$ROOH$
	Ácido hipocloroso	$HClO$
	Ozono	O_3
	Aldehídos	$HCOR$
	Oxígeno singlete	1O_2
	Peroxinitrito	$HNOOH$

Además de la producción fisiológica de ROS (endógenas), existen fuentes exógenas (Tabla I.3). Entre las fuentes endógenas, principalmente se encuentra la cadena de transporte de electrones, durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de los compuestos ROS. El anión superóxido es un subproducto de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria y constituye el primer paso en la producción de ROS, que luego es metabolizado por la superóxido dismutasa en las mitocondrias, convirtiéndose en peróxido de hidrógeno, que se difunde al citoplasma y luego es metabolizado por el sistema de defensa antioxidante.

Las ROS tienen un papel importante en la regulación de diversas funciones fisiológicas, incluyendo la transducción de señales, la regulación vascular, la función inmune y la activación génica. Sin embargo, cuando ocurre la acumulación de ROS en exceso, el flujo continuo desde fuentes endógenas y exógenas resulta en daños oxidativos acumulativos y continuos a componentes celulares y altera muchas funciones celulares. El daño oxidativo producido está

relacionado con la patogénesis del envejecimiento, el cáncer, la diabetes, la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas, la artritis reumatoide, la isquemia-reperfusión, la apnea obstructiva del sueño y otras enfermedades. Entre los objetivos biológicos más vulnerables al daño oxidativo se encuentran las enzimas proteicas, las membranas lipídicas y el ADN (Fig. I.3).

Tabla I.3. Fuentes exógenas y endógenas generadoras de especies reactivas.

Fuentes exógenas	Radiación γ Radiación UV Ultrasonido Alimentos Drogas Xenobióticos Toxinas
Fuentes endógenas	Células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) Enzimas productoras de ROS en forma directa (ej. nitrógeno sintasa) Activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermedio (ej. xantina oxidasa, ciclooxygenasa, lipoxygenasa) Metabolismo (ej. mitocondrias) Enfermedades

En el caso de las proteínas, éstas pueden sufrir daño directo e indirecto debido al ataque de los ROS, incluyendo peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos, cambios en su estructura terciaria, degradación y fragmentación. Las consecuencias de este daño como mecanismo de respuesta al estrés, son la pérdida de actividad enzimática, alteración de funciones celulares como la producción de energía, interferencia con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares. Tras la oxidación, las proteínas modificadas son susceptibles a muchos cambios en su función. Estos incluyen fragmentación química, inactivación y mayor degradación proteolítica (Jomova y col., 2023).

Por otra parte, el daño a los lípidos, componentes principales de las membranas celulares, ocurre debido a sus altas concentraciones de ácidos grasos insaturados. Estos son susceptibles al ataque del radical OH•, del oxígeno singlete y del hidroperoxilo, iniciando un proceso de

lipoperoxidación autocatalítica. La oxidación de los lípidos de membrana provoca pérdida de la permeabilidad selectiva, la fluidez y la integridad de las mismas (la plasmática y de los orgánulos celulares) (Amorati y Valgimigli, 2015).

Con respecto al ADN, los ROS/RNS pueden interactuar con él y modificar las bases nitrogenadas, causar rupturas simples y dobles en la cadena ADN, pérdida de purinas (sitios apurínicos), daño al azúcar desoxirribosa, enlaces cruzados de ADN-proteína y daño al sistema de reparación del ADN (Nimse y Pal, 2015). Los radicales hidroxilo interactúan con el ADN atacando la guanina en su posición C-8 para producir un producto de oxidación, 8-hidroxidesoxiguanosina o atacando a la adenina para producir 8 (o 4-, 5-) hidroxiadenina; además, como resultado de interacciones entre pirimidinas y radicales hidroxilo se forman peróxido de timina, glicoles de timina, 5-(hidroximetil) uracilo y otros productos similares. La interacción directa del ADN con otros ROS menos reactivos, como O_2^- y H_2O_2 , no conduce a daño en sus concentraciones fisiológicas; sin embargo, estas especies sirven como fuentes de otros intermedios reactivos que pueden atacar fácilmente y causar daño. Por ejemplo, el H_2O_2 y el superóxido pueden conducir a la producción de OH^\cdot mediante la reacción de Haber-Weiss, y NO y O_2^- pueden conducir a la formación de ONOO que puede causar fácilmente daño al ADN similar al obtenido cuando se involucran radicales hidroxilo (Nimse y Pal, 2015).

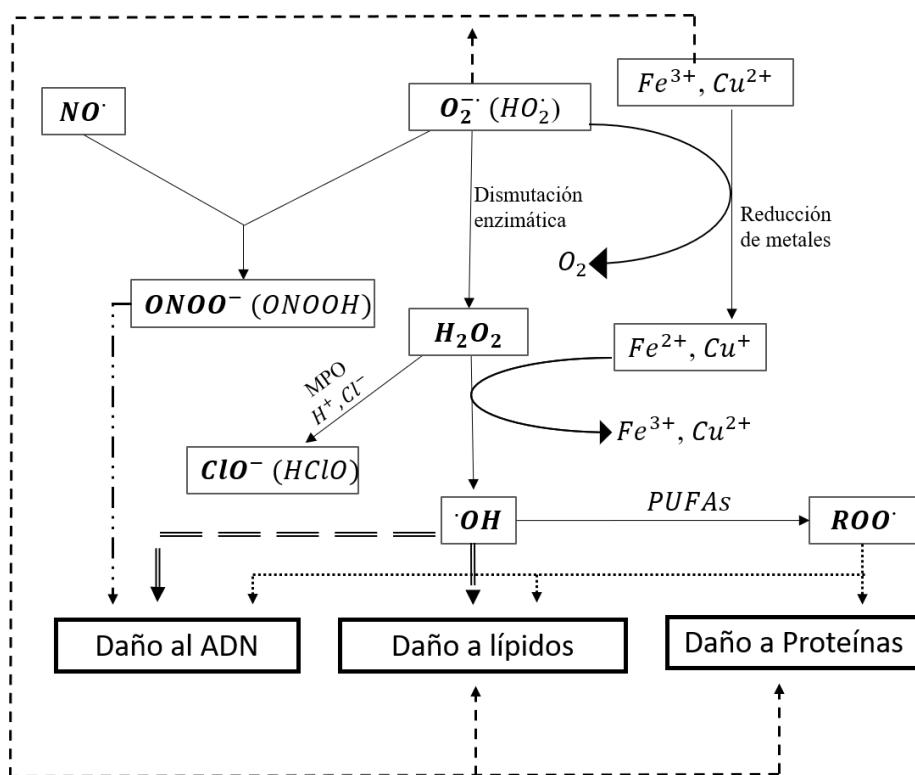


Figura I.3. Diagrama esquemático del daño oxidativo inducido por ROS. MPO: mieloperoxidasa. PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados. Adaptado de Kohen y Nyska, 2002.

Los metales de transición como el hierro, que poseen alta afinidad de unión a sitios de ADN, pueden catalizar la producción de OH[•] en proximidad al ADN propiciando el ataque continuo sobre el ADN. Estas modificaciones inducen mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada (Valko y col., 2016)

I.4.1. Mecanismo de defensa antioxidante

El organismo ha desarrollado mecanismos de defensa para protegerse contra radicales libres. Cuando dicha capacidad para hacer frente a la agresión oxidativa no es suficiente, se origina un desbalance denominado estrés oxidativo. Antioxidante es un compuesto que, estando presente en baja concentración con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación del mismo, y por lo tanto previene los efectos adversos de especies reactivas (ROS/RNS) sobre las funciones fisiológicas normales en los seres humanos (Karadag y col., 2009). Los mecanismos de defensa antioxidante pueden ser de origen endógeno (enzimáticos y no enzimáticos) y exógeno (artificiales o naturales) (Korhonen y Pihlanto, 2006).

En la Figura I.4 se muestran algunos ejemplos de mecanismos antioxidantes de defensa. La defensa física de sitios biológicos como las membranas celulares es un mecanismo importante que permite a la célula enfrentar el estrés oxidativo; los tocoferoles pueden proporcionar una mayor estabilidad a las membranas celulares, y la interferencia estérica puede evitar que los ROS se acerquen a las moléculas objetivo. Por otra parte, existen los mecanismos de reparación para hacer frente al daño oxidativo que consisten en enzimas y pequeñas moléculas que pueden reparar eficientemente un sitio de daño oxidativo en macromoléculas.

Entre los diversos mecanismos de defensa, el mecanismo que involucra antioxidantes elimina de forma directa los compuestos pro-oxidantes. Este sistema comprende enzimas antioxidantes, proteínas de acción directa como la superóxido dismutasa (SOD) es capaz de aumentar la dismutación espontánea de O₂[•] a H₂O₂. Posteriormente, la catalasa puede eliminar el H₂O₂ presente en altas concentraciones mientras que la peroxidasa puede eliminar el H₂O₂ incluso cuando está presente en baja concentración. Por otra parte, este sistema comprende compuestos antioxidantes de bajo peso molecular capaces de prevenir el daño oxidativo mediante la interacción directa e indirecta con los ROS.

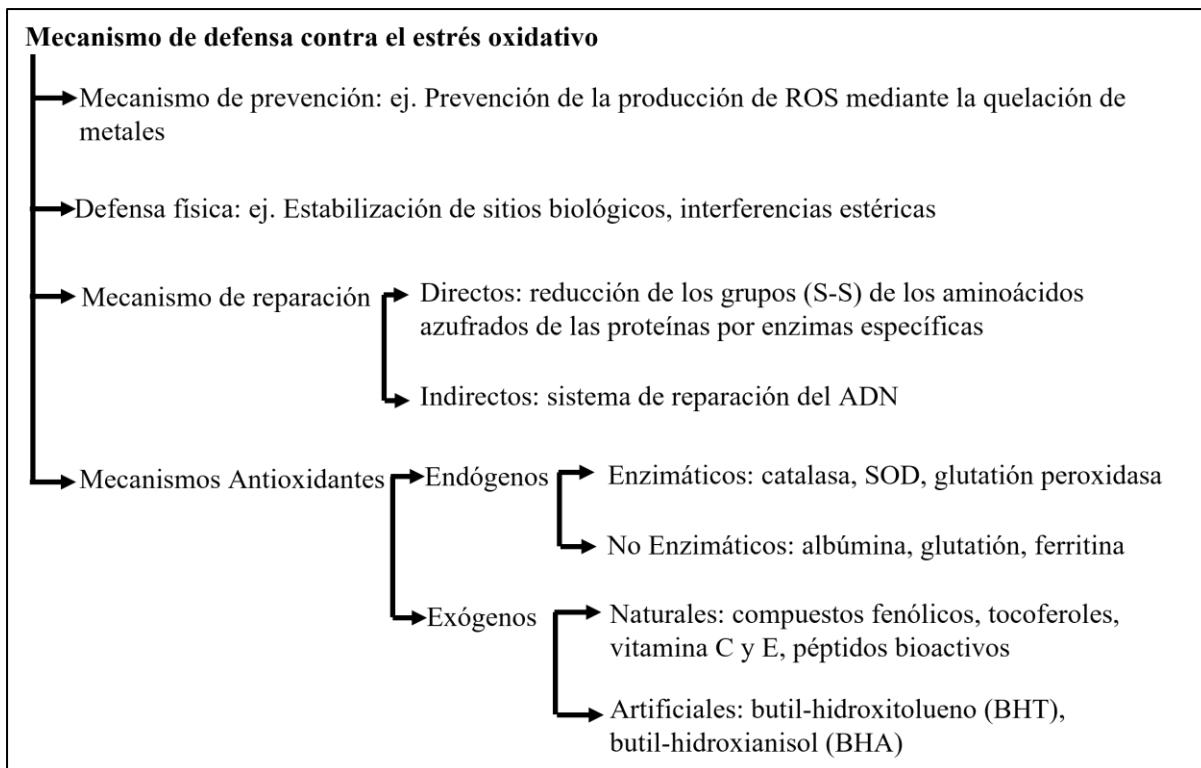


Figura I.4. Clasificación y ejemplos de mecanismos antioxidantes de defensa.

El mecanismo indirecto involucra la quelación de metales de transición, lo que evita que participen en la reacción de Haber-Weiss mediada por metales. Las moléculas que tienen acción directa tienen como característica que pueden donar electrones a la especie reactiva para eliminarla y evitar que ataquen el objetivo biológico. Además, dado que son moléculas pequeñas, pueden penetrar las membranas celulares y localizarse cerca del objetivo biológico. Los compuestos antioxidantes de bajo peso molecular se originan de fuentes endógenas (procesos biosintéticos y generación de productos de desecho por la célula: dipéptidos de histidina, glutatión, ácido úrico, etc) y exógenas (a partir de la dieta). El glutatión actúa como cofactor de la enzima peroxidasa, de este modo actúa como un antioxidante indirecto que dona los electrones necesarios para la descomposición del H_2O_2 . Además, el glutatión puede actuar como agente quelante de iones cobre y evitar que participen en la reacción de Haber-Weiss y eliminar ROS directamente., ya que puede interactuar con OH^- , ROO^- y RO^- , así como con $HClO$ y 1O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Otro ejemplo constituye el ácido úrico. Es un producto de desecho celular originado de la oxidación de hipoxantina y xantina por la xantina oxidasa y deshidrogenasa. El urato, el estado fisiológico del ácido úrico, reacciona con los radicales OH^- produciendo un radical de urato estable que puede ser regenerado por el ascorbato a su estado anterior, urato. Este

compuesto puede actuar con radicales peroxilo, $^1\text{O}_2$, O_3 , $\text{NO}\cdot$, y otros radicales de oxígeno y nitrógeno. El urato también protege las proteínas de la nitración; puede quelar iones metálicos, como cobre y hierro, y evitar que participen en el ciclo redox (Kohen y Nyska, 2002).

Entre los mecanismos de defensa antioxidante exógenos, la mayoría de los compuestos de bajo peso molecular provienen de la dieta. Se encuentran en vegetales verdes, frutas y pescado, incluyendo moléculas pequeñas como el ácido ascórbico, tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides. Se pueden encontrar tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos que poseen diferentes potenciales de oxidación, lo que refleja su capacidad para donar electrones y actuar como antioxidantes.

Los antioxidantes artificiales son más eficaces que los naturales frente a los radicales libres. Sin embargo, los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados, como la terc-butilhidroquinona, el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y el galato de propilo (PG), exhiben efectos tóxicos y cancerígenos (Xu y col., 2021).

I.4.2. Mecanismos generales de acción de los antioxidantes

Las reacciones de oxidación son generalmente reacciones en cadena de radicales libres. Comienzan con la formación del radical libre, llamada reacción de iniciación. El radical libre luego se propaga atacando a otras moléculas. Las reacciones de terminación, origina la formación de especies neutras o productos no radicales. El sustrato para los radicales libres puede ser un lípido, proteína, carbohidratos, compuesto orgánico o inorgánico, o un átomo de metal. Por lo tanto, los antioxidantes se dividen en antioxidantes secundarios: aquellos que inhiben o retardan la formación de radicales libres a partir de su precursor inestable, es decir, que inhiben el proceso de iniciación; y antioxidantes primarios/“chain-breaking”/“interruptores de la cadena de reacciones”, aquellos que interrumpen la reacción radicalaria en cadena, es decir, la propagación.

En el **mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno HAT**, el antioxidante que contiene un átomo de hidrógeno representado por AH reacciona con los radicales libres. El radical libre se estabiliza para formar una especie neutra, mientras que el antioxidante se convierte en un radical libre antioxidante (A'). El antioxidante (AH) puede proporcionar un átomo de hidrógeno al sustrato radical libre y producir una especie no radical (RH, ROH, o ROOH) y un radical libre antioxidante (A'), como se muestra en la Figura 1.5. La donación de un átomo de hidrógeno por un antioxidante se explica por el potencial de reducción. "Cualquier compuesto que tenga un potencial de reducción menor que el potencial de reducción de un

radical libre (o especie oxidada) es capaz de donar su átomo de hidrógeno al radical libre, a menos que la reacción sea cinéticamente inviable" (Ambigaipalan y Shahidi, 2015).

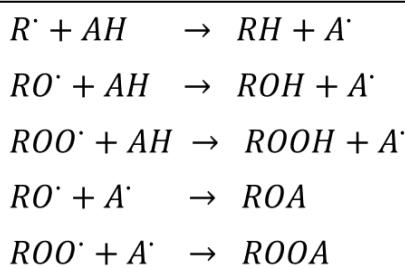


Figura I.5. Reacciones de antioxidantes (AH) con radicales libres, método HAT.

La entalpía de disociación de enlace del átomo de hidrógeno unido al compuesto antioxidante determina las reacciones HAT. El valor más bajo refleja la facilidad de disociación del átomo de hidrógeno y la consecuente reacción con un radical libre. Además, la presencia de un grupo OH en la posición orto del anillo bencénico y la creación del enlace de hidrógeno intramolecular con el hidroxilo adyacente puede contribuir a disminuir la energía de disociación (Jomova y col. 2023).

En el **mecanismo de transferencia de electrones simple (SET)**, el anión R^\cdot formado es una especie energéticamente estable con un número par de electrones, mientras que el catión radical AH^{+} es una especie radical menos reactiva y, por lo tanto, estable (Zeb, 2020). Se pueden reducir carbonilos, radicales y metales (Figura I.6). El potencial de ionización (IP) del compuesto antioxidante es el parámetro más importante para la evaluación de la actividad de eliminación en el mecanismo SET, cuanto más bajo sea, más fácil va a ser la transferencia de electrones. Cuando hay ausencia de grupos oxidrilo vecinales para estabilizar el radical por puente de hidrógeno y las estructuras del compuesto antioxidante son planares, los mecanismos de transferencia SET se ven favorecidos, ya que el electrón impar formado por las reacciones con el radical libre en AH^{+} tiene la posibilidad de distribuirse por toda la molécula lo que resulta en una estabilización radical de la molécula antioxidante.

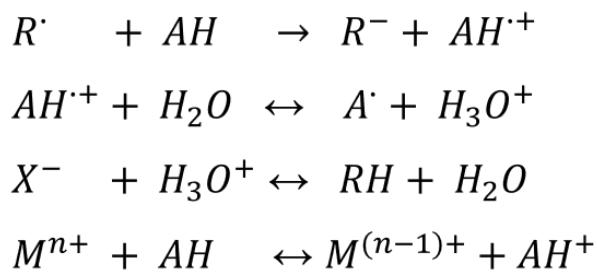


Figura I.6. Reacciones de antioxidantes (AH) con radicales libres, método SET.

Los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción en el que se encuentren. Dependiendo del mecanismo de las reacciones químicas involucradas, los ensayos de actividad antioxidante pueden clasificarse en: (i) transferencia de electrones simples (SET), (ii) ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o (iii) quelación de metales de transición.

El mecanismo de transferencia de electrones simples (SET) implica una reacción redox (reducción-oxidación) con un oxidante (también conocido como sonda o radical) como indicador del punto final de la reacción. Los ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) implican un generador de radicales sintéticos, una sonda oxidable y un antioxidante. Tanto los ensayos basados en reacciones SET como HAT miden la capacidad de eliminación de radicales en lugar de la capacidad preventiva de una muestra. Los ensayos basados en SET miden la capacidad reductora del antioxidante, mientras que los ensayos basados en HAT cuantifican la capacidad de donación de átomos de hidrógeno. En los ensayos SET, un antioxidante dona un electrón al radical para estabilizarlo. La transferencia de un electrón desde el antioxidante al radical causará un cambio de color en el radical. La intensidad del cambio de color es proporcional a la concentración de antioxidante presente en la mezcla de reacción. El punto final de la reacción se alcanza cuando no se observa ningún cambio de color, es decir, cuando la transferencia de electrones se ha detenido.

Además de los mecanismos SET y HAT, el tercer tipo de mecanismo de acción de los antioxidantes es su capacidad para quelar metales de transición, como Zn^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} . La quelación de metales de transición también puede considerarse para estimar la capacidad antioxidante de un extracto o compuesto. Se han desarrollado varias técnicas para medir la capacidad antioxidante de muestras. En la Tabla I.4 se resumen las técnicas espectroscópicas.

Tabla I.4. Diferentes técnicas espectroscópicas usadas para medir la actividad antioxidante.

Ensayo	Principio del método	Determinación del punto final
ORAC	Reacción antioxidante con radical peroxilo, inducido por 2,2-azinobis-2-amidino-propano (AAPH) / HAT	Pérdida de la fluorescencia de fluoresceína
TRAP	Capacidad antioxidante de captar radicales derivados del luminol, generados por la descomposición del AAPH / HAT	Quimioluminiscencia
CUPRAC	Reducción del Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes / SET	Colorimetría
FRAP	Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III) / SET	Colorimetría
ABTS	Reacción antioxidante con un catión radical orgánico / HAT/SET	Colorimetría
DPPH	Reacción antioxidante con un catión radical orgánico / HAT/SET	Colorimetría
HORAC	Capacidad antioxidante de captar radicales OH [•] generados por un sistema tipo Fenton	Pérdida de la fluorescencia de fluoresceína

ORAC—*Oxygen Radical Absorption Capacity*; HORAC—*Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*; TRAP—*Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant*; CUPRAC—*Cupric Reducing Antioxidant Power*; FRAP—*Ferric Reducing Antioxidant Power*; ABTS—*2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*; DPPH—*[2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl]*.

I.5. Compuestos antioxidantes presentes en legumbres

I.5.1. Actividad antioxidante de péptidos

Se considera que las proteínas dietarias son fuente de energía y aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento y el mantenimiento de las funciones fisiológicas. Varios estudios se han realizado para investigar las propiedades antioxidantes de hidrolizados o péptidos bioactivos de fuentes vegetales y animales como granos de maní, salvado de arroz, proteína de girasol, proteína de hoja de alfalfa, harina de gluten de maíz, proteína de yema de huevo, proteína de soja, y proteínas de trigo sarraceno. Se ha demostrado que una hidrólisis de las proteínas, mejora propiedades funcionales y libera péptidos con actividades bioactivas. La

hidrólisis puede ser enzimática (*in vitro*), debido a la actividad microbiana, o como resultado de la hidrólisis con enzimas gastrointestinales, pudiendo así expresar su actividad biológica en el organismo. Los péptidos bioactivos se consideran fragmentos específicos de proteínas que están inactivos dentro de la secuencia de la proteína original. Estos péptidos tienen un tamaño de 2 a 20 aminoácidos y masas moleculares de menos de 6000 Da. La composición y las secuencias de aminoácidos afectan la actividad de los péptidos. Según sus propiedades estructurales y su composición y secuencia de aminoácidos, estos péptidos pueden presentar funciones inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolémicos, antihipertensivos, etc.

El mecanismo involucrado en la actividad antioxidante de los péptidos no se ha comprendido completamente, pero varios estudios han mostrado que pueden actuar como inhibidores de la peroxidación lipídica, captar radicales libres y quelar iones metálicos de transición. Las propiedades antioxidantes de los péptidos están más relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad (Figura I.7). Los aminoácidos como Tyr, Trp, Met, Lys, Cys e His son ejemplos de aminoácidos que causan actividad antioxidante. Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a radicales deficientes en electrones, lo que mejora las propiedades de captación de radicales de los residuos de aminoácidos. Se propone que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen His está relacionada con la capacidad de donar hidrógeno, atrapar radicales lipídicos peroxilo y/o quelar iones metálicos del grupo imidazol. Por otro lado, el grupo SH en cisteína tiene una acción antioxidante crucial de manera independiente debido a su interacción directa con los radicales. Además de la presencia de aminoácidos adecuados, su correcta posición en la secuencia del péptido también desempeña un papel importante en la actividad antioxidante de los péptidos.

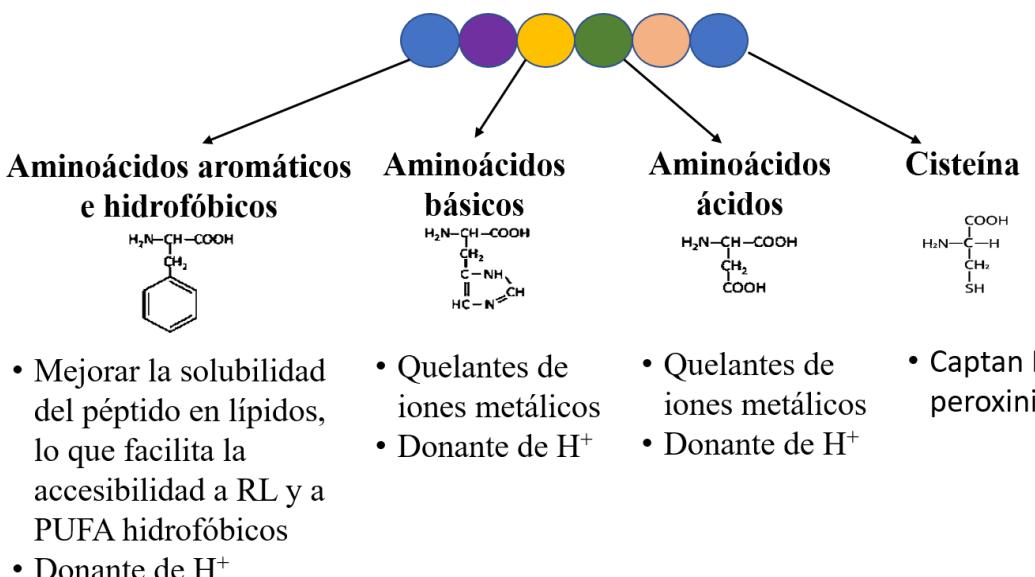


Figura I.7. Mecanismo de acción de péptidos antioxidantes dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral de los residuos aminoacídicos. Adaptado de González-Osuna 2024.

Es importante relacionar las propiedades antioxidantes *in vitro* y la capacidad antioxidante *in vivo* de los péptidos, ya que están sujetos a degradación y modificación en el intestino, el sistema vascular y el hígado. Por lo tanto, se puede inferir que los péptidos deben ser capaces de superar estas barreras y alcanzar su objetivo en una forma activa. La Tabla I.6 presenta una serie de mecanismos para la absorción intacta de péptidos, que incluyen: ruta paracelular, difusión pasiva, transporte a través de un transportador, endocitosis y sistema linfático.

Tabla I.6. Mecanismos de absorción fisiológica de péptidos dependiendo de su naturaleza y tamaño molecular.

Ruta de transporte	Descripción	Péptidos
Ruta paracelular	Difusión a través de las uniones estrechas entre células mediante un proceso de difusión pasiva independiente de la energía	Péptidos grandes solubles en agua. (Gardner, 1998)
Difusión pasiva	Difusión a través de la vía transcelular mediante un proceso de difusión pasiva independiente de la energía.	Péptidos hidrofóbicos. (Ziv y col. 2000)

Mediante transportador	Salida de algunos péptidos del enterocito a la circulación portal a través de un transportador de péptidos ubicado en la membrana basolateral intestinal.	Péptidos pequeños resistentes a la hidrólisis. (Gardner, 1984)
Endocitosis	Unión de moléculas a las células y absorción en la célula mediante vesiculización.	Péptidos polares grandes. (Gardner, 1998)
Sistema linfático	Absorción de péptidos desde el espacio intersticial al sistema linfático intestinal.	Péptidos altamente lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos en la circulación portal. (Deak y Csáky, 1984; Rubas y Grass, 1991)

El estudio de actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de hidrolizados enzimáticos de proteínas de soja, garbanzo, trigo, arveja, amaranto, entre otras proteínas vegetales ha sido reportado (Contreras-Calderón y col., 2011; Zhang y col., 2023; Ramirez y col., 2020, Cipollone y col., 2020). En el caso del caupí, se ha descripto que luego de su hidrólisis enzimática, se liberan péptidos bioactivos con actividades antioxidante, anti-inflamatoria, antihipertensiva, e hipercolesterolemica (Mune y col., 2014; Segura-Campos y col., 2010; Xiong y col., 2013; Rodrigues Marques y col., 2015).

I.5.2. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son producidos por las plantas como metabolitos secundarios y son esenciales para la fisiología y el metabolismo celular. Están involucrados en diversos procesos, tales como el crecimiento, la lignificación, la pigmentación, la polinización y la resistencia contra patógenos, depredadores y estrés ambiental (Duthie y col., 2003). Funcionan como antibióticos, pesticidas naturales, sustancias de señal para el establecimiento de simbiosis con rizobios, atrayentes para polinizadores, agentes protectores contra la luz ultravioleta (UV), materiales aislantes para hacer las paredes celulares impermeables a gases y agua, y como materiales estructurales que proporcionan estabilidad a las plantas. Muchas propiedades de los productos vegetales están asociadas con la presencia, el tipo y el contenido de sus compuestos fenólicos, como ser la astringencia de los alimentos, los efectos beneficiosos para la salud de

ciertos compuestos fenólicos o sus posibles propiedades anti-nutricionales (Shahidi y Naczk, 2004).

Químicamente, los compuestos fenólicos pueden definirse como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Varían desde simples hasta conjugados o compuestos complejos. En la actualidad se conocen más de 8000 estructuras (Morandi y col., 2019). Según su cadena de carbono, los compuestos fenólicos pueden categorizarse en flavonoides y compuestos no flavonoides (Figura I.8). Los flavonoides tienen una estructura común C6–C3–C6 que consiste en dos anillos aromáticos (A y B) enlazados a través de una cadena de tres carbonos, generalmente organizada como un heterociclo oxigenado (anillo C). Los flavonoides se pueden dividir en varias subfamilias según el grado de oxidación del heterociclo oxigenado, siendo los flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles (esencialmente, flavan-3-oles), isoflavonas y antocianidinas, los más relevantes para las dietas humanas.

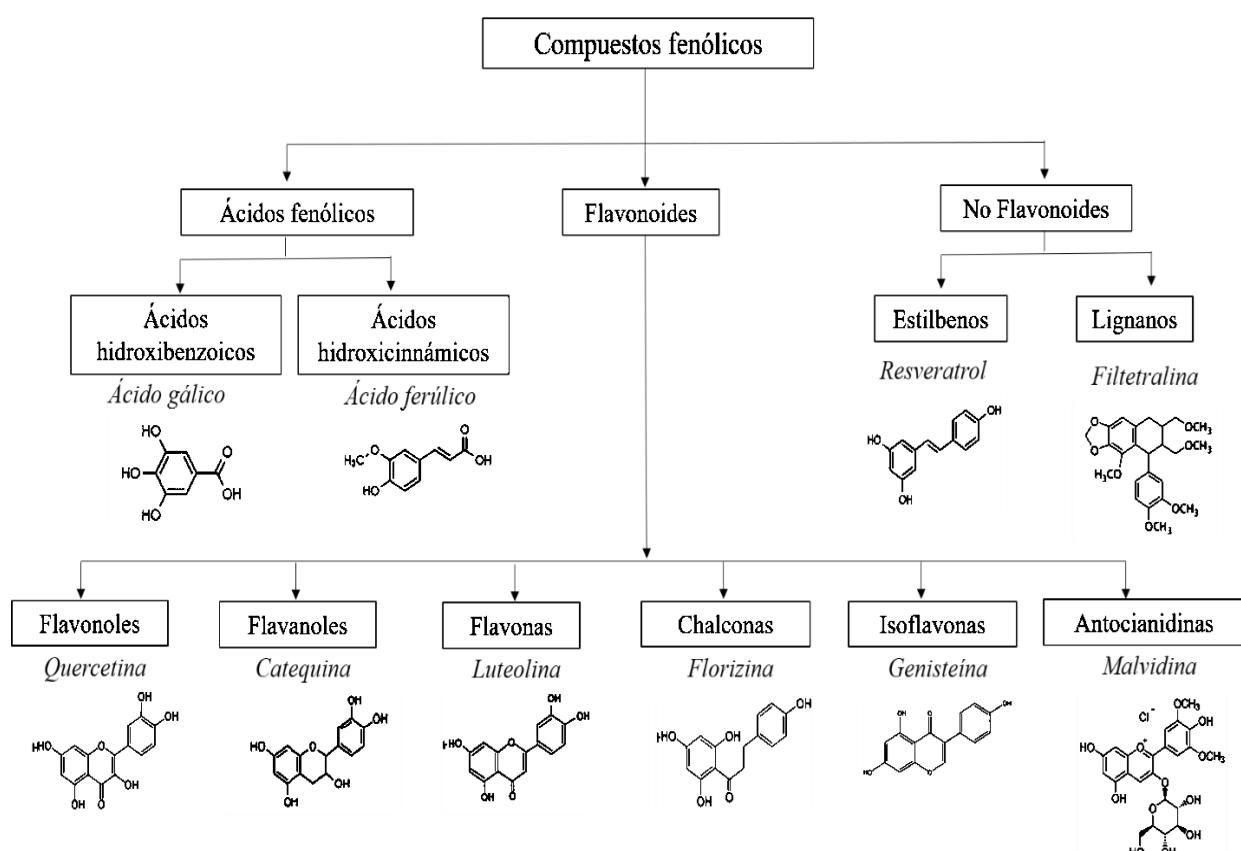


Figura I.8. Compuestos fenólicos: tipos, estructuras y principales compuestos.

La capacidad o potencia de los compuestos fenólicos para tener la función antioxidante está dictada por su estructura, especialmente el anillo aromático y el número y posición del

grupo hidroxilo. Dos características químicas compartidas por la mayoría de los compuestos fenólicos son responsables de la eficiencia de la reacción antioxidante: los grupos fenólicos OH que son capaces de reducir radicales libres mediante la donación de un electrón; y las estructuras aromáticas que permiten la estabilización por resonancia de los radicales aroxilo resultantes. El ácido gálico es un ácido fenólico que contiene tres hidroxilos y un grupo ácido carboxílico, donde el grupo hidroxilo es responsable de la función antioxidante al formar radicales libres de ácido gálico que se estabilizan por los efectos de resonancia del anillo benceno (Figura I.9). Los flavonoles como la quercetina, que contiene tres grupos hidroxilo, tienen un potencial antioxidante comparativamente mayor que aquellos que carecen de radical libre neutralizante (Tsao, 2010).

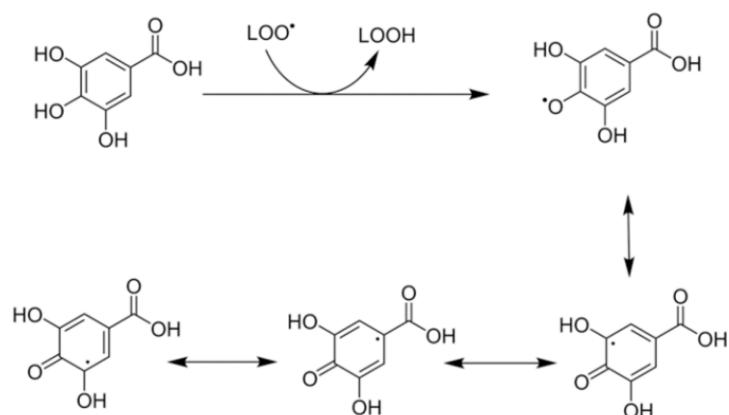


Figura I.9. Reacción del ácido gálico con radicales libres y estabilización del radical libre del ácido gálico (Zeb, 2020).

La actividad antioxidante del ácido fenólico se incrementa si el grupo COOH se encuentra a mayor distancia, con respecto al anillo de benceno, debido a que esto influye las propiedades de atracción de electrones del grupo COOH. Por ejemplo, en el caso del ácido cinámico o sus derivados, tienen mayor actividad antioxidante que el ácido benzoico o sus derivados. De manera similar, la posición de los grupos hidroxilo en el anillo de benceno también produce efectos en el potencial antioxidante. Por ejemplo, el grupo hidroxilo en la posición orto o para tiene una mayor actividad antioxidante en comparación con otras posiciones y el fenol no sustituido (Zeb, 2020). La sustitución con un grupo etilo o n-butilo en lugar de un grupo metilo en la posición para mejora la actividad del antioxidante (Ambigaipalan y Shahidi, 2015). Sin embargo, una disminución en la actividad antioxidante se debe a la presencia de cadenas o grupos alquilo ramificados en la posición para. Cuando hay

grupos voluminosos en las posiciones 2 y 6, la estabilidad del radical fenoxilo se incrementa aún más. Los grupos voluminosos contribuyen a un impedimento estérico en la zona del radical, reduciendo así las reacciones de propagación de radicales libres. El número de grupos hidroxilo en el anillo de benceno también contribuye al potencial antioxidante. Por ejemplo, los flavonoides han mostrado tener una mayor actividad antioxidante en comparación con los ácidos fenólicos (Zhang y Tsao, 2016).

En los sistemas biológicos, los metales (hierro y cobre) catalizan reacciones productoras de radicales libres que son lentas en su ausencia. Los compuestos fenólicos pueden, secuestrar los metales (hierro y/o cobre) para prevenir la formación de radicales libres (Figura I.10). La quelación de metales puede inhibir directamente la reducción de Fe^{3+} , reduciendo consecuentemente la formación de radicales libres reactivos OH en la reacción de Fenton. La quelación de metales depende del potencial de reducción de los compuestos fenólicos. Se encontró que el potencial de reducción de los compuestos sigue el orden: Propil galato > Ácido gálico > Ácido cafeico > Pirogalol > Ácido protocatecuico > Ácido sináptico > BHA > Alcohol vainílico > Ácido ferúlico > Guaiacol > Ácido vainílico > Ácido cumárico (Mathew y col., 2015). Los ácidos fenólicos y los flavonoides tienen un fuerte potencial de eliminación de radicales libres. Sin embargo, el potencial quelante con metales y el poder reductor pueden diferir según sus características estructurales. Por ejemplo, en los flavonoides, la mayor actividad quelante de metales y de eliminación de radicales depende de la unidad catecol (anillo B), el doble enlace 2,3 y el grupo oxo conjugado 4 (anillo C) y las unidades hidroxilo 3 y 5 (Fraga y col., 2010).

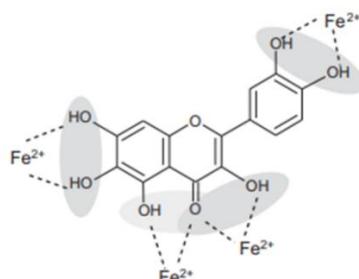


Figura I.10. Características estructurales que definen las posibilidades antioxidantes de los flavonoles como antioxidantes quelantes de metales (hierro). Las áreas resaltadas y las líneas punteadas definen los sitios de quelación de hierro (Fraga y col., 2010).

Los beneficios para la salud de los compuestos fenólicos ingeridos en la dieta dependen en gran medida de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad en el tracto digestivo y el sistema

circulatorio. Entre los diferentes compuestos fenólicos, la biodisponibilidad varía considerablemente; aquellos con mayor abundancia o mayor actividad *in vitro* en la dieta diaria no necesariamente se correlacionan positivamente con los que tienen el mejor perfil de bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Carbonell-Capella y col., 2014). Las características estructurales, incluidos los grupos funcionales y la polimerización, permiten que los compuestos fenólicos presenten diferentes solubilidades y sean absorbidos y metabolizados de manera específica. Además, los factores externos juegan un papel vital en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los fenoles al ser ingeridos. La interacción con varios componentes de la matriz alimentaria y los diversos métodos de procesamiento influyen significativamente en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad real de los fenoles ingeridos.

Numerosas investigaciones reportaron elevada actividad antioxidante *in vitro* de extractos fenólicos provenientes de diversas legumbres como lentejas, garbanzos, arvejas, porotos y guandúes (León-López y col., 2020; Cipollone y col., 2024; Alcázar-Valle y col., 2020; Tungmannithum y col., 2021). En el caso del caupí, se ha reportado actividad antioxidante en sus extractos fenólicos (Carvalho y col., 2020; Siddhuraju y Becker, 2007; Sombié y col., 2018; Zia-Ul-Haq y col., 2013). Además, Li y col., (2022), reportaron actividad antioxidante en la fracción polifenólica bioaccesible de extractos fenólicos de caupí sometidos a digestión gastrointestinal simulada y fermentación colónica completa.

En los últimos años, diferentes investigaciones se han centrado en la incorporación de leguminosas en la formulación de alimentos con el fin de mejorar sus propiedades nutricionales, estabilidad y perfil antioxidante. La incorporación de hidrolizados de porotos *Phaseolus lunatus* y caupí con actividad antioxidante en la formulación de pasta, mejoró su actividad antioxidante incluso luego del proceso de extrusión y de cocción (Drago y col., 2016). Por otra parte, la incorporación de hidrolizados de proteína de porotos rojo *Phaseolus vulgaris* en jugo de manzana resultó eficaz para retrasar el proceso de oxidación del jugo durante el almacenamiento (Roy y col., 2022). Mohammadi y col. (2022), utilizaron proteínas e hidrolizados proteicos de lenteja en productos de panadería (muffins) obteniendo un aumento en la actividad antioxidante respecto a las formulaciones control.

Hipótesis

Es esperable que a partir de las semillas de caupí puedan obtenerse harina, extractos de compuestos fenólicos, aislados proteicos e hidrolizados con actividad antioxidante, propiedad de interés en la formulación de alimentos, ya sea como suplemento o ingrediente funcional.

CAPÍTULO II

OBJETIVO

Objetivo General:

Generar nuevos conocimientos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas antioxidantes de ingredientes derivados de caupí, de sus proteínas, péptidos y polifenoles, a efectos de poder incorporarlos como suplemento o ingrediente en productos alimentarios fabricados para fines específicos o bien su uso como potenciales componentes benéficos para la salud.

Objetivos particulares:

- Obtener hidrolizados a partir de aislados proteicos de caupí variedad Cuarentón por digestión con alcalasa.
- Obtener hidrolizados a partir de aislados proteicos y harina de caupí variedad Cuarentón por digestión gastrointestinal simulada.
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de hidrolizados proteicos.
- Estudiar la actividad antioxidante de proteínas y péptidos provenientes de la hidrólisis enzimática por diferentes metodologías con la finalidad de comprender los mecanismos involucrados.
- Establecer relaciones entre las propiedades fisicoquímicas/estructurales de las proteínas de aislados e hidrolizados proteicos y su actividad antioxidante.
- Identificar péptidos generados por hidrólisis de proteínas de caupí con potencial actividad antioxidante.
- Evaluar la presencia e interacción de polifenoles con otros componentes y su actividad antioxidante antes y después de la hidrólisis enzimática por diferentes metodologías con la finalidad de comprender los mecanismos involucrados.
- Evaluar la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica de hidrolizados proteicos/péptidos incorporados a un sistema modelo cárnico (digestión por alcalasa).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Preparación de la harina

La harina (H) se preparó a partir de semillas de caupí, variedad Cuarentón obtenidas de la Estación Experimental El Sombrero, Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA). Las semillas fueron molidas en un molinillo Braun (KSM2 *coffee grinder*, México) y pasadas por un tamiz con aberturas de 177 µm (ASTM 80). La harina fue desgrasada con hexano agitando la dispersión (relación hexano:harina 10:1) durante 24 h a 4 °C, luego se filtró y eliminó el exceso de hexano por evaporación a temperatura ambiente.

III.2. Preparación de aislados proteicos de caupí

Los aislados proteicos de caupí se prepararon según el método de Qi y col. (1997). Se obtuvieron dispersiones al 10% p/v de harina desgrasada en agua destilada y se llevaron al pH de extracción (8,0 o 10,0) con NaOH 2 N. Las dispersiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente con control periódico del pH y luego se centrifugaron a 10000×g por 30 min a 20 °C (Sorvall, ST 8R, Thermo Scientific, Alemania). Los sobrenadantes se ajustaron a pH 4,5 con HCl 2 N, se agitaron por 2 h a 4 °C y luego se centrifugaron a 10000×g por 20 min a 5 °C. El pellet se resuspendió en agua y se llevó a pH 7,0 con NaOH 2 N, luego se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso. Los aislados obtenidos se llamaron A8 y A10 según el pH de extracción proteica.

III.2.1. Cálculo del rendimiento en peso y de proteínas totales

Se calculó el rendimiento en peso del proceso de obtención de los aislados, como el porcentaje en peso del aislado obtenido en relación al peso de harina inicial (ec. 1). Además, se calculó el porcentaje del rendimiento de extracción de proteínas totales (ec. 2), a partir del contenido total de proteínas en la harina y en las muestras.

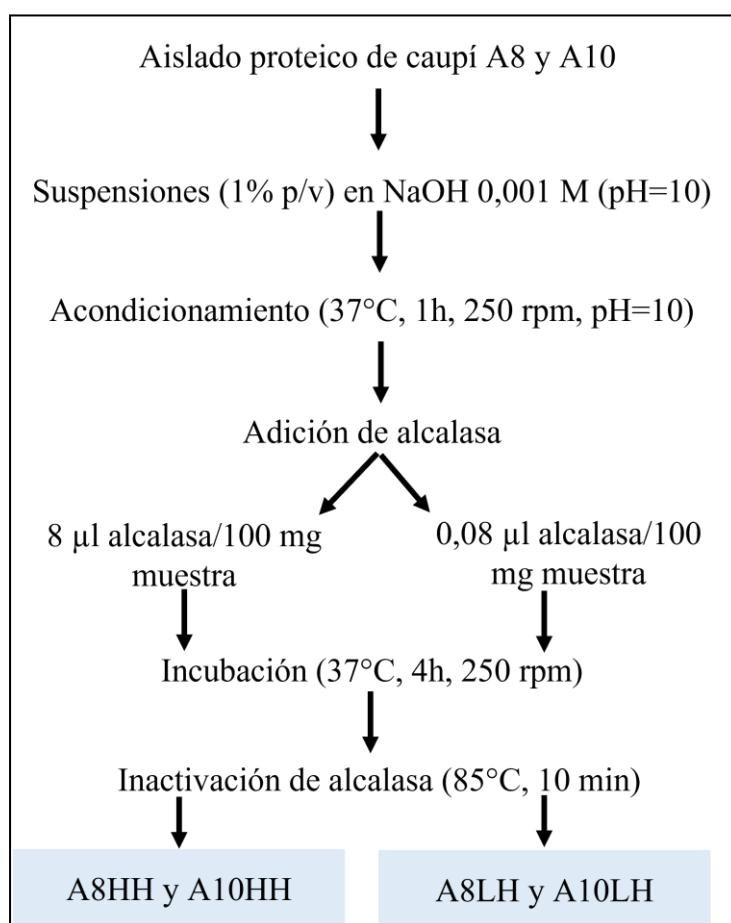
$$\text{Rendimiento en peso} = \frac{\text{peso de aislado}}{\text{peso de harina}} \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

$$\text{Rendimiento de proteína} = \frac{\text{proteínas en aislado}}{\text{proteínas en harina}} \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

III.3. Tratamientos de hidrólisis

III.3.1. Hidrólisis con alcalasa

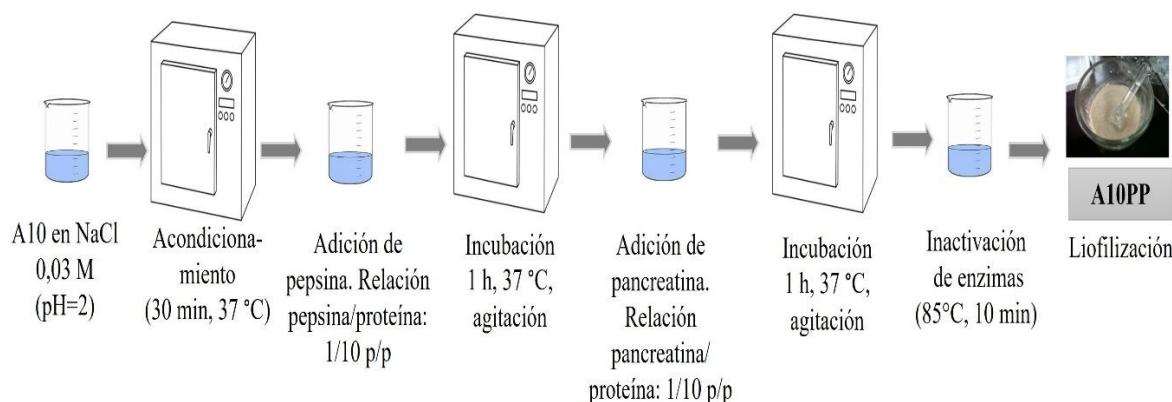
Los hidrolizados proteicos de caupí con alcalasa fueron preparados según el método de Orsini Delgado y col. (2011) con algunas modificaciones. Se obtuvieron suspensiones (1% p/v) de A8 y A10 en NaOH 0,001 M a pH = 10. Las suspensiones se agitaron durante 1 h a 37 °C, manteniendo el pH = 10 por adición de NaOH 0,1 M. Luego, se adicionó la enzima alcalasa (2,4 U/g, Anson Units) en una proporción de 8 µl/100 mg muestra para obtener hidrolizados con alto grado de hidrólisis (HH) o 0,08 µl/100 mg muestra para hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (LH). Se incubaron las mezclas de reacción a 37 °C por 4 h. Se detuvo la actividad enzimática calentando a 85 °C durante 10 min y luego las suspensiones fueron liofilizadas. Los hidrolizados proteicos obtenidos se llamaron A8LH, A8HH, A10LH y A10HH según el pH de extracción proteica y la proporción de enzima a proteína usada (Esquema III.1).



Esquema III.1. Hidrólisis con alcalasa.

III.3.2. Hidrólisis con pepsina-pancreatina

El aislado proteico A10 de caupí fue sometido a una digestión secuencial con las enzimas involucradas en la digestión gastrointestinal (Orsini Delgado y col. 2011). Se obtuvo una suspensión (2,5% p/v) de A10 en NaCl 0,03 M y el pH se ajustó a 2 por adición de HCl 1,0 N. La suspensión se termostatizó durante 30 min a 37 °C. Luego, se adicionó solución de pepsina (pepsina de mucosa gástrica porcina 1:15000 MP Biomedicals, Inc.) en HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M, en una relación pepsina/proteína 1/10 p/p. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C por 1 h, con agitación. Luego de neutralizar la solución a pH = 6 con NaOH se agregó una solución de pancreatina (Pancreatina Porcina 4X-USP MP Biomedicals, Inc.) en NaHCO₃ 0,1 N en una relación pancreatina/proteína 1/10 p/p. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C por 1 h, con agitación. Se detuvo la actividad enzimática calentando a 85 °C durante 10 min y luego la suspensión fue liofilizada. El hidrolizado proteico obtenido se denominó A10PP (Esquema III.2).



Esquema III.2 Hidrólisis con pepsina-pancreatina.

III.3.3. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS)

La DGIS se realizó siguiendo el protocolo estandarizado COST-INFOGEST (Minekus y col., 2014; Brodkorb y col., 2019).

Se llevó a cabo la preparación de los fluidos digestivo, el fluido salival simulado (FSS), el fluido gástrico simulado (FGS) y el fluido intestinal simulado (FIS). En la Tabla III.1 se indican las concentraciones (mM) de electrolitos utilizados para preparar los diferentes fluidos digestivos.

Las actividades de las enzimas α-amilasa (Sigma 100-70), pepsina (Sigma P7125) y pancreatina porcina (MP Biomedicals inc. Grado USP 4X) se determinaron, en primera

instancia, siguiendo los ensayos definidos por el método de digestión consensuado (Minekus y col., 2014).

Tabla III.1. Concentración (mmol/L) de electrolitos en los fluidos salival (FSS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS).

Electrolito	Concentración (mM)		
	FSS (pH = 7)	FGS (pH = 3)	FIS (pH = 7)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,15	0,12	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	-
HCl	1,1	15,6	8,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5	0,15	0,6

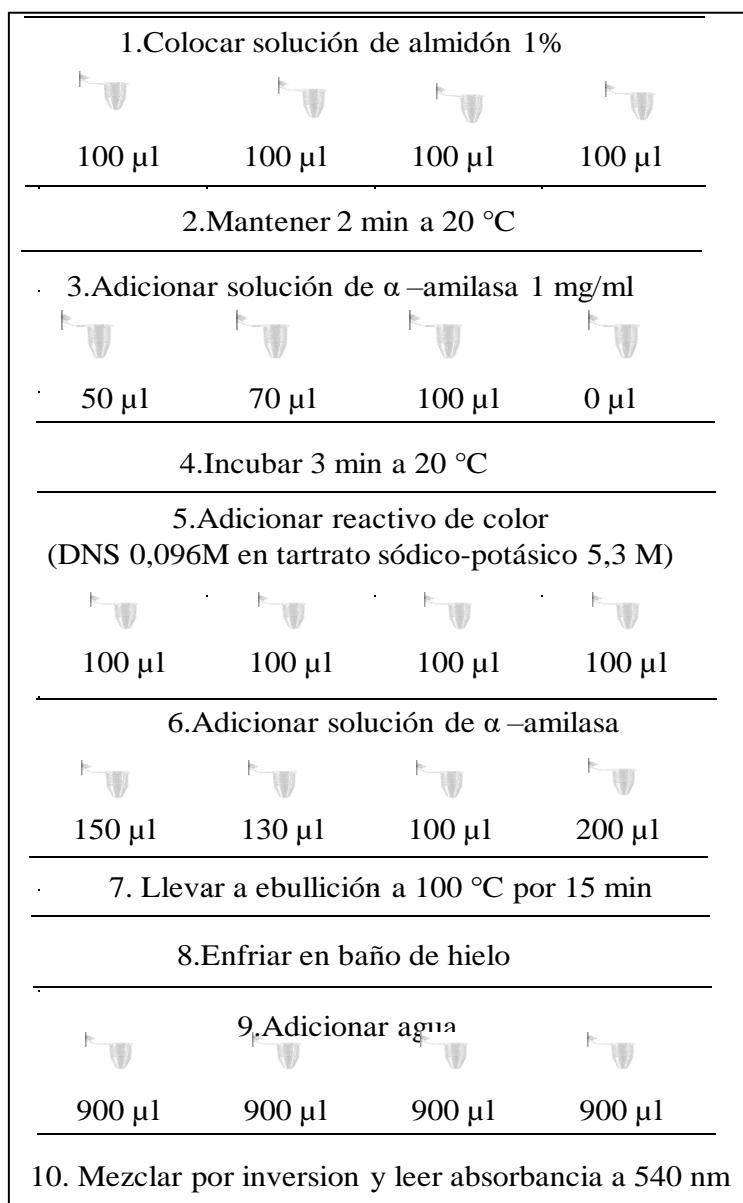
Determinación de la actividad de α-amilasa. Se basa en la hidrólisis de almidón por la α-amilasa con liberación de azúcares reductores (*e. g.* maltosa) que reducen al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cuyo producto se detecta a 540 nm (Bernfeld, 1955).



Se define **una unidad (U) de actividad de α-amilasa** a aquella que *libera 1 mg de maltosa equivalente a partir del almidón en 3 min a pH 6,9 y a 20 °C*.

Como sustrato se utilizó una solución de almidón soluble al 1% p/v en buffer (fosfato de sodio 0,02 M con NaCl 0,067 M, pH 6,9). Por otra parte, se preparó una solución de α-amilasa (1 mg/ml) en H₂O, con una actividad estimada de 1 U/ml. Para determinar la actividad enzimática se realizó un ensayo con 3 concentraciones de α-amilasa y se incubó con la solución de almidón por 3 min a 20 °C. La reacción se detuvo por agregado del reactivo de color (DNS 0,096 M en tartrato sódico-potásico 5,3 M) y se llevó con agua a volumen final, según protocolo especificado en el Esquema III.3. Finalmente, se calentó a ebullición por 15 min. Se registraron las absorbancias a 540 nm y se calculó la actividad enzimática con una curva estándar de

maltosa (0 – 2,6 mg maltosa). Se graficaron los valores absorbancia en función de la concentración de maltosa expresada en mg.



Esquema III.3. Protocolo para determinación de la actividad de α -amilasa.

* La segunda adición de enzima se realiza para llegar a volumen final de 200 μl en todos los tubos.

La ecuación de la curva de calibración obtenida fue:

$$y = 0,3326 x - 0,0896 \quad (\text{ec. 3})$$

Donde:

y: absorbancia a 540 nm,

x: mg maltosa y,

$R^2 = 0,9915$, coeficiente de correlación.

La actividad enzimática de α -amilasa en U/mg se calculó con la siguiente expresión:

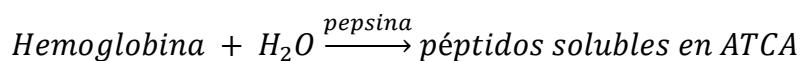
$$\frac{\text{Unidad}}{\text{mg}} = \frac{(Abs_{Tubo\ i} - Abs_B)}{(a-X)} \quad (\text{ec. 4})$$

Donde:

- a: pendiente de la regresión lineal establecida para la curva de calibración con maltosa (mg),
- b: valor de ordenada al origen de la regresión lineal establecida para la curva de calibración con maltosa (mg),

X: cantidad de α -amilasa (mg) adicionados antes de detener la reacción.

Determinación de la actividad de la pepsina. Se basa en la hidrólisis de la hemoglobina por acción de la pepsina que libera péptidos de tirosina solubles en ácido tricloroacético (ATCA) que se miden a 280 nm (Anson y Mirsky, 1932).



Se define **una unidad Sigma o Anson (UA, comúnmente usada)** la que *produce un cambio de 0,001 unidades de absorbancia a 280 nm (ΔA_{280}) por min a pH 2 y a 37 °C, medida como productos solubles en ATCA*.

Como sustrato se utilizó una solución de hemoglobina al 2% p/v en agua a pH 2. Por otra parte, se preparó una solución patrón de pepsina en NaCl 0,150 M, ajustando a pH 6,5 con NaOH 0,1 M, a partir de la cual se prepararon diluciones en HCl 0,01 M para alcanzar las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25, 30 μg pepsina/ml. Para determinar la actividad enzimática se incubó la hemoglobina con las soluciones de pepsina por 10 min 37 °C, siguiendo el procedimiento especificado en el Esquema III.4. Se frenó la reacción por el agregado de ATCA 5% (p/v), se centrifugó y se midió el sobrenadante a 280 nm.

Para la preparación del blanco de reacción se utilizó un tubo para cada concentración de pepsina ensayada y, se realizó el mismo procedimiento indicado en el esquema, pero agregando la pepsina después de la adición de ATCA.

La actividad enzimática de la pepsina en UA/mg se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{UA}{\text{mg}} = \frac{[(\Delta A_{280\ muestra} - \Delta A_{280\ blanco})]}{(\Delta t \times P)} \times 100 \quad (\text{ec. 5})$$

Donde:

Δt : duración de la reacción (10 min) y,

P: concentración de pepsina en la mezcla de reacción final (mg/ml).

1. Colocar solución de hemoglobina					
500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
2. Mantener 4 min a 37 °C					
3. Adicionar solución de pepsina					
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
5 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	30 µg/ml
4. Incubar 10 min a 37 °C					
5. Adicionar solución de TCA 5% p/v					
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
6. Centrifugar 6000×g 30 min					
7. Leer absorbancia a 280 nm					

Esquema III.4. Protocolo para determinación de la actividad de pepsina.

Determinación de actividad de tripsina en pancreatina. Se realizó siguiendo la metodología desarrollada por Humel (1959). Este método se basa en la acción de la enzima sobre el éster metílico de *p*-tolueno-sulfonil-L-arginina (TAME), lo que da lugar a la formación de metanol y *p*-tolueno-sulfonil-L-arginina, la cual se cuantifica espectrofotométricamente.

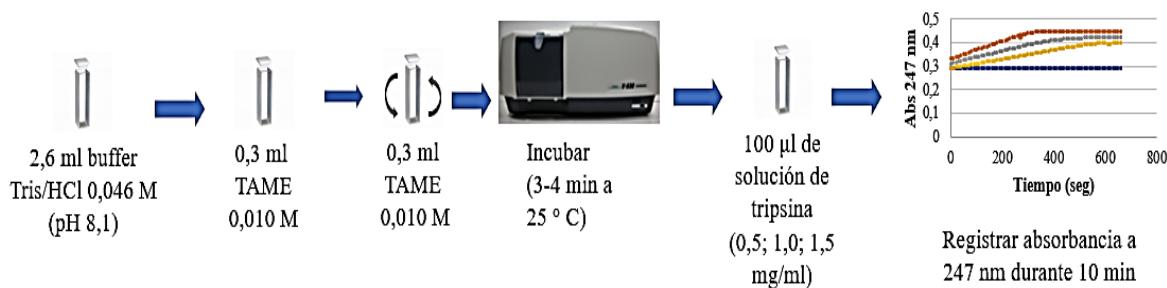


Para expresar la actividad enzimática, se introduce el concepto de **unidad TAME (U TAME)**, que se define como *la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 µmol de TAME en 1 min a 25 °C y pH 8,1*.

Como sustrato se utilizó una solución de TAME 0,01 M en agua bidestilada. Se preparó una solución buffer Tris/HCl 0,046 M con CaCl₂ 0,0115 M (pH 8,1). Por otra parte, se preparó

una solución de pancreatina en HCl 0,001 M a partir de la cual se realizaron diluciones de las siguientes concentraciones: 0,5, 0,75 y 1 mg/ml.

Para determinar la actividad enzimática se siguió el procedimiento especificado en el esquema III.5. 2,6 ml de buffer Tris/HCl 0,046 M (pH 8,1) con 0,3 ml del sustrato (TAME 0,010 M) en cubeta de cuarzo. Se mezcló por inversión e incubó en espectrofotómetro (durante 3-4 min a 25 °C). Luego, se agregó 100 µl de solución de tripsina para cada concentración y se registró el aumento de absorbancia a 247 nm (ΔA_{247}), durante 10 min. Se realizó un blanco con el mismo protocolo, sin agregar enzima, y se registró el aumento de absorbancia a 247 nm ($\Delta A_{247\text{Blanco}}$).



Esquema III.5. Protocolo para determinación de la actividad de tripsina en pancreatina.

Para las pruebas con enzima y blanco se determinó la pendiente de la porción lineal inicial de la curva [unidad de absorbancia/min], utilizando la velocidad lineal máxima durante al menos 5 min. El cálculo de la actividad en U TAME/mg se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}} = \frac{[(\Delta A_{247} - \Delta A_{247\text{Blanco}})] \times 1000 \times 3}{(540 \times X)} \quad (\text{ec. 6})$$

Donde:

ΔA_{247} : pendiente de la porción lineal inicial de la curva para cada concentración de enzima ensayada,

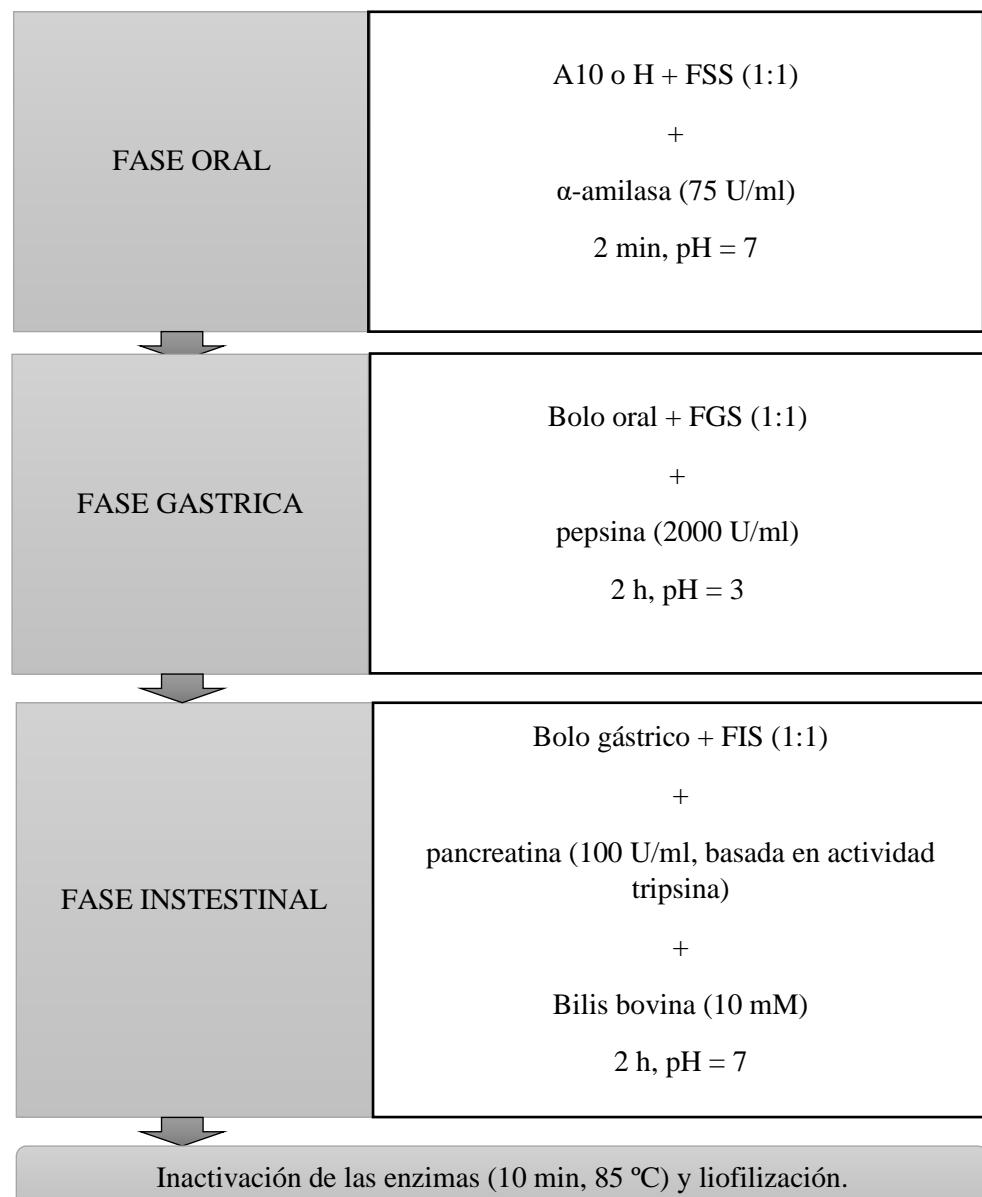
540: coeficiente de extinción molar del TAME (L/(mol × cm) a 247 nm,

3: Volumen (ml) de mezcla de reacción,

X: cantidad de tripsina en la mezcla de reacción final (mg).

DGIS de harina y aislado A10. Las muestras de H y A10 se mezclaron con FSS en la siguiente proporción: 5 g H y 5 ml de solución de A10 (20% p/v, en agua) con 5 ml FSS. Se adicionó α-

amilasa (Sigma 100-70 57,4 U/mg, 26 mg/ml en FSS), y se incubó con agitación durante 2 min a 37 °C. Luego se agregaron 10 ml de FGS, pepsina (Sigma P7125 400 U/mg, 62,5 mg/ml en FGS), y se incubó agitando durante 2 h a 37 °C. Luego, se agregó 20 ml de FIS, pancreatina (MP Biomedicals inc. Grado USP 4X, 15,3 mg/ml en FIS) y bilis (150 mg/ml Fluka Bile B3883) y se incubó agitando durante 2 h a 37 °C. Finalmente, las enzimas se inactivaron calentando durante 10 min a 85 °C y luego las suspensiones fueron liofilizadas. Los digeridos obtenidos se llamaron HD y A10D (Esquema III.6).



Esquema III.6. Condiciones de ensayo de la DGIS. FSS: Fluido salival simulado, FGS: Fluido gástrico simulado, FIS: Fluido intestinal simulado.

III.4. Caracterización fisicoquímica y estructural

III.4.1 Contenido de proteínas

El contenido de proteínas de la harina, los aislados y los hidrolizados, se determinó mediante microKjeldhal, el factor de conversión utilizado fue 6,25 g de proteína/g de nitrógeno (AOAC, 1990; Robinson, 1983).

III.4.2. Preparación de dispersiones solubles

La harina, los aislados, los hidrolizados y los digeridos se solubilizaron en buffer fosfato de potasio 0,035 M (pH = 7,8) y se homogeneizaron en agitador magnético a temperatura ambiente por 30 min. Estas dispersiones fueron centrifugadas (10000×g durante 15 min). A partir de los sobrenadantes se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, estructurales y actividad antioxidante de la harina, los aislados, hidrolizados y digeridos.

III.4.2.1 Método de Lowry

La determinación de la concentración proteica en las dispersiones solubles se realizó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Se preparó el reactivo mezclando las soluciones A y B (A: Na₂CO₃ 2% p/v, NaOH 0,1 N; y B: CuSO₄.5H₂O 1% p/v, tartrato de sodio y potasio 2% p/v). Las muestras se mezclaron con 1 ml de la solución A+B, se agitaron vigorosamente con un vórtex y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el cual se les agregó 100 µl de la solución de Folin (dilución 50% v/v en agua destilada), se agitó enérgicamente y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó (12000×g, 10 min) debido a que el dodecil sulfato de sodio (SDS) precipita e interfiere con la lectura en placa. Se midió la absorbancia a 750 nm. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (0-0,4 mg/ml).

III.4.2.2 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis de las proteínas (GH) se midió mediante la reacción de grupos amino libres con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) y se calculó utilizando la ecuación:

$$\% \text{ } GH = \frac{([NH_2]_h - [NH_2]_0)}{([NH_2]_1 - [NH_2]_0)} \cdot 100 \quad (\text{ec. 7})$$

donde: [NH₂] indica la concentración de grupos amino libres en la muestra no hidrolizada (0) o en la muestra hidrolizada (h).

El parámetro $[NH_2]_1$ se estimó de acuerdo a:

$$[NH_2]_1 = \frac{1}{M_{aa}} (1 + f_{Lys}) C_{prot} \quad (\text{ec. 8})$$

donde: M_{aa} : es el promedio del peso molecular de los aminoácidos en las proteínas de los porotos caupí (130 g/mol), f_{Lys} : es la proporción de lisina en estas proteínas (1/13) (Iqbal y col., 2006) y C_{prot} es la concentración de proteínas (1 g/L para este ensayo).

III.4.2.3 Determinación del tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL)

El cálculo se realizó según lo descripto en Adler-Nissen, 1986. Una proteína con un tamaño de cadena polipeptídica PCL_0 , puede ser hidrolizada en n péptidos, mediante la ruptura del enlace peptídico ($n - 1$), por lo que el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína es: $PCL_0 - 1$.

El grado de hidrólisis puede ser definido como “el porcentaje de uniones peptídicas clivadas”, entonces reemplazando en (ec. 6) se puede obtener:

$$GH (\%) = \frac{n-1}{PCL_0-1} \times 100 \quad (\text{ec. 9})$$

Teniendo en cuenta que $PCL_0 = n \times PCL$ y para proteínas alimentarias el valor de PCL_0 es del orden de 200 – 300 kDa (correspondiendo un PM: 25000 a 40000 Da para las subunidades). Por lo tanto, el valor de $1/PCL_0 \approx 0$ ya que PCL_0 tiende a ∞ . Teniendo en cuenta estas consideraciones, la expresión para calcular el GH es la siguiente:

$$GH = \frac{1}{PCL} \times 100 \quad (\text{ec. 10})$$

El cálculo del tamaño promedio de la cadena polipeptídica se calculó con la siguiente ecuación:

$$PCL = \frac{1}{GH} \times 100 \quad (\text{ec. 11})$$

III.4.3. Electroforesis

III.4.3.1. Electroforesis SDS-PAGE

El análisis de los perfiles electroforéticos de hidrolizados proteicos A8LH, A8HH, A10LH y A10HH, los digeridos A10D y HD, los aislados proteicos A8 y A10 y la harina fueron realizados según técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando el sistema Mini-Protean II con fuente de voltaje de Bio-Rad.

Las dispersiones solubles de las diferentes muestras (obtenidas como se indicó en el ítem III.4.2) se mezclaron con buffer de muestra (concentración final Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8,

SDS 4%, glicerol 20%, y azul de bromofenol 0,5%). Para las corridas electroforéticas en condiciones reductoras se agregó 2-mercaptopropano (2-ME) 5% v/v al buffer de muestra y se calentó 1 min en baño a ebullición.

Se prepararon dos geles según el sistema discontinuo que consiste en un *gel de separación* (acrilamida-bisacrilamida 15,0% p/v en buffer de gel separador, pH 8,8) y un *gel concentrador* (acrilamida-bisacrilamida 4,0% p/v en buffer de gel concentrador, pH 6,8). Se cargaron entre 5 y 15 µl de muestra en cada calle, dependiendo de la concentración de proteínas de las dispersiones, a fin de contar con 20 µg de proteínas/calle. Se utilizó una solución de patrones de bajo peso molecular con las siguientes proteínas: β-fosforilasa (97 kDa), seroalbúmina bovina (65 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y β-lactoalbúmina (14,4 kDa) (LMW - GE Health Care). Se utilizó el buffer de corrida Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, 0,1% SDS, pH 8,3 y se aplicó una corriente 25 mA/gel en el gel concentrador y 30 mA/gel en el gel separador.

Los geles obtenidos fueron fijados y coloreados con *Coomassie Brilliant Blue R-250* al 0,1% en agua:metanol:ácido acético (10:10:4) (v/v/v) durante 2 h. En caso de ser necesario, se realizó una tinción con nitrato plata para aumentar la sensibilidad (Rabilloud y col., 2009). Luego, los geles fueron fotografiados y las imágenes analizadas para estimar el peso molecular de las bandas usando el programa *GelAnalyzer 19.1 software* (<http://www.gelanalyzer.com>).

III.4.3.2. Electroforesis Tricina - SDS - PAGE

Para el análisis de proteínas y péptidos de bajo peso molecular se utilizó el sistema descrito por Schagger (2006), utilizando un sistema Mini-Protean II con fuente de voltaje de Bio- Rad.

Las dispersiones solubles de las diferentes muestras (obtenidas como se indicó en el ítem III.4.2) con buffer de muestra (concentración final 0,150 M Tris-HCl, glicerol 30% p/v, SDS 12% p/v, *Coomassie Blue G-250* 0,05% p/v, pH 7). Para las corridas electroforéticas en condiciones reductoras se agregó 2-ME 5% v/v al buffer de muestra y se calentó 1 min en baño a ebullición.

Se empleó un sistema de tres geles de diferente concentración conformados por un *gel concentrador* (acrilamida – bisacrilamida 4% p/v en buffer Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0,3% p/v, TEMED, persulfato de amonio, pH 8,45), un *gel espaciador* (acrilamida – bisacrilamida 10% p/v en buffer Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0,3% p/v, TEMED, persulfato de amonio, pH 8,45) y un *gel separador* (acrilamida – bisacrilamida 16%/6 M urea en buffer Tris 3 M, HCl 1 M, SDS

0,3% p/v, TEMED, persulfato de amonio, pH 8,45). Se cargaron entre 5 y 15 µl de muestra en cada calle, dependiendo de la concentración de proteínas de las dispersiones, a fin de contar con 20 µg de proteínas/calle. Se utilizó una solución de patrones de proteína de bajo peso molecular [β -fosforilasa (97 kDa), seroalbúmina bovina (65 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y β -lactoalbúmina (14,4 kDa) (LMW - GE Health Care)], así como también una solución de patrones de muy bajo peso molecular [triosfa-fosfato isomerasa (26,6 kDa), mioglobina (16,95 kDa), α -lacto albúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,51 kDa), cadena β de la insulina (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa) (VLMW - BIO RAD)]. Se emplearon dos buffers de corrida, uno para el cátodo (Tris 0,1M, tricina 0,1 M, SDS 0,1% p/v, pH 8,25) y otro para el ánodo (Tris 0,1 M, HCl 0,0225 M, pH 8,9). Las electroforesis se desarrollaron a voltaje constante, empleando 30 V por aproximadamente 1 h y luego se aumentó a 90 V hasta finalizar la corrida (aproximadamente 4 h).

Los geles obtenidos fueron fijados y coloreados con *Coomassie Brilliant Blue R-250* al 0,1% en agua:metanol:ácido acético (10:10:4) (v/v/v) durante 2 h. Cuando fue necesario, se realizó una tinción con nitrato plata para aumentar la sensibilidad (Rabilloud y col., 2009). Luego, los geles fueron fotografiados y las imágenes analizadas para estimar el peso molecular de las bandas usando el programa *GelAnalyzer 19.1 software* (<http://www.gelanalyzer.com>).

III.4.4. Cromatografía de exclusión molecular

En este trabajo la columna de exclusión molecular utilizada fue Superdex 30 (30 x 1 cm) cuyo rango de separación es <10 kDa (GE Healthcare). La columna se calibró con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0), y las siguientes moléculas de masa molecular conocida: aprotinina (6,50 kDa), vitamina B12 (1,85 kDa) y ácido hipúrico (0,179 kDa). Se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa) con el K_{AV} , siendo K_{AV} :

$$K_{AV} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_T - V_0)} \quad (\text{ec. 12})$$

Donde:

V_e corresponde al volumen de elución en mililitros del pico de interés,

V_T corresponde al volumen total de la columna (24 ml) y,

V_0 al volumen muerto de la columna.

Las dispersiones solubles (15 mg de proteína/ml) de las diferentes muestras (obtenidas como se indicó en el ítem III.4.2) y el buffer de corrida (el mismo en que se disolvieron las muestras: fosfato de potasio 0,035 M, pH 7,8) fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0,45 µm de poro. Los filtrados así obtenidos se inyectaron (0,2 ml) en la columna de separación y las cromatografías se realizaron a presión y temperatura ambiente. Se realizó una colección de las fracciones eluídas (0,5 ml). El perfil de elución de los polipéptidos y péptidos se obtuvo por lectura de la absorbancia a 280 nm y, finalmente, se agruparon las fracciones correspondientes a cada uno de los picos.

Para las muestras digeridas con alcalasa (y en el marco de una pasantía en CIDCA), los perfiles cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo FPLC (ÄKTA purifier UPC10, GE Healthcare, Suecia), con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y 0,3 MPa de presión, utilizando una columna Superdex Peptide 10/300 (GE HealthCare, límite exclusión = 10 kDa, rango de separación óptimo 0,1-7 kDa) y volumen total de columna (Vt) = 24 ml.

III.4.5. Método de Lowry modificado

La concentración de proteínas en las fracciones se determinó mediante un método modificado de Lowry (Stoscheck, 1990) para lograr una mayor sensibilidad. Se preparó el reactivo mezclando 3 volúmenes del reactivo de cobre (Na_2CO_3 6,66% p/v, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,13% p/v, tartrato de Na y K 0,066% p/v) con un volumen de SDS 1% p/v y un volumen de NaOH 1 M. Se tomaron 100 µl de muestra y se mezclaron con 100 µl del reactivo de Lowry modificado recién preparado, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el cual se agregaron 50 µL de Folin 0,2 N (previamente diluido 1/10 en agua bidestilada), se agitó enérgicamente y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó (12000×g, 10 min) debido a que el SDS precipita e interfiere con la lectura en placa. Se midió la absorbancia a 750 nm. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (0-0,2 mg/ml).

III.5. Caracterización estructural

III.5.1. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) se determinó con el método de Cardamone y Puri (1992). Como sonda de fluorescencia se utilizó 1,8-anilina naftaleno-sulfonato (ANS) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee-Wisconsin, EE.UU.). El espectro de emisión fue determinado entre 370 a 600 nm, en dispersiones de 0,020-0,030 mg/ml de proteína que se obtuvieron por dilución

de una solución madre (0,1% p/p de proteína) en buffer fosfato de potasio 0,035 M pH 7,8, las cuales se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000×g por 30 min a 20 °C. Se obtuvieron los espectros de emisión a diferentes concentraciones de ANS (de 0 a 100 µM), los espectros se corrigieron sustrayendo el blanco (solución de cada concentración de ANS en el mismo buffer), y se determinó el aumento de la intensidad de fluorescencia emitida (ΔIF) por la unión proteína-ANS. El ΔIF a la longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia (470 nm) fue graficado en función a la concentración de ANS (µM), y la curva se ajustó a la siguiente ecuación:

$$\Delta IF = \frac{A \times ANS}{B + ANS} \quad (\text{ec. 13})$$

donde el coeficiente A = ΔIF_{\max} es el cambio de intensidad de fluorescencia en la saturación de ANS, B = 1/ K_a , y K_a es la constante de asociación de la unión ANS-proteína. La H_o es proporcional a ΔIF_{\max} por mg de proteína, por lo tanto, se calcula dividiendo el coeficiente A estimado de la ecuación 12 por los mg de proteína determinados en la dispersión proteica por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

III.5.2. Espectroscopia infrarroja

Aproximadamente 5 mg de los aislados proteicos A8 y A10, así como de los hidrolizados proteicos (A8LH, A8HH, A10LH y A10HH) fueron mezclados con 5 µl de agua Milli-Q durante toda la noche. Posteriormente, fueron analizados mediante un espectrómetro ATR-FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, EE. UU.). Los espectros IR (4000- 400 cm⁻¹) fueron registrados mediante 32 barridos con 4 cm⁻¹ de resolución espectral. La región del espectro IR correspondiente a la banda amida I de proteína (1700-1600 cm⁻¹) fue deconvolucionada y ajustada al modelo Gausiano/Lorentziano. El ajuste de las curvas fue realizado con OMNIC 8.3 software (Thermo Fisher Scientific Inc.).

III.5.3. Fluorescencia intrínseca

Los aislados proteicos A8 y A10, así como los hidrolizados proteicos (A8LH, A8HH, A10LH y A10HH) fueron dispersados (1 mg proteína/ml) en el buffer fosfato de potasio 0,035 M (pH = 7,8) durante 30 min a temperatura ambiente. Las dispersiones se centrifugaron (10000×g, 25 °C, 30 min) y los sobrenadantes fueron analizados. La fluorescencia intrínseca de las muestras se determinó con un espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Corea del Sur) a una longitud de onda de excitación de 280 nm (ranura de excitación de 5 nm) y una longitud de onda de emisión entre 300 - 450 nm (ranura de emisión de 5 nm) a una velocidad

de barrido de 500 nm/min, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La intensidad de fluorescencia emitida se normalizó con la cantidad de proteína, teniendo en cuenta la concentración proteica en el sobrenadante determinada con el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

III.5.4. Solubilidad en función del pH

Se determinó la solubilidad (S_o) de los aislados proteicos, A8 y A10, y de los hidrolizados proteicos A8LH y A10LH en función del pH mediante el método de Were y col. (1997). Se prepararon dispersiones proteicas de 0,1% p/v en agua destilada, y las soluciones se ajustaron a distintos pH (2-10) utilizando 0,1 N NaOH o HCl. Las dispersiones se agitaron (30 min a temperatura ambiente) y luego se centrifugaron (10000 $\times g$, 25 °C, 30 min). El contenido de nitrógeno inicial de las muestras se determinó por microKjeldhal (AOAC, 1990) y el contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Jasco V-630 model, Germany). Se utilizó seroalbúmina bovina como patrón.

III.6. Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante por diferentes métodos de todas las dispersiones preparadas (tal como se describió en el ítem III.4.2): harina, aislados, hidrolizados proteicos y digeridos.

III.6.1. Inhibición del radical ABTS⁺

El ensayo de decoloración del catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se llevó a cabo siguiendo el método de Tironi y Añón (2010). Se disolvió la masa necesaria de ABTS en buffer fosfato de potasio 0,035 M (pH = 7,8) hasta alcanzar una concentración de 0,007 M. La formación del radical ABTS^{•+} se produjo mediante la reacción de la solución de ABTS con persulfato de potasio 0,00245 M (concentración final) en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 16 h. Previo al ensayo, la solución se diluyó en buffer fosfato de potasio 0,035 M (pH = 7,8), y se equilibró a temperatura ambiente para obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm (cubeta de 1 cm) en un espectrofotómetro UV-visible (modelo Jasco V-630, Alemania). Se mezclaron 10 µl de muestra (preparada según ítem III.4.2) con 1 ml de la solución de ABTS^{•+} y se midió la absorbancia a 734 nm a los 10 min. Para cada ensayo se realizaron blancos de solvente adecuados (controles negativos).

El porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición del ABTS}^{+\bullet} = \frac{[Abs_{B0} - Abs_{M10}]}{Abs_{B0}} 100 \quad (\text{ec. 14})$$

Donde: Abs_{B0} son las absorbancias del control negativo a los 0 min, respectivamente, y Abs_{M10} es la absorbancia de la muestra a los 10 minutos.

Para determinar la concentración de muestra que produce una inhibición del 50% del radical ABTS⁺ (valor IC₅₀), para cada muestra, se evaluaron la fracción soluble sin diluir y sus diluciones 1:2,5, 1:5 y 1:10 por triplicado. Luego, con los valores experimentales de inhibición de radicales ABTS⁺ vs. concentración se construyeron curvas cuyas regresiones matemáticas (software OriginPro® 8.0), ajustaron con los siguientes modelos:

$$y = a + (bx) \quad (\text{ec. 15a})$$

$$y = a \ln(x) + b \quad (\text{ec. 15b})$$

donde, y: es la inhibición (%); a y b: son parámetros de la regresión; y x: es la concentración de proteínas en mg/g muestra.

A partir de la ecuación 14a y 14b haciendo: y = 50%, se obtuvo el valor de IC₅₀ de las muestras.

III.6.2. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno de las muestras fue medida siguiendo el método propuesto por Ou y col. (2002), adaptado por Rodriguez y Tironi (2020). Se tomaron 25 µl de muestra (preparada según ítem III.4.2) y se mezclaron con 150 µl de fluoresceína (96 nM, en buffer fosfato 0,035 M pH = 7,8). Se inició la reacción mediante el agregado de 25 µl de 2,2'-azo-bis (2- amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) 320 mM.

Se registró la curva de cinética de decaimiento de la fluoresceína en buffer fosfato (485 nm excitación y 535 nm emisión), luego se registraron las curvas de cinética de decaimiento de la fluoresceína + las muestras y se calculó el área bajo la curva (ABC_{muestra}) empleando la ecuación 15:

$$ABC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} \quad (\text{ec. 16})$$

donde: f_i: fluorescencia en un tiempo i (min) y f₀: fluorescencia inicial.

Se realizó el mismo procedimiento utilizando buffer en lugar de muestra (blanco) y utilizando buffer tanto en lugar de muestra como en lugar del AAPH (control negativo) y se

calculó el área bajo la curva (ABC_{blanco} y ABC_{CN} , respectivamente) a las mismas longitudes de onda.

Se calculó el % de secuestro de radicales como:

$$\% \text{ Secuestro de } ROO^\bullet = \frac{(ABC_M - ABC_{CN})}{(ABC_B - ABC_{CN})} 100 \quad (\text{ec.17})$$

donde: M: muestra; B: blanco y CN: control negativo.

Para el control positivo se utilizó Trolox (6,25 – 75 mM) como sustancia estándar, se registraron las curvas de cinética de decaimiento de la fluoresceína + el estándar y se calculó el área bajo la curva (ABC_{Trolox}). Se hizo la diferencia entre $ABC_{muestra}$ y ABC_{blanco} y se ingresó en la curva de calibrado construida con Trolox (ABC_{Trolox} vs. concentración de Trolox).

Para determinar la concentración de muestra que produce una inhibición del 50% del radical ROO^\bullet (IC_{50}), se hicieron diluciones seriadas de las muestras. Luego, con los valores experimentales de inhibición de radicales ROO^\bullet vs. concentración se construyeron curvas cuyas regresiones matemáticas (software OriginPro® 8.0), ajustaron con los siguientes modelos (ecuación 18a y b):

$$y = a + (bx) \quad (\text{ec. 18a})$$

$$y = a \ln (x) + b \quad (\text{ec. 18b})$$

donde, y: es la inhibición (%); a y b: son parámetros de la regresión; y x: es la concentración de proteínas en mg AGE/g muestra.

A partir de la Ecuación 17a y 17b haciendo: $y = 50\%$, se obtuvo el valor de IC_{50} de las muestras.

III.6.3. Ensayo HORAC

Se midió la capacidad de inhibición de radicales OH^\bullet al exponer las muestras a un sistema generador de estos radicales, H_2O_2/M^{+2} , a través de la reacción de Fenton a 37 °C, utilizando la fluoresceína como sonda fluorescente, siguiendo el método propuesto por Ou y col. (2002), adaptado por Rodríguez y Tironi (2020).

Se preparó una solución de fluoresceína de 60,3 nmol L⁻¹ en el buffer fosfato de potasio 0,035 M (pH = 7,8) y se preparó una solución acuosa de H_2O_2 0,75 M. Se obtuvo una solución de cobalto disolviendo 10 mg de ácido picolínico y 11 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en 50 ml de agua. Se mezclaron muestras (preparada según ítem III.4.2) o buffer (20 µl) con la solución de

fluoresceína (190 µl), la solución de H₂O₂ (15 µl) y la solución de cobalto (75 µl); se incubaron a 37 °C durante 3 horas en un lector de microplacas SYNERGY HT–SIAFRT (Biotek); y la fluorescencia (λ_{exc} : 485, λ_{em} : 535 nm) se leyó a intervalos de 1 min para obtener el área bajo la curva (AUC).

La inhibición del radical hidroxilo se calculó como:

$$\% \text{ Inhibición HO}^\bullet = \frac{(ABC_M - ABC_{CN})}{(ABC_B - ABC_{CN})} 100 \quad (\text{ec. 19})$$

donde: M = muestra, B = blanco (sin adición de soluciones de cobalto y peróxido de hidrógeno) y NC = control negativo.

El % de inhibición de HO[•] fue graficado en función del contenido de proteínas de la muestra y se calcularon los parámetros de regresión para obtener el valor de IC₅₀ (Orsini Delgado y col., 2015).

III.6.4. Ensayo FRAP (Capacidad antioxidante para reducir el ion férrico)

La capacidad antioxidante para reducir el ion férrico se desarrolló siguiendo la metodología de Benzie y Strain (1996). Se mezclaron 20 µl de las muestras (preparada según ítem III.4.2), o blanco con 280 µL del reactivo FRAP [2,5 ml de solución 0,02 M de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) preparado en HCl 0,040 M más 2,5 m; de FeCl₃.6H₂O 0,02 M y 25 ml de buffer acetato 0,3 M (pH = 3,6)]. Se incubaron las mezclas a 37 °C durante 30 min y se midieron los valores de absorbancia a 593 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de Trolox (0,01–4 mg ml⁻¹). Los resultados se expresaron como µmol Trolox equivalente (TE) por g de muestra.

III.6.5 Actividad antioxidante frente a células intestinales

III.6.5.1. Acondicionamiento de las muestras y línea celular utilizada

Se evaluaron los extractos de HD y A10D y sus fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, que presentaron actividad antioxidante verificada por métodos acelulares. Debido a la citotoxicidad de las sales biliares incluidas en el protocolo de DGIS al que fueron sometidos las muestras, se utilizó una estrategia para reducir el contenido de sales biliares (Rodriguez y Tironi, 2023):

- *solubles directos (sd)*: se resuspendió HD y A10D liofilizado en buffer fosfato de potasio 35 mM pH = 7,8 (manteniendo las concentraciones originales en el digerido) y se agitó a 37 °C, 1 h, 500 rpm (Thermomixer Eppendorf), y posteriormente se centrifugó (10000×g, 10 min) conservando el sobrenadante (HDsd y A10Dsd).

- *solubles bioaccesibles (sba)*: los solubles directos fueron tratados con resina colestiramina (C4650 SIGMA) en una relación 10% p/v, se homogenizó a 25 °C, 1 h, 500 rpm (Thermomixer Eppendorf); luego se centrifugó (10000×g, 20 min) para remover la resina y los ácidos biliares adsorbidos conservando el sobrenadante (HDsba y A10Dsba), que se filtró (0,22 µm).

Además, para evaluar el efecto citotóxico de los componentes de los fluidos utilizados en la DGIS, se analizó un blanco de reactivos (bR), el cual fue obtenido siguiendo los mismos pasos del protocolo de DGIS reemplazando la muestra por agua. A partir de esta muestra, se prepararon las fracciones solubles en buffer fosfato a partir de la resuspensión (manteniendo las concentraciones originales en el digerido) y posterior centrifugación de bR liofilizado (bRsd) y, también, el soluble bioaccesible tratado con la colestiramina (bRsba).

Se utilizó la línea celular Caco-2 TC7 (pasajes 54–55) del *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA), la cual es un clon con características de enterocitos del íleon y un alto grado diferenciación morfológica y funcional (Turco y col., 2011). Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo). Se utilizó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, pH = 7,4) suplementado con 15% p/v de suero fetal bovino (SFB), 4,5 g/L glucosa, 13 ml/L de PenStrep, NaHCO₃ (2 g/L), gentamicina (0,5 g/L) (Gibco), y 1% p/v de aminoácidos no esenciales (NEAA) y los experimentos se realizaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Las condiciones experimentales se ajustaron de acuerdo a García Fillería y Tironi (2021) para asegurar una respuesta medible, incubando las células hasta confluencia, quedando las placas listas para los ensayos.

III.6.5.2. Citotoxicidad de las muestras: determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH)

La citotoxicidad se cuantificó en términos de liberación de LDH (indicador de daño celular) al medio extracelular (Kaja y col., 2016). La enzima LDH cataliza la conversión de piruvato a lactato, usando NADH como cofactor. La oxidación de NADH resulta en una caída de la absorbancia a 340 nm.

Para el estudio de la citotoxicidad de las muestras se realizó el método descrito por García Fillería y Tironi (2021). Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$

células/pocillo) y, luego de 48 h, se retiró el medio de cada pocillo y se lavó dos veces con PBS. Se realizó el tratamiento con 125 µl de muestra, se incubó en estufa (37 °C, 5% CO₂) por 3 h. Luego, se trasvasó el sobrenadante a otra placa y se cuantificó la actividad de LDH mediante el kit comercial LDH-P UV unitest (Wiener Lab, Argentina). Las muestras se hicieron reaccionar con el sustrato reconstituido contenido piruvato y NADH siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó la lectura de la caída de la absorbancia a λ = 340 nm en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Bioteck Instruments, EE. UU) utilizando una placa de 96 pocillos apta para la lectura en el UV (Costar®).

La actividad enzimática (UI) se expresó como la variación de absorbancia/min (ΔA/min) calculando el promedio de la diferencia en las absorbancias/min, a los tiempos 0,5, 1,5, 2,5 y 3,5 min. Cada determinación se realizó por triplicado. La citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH:

$$\% \text{ LDH} = \frac{\text{LDH}_m}{\text{LDH}_T} 100 \quad (\text{ec. 20})$$

Donde:

LDH (U/I): ΔA/min x f [f_(30 °C, 340nm) = 9,683],

LDH_m: LDH (U/I) obtenido por tratamiento con las muestras

LDH_T: LDH (U/I) del control (+) de muerte celular.

Controles:

(-): DMEM, buffer muestra, PBS,

(+): DMEM adhesión sin color con detergente Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) 3% v/v (provoca lisis celular).

III.6.5.3. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los ensayos se realizaron basados en los protocolos de García Fillería y Tironi (2021). Se evaluó la capacidad de las muestras para neutralizar ROS en las células Caco-2 TC7 sometidas a daño oxidativo por H₂O₂ mediante el uso de la sonda 2',7'-diclorohidrofluoresceína di acetato (DCFH-DA). Esta sonda se aplica en estudios celulares debido a su capacidad de difundir a través de la membrana e ingresar a la célula, donde es hidrolizada a 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) mediante esterasas intracelulares que rompen la unión con el acetato. La oxidación de DCFH por ROS origina la 2,7-diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 498 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$).

Las células Caco-2 TC7 se sembraron en una placa de cultivo oscura de 96 pocillos en una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se incubó 48 h en estufa (37°C , 5% CO₂). Luego de este tiempo se retiró el medio y se lavó con PBS. Se realizó el tratamiento con la sonda DCFH (T1), para lo cual se agregaron 100 µL de DCFH-DA 20 µM (en PBS) y se incubó 30 min en estufa (37°C , 5% CO₂, en oscuridad). Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS. A continuación, se realizó un segundo tratamiento con las muestras (T2), agregando 100 µL de las mismas y se incubó 1 h (37°C , 5% CO₂). Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS. El tercer tratamiento consistió en la inducción del estrés oxidativo (T3), agregando 100 µL de H₂O₂ 500 µM (en PBS) y se incubó 3 h leyendo la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 485$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 528$ nm) cada 10 min en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU.).

Se prepararon tres sistemas control:

Control 1 (C1): Control de máximo estrés oxidativo. En T2 las células se incubaron con buffer fosfato pH = 7,8 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con H₂O₂ (T3).

Control 2 (C2): Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo; en T2 se agregó buffer fosfato 35 mM pH = 7,8 y en T3 PBS.

Control 3 (C3): Control de fluorescencia intrínseca. En T1 y T2 se incubó con PBS y buffer muestra 35 mM, pH = 7,8, respectivamente, y en T3 se incubó con el H₂O₂.

El porcentaje de inhibición de ROS se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición ROS intracelulares} = \frac{(\Delta F_C - \Delta F_M)}{\Delta F_C} \times 100 \quad (\text{ec. 21})$$

Donde:

ΔF_C : diferencia de fluorescencia ($F_{180\text{min}} - F_{0\text{min}}$) para el control de máxima oxidación,

ΔF_M : diferencia de fluorescencia ($F_{180\text{min}} - F_{0\text{min}}$) para M (muestra).

Los resultados se expresaron como porcentaje del control de máxima oxidación.

III.6. Caracterización de las secuencias peptídicas

Picos seleccionados de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular que presentaron elevada actividad antioxidante, fueron analizadas por el servicio de espectrometría de masas en el laboratorio “Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa - CEQUIBIEM” perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires (<http://www.cequibiem.qb.fcen.uba.ar/index.html>).

Las muestras liofilizadas fueron tratadas con bicarbonato de amonio 50 mM, pH = 8 y posteriormente digeridas con tripsina (corta en el extremo C-terminal de Arg y Lys) durante toda la noche. Las muestras fueron liofilizadas por centrifugación al vacío (Speed Vac) y vueltas a resuspender con 30 µL de ácido trifluoroacético 0,1% para ser desalada (zip Tip C18, Merck) y analizada por nanoHPLC (EASY-nLC 100, ThermoScientific) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap.

La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna capilar de fase reversa de 15 cm [ThermoScientific EASY-Spray Accucore (P/N ES801), C18, 2 µm, 100 Å, 75-µm d.i.] aplicando un gradiente de 5 a 95% del solvente B (acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico) en el solvente A (agua con 0,1% de ácido fórmico) en 120 min, con un flujo de 200 nL/min.

Para el análisis de la fragmentación de los péptidos (MS/MS) se adquirieron los escaneos MS totales a una resolución de 70,000 (FWMH) usando el analizador Orbitrap (rango m/z: 400-2000) así como los espectros (MS/MS) de disociación inducida por colisión (CID). Una vez obtenidos los datos, éstos fueron analizados con el software Proteome Discoverer 2.1 (ThermoScientific) contrastando con la base Uniprot (Universal Protein Resource) restringida a la taxonomía *Vigna unguiculata* (septiembre 2023). Los parámetros de búsqueda y los criterios de aceptación utilizados fueron: tolerancia: 10 ppm para iones parentales, 0,05 Da para fragmentos, modificaciones: oxidación (M), carbamidometilación (C).

III.7. Caracterización de la fracción polifenólica

III.7.1. Extracción de compuestos fenólicos

Se realizó el estudio de los compuestos fenólicos (CF) en muestras de H y A10 y sus correspondientes digeridos gastrointestinales (HD y A10D). Se utilizaron diferentes sistemas extractivos, variando la proporción de solventes como se describe en la siguiente Tabla (Tabla III.2):

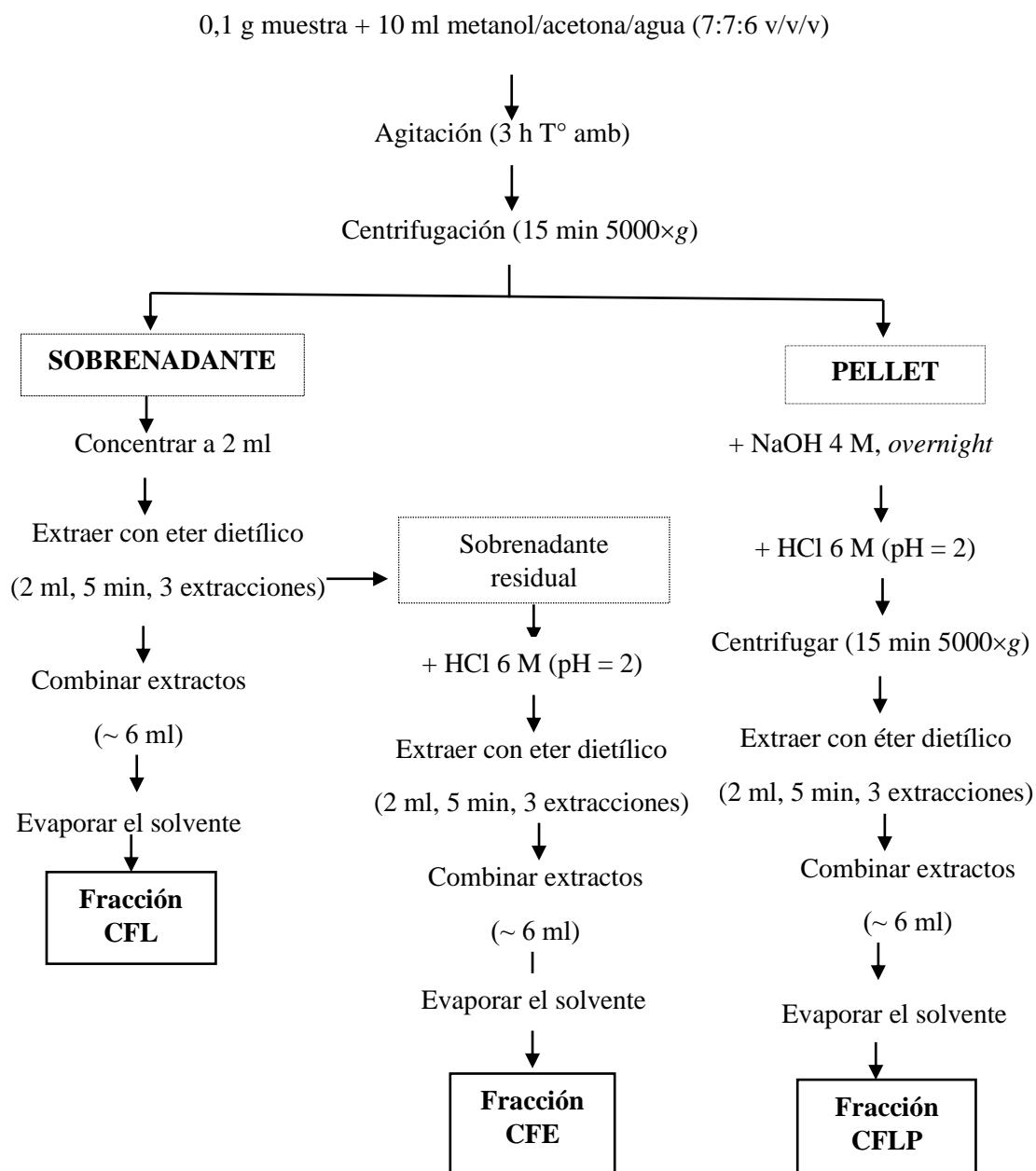
Tabla III.2. Sistemas de extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes

Sistema	Agua destilada (%)	Metanol (%)	HCl 1,2 M (%)	Acetona (%)
MA	30	70	0	0
MH	0	50	50	0
MAA	35	30	0	35

MA: metanol/agua; MH: metanol/HCl; MAA: metanol/agua/acetona.

Se prepararon dispersiones de las muestras al 1% (p/v) en los sistemas solventes MA y MH. Se agitaron en agitador magnético durante 3 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 5000×g. Los sobrenadantes fueron colectados y conservados a -20 °C.

Por su parte, para el sistema MAA se trabajó con el método de Liyana-Pathirana y Shahidi (2006) adaptado por Rodriguez y Tironi (2020), como se muestra en el Esquema III.7. Se prepararon dispersiones de las muestras al 1% (p/v) en el sistema solvente MAA. Se agitaron en agitador magnético durante 3 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron (5000×g, 5 min). Se obtuvieron dos fracciones: el pellet y el sobrenadante. El pellet obtenido por el sistema MAA fue sometido a tratamiento alcalino (1,5 ml de NaOH 4 M, temperatura ambiente, *overnight*), con posterior acidificación con HCl 2 M (pH=2), centrifugación (5000×g, 15 min) y extracción con éter dietílico (2 ml, 5 min, 3 veces). Los extractos fueron combinados y llevados a sequedad (evaporación del solvente) a fin de obtener la fracción de compuestos fenólicos insolubles ligados a proteínas (CFLP). Por su parte, el sobrenadante obtenido luego de la extracción por el sistema MAA fue concentrado a 2 ml (desecador y bomba de vacío/rotavapor) y posteriormente se realizó la extracción con éter dietílico (2 ml, 3 veces, 5 min). Los extractos etéreos fueron combinados y llevados a sequedad (evaporación del solvente) a fin de obtener la fracción de compuestos fenólicos libres (CFL). El sobrenadante residual se sometió a tratamiento alcalino (1,5 ml de NaOH 4 M, temperatura ambiente, *overnight*), con posterior acidificación con HCl 2 M (pH=2), centrifugación (5000×g, 15 min) y extracción con éter dietílico (2 ml, 3 veces, 5 min). Los extractos fueron combinados y llevados a sequedad (evaporación del solvente) a fin de obtener la fracción de compuestos fenólicos esterificados (CFE). Las fracciones CFLP, CFL Y CFE fueron solubilizadas en 1 ml de mezcla metanol:agua (70:30) y guardadas a -20 °C, para posteriores determinaciones de contenido en fenoles totales y actividad antioxidante.



Esquema III.7. Protocolo de extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes.

III.7.2. Determinación de fenoles totales

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) siguiendo la técnica descripta por Singleton y Rossi (1965), que utiliza el reactivo de Folin-Cicalteau. Se mezclaron de 10 µl de extracto con 600 µl de agua destilada. Se adicionó 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 1 min, se adicionaron 150 µl de solución de Na₂CO₃ 20% (p/v) y se llevó a volumen final de 1 ml con agua destilada. Se incubaron las muestras por 2 h a 25 °C en la oscuridad. Se transfirieron 300 µl de cada mezcla de reacción a una microplaca de 96 pocillos. Se realizó la lectura de la absorbancia a 760 nm en una lectora de microplaca. Todos

los análisis se realizaron por triplicado. Se realizó una curva de calibrado con diluciones seriadas de ácido gálico (0,031–2 mg/ml). Los resultados de CFT se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (AGE) por g de extracto.

III.8.3. Propiedades antioxidantes

III.8.3.1. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)

La TEAC de las fracciones MA, MH, CFL, CFE, CFLP obtenidas a partir de H, A10 y sus digeridos gastrointestinales, se evaluó como se mencionó en el ítem III.6.1. Los valores de absorbancia a 734 nm, fueron registrados a los 45 min de iniciada la reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol TE/mg AGE}$ y $\mu\text{mol TE/g BS}$.

III.8.3.2. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno de las fracciones MA, MH, CFL, CFE, CFLP obtenidas a partir de H, A10 y sus digeridos gastrointestinales, se evaluó como se mencionó en el ítem III.6.2. Para determinar la concentración de extractos fenólicos que produce una inhibición del 50% del radical ROO^\cdot (IC_{50}), se hicieron diluciones seriadas de las muestras (MA, MH, CFL, CFE, CFLP de H, HD, A10, A10D).

III.8.3.3. Ensayo FRAP

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno de las fracciones CFL, CFE, CFLP obtenidas a partir de H, A10 y sus digeridos gastrointestinales, se evaluó como se mencionó en el ítem III.6.3. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol TE/mg AGE}$ y $\mu\text{mol TE/g BS}$.

III.8.4 Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)

Método realizado en el Grupo de Bioquímica Vegetal del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

Se utilizó un equipo HPLC-DAD-FLD (sistema Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Alemania) y una columna Kinetex C18 de fase reversa (3,0 × 100 mm, 2,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Para analizar compuestos no antocianínicos, los extractos de H, HD, A10 y A10D que habían sido previamente evaporado se disolvieron en la fase móvil inicial del método y se analizó según

Ferreyra y col. (2021). Las fases móviles fueron una solución acuosa al 0,1% de ácido fórmico (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). El gradiente fue el siguiente: 0-1,7 min, 5% B; 1,7-10 min, 30% B; 10-13,5 min, 95% B; 13,5-15 min, 95% B; 15-16 min, 5% B; 16-19, 5% B. El caudal se fijó en 0,8 ml/min, la temperatura de la columna fue de 35 °C y el volumen de inyección fue de 10 µl. Las condiciones para los detectores de DAD y FLD fueron las siguientes: la celda de flujo analítico para DAD se configuró para escanear de 200 nm a 400 nm. Se utilizó una tasa de recolección de datos de 5 Hz, un ancho de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 1000 s. Se utilizaron diferentes longitudes de onda (254, 280, 320 y 370 nm) según la absorbancia máxima de los analitos para DAD. Para FLD, se usaron una longitud de onda de excitación de 290 nm y una respuesta de emisión monitoreada de 315, 360 y 400 nm dependiendo de los analitos objetivo. Se utilizó una tasa de recopilación de datos de 10 Hz (ancho de pico de 0,04 min correspondiente a un tiempo de respuesta de 0,8 s y una ganancia de fotomultiplicador de 5 unidades) para FLD. Los tiempos de retención de los compuestos en las muestras se compararon con los de estándares auténticos. Los gráficos de calibración para los analitos estudiados mostraron rangos lineales entre 0,05 y 40 mg/L ($R^2 > 0,993$). Los compuestos patrón analizados fueron: ácido gálico, 3-hidroxitirosol, tirosol, ácido caftárico, ácido cafeico, ácido siringico, ácido coumarico, ácido ferulico, (-)-epigallocatequina, (+)-catequina, (-)-epicatechin, (+)-procianidina B1, procianidina B2, dihidroquercetina 3-rhamnoside (astilbin), *trans*-resveratrol, hidrato de quercetin, quercetina 3-β-D-glucósido (isoquercetina), kaempferol-3-glucósido, miricetina, naringina, quercetina 3-β-D-galactósido, malvidina-3-O-glucósido (cloruro), rutina (trihidrato).

III.9. Preparación de muestras de carne a partir de carne picada molida, harina, aislados e hidrolizados de proteínas

Se utilizó, por un lado, carne vacuna, específicamente el corte denominado “costeleta” (contenido lipídico 2,5 g/100 g; Pouzo, 2015) sin hueso, sin grasa y sin tejido conectivo visible, obtenida del comercio local. Por otro lado, se utilizó carne de pescado *Pterodoras granulosus*, conocido comúnmente como armado común (contenido lipídico 1,5 g/100 g), sin piel ni espinas, capturado del Río Paraná y procesado en el día.

La carne fue pasada con una picadora eléctrica (HR7302/90, Philips). La carne picada obtenida fue mezclada para asegurar la homogeneidad y se separó en fracciones de 500 g (cantidad de carne a partir de la cual se elaboró cada unidad de producción).

Se empleó, además, sal (NaCl) de grado alimentario. Como reemplazo de la carne se utilizaron harina de caupí (H, descripta en el ítem III.1), aislado proteico de caupí obtenido a

pH 10 (A10, descripto en el ítem III.2) e hidrolizado proteico de caupí obtenido a partir de A10 con bajo grado de hidrólisis (A10LH, descripto en el ítem III.3.1).

III.9.1. Elaboración de hamburguesas

III.9.1.1. Elaboración de hamburguesas de carne de pescado

La carne de pescado picada necesaria para la elaboración de cada formulación de hamburguesas fue mezclada con H, A10 y A10LH al 2%, NaCl al 1,5% en procesadora (HR7302/90, Philips). Se mezcló durante 5 min a velocidad baja y la pasta resultante se utilizó para formar las hamburguesas. Se realizó la preparación de una formulación control sin el agregado de ingredientes de caupí. Las hamburguesas fueron moldeadas en recipientes circulares (4,3 cm de diámetro por 1,24 cm de espesor) y pesadas. Se obtuvieron 10 hamburguesas para cada formulación, se envasaron en bolsas de polietileno selladas, se almacenaron en heladera de 4-8 °C. Con el objetivo de evaluar el efecto de la cocción en las formulaciones, se tomaron muestras a los días 2 y 5 para cocinar en horno a 180 °C. Durante el proceso de cocción, las hamburguesas se cocieron aproximadamente 2 min por lado, y la temperatura interna fue monitoreada hasta alcanzar una temperatura interna de punto final de 71,1 °C.

III.9.1.2. Elaboración de hamburguesas de carne vacuna

La carne vacuna picada necesaria para la elaboración de cada formulación de hamburguesas fue mezclada con A10 y A10LH al 1% y 4%, NaCl al 1% y se incorporó agua al 2%. El procedimiento elegido para incorporar los ingredientes a la carne consistió en colocar la harina a utilizar en un recipiente junto con el agua y el NaCl al 1%, homogeneizar y dejar hidratar. Luego para cada formulación, se colocaron en procesadora (HR7302/90, Philips) la carne y la mezcla de sal, agua e ingrediente de caupí. Se mezcló durante 5 min a velocidad baja y la pasta resultante se utilizó para formar las hamburguesas. Se realizó la preparación de una formulación control sin el agregado de ingredientes de caupí. Las hamburguesas fueron introducidas en tubos de centrífuga de 50 ml, pesadas y centrifugadas a 100×g durante 10 min para eliminar el aire atrapado. Luego, las muestras en los tubos se cocinaron hasta alcanzar una temperatura interna de 71 °C en un baño de agua termostatizado. La temperatura interna fue monitoreada mediante un termopar de tamaño de aguja insertado en el centro térmico de los tubos durante la cocción. Las muestras de carne cocida fueron luego retiradas y pesadas

nuevamente. Se obtuvieron 10 hamburguesas para cada formulación, se envasaron en bolsas de polietileno selladas, se almacenaron en heladera de 4-8 °C.

III.9.2. Rendimiento

El rendimiento fue evaluado como el porcentaje del peso retenido luego del proceso de cocción. Para ello, se pesaron las hamburguesas crudas (P_{crudo}) e inmediatamente después de cocidas y enfriadas (P_{cocido}). El rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{P_{cocido}}{P_{crudo}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 22})$$

III.9.3. Medición de pH

La medición de pH de las muestras de carne se realizó sobre 3 g de muestra solubilizada en 10 ml de agua destilada utilizando un pHmetro de vidrio.

III.9.4. Oxidación lipídica

La extensión de la peroxidación lipídica en las muestras de carne se determinó mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Este análisis se realizó por triplicado sobre 2 g de muestra. Para precipitar la proteína presente y solubilizar las TBARS se usó 20 ml de ATCA 5% p/v y se colocó en baño de agua-hielo. Luego se realizó una filtración por papel y posteriormente se centrifugó (13500×g, 10 min), para precipitar las posibles partículas en suspensión que hubieran atravesado el papel de filtro. Se tomaron 2 ml del sobrenadante y se colocaron en un tubo con 2 ml de reactivo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (preparado en agua bidestilada el día de uso y sonicado previamente), dejando reaccionar en baño termostático a 70 °C durante 30 min. Luego, se enfrió bajo canilla y se midió la absorbancia a 532 nm. Se realizó una curva de calibración con 1,1,3,3 -tetraetoxipropano (0-0,2 mg/ml). Las TBARS se expresaron como mg de malondialdehido (MDA)/kg producto.

III.9.5. Color

Se realizaron mediciones con un colorímetro Chroma Meter CR- 300C, (MINOLTA, Osaka, Japón). La luminosidad de las formulaciones tipo hamburguesa se determinó por medio del parámetro L^* , el equilibrio entre el color verde y rojo por el valor a^* , y el equilibrio entre el amarillo y el azul por medio del valor b^* .

A partir de estos parámetros se calcularon los atributos de color (hue, H*) e intensidad del color (chroma, C*):

$$H^* = \operatorname{tg}^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \text{ cuando } a^* > 0 \quad (\text{ec. 23})$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{ec. 24})$$

Los parámetros fueron medidos en una placa de Petri de polietileno, obteniendo un espesor constante de las muestras y sobre un fondo negro. Los resultados presentados son los valores promedio de 10 determinaciones efectuadas en cada duplicado de muestra.

III.9.6. Análisis del perfil de textura

Se realizó sobre cilindros de las formulaciones tipo hamburguesas de 22 mm de diámetro y 5 mm de altura inmediatamente después de su corte. Las muestras se comprimieron 50% de su altura original, confirmando que no ocurría fractura del material, en un analizador de textura TA-XT2i Texture Analyser, (Vienna Court, Inglaterra), con el software Texture Export para windows 1.0. Se ensayó un test de compresión uniaxial de dos ciclos (Steffe, 1996), en platos paralelos con una sonda SMSP/75 (0.98 N) a una velocidad constante de 0,5 mm/s con un tiempo de 5 s entre los dos ciclos de compresión.

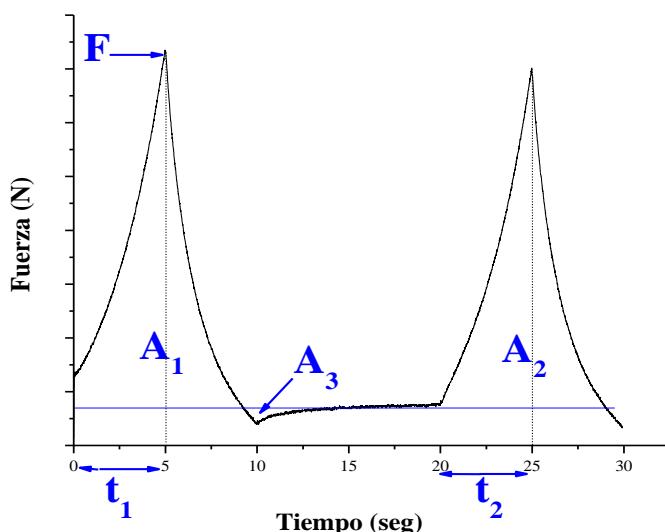


Figura III.1: Curva típica del perfil de textura (fuerza en función del tiempo). Parámetros: dureza (F); adhesividad (A_3), cohesividad (A_2/A_1) y elasticidad (t_2/t_1).

A partir de las curvas de fuerza en función del tiempo (Figura III.1) se calcularon los parámetros de dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad de las muestras utilizando el software OriginPro 8. La dureza (F) se definió como el valor de fuerza correspondiente al máximo del primer ciclo de compresión. Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o entre la lengua y el paladar. El parámetro elasticidad (t_2/t_1) indica la habilidad que tiene la muestra para recuperar su altura original, y se calcula como la altura que el material recupera entre el final de la primera compresión (equivalente a una mordida) y el comienzo de la segunda. Con respecto al parámetro cohesividad (A_2/A_3), este parámetro refleja lo bien que el producto resiste una segunda deformación respecto a cómo se comporta en una primera. Indica la fuerza de los enlaces internos que forman la matriz de los alimentos y el grado en que un alimento puede deformarse antes de romperse. Se calculó como la relación entre el área de fuerza positiva obtenida durante la segunda compresión y el área de fuerza positiva obtenida durante la primera compresión, por lo que es también adimensional. La masticabilidad se definió como el producto de la dureza x cohesividad x elasticidad (Bourne, 1968).

III.10. Análisis estadístico de los datos

Todos los tratamientos y análisis experimentales se realizaron al menos por triplicado. Se realizó un análisis factorial de la varianza (ANOVA) considerando factores como: tipo de muestra (harina o aislado), pH de extracción (A8 o A10), tratamiento (condición de preparación del hidrolizado); incluyendo las interacciones entre ellos. Se utilizó una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con un intervalo de confianza de 95% para comparar las medias. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat (Di Rienzo y col., 2016).

CAPÍTULO IV

HIDRÓLISIS CON ALCALASA DE AISLADOS PROTEICOS DE CAUPÍ

Los aislados proteicos vegetales de caupí pueden ser incorporados en la formulación de alimentos siempre que posean adecuadas propiedades funcionales. En base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, se eligieron dos condiciones experimentales (extracción a pH = 8 y a pH = 10) para obtener proteínas de caupí con diferencias estructurales marcadas (Peyrano y col., 2016). Por otra parte, el tratamiento con enzimas proteolíticas para generar la hidrólisis del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de amino ácidos libres, es uno de los procesamientos aplicados en las últimas décadas a fin de mejorar las propiedades funcionales y bioactivas de las proteínas de origen.

En este capítulo se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas de caupí y los efectos específicos de la acción de la enzima alcalasa aplicadas a dos niveles de concentración (bajo y alto grado de hidrólisis) sobre A8 y A10. Se analizan también las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los hidrolizados resultantes, centrándose en la producción de péptidos antioxidantes.

IV. 1. Caracterización fisicoquímica y estructural

Las muestras de harina desgrasada de caupí fueron dispersadas en agua y llevadas a pH 8,0 y 10,0, luego de una centrifugación a $10000\times g$ por 30 min y a 20 °C, las dispersiones dieron lugar a sus respectivas fracciones solubles. Tanto A8 como A10 mostraron un contenido similar de proteínas totales según el método de microkjeldahl (Tabla IV.1). El rendimiento en proteína de los mismos no varió con el pH de extracción ($p>0,05$). Algunas fracciones proteicas de la harina pudieron quedar insolubles en el pellet luego de la centrifugación a pH 8,0 o 10,0 (después de la extracción de proteínas solubles) y/o solubles en el sobrenadante de la centrifugación a pH 4,5 (después de la precipitación isoeléctrica), por lo tanto, la recuperación de proteínas en los aislados proteicos no fue completa. Asimismo, Peyrano y col. (2016) informaron valores de recuperación proteica similares a los obtenidos en esta tesis para aislados de *Vigna unguiculata* obtenidos a pH 8,0 y 10,0, empleando la misma técnica de extracción. Por otra parte, estos rendimientos están en el rango de los reportados por otros autores que utilizaron métodos de extracción semejantes (Horax y col., 2004, Mwasaru y col., 1999).

Tabla IV.1. Rendimiento de extracción y contenido en proteínas en base seca de aislados proteicos de caupí.

	Proteína (%)	Rendimiento (%)
A8	$81,0 \pm 0,2^a$	58 ± 1^a
A10	81 ± 3^a	63 ± 2^a

Las letras muestran diferencias significativas entre medias de la misma columna con $p<0,05$.

La hidrólisis con alcalasa se utilizó como estrategia para mejorar las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los aislados de proteínas de *V. unguiculata*. La alcalasa es una endoproteasa microbiana no específica, de grado alimentario, ampliamente utilizada para la preparación de hidrolizados de proteínas. Se utilizaron dos relaciones diferentes de alcalasa y proteína para obtener hidrolizados de proteínas de caupí con bajo (LH) o alto (HH) grado de hidrólisis (GH). El valor del GH tiene en cuenta la cantidad de enlaces peptídicos rotos y a menudo se utiliza para describir la extensión de la hidrólisis. Los valores de GH de A8LH, A10LH, A8HH y A10HH que se presentan en la Tabla IV.2, muestran que el pH de extracción influyó significativamente ($p<0,05$) en la proteólisis en los hidrolizados de baja extensión. En A10, como sustrato de partida, las proteínas fueron inicialmente desnaturizadas a un pH mayor de extracción, por lo que probablemente presentaban un mayor número de enlaces peptídicos accesibles a la proteasa, lo que origina que la hidrólisis de estas proteínas sea mayor, comparado al obtenido en la hidrólisis de las proteínas obtenidas a pH 8,0, en bajas concentraciones de alcalasa agregada. Sin embargo, al incrementar la cantidad la enzima pudo atacar todos los sitios disponibles en las secuencias de A8 y A10, independientemente de su grado de desnaturización inicial.

Tabla IV.2. Grado de hidrólisis y longitud promedio de la cadena polipeptídica de proteínas de caupí hidrolizadas con alcalasa.

	GH (%)	LPCP
A8LH	$2,3 \pm 0,2^c$	43
A8HH	26 ± 2^a	4
A10LH	$4,6 \pm 0,4^b$	22
A10HH	24 ± 1^a	4

Las letras muestran diferencias significativas entre medias de la misma columna con $p<0,05$.

Por medio del cálculo de la longitud promedio de las cadenas peptídicas (LPCP) en los hidrolizados se pudo estimar que las cadenas peptídicas producidas por la digestión con alcalasa contienen en promedio 43 aminoácidos en A8LH, 22 aminoácidos en A10LH y 4 aminoácidos en A8HH y A10HH (Adler-Nissen y Olsen, 1979). De esta manera, obtuvimos cuatro opciones de hidrolizados de proteínas con los que se continuó la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

IV.1.2. Caracterización físico-química y estructural de hidrolizados y aislados proteicos

La Figura IV.1 muestra los perfiles de SDS-PAGE de los aislados de proteínas de caupí e hidrolizados obtenidos por digestión con alcalasa. El análisis de la composición de polipéptidos de ambos aislados no mostró diferencias apreciables en condiciones no reductoras (Figura IV.1A). Los perfiles de A8 y A10 mostraron polipéptidos con peso molecular (PM) en el rango de 42-80 kDa, correspondientes a las fracciones α -vignina y β -vignina, y un polipéptido de 20 kDa, correspondiente a la fracción γ -vignina. Estas fracciones corresponden a las globulinas con un coeficiente de sedimentación 7S, conocidas como vicilinas en el caupí (Freitas y col., 2004). Además, se observaron los polipéptidos de 94, 33, 25 y 20 kDa de la fracción de albúmina. Estos resultados son similares a lo informado previamente por Peyrano y col., (2016) para las proteínas de caupí. Por otro lado, A8 y A10 presentaron agregados en la parte superior del gel de separación y otros que no ingresaron al gel concentrador (Figura IV.1A). Por su parte, Segura-Campos y col. (2012) reportaron un perfil electroforético complejo de proteínas con siete bandas características entre 21 y 103 kDa y otra por debajo de 20,7 kDa en un concentrado de proteínas de caupí.

En condiciones reductoras, A8 y A10 no mostraron los polipéptidos de 80 kDa, (Figura IV.1A, flecha 1 y 3) y de 42 kDa (Figura IV.1A, flecha 2 y 4). Se detectaron nuevas bandas correspondientes a un polipéptido de 29 kDa (Figura IV.1A, flecha 5 y 7) y de 19 kDa (Figura IV.1A, flecha 6 y 8). Vasconcelos y col. (2010), reportaron que α -vignina (globulina mayoritaria, no glicosilada, compuesta de una subunidad mayor de 80 kDa) tras la reducción, produce dos polipéptidos de 20 y 60 kDa. Por otra parte, se observó la desaparición de los agregados solubles que no ingresaron al gel en A8 y si bien disminuyó la intensidad de los agregados en A10, estos no desaparecieron. Estos resultados indican que los agregados proteicos estaban estabilizados por puentes disulfuro, sin embargo, su persistencia en A10 indicaría la presencia de otras interacciones (Figura IV.1A). Se ha reportado que el tratamiento a pH alcalinos altos puede conducir a la formación de enlaces covalentes entre cadenas polipeptídicas dentro de una misma proteína (enlaces cruzados intramoleculares) o entre

diferentes proteínas (enlaces cruzados intermoleculares) distintos a los puentes disulfuro, como resultado de la desnaturalización (Gerrard, 2002, Wang y col., 2018).

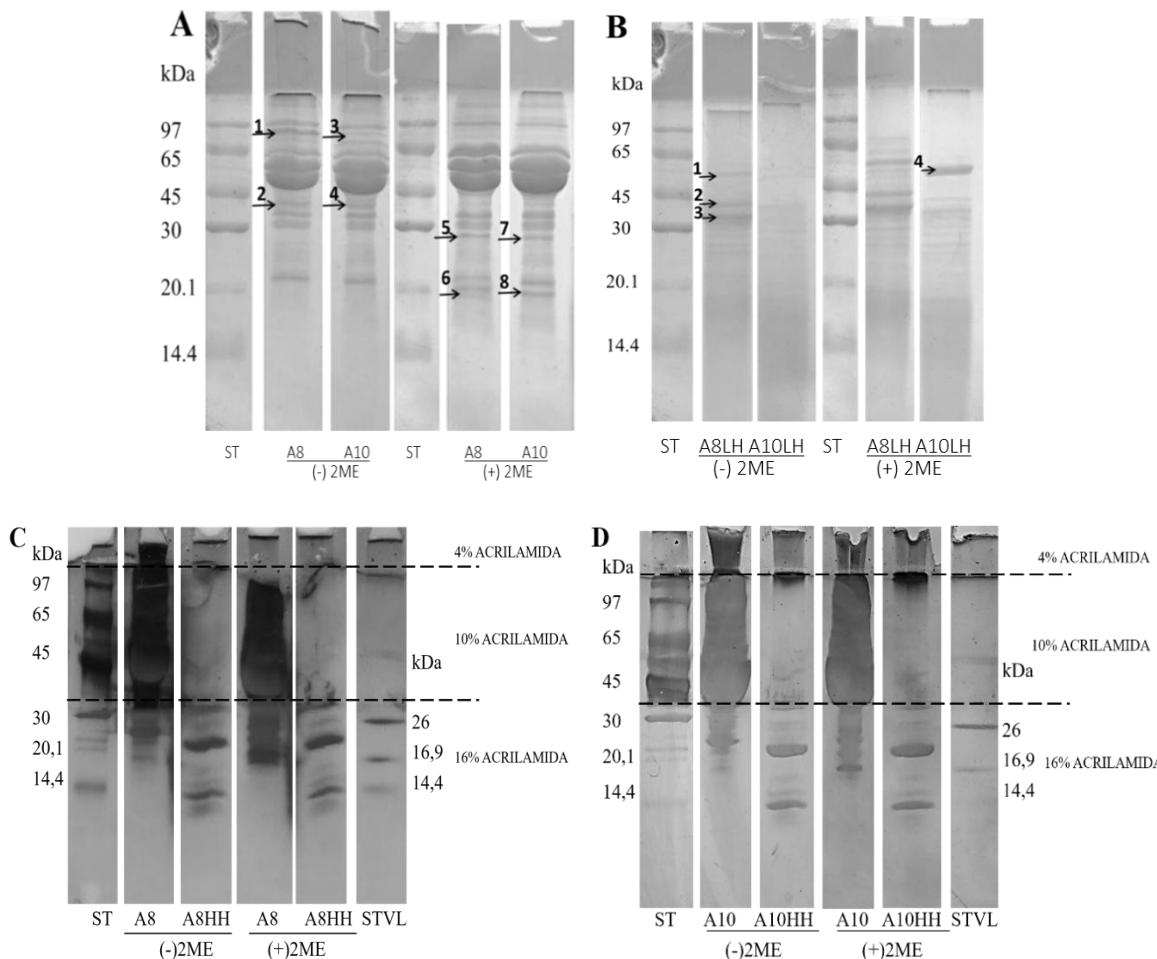


Figura IV.1: Perfil electroforético de aislados proteicos de caupí y sus hidrolizados con alcalasa en condiciones no reductoras y reductoras; A) SDS-PAGE 15% de A8 y A10; B) SDS-PAGE 15% de A8LH y A10LH; C) Tricine-SDS-PAGE 16%/6M urea de A8HH y D) Tricina-SDS-PAGE 16%/6M urea de A10HH. ST: patrón de bajo peso molecular. STVL: patrón de muy bajo peso molecular. Números con flechas: efectos relevantes.

La hidrólisis con alcalasa modificó completamente el perfil electroforético de ambos aislados (Figura IV.1B). El tratamiento con la menor concentración de alcalasa resultó en una disminución significativa de las bandas de polipéptidos por encima de 45 kDa para A8LH y A10LH, y un aumento de los productos de la digestión con PM <20 kDa (Figura IV.1B). En ausencia de 2ME, A8LH mostró bandas más intensas correspondientes a 35, 40 y 55 kDa (Figura IV.1B, flecha 1, 2 y 3) en comparación con A10LH. En condiciones reductoras, A8LH y A10LH también mostraron algunas diferencias en los perfiles de polipéptidos. A10LH exhibió una banda intensa correspondiente a 53 kDa (Figura IV.1B, flecha 4), mientras que

A8LH mostró varias bandas comprendidas entre 45 y 97 kDa. La visualización de agregados solubles con PM >97 kDa en ambos hidrolizados (en condiciones reductoras y no reductoras) podrían ser los agregados solubles presentes en las proteínas de partida A8 y A10 que no fueron hidrolizados por la alcalasa. Además, estos agregados podrían ser consecuencia del proceso de hidrólisis *per se*. Algunos estudios han reportado la formación de agregados luego de la hidrólisis como consecuencia de la digestión con enzimas proteolíticas, como es el caso de la glutamil endoproteasa (Xia y col., 2012; Creusot y Gruppen, 2007). Spellman y col. (2005) informaron que la enzima alcalasa realiza tanto actividad subtilisina como también glutamil endoproteasa. Esta última puede liberar péptidos con ácido glutámico en el extremo C-terminal y generar parches hidrofóbicos en la secuencia, lo que contribuye a la agregación.

Para mejorar la visualización de los péptidos más pequeños, se realizó una electroforesis en gel de tricina-SDS-PAGE 16%/6M urea, ya que permite separar péptidos de baja masa molecular (Figura IV.1C-D). A8HH y A10HH mostraron un perfil de polipéptidos similar (Figura IV.1C-D) en condiciones reductoras y no reductoras. Se observó una desaparición casi completa de las fracciones de vicilina y albúmina y solo la presencia de algunas bandas de hidrólisis, entre 13 y 33 kDa (Figura IV.1C-D). Segura-Campos y col. (2012) informaron más bandas entre 21 y 60 kDa y dos bandas por debajo de 20,7 kDa en hidrolizados de alcalasa de caupí con un GH similar (GH = 23,6%). A pesar de que el grado de hidrólisis fue relativamente alto, se registraron agregados en la parte superior del gel de separación y agregados que no ingresaron al gel concentrador. Es interesante tener presente que los aislados de partida presentan una importante agregación (Figura IV.1A) y que la reacción de hidrólisis se detuvo mediante un tratamiento térmico, lo que podría favorecer esta tendencia. Como se observó para los hidrolizados con bajo GH, A10LH y A8LH, los agregados estabilizados por enlaces covalentes distintos a las uniones disulfuro (formación de isopéptidos) presentes en las proteínas de partida, no serían atacados por la alcalasa.

IV.1.3. Cromatografía de exclusión molecular

A efectos de visualizar los cambios sufridos por las proteínas de caupí como consecuencia de la hidrólisis, se analizaron las variaciones en la masa molecular de las mismas mediante cromatografía de exclusión molecular, que permite separar fracciones proteicas en base a sus tamaños moleculares. Se utilizó una columna Superdex 30, que permite analizar péptidos de masa molecular baja (rango de separación óptima <10 kDa). Para calcular la masa de las especies se utilizó la curva de calibración como se indicó en Materiales y Métodos (III.4.4.).

El efecto de la hidrólisis sobre las proteínas de caupí puede observarse en la Figura IV.2, la cual muestra los perfiles cromatográficos de los aislados y sus hidrolizados. Ambos aislados mostraron seis picos en los cromatogramas respectivos (Figura IV.2A-B). El pico 1_i (en V_0), correspondiente a la elución de partículas con $PM > 10$ kDa, representó la mayor proporción de moléculas en A8 y A10. El pico 2_i (polipéptidos con $PM > 6,5$ kDa) se visualizó como un hombro de 1_i , y se observaron 3 picos minoritarios (3_i a 6_i ; volumen de exclusión mayor a 16 ml) correspondientes a péptidos de $PM < 6,5$ kDa.

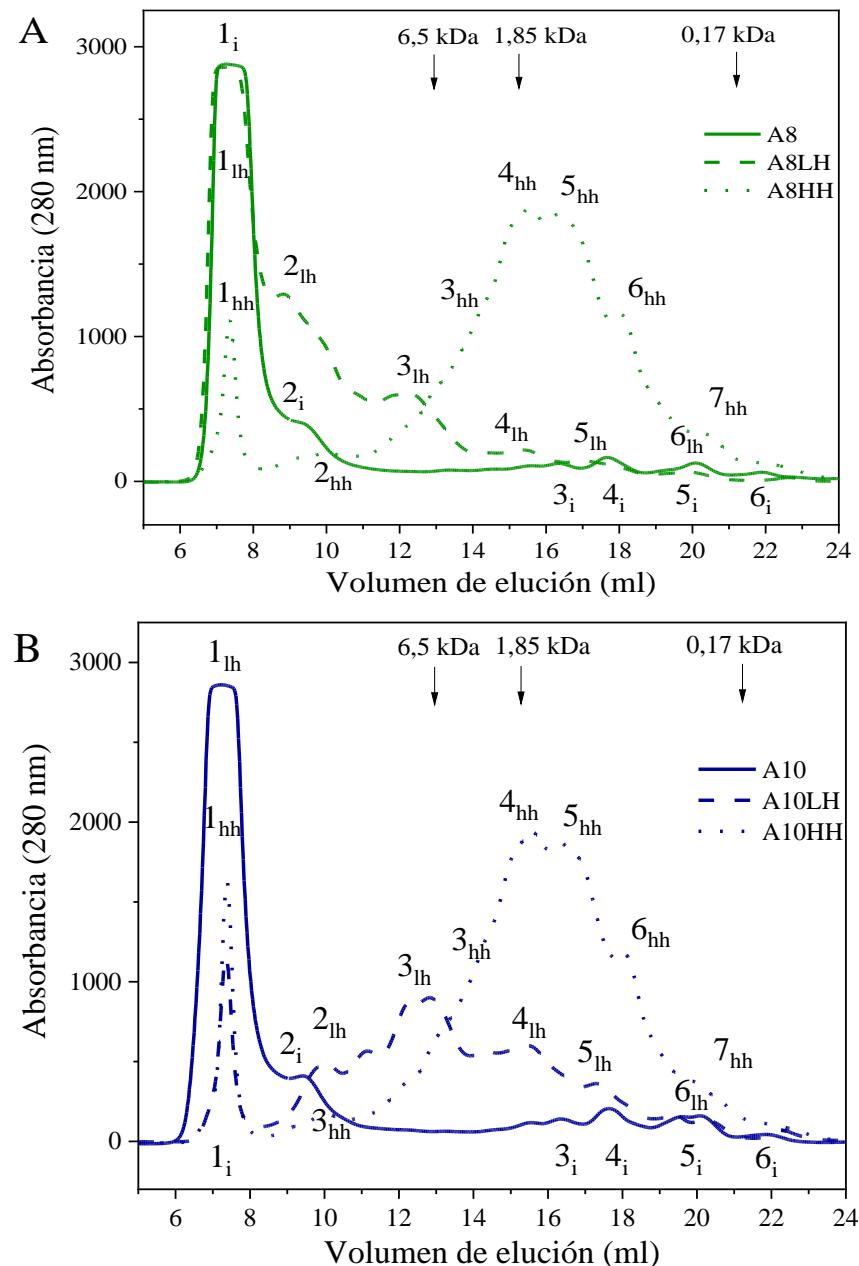


Figura IV.2. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones solubles (10 mg proteína/ml) de aislados proteicos de caupí e hidrolizados con alcalasa. A) A8, A8LH y A8HH. B) A10, A10LH y A10HH.

A efectos de cuantificar los cambios entre las muestras estudiadas se calcularon las áreas porcentuales de los picos. Para ello se calculó el área total encerrada bajo el cromatograma y la correspondiente a cada pico. El tratamiento de los datos se realizó con el programa Origin 8.0, empleando la función *peak analyzer*. La relación entre el área de cada pico y la total se multiplicó por cien. Después de la hidrólisis con la menor concentración de alcalasa, el fraccionamiento de A8LH mostró una disminución del área relativa en el pico 1_{lh} y un aumento considerable del área relativa del pico 2_{lh} (área 45%, moléculas con PM >6,5 kDa). Además, apareció un nuevo pico 3_{lh} con un área relativa de 30% y moléculas con PM entre 3,6 y 8,5 kDa (Figura IV.2A). Por otra parte, también se observaron los picos 4_{lh}, 5_{lh} y 6_{lh} con áreas relativas de menos del 5% y masas moleculares entre 3,4 - 1,1, 1,7-0,39 y 0,39 – 0,1 kDa, respectivamente, que evidenciaron la presencia de polipéptidos con secuencias con menos de 30 aminoácidos.

Por otro lado, el fraccionamiento de A10LH exhibió una mayor reducción del área del pico 1_{lh} con respecto a A10 (polipéptidos con PM >10 kDa), lo que refleja digestión principalmente de las fracciones de vicilina y albúmina por alcalasa (Figura IV.2B), como se observó en el perfil electroforético de la hidrólisis. Se observaron, además, siete picos en el rango de volumen de elución de 8 a 18 ml (2_{lh}-7_{lh}). De estos, el pico principal 4_{lh} (~30% del área total), corresponde a péptidos con un PM alrededor de 6,5 kDa, y el 5_{lh} (~ 25% del área total) corresponde a péptidos con un PM entre 1 y 4 kDa. Estos resultados sugirieron que la hidrólisis limitada con alcalasa, en la menor concentración usada, promovió la producción de péptidos pequeños e intermedios. Sin embargo, comparando los análisis de los cromatogramas y perfiles electroforéticos de A10LH (GH = 4,6%) con A8LH (GH = 2,3%), en este último se obtuvieron péptidos de tamaño un poco mayor que en el primero, debido al menor GH alcanzado.

Aumentar la proporción de alcalasa/proteína para obtener GH >20% indujo el mismo efecto en ambos aislados (Figura IV.2A-B). Como era de esperar, el cambio más evidente observado en ambos hidrolizados HH con respecto a los aislados de proteínas, fue la reducción del pico 1_{hh} (que representa menos del 10% del área total) y un aumento notable de los picos que eluyeron por encima de 12 ml (0,18 - 6,5 kDa). Los picos 4_{hh} de A8HH y A10HH representaron alrededor del 35% del área total y corresponden a péptidos que contienen de 13 a 28 aminoácidos (1,46 - 3,12 kDa) para A8HH y de 13 a 46 residuos de aminoácidos (1,46 - 3,12 kDa) para A10HH; los picos 5_{hh} (~ 27% del área total) correspondieron a péptidos con 6 a 13 residuos de aminoácidos (0,7 - 1,46 kDa). Los picos 6_{hh} (0,3 - 0,7 kDa) contenían un

conjunto de péptidos en el rango de 3 a 7 aminoácidos (~ 15% del área total). Los picos 7_{hh} correspondieron a péptidos de tamaño inferior a 3 residuos de aminoácidos (~ 5% del área total). Tironi y Añón (2010) observaron perfiles cromatográficos similares cuando caracterizaron aislados de proteínas del pseudocereal amaranto y sus hidrolizados de alcalasa preparados de manera similar a los de este trabajo utilizando cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex 30), principalmente en cuanto a que el hidrolizado de bajo grado de hidrólisis presentó polipéptidos con PM >6,5 kDa, aunque en menor proporción que los correspondientes al aislado y péptidos de PM muy bajo resultantes de la reacción de hidrólisis, mientras que el hidrolizado de alto grado de hidrólisis presentó una hidrólisis casi total de especies con PM >6,5 kDa y estaba constituido por una proporción muy alta de péptidos con PM <0,5 kDa (aproximadamente el 47% de la masa total de proteínas), incluida una presencia significativa (2,6%) de moléculas de masa molecular muy baja (<0,25 kDa).

IV.1.4. Perfil de solubilidad de proteínas en función del pH

Con el fin de estudiar el posible uso de los hidrolizados de bajo GH para mejorar las propiedades tecno-funcionales de los alimentos, se evaluó la solubilidad de las proteínas en función del pH. A8 y A10 mostraron perfiles de solubilidad similares, evidenciando los valores más altos en el rango de pH entre 2,0 y 3,0, y los valores más bajos cerca del punto isoeléctrico de las proteínas del caupí (rango de pH entre 3,5 y 5,5) (Figura IV.3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Horax y col. (2004) que estudiaron la solubilidad en función del pH de proteínas de aislados proteicos de caupí obtenidas a pH 8 cuyo perfil de solubilidad proteica vs pH mostró una curva en forma de "u" en la que los aislados tenían los valores de solubilidad más altos a pH alcalino y en el rango de pH entre 2,0 y 3,0, y los más bajos a pH entre 3,5 y 5,5. El cambio de pH modifica la carga de la proteína y por lo tanto el balance electrostático. En el lado alcalino o ácido del punto isoeléctrico las proteínas tienen una carga neta, ya sea negativa o positiva que origina fuerzas repulsivas que causan un incremento de las interacciones proteína-solvente y por ende de la solubilidad. En el punto isoeléctrico la carga neta es cero y las moléculas pueden agregarse ya que predominan las fuerzas atractivas, causando un mínimo de solubilidad (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979). A8LH e A10LH aumentaron la solubilidad en el área cercana al punto isoeléctrico, mientras que a pH <3,0 y pH >5,0, no alcanzaron la solubilidad de los aislados. Segura-Campos y col. (2012) encontraron un comportamiento de solubilidad dependiente de la enzima y del pH cuando estudiaron la hidrólisis de proteínas de caupí mediante la digestión con alcalasa. Informaron que la solubilidad de las proteínas en los hidrolizados de alcalasa (GH = 23,6%) aumentó un

34,4% cerca del punto isoeléctrico, sin diferencias significativas en el resto del rango de pH estudiado.

Se sabe que la menor carga/carga nula a pH isoeléctrico permite que las proteínas formen agregados con la consecuente disminución en la solubilidad. La hidrólisis de proteínas disminuye el tamaño de los péptidos y expone grupos hidrofílicos, que ahora pueden ser solvatados y podrían contribuir a una mayor solubilidad de los hidrolizados cerca del pH isoeléctrico de las proteínas. Además, también podría ocurrir una mayor exposición de grupos hidrofóbicos y, como consecuencia, de interacciones hidrofóbicas que podrían contribuir a la disminución de la solubilidad en otros pHs. Orsini Delgado (2015), reportó para muestras de amaranto que la generación de péptidos/oligopéptidos de menor peso molecular producto de la hidrólisis con alcalasa de proteínas de caupí incrementó la solubilidad de los hidrolizados a pH = 8; sin embargo, a pH = 2 ocurrió lo contrario, explicando este comportamiento por la posible liberación de péptidos hidrofóbicos durante la hidrólisis, capaces de interaccionar entre ellos y formar agregados insolubles, estabilizados por interacciones hidrofóbicas.

En esta tesis, no se realizó el estudio de solubilidad de hidrolizados de alto GH, ya que el interés está focalizado en sus propiedades bioactivas. Sin embargo, cabe destacar que numerosos reportes han indicado que la hidrólisis extensiva de proteínas vegetales conduce al incremento de la solubilidad del hidrolizado cerca del punto isoeléctrico (pI) en comparación con la proteína no hidrolizada (Islam y col., 2020; Dent y col., 2023; Xu y col., 2020).

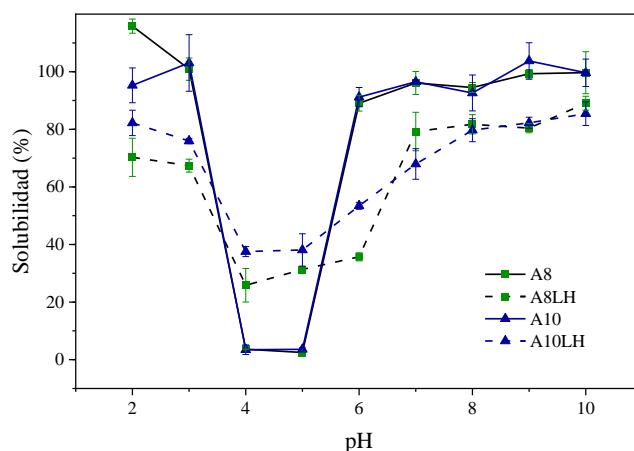


Figura IV.3. Perfil de solubilidad en función del pH de aislados proteicos de caupí e hidrolizados con alcalasa.

IV.1.5. Espectroscopia infrarroja

El espectro de absorción IR de proteínas se caracteriza por la presencia de regiones de banda amida I (vibración o estiramiento del enlace C=O acoplado al aleteo del H, 1600-1700 cm⁻¹), amida II (1600-1500 cm⁻¹) y cerca de 1406 cm⁻¹ (correspondiente al estiramiento simétrico de los carboxilatos libres) (Barth, 2007). La sensibilidad de la banda amida I a cambios conformacionales hace posible estudiar no solo la desnaturalización o renaturalización de las proteínas sino también los procesos de agregación (Carbonaro y col., 2012).

En la banda amida I predominan las conformaciones hoja plegada β (1620-1640 cm⁻¹), la estructura desordenada (1640-1650 cm⁻¹), α -hélice (1650-1660 cm⁻¹) y giros- β (1660-1680 cm⁻¹) (Fabian y Mäntele, 2006; Kong y Yu, 2007). Se observan también señales de hebras β en estructuras agregadas (1618 cm⁻¹ y 1685 cm⁻¹) (Achouri y col., 2012; Fabian y Mäntele, 2006). La deconvolución de bandas Gaussianas/Lorentzianas en la regiónpectral de la amida I se utiliza para obtener información cuantitativa sobre las estructuras secundarias ya que, las áreas de las bandas asignadas de amida I en los espectros de la segunda derivada, corresponden de manera lineal a la cantidad de los diferentes tipos de estructuras secundarias presentes en la proteína.

En esta tesis se pudo demostrar que A8 y A10 exhibieron una estructura secundaria ordenada con una mayor proporción del pico con un máximo alrededor de 1636,1 cm⁻¹, que corresponde a la banda de estructura intramolecular de hoja plegada β (Figura IV.4A-B, Tabla IV.3). El contenido de estructura secundaria de hoja plegada β fue significativamente mayor que otras estructuras secundarias reportadas en estudios anteriores (Mune Mune y Sogi, 2016). A8 mostró un mayor contenido de hoja plegada β y menores contenidos de α -hélice y giros- β en comparación con A10 ($p<0,05$), lo que indica que las estructuras secundarias de A8 y A10 son significativamente diferentes (Tabla IV.3).

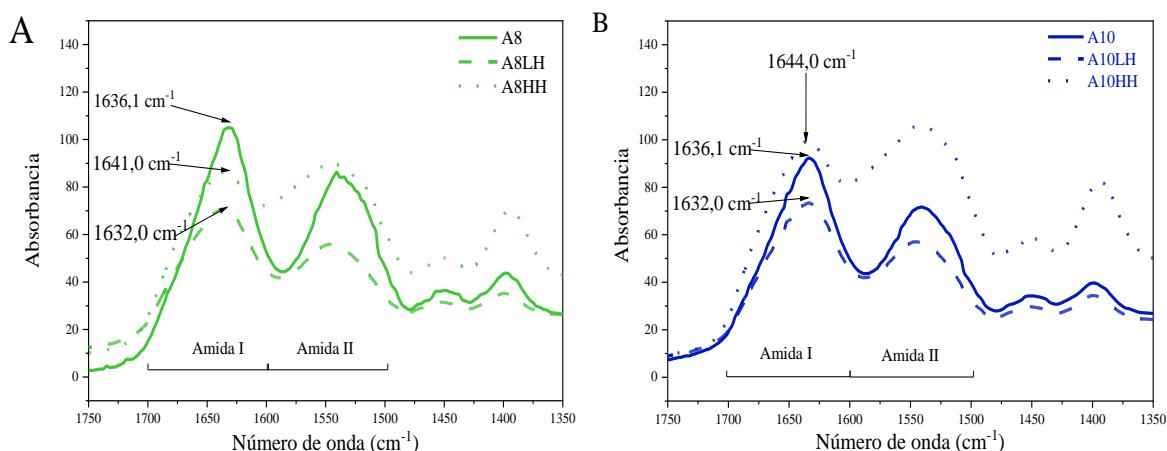


Figura IV.4. Espectros de absorción FTIR entre 1750–1350 cm^{-1} de aislados proteicos de caupí e hidrolizados con alcalasa. A) A8, A8LH y A8HH. B) A10, A10LH y A10HH.

Se registraron algunas diferencias entre los espectros de absorción IR de los aislados e hidrolizados LH. A8LH mantuvo la mayor proporción del pico correspondiente a la banda de 1636,1 cm^{-1} correspondiente a la estructura intramolecular de lámina β (Figura IV.4A). A10LH mostró un pico de máximo en el número de onda de 1632 cm^{-1} (estructura intramolecular de lámina β) (Figura IV.4B). Además, el proceso de hidrólisis disminuyó significativamente ($p<0,05$) la proporción de lámina β y aumentó las estructuras de α -hélice y giros β en A8LH (Tabla IV.3). Sin embargo, A10LH mostró incrementos en las estructuras de lámina β y giros β , pero un menor contenido de α -hélices y estructuras desordenadas en comparación con A10. Zhao y col. (2013) informaron que la hidrólisis de proteínas de soja (GH = 5%) desplazó la banda de amida I de 1635 cm^{-1} (estructura intramolecular de lámina β) a 1643-1645 cm^{-1} (estructuras desordenadas) y también causó una pérdida pronunciada de estructuras ordenadas, especialmente α -hélices.

La hidrólisis extensiva indujo un desplazamiento del número de onda de la banda de amida I a la frecuencia característica de las estructuras desordenadas (1641 cm^{-1} y 1644 cm^{-1} para A8HH e A10HH, respectivamente) (Figura IV.4A-B), aumentó el contenido de giros β y redujo la lámina β y α -hélices en comparación con los aislados sin hidrolizar (Tabla IV.3). Xu y col. (2019) observaron que la hidrólisis del aislado de proteína de garbanzo utilizando alcalasa (GH = 25%) y flavourzyme (GH = 11,9%) cambió apreciablemente la estructura secundaria de la proteína disminuyendo las estructuras ordenadas (lámina β y α -hélice) y aumentando las estructuras de giros β .

Tabla IV.3. Composición de la estructura secundaria de aislados proteicos de caupí e hidrolizados con alcalasa.

	Hoja plegada β	α-hélice	Estructura desordenada	Giros-β
A8	51,61 ± 0,04 ^a	13,7 ± 0,1 ^b	18,5 ± 0,1 ^a	16,23 ± 0,02 ^e
A8LH	44,6 ± 0,1 ^d	15,16 ± 0,03 ^a	17,00 ± 0,03 ^b	23 ± 0,1 ^b
A8HH	46 ± 2 ^c	13,2 ± 0,4 ^b	12 ± 2 ^e	29 ± 1 ^a
A10	48 ± 1 ^b	14,9 ± 0,1 ^a	18,3 ± 0,3 ^a	19 ± 1 ^d
A10LH	51 ± 1 ^a	13,3 ± 0,7 ^b	13,2 ± 0,3 ^d	22 ± 1 ^c
A10HH	43 ± 1 ^e	13 ± 1 ^b	15 ± 1 ^c	28 ± 1 ^a

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

IV.1.6. Fluorescencia intrínseca

La conformación terciaria de los aislados proteicos de caupí y sus hidrolizados con alcalasa, se estudió mediante espectroscopía de fluorescencia de emisión intrínseca (IF). Esta medida está influenciada por la polaridad del entorno que rodea a los residuos de aminoácidos aromáticos, principalmente el triptófano, y proporciona información sobre cambios conformacionales en las proteínas (Lakowicz, 1983). Los residuos de triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) son los fluoróforos intrínsecos de las proteínas, donde los primeros son los de mayor rendimiento cuántico y su espectro de emisión responde a la polaridad de su entorno (Lakowitz, 2006). El corrimiento del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) hacia el rojo ocurre cuando el microambiente que rodea a los residuos de Trp cambia de no polar a polar y la exposición de estos residuos al solvente es mayor (Chatterjee y Mandal, 2003).

A8 y A10 exhibieron una longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}) en buffer fosfato a 337,5 nm (Figura IV.5A-B), que está cerca de la λ_{max} de los residuos de triptófano (348 nm; en agua) (Lakowicz, 1983). Los valores de intensidad de fluorescencia (FI) fueron significativamente diferentes ($p<0,05$) para A8 e A10 (480000 ± 1150 y 446000 ± 1020 FI/mg/ml, respectivamente).

A8LH no presentó cambios significativos ($p>0,05$) en la λ_{max} , sin embargo, A8HH mostró un corrimiento hacia el rojo a 350,9 nm en comparación con A8 (Figura IV.5A). El corrimiento hacia el rojo en λ_{max} se atribuye a la hidrólisis, así como al alto grado de desnaturalización de la proteína y la exposición de los residuos de Trp en un entorno más polar

(Peyrano y col., 2016). Del mismo modo, los valores de IF de A8LH e A8HH disminuyeron significativamente ($p<0,05$) (347000 ± 1040 y 204000 ± 792 FI/mg/ml, respectivamente) en comparación con el valor correspondiente al aislado sin hidrolizar. Cuando las proteínas tienen una estructura terciaria estable, la intensidad de fluorescencia es alta. La presencia de péptidos de tamaño molecular más pequeños y más flexibles en los hidrolizados, favorece el aumento de colisiones (entre dichos péptidos y las moléculas de solvente) que desexcitan una alta proporción de los fluoróforos proteicos (a través de rutas no radiativas) y, conduce a valores más bajos de IF (Santos, 2009).

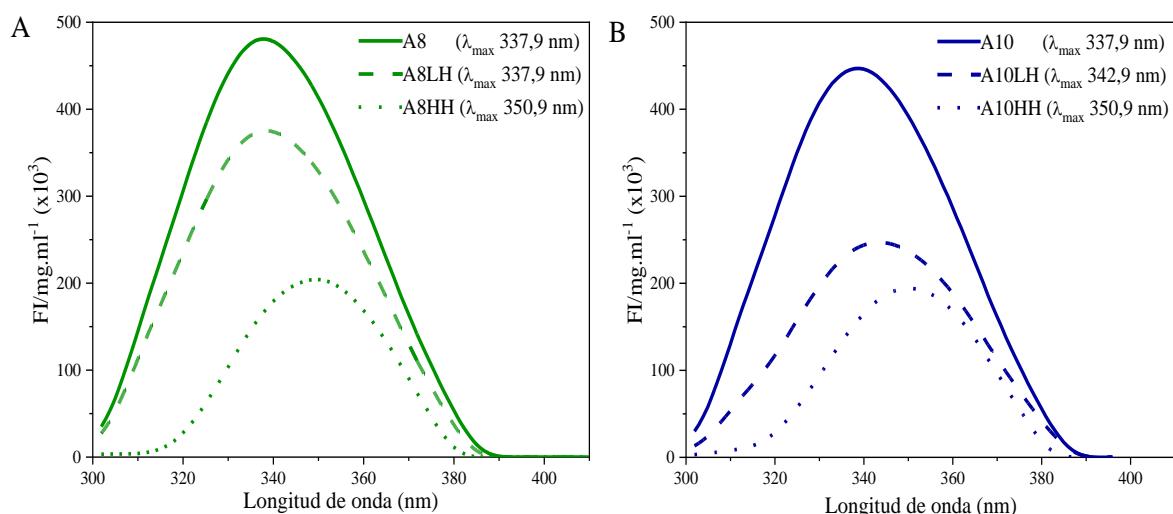


Figura IV.5. Espectros de fluorescencia intrínseca (FI/mg/ml) de aislados proteicos de caupí e hidrolizados con alcalasa normalizados a 1 mg/ml, con excitación a 280 nm. A) A8, A8LH y A8HH. B) A10, A10LH y A10HH.

A10LH e A10HH mostraron diferencias significativas ($p<0,05$) en λ_{\max} y en los valores de IF en comparación con A10 (Figura IV.5B). Ambos hidrolizados exhibieron corrimiento hacia el rojo en la λ_{\max} , lo que indica un aumento en la exposición del triptófano al entorno, y el cual estuvo influenciado por el GH (342,9 nm para A10LH y 349,9 nm para A10HH). También se observó una disminución en los valores de IF (247000 ± 616 y 194000 ± 506 FI/mg/ml para A10LH e A10HH, respectivamente) en comparación con el valor correspondiente al aislado sin hidrolizar.

Del análisis de estos resultados, se pueden destacar algunas diferencias entre ambos aislados LH. A8LH e A10LH mostraron valores de IF más bajos que los aislados respectivos (27% y 44%, respectivamente), lo que nuevamente indica que A10 fue más susceptible que A8 a la acción de la proteasa. La alta concentración de OH^- durante la extracción de proteínas

en A10, probablemente modificó el microentorno de los triptófanos, lo que condujo a cambios conformacionales en las proteínas con un subsiguiente aumento de la extinción de fluorescencia de los triptófanos expuestos. En condiciones de un alto grado de hidrólisis, ambos hidrolizados HH mostraron valores de IF un 57% más bajos que los aislados respectivos, lo que indica que la conformación de las proteínas en los aislados no tuvo influencia en los hidrolizados obtenidos bajo estas condiciones.

IV.1.7. Hidrofobicidad Superficial

La hidrofobicidad superficial (H_0) es una propiedad estructural de las proteínas que se relaciona con sus propiedades tecno-funcionales (solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes), su biodisponibilidad y calidad nutricional. En general, la concentración de aminoácidos hidrofóbicos es elevada en proteínas de legumbres, y su presencia en la superficie también, sobre todo en comparación con proteínas animales. Esto juega un papel importante en la estabilidad de las proteínas y puede disminuir su susceptibilidad a la proteólisis (Carbonaro y col., 2015). El valor de H_0 refleja la cantidad de grupos apolares en la superficie de la proteína en contacto con el entorno acuoso polar (Cardamone y Puri, 1992). Por otro lado, la hidrólisis enzimática podría producir cambios en H_0 y, de esta manera, influir en las propiedades interfaciales de los hidrolizados. La proteólisis puede dar como resultado un aumento o disminución de H_0 , debido a la exposición de grupos hidrofóbicos que están plegados dentro de la estructura nativa de las proteínas (Liu y col. 2010).

En esta tesis se observó que los aislados A8 y A10 mostraron valores similares de H_0 de 4908 ± 305 y 3832 ± 581 , respectivamente. El valor de H_0 para A8LH (14141 ± 1031) fue significativamente ($p<0,05$) mayor que para A8, lo que sugiere que la hidrólisis enzimática provocó la exposición de grupos hidrofóbicos que inicialmente estaban ubicados dentro de la proteína. Evangelho y col. (2017) informaron que los hidrolizados de proteína de frijol negro digeridos con alcalasa mostraron un H_0 más alto en comparación con los obtenidos por la digestión con pepsina. Los valores más altos de IF de la sonda ANS unida a superficies hidrofóbicas expuestas en los hidrolizados de alcalasa pueden deberse a la especificidad del sitio de corte de esta proteasa, que hidroliza enlaces peptídicos que contienen residuos hidrofóbicos en el lado carboxilo. Sin embargo, la hidrólisis no causó diferencias significativas ($p>0,05$) en el valor de H_0 de A10LH (3185 ± 208), en comparación con A10. La presencia de grupos hidrofóbicos dentro de los agregados proteicos presentes en A10LH (Figura IV.1B) puede impedir la interacción entre el ANS y las regiones hidrofóbicas (Fernandez-Sosa y col., 2021; Alizadeh-Pasdar y Li-Chan, 2000).

En condiciones de alto grado de hidrólisis, los valores de H_0 de A8HH y A10HH fueron muy bajos y no se pueden determinar con precisión, lo que indica la desaparición de bolsas hidrofóbicas. Estos resultados concuerdan con los de la espectroscopía de fluorescencia, en la que A8HH y A10HH mostraron valores más altos de λ_{max} que A8 y A10, lo que demuestra que los residuos de triptófano están inmersos en un entorno más polar. Un bajo valor de H_0 sugiere que los péptidos pequeños presentes en los hidrolizados con alta concentración de alcalasa, tendrían disponibles menos sitios de unión hidrofóbicos para la sonda ANS o que dichos sitios de unión se modificaron durante la hidrólisis (Muhamyankaka y col. 2013).

IV.2. Actividad antioxidante

Las moléculas antioxidantes pueden reaccionar mediante múltiples mecanismos, por lo que es importante evaluar la actividad antioxidante de las proteínas de caupí y sus hidrolizados mediante diferentes métodos. Para determinar el potencial antioxidante, se utilizaron tres metodologías: secuestro del catión radical ABTS^{•+} y los métodos ORAC y HORAC.

En primer lugar, se realizó la preparación de las fracciones solubles de las muestras a fin de enfrentarlas con la solución del catión radical ABTS^{•+}. Utilizando las condiciones seleccionadas de solubilización, se evaluó la concentración de proteínas en las fracciones solubles obtenidas a partir de cada una de las muestras liofilizadas (aislados/hidrolizados) en suspensiones (10 mg/ml) en buffer fosfato 35 mM pH 7,8. El contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry y se determinó la solubilidad para cada una de ellos (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Concentración proteica de las fracciones solubles de aislados/hidrolizados en buffer fosfato 35 mM pH 7,8.

	Proteína (mg/ml)	Solubilidad (%)
A8	$8,7 \pm 0,3^a$	81 ± 3^b
A8 LH	8 ± 1^b	92 ± 2^a
A8 HH	7 ± 1^c	80 ± 2^b
A10	9 ± 1^a	$75,1 \pm 0,3^b$
A10 LH	8 ± 1^b	76 ± 1^b
A10 HH	$6,1 \pm 0,7^c$	80 ± 7^b

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

A partir de cada fracción soluble se prepararon cuatro diluciones a fin de ensayar la respuesta de actividad antioxidante de las muestras referidas a la concentración. El método de decoloración de ABTS⁺ mide la capacidad de los compuestos para eliminar el radical catión preformado (Re y col., 1999) y se registra espectrofotométricamente.

Para determinar el tiempo del punto final de la reacción, se enfrentaron las muestras al ABTS⁺ y se determinó la absorbancia en función del tiempo (entre t = 0 y t = 10 min), observándose que si bien las distintas muestras presentaban inicialmente diferentes velocidades de reacción, en todos los casos, los valores de absorbancia se estabilizaban a partir de los 9 min; por ello, se decidió trabajar con los valores de absorbancia en el punto final (10 min), asegurando alcanzar la máxima decoloración.

Luego, con dichos valores de absorbancia, se calculó el % de secuestro del radical catión para cada dilución de cada muestra y se graficó en función de la concentración proteica. Todas las muestras ensayadas mostraron una actividad dependiente de la dosis (Fig. IV.6A-B), con ajuste logarítmico excepto en el caso de los aislados A8 y A10 cuyo mejor ajuste fue lineal. Los valores de IC₅₀ de todas las muestras se calcularon utilizando los parámetros de regresión (Tabla IV.5). A mayor valor de IC₅₀ menos potente será la muestra como antioxidante, ya que se requiere una concentración mayor de péptidos/proteínas para poder lograr el mismo efecto inhibitorio (50%).

Las proteínas de caupí no hidrolizadas, A8 y A10, mostraron una baja actividad de eliminación de ABTS⁺ (<20% con una respuesta lineal para concentraciones de hasta 9,6 mg de proteína/ml), lo que no permitió calcular los valores de IC₅₀ (Figura IV.6 A-B). El efecto de la hidrólisis con alcalasa en la actividad antioxidante de las proteínas de caupí fue similar para ambos aislados. Se observó un comportamiento logarítmico tanto en hidrolizados de bajo como de alto grado de hidrólisis (Fig. IV.6 A-B). A8LH y A10LH alcanzaron valores de actividad de eliminación de ABTS⁺ similares ($p>0,05$) (Tabla IV.5). Sin embargo, en condiciones de alto grado de hidrólisis, se produjeron incrementos diferentes en la actividad antioxidante de cada hidrolizado ($p<0,05$). Los valores de IC₅₀ fueron 1,5 y 1,9 veces más bajos cuando se compararon A8HH y A10HH con sus respectivos hidrolizados LH (Tabla IV.5). Este aumento en los IC₅₀ es probablemente debido a que durante la hidrólisis enzimática se liberaron péptidos con capacidad antioxidante que estaban inactivos cuando formaban parte de la estructura nativa de las proteínas intactas. Lo que indicaría una mayor accesibilidad de los péptidos pequeños al radical ABTS⁺ debido a la disminución de la longitud de la cadena y mayor exposición de los aminoácidos dadores de electrones.

Los datos bibliográficos referidos a esta actividad antioxidante de proteínas de caupí concuerdan con los resultados hallados en esta tesis. Segura-Campos y col. (2012) informaron que los concentrados de proteína de caupí no tenían acción antioxidante, mientras que los hidrolizados con alcalasa (GH = 53%) mostraban actividad medida por el ensayo de ABTS (14,7 mM de Trolox/mg de muestra). Además, un hidrolizado con alcalasa de *Vigna radiata* (GH = 28,81%) mostró valores de IC₅₀ de $67 \pm 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la eliminación de ABTS^{•+} (Guerra y col., 2017). Nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Tironi y Añón (2010) para hidrolizados de proteína de amaranto con alcalasa, quienes demostraron un efecto positivo de la hidrólisis de proteínas en la capacidad de eliminación de radicales, particularmente de aquellos péptidos obtenidos por hidrólisis extensiva, con un IC₅₀ de 92,8 µg de proteína reportado para el aislado proteico y un aumento de la actividad de 1,2 y 3,3 veces para los hidrolizados de bajo y alto grado de hidrólisis, respectivamente.

Tabla IV.5. Valores de IC₅₀ (ensayos ABTS, ORAC y HORAC) para las proteínas de caupí y los hidrolizados con alcalasa.

	ABTS	ORAC	HORAC
	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
A8	ND	$0,16 \pm 0,01^{\text{a}}$	ND
A8LH	$5,8 \pm 0,2^{\text{a}}$	$0,06 \pm 0,01^{\text{b}}$	$4,2 \pm 0,4^{\text{a}}$
A8HH	$3,8 \pm 0,5^{\text{b}}$	$0,03 \pm 0,01^{\text{c}}$	$2,2 \pm 0,1^{\text{b}}$
A10	ND	$0,15 \pm 0,01^{\text{a}}$	ND
A10LH	$6,3 \pm 0,5^{\text{a}}$	$0,05 \pm 0,01^{\text{b}}$	$4,2 \pm 0,1^{\text{a}}$
A10HH	$3,3 \pm 0,1^{\text{c}}$	$0,03 \pm 0,01^{\text{c}}$	$2,08 \pm 0,02^{\text{d}}$

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

El ensayo ORAC permitió evaluar directamente la capacidad antioxidante de compuestos que actúan interrumriendo la cadena de reacciones de radicales peroxilo (*hydrophilic chain-breaking*) a través de la donación de un átomo de H (Ou y col., 2001). A10 se ajustó a un modelo de regresión lineal hasta una concentración de proteína de 0,3 mg/ml, mientras que A8 y las muestras de hidrolizados con alcalasa se ajustaron a una curva de regresión logarítmica (Fig. IV.6. C-D), mostrando una concentración de saturación, a partir de la cual el efecto interruptor de la cadena radicalaria no aumenta con el incremento de la concentración proteica. La digestión con alcalasa aumentó la capacidad de eliminación de

peroxilos de las muestras (Tabla IV.5). Los valores de IC₅₀ fueron 3 y 6 veces más bajos para las muestras LH y HH, respectivamente, en comparación con los correspondientes aislados A8 y A10. Estos resultados resaltan la eficiencia de los hidrolizados de caupí con bajo y alto GH como eliminadores de peroxilos. Orsini Delgado y col. (2015) informaron que para las proteínas de amaranto hidrolizadas con alcalasa (GH = 29,2%), los valores de IC₅₀ fueron 5 veces más bajos que los aislados respectivos. Para otras leguminosas como *Erythrina edulis* (chachafruto), Inquilla y col. (2018) demostraron que la hidrólisis de proteínas con alcalasa (GH = 37%) aumentó los valores de ORAC de $0,79 \pm 0,06 \mu\text{mol}$ de equivalente de Trolox/mg de péptido (proteína no hidrolizada) a $2,83 \pm 0,07 \mu\text{mol}$ de equivalente de Trolox/mg de péptido, un incremento de más de 3 veces en la actividad antioxidante de ORAC.

El método HORAC evalúa la capacidad para prevenir la formación de radicales hidroxilos por compuestos que pueden quelar metales (Ou y col., 2002). La actividad HORAC mostró valores inferiores al 20% de inhibición para ambos aislados A8 y A10 (comportamiento lineal para concentraciones de hasta 6 mg/ml), lo que no permitió calcular los valores de IC₅₀ (Fig. IV.6E-F). La hidrólisis condujo a un aumento en la actividad HORAC (Fig. 6E-F). A8LH y A10LH mostraron valores de IC₅₀ similares ($p>0,05$) (Tabla IV.5). Los valores de IC₅₀ para A8HH y A10HH fueron similares y aproximadamente 2 veces más bajos que los de sus respectivos hidrolizados LH (Tabla IV.5).

En la bibliografía consultada durante el desarrollo de esta tesis, no se encontraron reportes de actividad antioxidante medido por HORAC de hidrolizados de porotos. Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Cipollone y Tironi (2020) para proteínas de arvejas amarillas (*Pisum sativum*) y sus hidrolizados (GH = 33-35%), que mostraron un aumento significativo de la actividad antioxidante, entre 2 y 3 veces para HORAC y 4-5 veces para el ensayo ORAC, pero realizando la hidrólisis por digestión gastrointestinal simulada.

Se ha informado que el aumento en la actividad antioxidante de las proteínas hidrolizadas se debe a la exposición de aminoácidos antioxidantes (Yang y col., 2019). En las proteínas de caupí, la digestión por alcalasa incrementó la capacidad de quelación de metales y la actividad de eliminación de radicales libres, debido a la exposición de aminoácidos antioxidantes generados por la hidrólisis. Esto constituye un conocimiento importante para usos futuros en la industria.

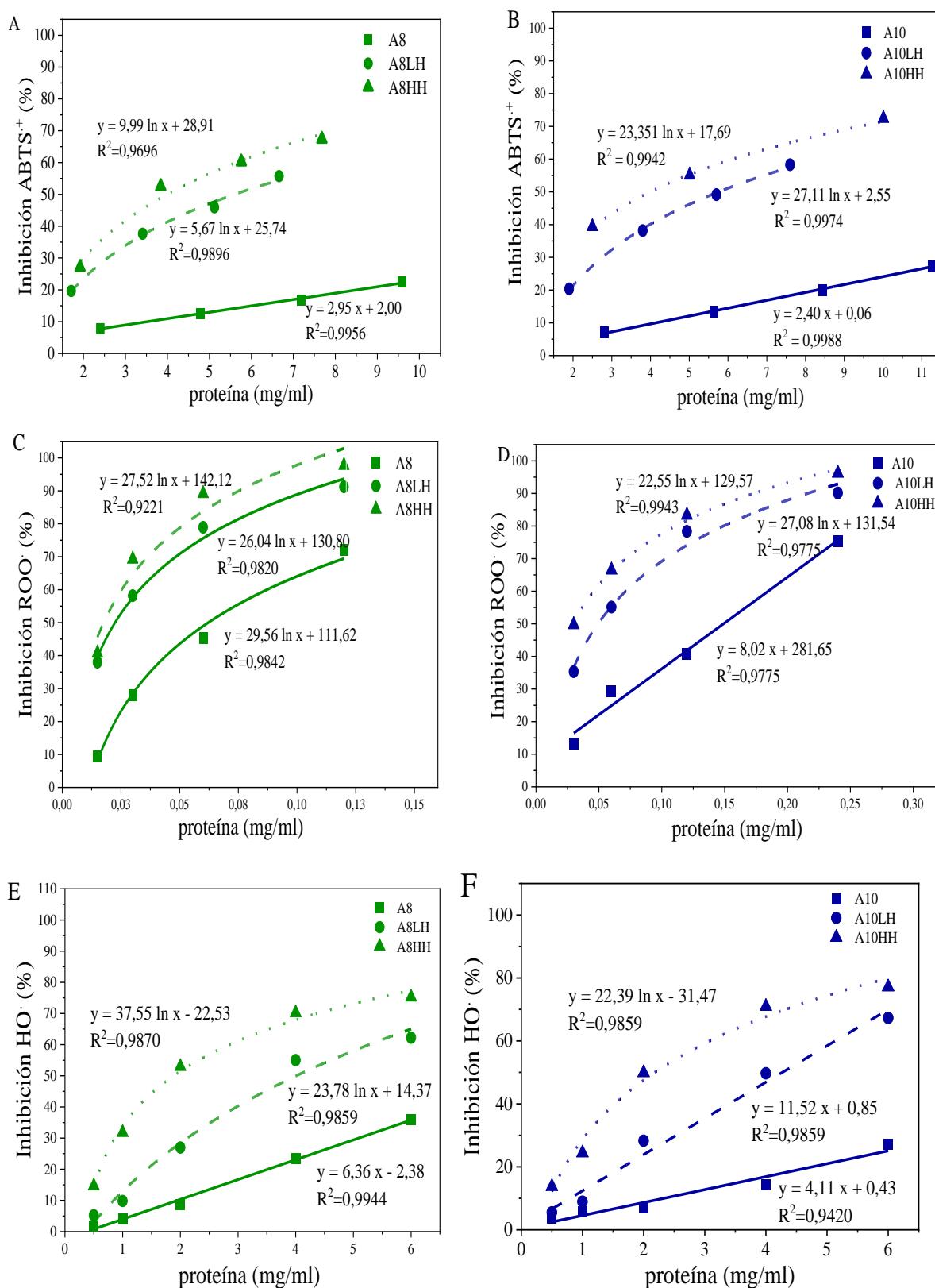


Figura IV.6. Porcentaje de inhibición en función de la concentración de proteínas para: A8, A8LH, A8HH, A10, A10LH y A10HH. A y B: ABTS⁺; C y D: ORAC; E y F: HORAC.

A fin de comenzar a analizar qué componentes eran los que presentaban mayor actividad, a partir de cada muestra de aislado e hidrolizados, se recolectaron fracciones de diferentes rangos de peso molecular correspondientes a los picos de los cromatogramas de exclusión molecular (Fig. IV.2A-B) y se les midió actividad antioxidante mediante el ensayo ORAC. Se realizó una primera selección de fracciones, descartando aquellas que presentaron valores bajos de actividad ORAC (Tabla IV.4). Los valores de IC₅₀ de las fracciones con alta actividad (>80% de eliminación) se obtuvieron a partir de las curvas dosis-respuesta correspondientes (curvas ajustadas a una relación logarítmica, datos no mostrados).

Las fracciones correspondientes al pico 4_{hh} de A8HH y al pico 5_{hh} de A10HH mostraron la mayor actividad antioxidante (Tabla IV.6). El valor de IC₅₀ para la fracción 4_{hh} de A8HH fue 12 veces menor que el obtenido para la muestra A8HH (IC₅₀ = 0,025 mg/ml, Tabla IV.5), mientras que el valor para la fracción 5_{hh} de A10HH fue cuatro veces menor que los obtenidos para A10HH (IC₅₀ = 0,030 mg/ml, Tabla IV.5). La fracción 4_{hh} de A8HH comprende péptidos con 13 a 28 residuos de aminoácidos (entre 1,46 y 3,12 kDa), y la fracción 5_{hh} de A10HH péptidos con 6 a 13 residuos de aminoácidos (entre 0,63 y 1,44 kDa), como se muestra en los cromatogramas de FPLC (Fig. IV.2). La mayor actividad antioxidante de estas fracciones podría atribuirse tanto al tamaño como a la composición de aminoácidos, secuencia y características estructurales (Samardi y col., 2010).

Osegura-Toledo y col. (2015) han demostrado que las fracciones con masas moleculares entre 3-5 y 5-10 kDa provenientes de las proteínas de frijol *Phaseolus vulgaris* hidrolizadas con alcalasa (GH = 50%) exhibieron las actividades antioxidantes ORAC más altas, alcanzando valores de 850 ± 4 mmol de equivalente de Trolox/g en comparación con el hidrolizado no fraccionado (327 ± 2 mmol de equivalente de Trolox/g; 2,6 veces mayor que el hidrolizado no fraccionado). Además, las proteínas de lino (*Linum usitatissimum*) hidrolizadas por alcalasa (GH = 17,2%) también mostraron una alta actividad antioxidante ORAC ($0,93 \pm 0,04$ µmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (Silva y col., 2016). En este último estudio, la fracción con la mayor actividad antioxidante ORAC ($3,6 \pm 0,1$ µmol de equivalente de Trolox/mg de proteína; 3,6 veces mayor que el hidrolizado no fraccionado) correspondía a péptidos de tamaño pequeño (masas moleculares <1,5 kDa), como un péptido de 13 aminoácidos identificado con la secuencia GFPGRLDHWCASE (Silva y col., 2016).

Tabla IV.6. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de aislados e hidrolizados de caupí.

Muestra	Fracción	Rango de PM estimado (kDa)	Proteína (μg/μl)	Actividad ORAC	
				% Inhibición ROO·	IC ₅₀ (μg/ml)
A8	1 _i	> 10	0,43	82 ± 3	80,0
	2 _i	> 10	0,10	29 ± 3	
	3 _i	2,8 - 0,9	0,41	23 ± 3	
	4 _i	0,9 - 0,39	0,27	ND	
	5 _i	0,36 - 0,12	ND	ND	
	6 _i	0,12 - 0,05	ND	ND	
A8LH	1 _{lh}	> 10	0,49	57 ± 5	
	2 _{lh}	> 10	0,16	56 ± 3	
	3 _{lh}	> 3,6	0,33	73 ± 6	
	4 _{lh}	3,4 - 1,1	0,02	28 ± 1	
	5 _{lh}	1,70 - 0,39	0,16	45 ± 3	
	6 _{lh}	0,39 - 0,10	0,02	13 ± 5	
A8HH	1 _{hh}	> 10	0,19	30 ± 2	
	2 _{hh}	> 10	0,03	64,4 ± 0,4	
	3 _{hh}	> 4	0,23	93 ± 1	9,0
	4 _{hh}	3,12 - 1,46	0,17	87 ± 6	0,2
	5 _{hh}	1,46 - 0,75	0,04	94 ± 8	5,0
	6 _{hh}	0,71 - 0,27	0,01	45 ± 6	
	7 _{hh}	0,27 - 0,11	ND	ND	
A10	1 _i	> 10	0,438	76 ± 3	192,0
	2 _i	> 10	0,026	17 ± 9	
	3 _i	2,18 - 0,91	ND	ND	
	4 _i	0,91 - 0,39	ND	ND	
	5 _i	0,39 - 0,14	ND	ND	
	6 _i	0,14 - 0,07	ND	ND	
A10LH	1 _{lh}	> 10	0,074	27,2 ± 0,1	
	2 _{lh}	> 10	0,132	52 ± 3	
	3 _{lh}	> 10	0,142	45 ± 5	
	4 _{lh}	> 4	0,125	65 ± 4	
	5 _{lh}	3,70 - 0,98	0,52	48 ± 3	
	6 _{lh}	0,98 - 0,35	0,09	25 ± 1	
	7 _{lh}	0,35 - 0,10		ND	
A10HH	1 _{hh}	> 10	0,111	24,4 ± 0,1	
	2 _{hh}	> 10	0,048	24 ± 3	
	3 _{hh}	> 5	0,249	76 ± 1	38,0
	4 _{hh}	5,12 - 1,41	0,259	76 ± 1	17,0
	5 _{hh}	1,44 - 0,63	0,234	87 ± 4	7,0
	6 _{hh}	0,62 - 0,29	0,789	86 ± 5	221,0
	7 _{hh}	0,31 - 0,12	0,575	22 ± 1	

IV.3. Caracterización de secuencias peptídicas de fracción antioxidante de caupí

Dado que uno de los principales objetivos del presente estudio fue identificar la secuencia de ciertos péptidos antioxidantes, encriptados dentro de las proteínas de caupí, se seleccionó una de las fracciones más activas. Si bien las fracciones 4_{hh} y 5_{hh} de A8HH fueron de las que presentaron la mayor actividad antioxidante por ORAC, se seleccionó la fracción 5_{hh} de A10HH, con componentes con masas moleculares de 1,44-0,63 kDa (calibración por cromatografía de exclusión molecular), que presentó mayor actividad antioxidante ORAC entre las fracciones de A10HH para ser analizada por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro nanoLC-ESI-ORBITRAP, debido a que los ensayos posteriores de esta tesis se realizarán a partir de muestras de A10. Se realizó inicialmente un ensayo sin digestión tríptica previa, intentando identificar las secuencias de los péptidos componentes que provenían del corte con alcalasa. Sin embargo, no se encontraron coincidencias entre las secuencias obtenidas tras el corte con alcalasa y los datos disponibles en las bases de datos para *Vigna unguiculata* en la base de datos Uniprot donde, si bien no se cuenta con las secuencias de todas las proteínas de reserva del caupí, se hallan disponibles las secuencias de las proteínas de reserva vignina (7S) y legumina (11S) y de varias enzimas del metabolismo primario y secundario del caupí. Es posible que en la fracción 5_{hh} de A10HH haya presentes otros péptidos correspondientes a proteínas de caupí aún no secuenciadas.

Para realizar el análisis e intentar identificar las secuencias, la fracción 5_{hh} de A10HH fue tratada con bicarbonato de amonio 50 mM, pH=8 y posteriormente digerida con tripsina (corte en el enlace peptídico de Arg y Lys del lado c-terminal) durante toda la noche. La muestra fue llevó a sequedad (*Speed Vac*) y se resuspendió con 30 µL de ácido trifluoroacético 0,1% para ser desalada (zip Tip C18, Merck) y analizada por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión tríptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realizó por electrospray. De esta manera, la fracción 5_{hh} de A10HH mostró diversos péptidos provenientes de diferentes proteínas de caupí, con masas moleculares entre 1100 y 2450 Da, lo cual equivaldría a péptidos de entre 9 y 21 aminoácidos (Tabla IV.7). Si bien la separación por cromatografía de exclusión molecular utilizada para separar las fracciones polipeptídicas de caupí (en este caso columna Superdex 30, con rango de separación óptimo < 10 kDa) indicaba péptidos con masas moleculares menores, CEM es una metodología que depende del volumen hidrodinámico y su resolución es demasiado baja para separar péptidos individuales. Por lo tanto, cada punto del chromatograma representa la señal de una mezcla de péptidos con peso molecular similar

(Bodin y col., 2015). Esto podría explicar la presencia de especies con masa molecular mayor a los 1440 estimados por CEM.

Las proteínas de origen de las secuencias identificadas pertenecen al identificador taxonómico 3917 de *Vigna unguiculata*, dos "RmlC-like jelly roll fold" una codificada por el gen DEO72_LG9g3346 y la otra por el gen DEO72_LG8g115, una "Ribulose bisphosphate carboxylase large chain", codificada por el gen DEO72_LG3g960 y una "Actin beta/gamma 1", codificada por el gen DEO72_LG3g2898. Se puede observar que hay ciertas secuencias que se solapan parcialmente, esto es, péptidos que provienen de la misma región de la proteína (Tabla IV.7).

Tabla IV.7. Péptidos trípticos identificados por HPLC-MS/MS a partir de la fracción 5_{hh} de A10HH de la CEM, proteína de origen de caupí (OS=*Vigna unguiculata* OX=3917), relación m/z, y su localización en las proteínas de origen.

Proteína de origen	m/z (Da)	Secuencia	Nº de	Localización
			AA	
	584,83789	AILTLVNPDGR	11	108-118
RmlC-like jelly roll fold	633,31378	NVLEASFDSEFKEINR	16	190-205
GN=DEO72_LG8g1158	693,33429	NVLEASFDSEFK	12	190-201
PE=4 SV=1	706,69232	IPAGTTFFLVNPNDNDNLR	19	131-159
	820,05768	FQDFFLSSTEAQQSYLQGFSK	21	169-189
	584,83789	AILTLVNPDGR	11	108-118
RmlC-like jelly roll fold	711,69281	IPAGTTFFLVNPDDNNENLR	19	131-159
GN=DEO72_LG9g3346	723,35596	FLVNPDDNNENLR	12	138-159
PE=4 SV=1	796,88812	FFLVPDDNNENLR	13	137-159
	489,25626	TFQGPPPHGIQVER	13	147-159
Ribulose bisphosphate	616,00781	LEGERDITLGFVDLLR	16	335-350
carboxylase large chain	511,26959	DTDILAAFR	9	33-41
GN=DEO72_LG3g960	933,97766	DITLGFVDLLRDDFVE	16	340-355
PE=3 SV=1	631,36218	DITLGFVDLLR	11	340-350
Actin beta/gamma 1	488,72824	AGFAGDDAPR	10	21-30
GN=DEO72_LG3g2898	566,76733	GYSFTTTAER	10	199-208
PE=3 SV=1				

Las secuencias de péptidos trípticos identificadas nos permitieron proponer potenciales péptidos antioxidantes de los que provienen (por digestión con alcalasa). En la Tabla IV.8 y en la Figura IV.7 (A-D) se señalan estos péptidos dentro de las secuencias de las proteínas de

origen de caupí. Para proponer las secuencias provenientes de la hidrólisis con alcalasa, se consideró su especificidad de corte, que se describe como preferencial cuando un residuo Ala, Leu, Tyr o Ser (A, L, Y, S) está en P1, dato obtenido de la base de datos de enzimas proteolíticas [MEROPS - the Peptidase Database \(ebi.ac.uk\)](https://merops.iab.uwa.edu.au/) (Rawlings y col., 2018). Se han señalado otras especificidades de corte para alcalasa por, Adamson y Reynolds (1996), quienes observaron la escisión de enlaces peptídicos cuando los aminoácidos Glu, Met, Leu, Tyr, Lys y Gln (E, M, L, Y, K, Q) están posicionados en P1 (preferiblemente Glu) y también se encuentra otro residuo hidrofóbico en P2' o P3'.

Posteriormente, las secuencias de péptidos propuestas (Tabla IV.8) fueron buscadas en la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>), y la mayoría de éstos compartían parcialmente secuencias internas con péptidos antioxidantes, que van desde dipéptidos hasta heptapéptidos.

Según Bashir y col. (2020), los péptidos antioxidantes suelen contener aminoácidos hidrofóbicos en sus secuencias. Los resultados de secuenciación de péptidos de frijol pinto hidrolizado mostraron que los residuos hidrofóbicos (leucina, valina, alanina, prolina y fenilalanina) cerca del N-terminal producen estructuras con potentes propiedades antioxidantes (Ngoh y Gan, 2016). Karami y Akbari-Adergani (2022), por su parte, reportaron que la mayoría de las secuencias de péptidos en su estudio de hidrolizados de *Vigna radiata* y *Vigna angularis* con alcalasa siguieron la misma tendencia, con la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como alanina, leucina y valina.

Según Karami y Akbari-Adergani (2019), los residuos de aminoácidos hidrofóbicos como valina y leucina podrían aumentar la presencia de péptidos en interfaces agua-lípido (de membranas celulares), facilitando la permeabilidad a la fase lipídica, para eliminar los radicales libres producidos. Los hallazgos de Ngoh y Gan (2016), quienes descubrieron que la valina y la leucina son responsables de elevar la capacidad antioxidante debido a su mayor solubilidad en lípidos, que respaldan esta teoría.

A

MMRARVPLLLGVLFASLSVSGIVHREHQESQESEPRGQNNPFYFDSDRNQYGHRLVLQRFDQRSKQIQNLENYRVVEFKSKPNT
 LLLPHADADFLVVNLNGRAILTVNPDRDSYILEQGHAQKIPAGTTFLVNPDNNENLRIKLAVPVNNPRFQHRSPTILLARIQQEYSR
 GLFRCCASVWESLCLFINSTFAP3GKVEKLINKQRD HFTDAQPEQ QQREEDRKGR KGPLSSILD LY

B

MMRARVPLLLGVLFASLSVSGIVHREHQESQESEPRGQNNPFYFDSDRNQYGHRLVLQRFDQRSKQIQNLENYRVVEFKSKPNT
 LLLPHADADFLVVNLNGRAILTVNPDRDSYILEQGHAQKIPAGTTFLVNPDNNENLRIKLAVPVNNPRFQHRSPTILLARIQQEYSR
 GLFRCCASVWESLCLFINSTFAP3GKVEKLINKQRD HFTDAQPEQ QQREEDRKGR KGPLSSILD LY

C

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKENVYTPEYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPEAGAAVAEESSTGTWTTVWTDGLTSLDR
 YKGRCYHIEPVAGEENQYIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLEDLRIPTAYIKTFQGPPPHGIQVERDK
 LNKYGRPLLGCITPKLGLSAKNYGRAVYECLRGGLDFKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIFKSQAETGEIKGHYL
 NATAGTCEEMMKRAVFARRELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAHAVIDRQKNHGMHFRVLAKAL
 RLSGGDHVHSGTVVVGKLEGERDITLGFDLLRDDFVEKDISHGVLPVASRGIVWHMPALTEIFGDDFVLQFGGGTLGH
 PWVNAPGAVANRVALEACVKARNEGRDLAREGAVANRVALEACVKARNEGRDLAREGNEIIRESASKWSPELAAACEVV
 KEIKFVFEAMDTI

D

MADGEDIQPLVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRWFPSIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDEAQSKRGILTKYPIEHGIVNNWDDMEKIWHHTFYNE
 LRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLLAGRDLTEALMKI
 LTTERGYSFTTTAEEREVRLVKEKLAYIALDYEQELETSRTSSVEKSYELPDGQIITIGNERFRCPEVLFQPSMIGMEAVGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL
 YGNIVLSSGGSTMFHGIADRMSKEISSLAPSSMKIKVVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIAKAEYDEAGPSIVHRKCF

Figura IV.7. Secuencia de las proteínas de caupí obtenidas de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y posición de cada uno de los péptidos trípticos (resaltados en gris) y los propuestos por hidrólisis con alcalasa (recuadro de línea cortada azul) con potencial actividad antioxidante. A) RmlC-like jelly roll fold (GN=DEO72_LG8g1158), B) RmlC-like jelly roll fold (GN=DEO72_LG9g3346), C) Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (GN=DEO72_LG3g960) y D) Actin beta/gamma (GN=DEO72_LG3g2898).

Por otro lado, investigaciones previas han sugerido, además, que los residuos aromáticos [como la tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H) y la metionina (M)] pueden tener un impacto positivo en la actividad antioxidante debido a sus características estructurales particulares. El grupo fenol en Y y el grupo NH indol en W pueden donar un átomo de hidrógeno a un radical. El grupo tioéter en M puede oxidarse a sulfóxido y el imidazol de H tiene capacidad de donación de protones (Rajapakse y col., 2005; Zhang y col., 2014). Existen reportes de ejemplos de péptidos con estos residuos que muestran actividad de captación de radicales, por ejemplo, WYSLAMAASDI de la β -lactoglobulina digerida con Corolase PP (Hernandez-Ledesma y col., 2005), GFPGRDHWCASE de la linaza digerida con alcalasa (Silva y col., 2017) y, TETWNPNHPEL de garbanzo digerido con pepsina (Torres-Fuentes y col., 2015).

Asimismo, se han reportado secuencias de péptidos con actividad antioxidante, con masas moleculares de 1257,7, 1000,6, 1494,8 y 1462,7 provenientes de proteínas de trigo hidrolizadas con alcalasa con actividad antioxidante ABTS TVGGAPAGRIVME, VGGIDEVIAK, GNPIPREPGQVPAY, MDATALHYENQK (Karami y col., 2019).

Se han encontrado en digeridos de la β -conglicinina de soja seis péptidos antioxidantes (medidos frente a la oxidación del ácido linoleico) los cuales contenían aminoácidos hidrofóbicos tales como la Val y la Leu en el extremo N-terminal, encontrándose también restos de Pro, His o Tyr en dichas secuencias (Chen y col., 1998). Utilizando péptidos sintéticos derivados de Leu-Leu-Pro-His-His, estos autores pudieron demostrar que los segmentos His-His eran importantes para la actividad antioxidante de los péptidos, dado que al hidrolizarlos y quitarles el residuo de His del extremo C-terminal, su actividad disminuía. La delección de la Leu del extremo N-terminal no tenía efecto sobre la actividad antioxidante, siendo los restos de Pro e His importantes para esta función (Chen y col., 1998). Chan y Decker (1994) han demostrado que la His es capaz de quesar metales y secuestrar oxígeno activo y al radical hidroxilo, acción que se le atribuye al grupo imidazol que puede participar en reacciones de transferencia de electrones y de protones. Por otra parte, Hernández-Ledesma y col. (2005) evaluaron la actividad antioxidante por ORAC de cada aminoácido libre, demostrando que Trp, Tyr y Met presentaban las mayores actividades, seguidos de Cys, His y Phe, mientras que el resto de los aminoácidos no presentaron actividad ORAC. La elevada actividad que presentaron el Trp y la Tyr podría explicarse por su capacidad para donar un átomo de hidrógeno; mientras que la Met podría ser oxidada a sulfóxido de metionina y la Cys podría donar el átomo de hidrógeno del grupo sulfhidrilo. Luego de la evaluación de la actividad de diferentes péptidos, dichos autores concluyeron que la composición peptídica

podría influir tanto de manera sinérgica como antagónica en comparación con la actividad antioxidante de los aminoácidos libres. En otro trabajo, se evaluaron diversos péptidos de la β -lactoglobulina, también a través del ensayo ORAC, encontrando una elevada actividad en aquellos péptidos que tenían residuos de Trp, Tyr y Met (Hernández-Ledesma y col., 2007). Adicionalmente, los mismos autores demostraron que la presencia de Tyr y Met en el extremo C-terminal, así como la presencia de Trp y Tyr en el extremo N-terminal aumentarían la capacidad antioxidante de los péptidos. En otros estudios ya se había demostrado que la presencia de Tyr en el extremo N-terminal sería uno de los factores determinantes en la actividad antioxidante de péptidos derivados de la ovoalbúmina (Dávalos y col., 2004). Otros autores han demostrado que la presencia de Leu mejoraría la actividad antioxidante de ciertos péptidos hidrolizados de gelatina de calamar (Alemán y col., 2011).

García-Fillería y col., (2021), analizaron, por medio de herramientas bioinformáticas, la relación entre las propiedades estructurales y fisicoquímicas y la actividad antioxidante de diez péptidos derivados de la globulina 11S de amaranto. Reportaron que los péptidos AWEEREQGSR (P8), YLAGKPQQEH (P5), IYIEQGNGITGM (P2), TEVWDSNEQ (P1) que presentaron una alta actividad ORAC y HORAC, tenían carga neta negativa (P8, P2, P1) o neutra (P5), y carácter hidrofílico, salvo P5 de naturaleza hidofóbica y, además, ninguno de los péptidos tenga una conformación con estructura ordenada o plegamientos, lo que resulta favorable para que los residuos aminoacídicos puedan interactuar con otras sustancias (radicales libres, metales, etc).

Resultados Capítulo IV

Tabla IV.8. Péptidos con potencial antioxidante identificados en la fracción 5_{hh} de A10HH, proteína de origen de caupí (OS=*Vigna unguiculata* OX=3917), fraccionado por CEM.

Proteína de origen	Secuencia propuesta	MM (Da)	Péptidos con actividad antioxidante*
RmlC-like jelly roll fold GN=DEO72_LG8g1158 PE=4 SV=1	VVLNGRAILTLVNPNDGRDS	2009,29	
	QRIPAGTTFFLVNPNDNDNLRIKL	2870,30	IKL
	VNNPHKFQDFFLSSTEAQQSYLQGFSKN	3262,54	PHK
	NVLEASFDSEFKEINRV	1997,19	
	STEAQQSYLQGFSKNVLEAS	2187,35	
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain GN=DEO72_LG3g960 PE=3 SV=1	LLPHHADADFLLVVLNGRAIL	2297,73	PHH, LLPH, LPHH, HH, LLPHH, ADF
	FLVNPDDNENLRIKL	1800,04	IKL, NEN
RmlC-like jelly roll fold GN=DEO72_LG9g3346 PE=4 SV=1	NYYTPEYETKDTDILAAFRV	2409,63	KD, NYY, YYT
	VVGKLEGERDITLGF	1632,88	LGF
	DITLGFVDLLRDDFVEKD	1995,26	LLR, KD
	LRIPTAYIKTFQGPPPHGIQVER	2521,95	GPP, PHG, AYI
Actin beta/gamma 1 GN=DEO72_LG3g2898 PE=3 SV=1	NGTGMVKAGFAGDDAPRA	1734,90	AGDDAPR
	LTERGYSFTTTAEREIVRD	2244,5	TERGY

*Se obtuvieron de BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, Abril 2024).

CONCLUSIONES

La variación del pH de extracción de las proteínas de caupí provocó diferencias en los aislados obtenidos. Si bien el perfil polipeptídico, de solubilidad en función del pH y la H₀ de A8 y A10 no presentaron cambios, las estructuras secundarias y terciarias de A8 y A10 fueron distintas. Las diferencias observadas se debieron a cambios en la estructura proteica causados por la exposición a pH 10,0 por 60 min durante el proceso de obtención del aislado A10. Las proteínas de caupí obtenidas a pH 8 y 10 fueron sometidas a dos tratamientos de hidrólisis con alcalasa y se lograron obtener hidrolizados con alto y bajo grado de hidrólisis que reflejaron cambios estructurales y en sus propiedades antioxidantes.

Los resultados presentados muestran que el tratamiento con alcalasa para obtener un bajo grado de hidrólisis afectó en mayor medida a A10 que a A8, según lo evaluado por el grado de hidrólisis alcanzado, SDS-PAGE y CEM. Asimismo, se evidenciaron cambios diferenciales en las características conformacionales a nivel de la estructura secundaria y terciaria, ya que A10LH presentó mayor aumento de la extinción de fluorescencia de los triptófanos expuestos respecto a A8LH y ambos presentaron cambios en las proporciones de lámina β, α-hélices y giros β.

En el tratamiento con alcalasa para obtener un alto grado de hidrólisis, se evidenciaron cambios fisicoquímicos y estructurales debidos a la extensión de hidrólisis alcanzada donde no tuvo incidencia el pH inicial de extracción de las proteínas.

En general, la hidrólisis con alcalasa produjo un aumento de la capacidad antioxidante medido a través de tres métodos experimentales diferentes, ABTS, ORAC y HORAC. A partir de los estudios electroforéticos y cromatográficos de exclusión molecular, se demostró que moléculas con masas moleculares menores a 6,5 kDa, que corresponden a péptidos generados durante la hidrólisis, son los responsables de incrementar la actividad antioxidante en los hidrolizados. La capacidad antioxidante fue mayor a mayor grado de hidrólisis de las muestras. Además, del pico cromatográfico que presentó mayor actividad antioxidante para el hidrolizado de A10HH, se ha logrado proponer secuencias de péptidos antioxidantes correspondientes a la hidrólisis de cuatro proteínas del caupí.

CAPÍTULO V

EFECHO DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HARINA Y AISLADO PROTEICO DE CAUPI

Teniendo en cuenta que ambos aislados presentaron similar comportamiento en la solubilidad y en las propiedades antioxidantes luego de la hidrólisis y, considerando que la extracción a pH 10 de las proteínas (más desnaturalizadas que a pH 8) facilitó la hidrólisis con alcalasa a bajas concentraciones, se decidió continuar la digestión gastrointestinal simulada solo con el aislado A10.

El primer abordaje sobre la digestión gastrointestinal de las proteínas de caupí estuvo relacionado con la evaluación de las etapas gástrica e intestinal de proteólisis con potencial liberación de péptidos antioxidantes. Se evaluó el efecto de la digestión del aislado proteico A10 siguiendo el método propuesto por Orsini Delgado y col. (2011), un método estático simplificado que consta de simulaciones de las fases gástrica e intestinal. Se utilizaron secuencialmente las enzimas proteolíticas pepsina y pancreatina, en ausencia de bilis bovina. La pepsina es la principal enzima proteolítica generada en el estómago durante la digestión de los alimentos. Es una endoproteasa con especificidad de corte en el extremo C-terminal en fenilalanina y leucina (Burrel y col., 1993) y escinde fácilmente uniones entre Leu-Ser, Leu-Thr y Ser-Trp (Schmelzer y col., 2007). Por su parte, la pancreatina incluye proteasas como la tripsina, la quimotripsina y la elastasa, que son liberadas por el páncreas en el intestino delgado. Los péptidos resultantes son, resistentes a la pepsina y pancreatina, lo que sugiere que pueden ser absorbidos por las células epiteliales digestivas del intestino delgado y, probablemente estén biodisponibles para ejercer su actividad biológica.

El segundo abordaje fue realizado mediante DGIS por un protocolo estático estandarizado (DGIS de Infogest) descripto en la sección I.3.2.3 (Minekus y col., 2014), partiendo de harina y aislado proteico A10 de caupí. El método consenso indica que los componentes más importantes de la digestión intestinal simulada son las enzimas pancreáticas y la bilis. En particular, la bilis es importante para el transporte de los productos de la lipólisis y, en el intestino adulto, la concentración típica en el estado de alimentación es de 10 mM en el líquido total. Sin embargo, también se menciona en el trabajo de Minekus y col. (2014), que la selección de la cantidad a utilizar en un modelo estático fue difícil de evaluar, ya que las mediciones fisiológicas se refieren más a las tasas de secreción que a cantidades específicas. La bilis de origen bovino utilizada en este protocolo es un polvo amarillo-marrón obtenido por secado de bilis fresca. Consta de 70% de sales biliares, 22% de fosfolípidos, 4% de colesterol, 3% de proteínas y 0,3% de bilirrubina. Un cálculo realizado utilizando varias aproximaciones estimó una concentración de 13 mM de los ácidos biliares presentes en digeridos gastrointestinales (Rodriguez, 2022).

En este capítulo se evalúan las propiedades estructurales y antioxidantes de la harina y las proteínas de caupí sometidas a la digestión gastrointestinal simulada. Se analiza también su actividad antioxidante *in vitro* e identificación de las secuencias peptídicas.

V.1 Digestión con pepsina/pancreatina (PP) de aislado proteico de caupí (A10)

V.1.1. Grado de hidrólisis

El tratamiento de A10 con pepsina (relación enzima:sustrato 1:10 p/p, pH = 2, 37 °C, 1 h, agitación) seguido de digestión con pancreatina (relación enzima:sustrato 1:10 p/p, pH = 2, 37 °C, 1 h, agitación) proporcionó un grado de hidrólisis similar al obtenido con alcalasa en A10HH (GH=24%). El hidrolizado A10PP obtenido fue caracterizado como de alto grado de hidrólisis (GH>10%) y se determinó el contenido proteico y la solubilidad, que se detallan en la Tabla V.1.

Tabla V.1. Concentración de proteínas, grado de hidrólisis y solubilidad de A10PP.

	Proteína (%)	GH (%)	Solubilidad (%)
A10	82,97 ± 0,01 ^a	nc	88,83 ± 0,01 ^a
A10PP	68 ± 1 ^b	24 ± 1	69,56 ± 0,02 ^b

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

El GH obtenido para A10PP es similar al informado previamente por Castañeda-Pérez y col. (2019), GH=23,12% (determinado por el método del ortoftaldehído, OPA), para concentrados proteicos de caupí tratados secuencialmente con pepsina y pancreatina (relación enzima:sustrato de 1:10) a pH 2 y pH 7,5, respectivamente, incubados a 37 °C durante 45 min cada enzima. Sin embargo, es menor al reportado por Drago y col. (2016), quienes realizaron la hidrólisis enzimática de concentrados proteicos de caupí (4 g/100 ml) en un reactor de 2 L con agitación y a 37 °C, usando pepsina a una relación enzima:sustrato de 1:10, pH 2, por 45 min, seguida de digestión con pancreatina, pH 7,5 por otros 45 min. El hidrolizado resultante, presentó un grado de hidrólisis del 30,75% (método OPA), indicando una hidrólisis extensa debido al proceso secuencial con pepsina-pancreatina. Por otro lado, en el caso del pseudocereal amaranto, Orsini Delgado y col. (2011) obtuvieron un GH mayor (39%, método TNBS) cuando se ensayaron en condiciones de hidrólisis similares que las descriptas en esta tesis. Barbana y Boye (2010), por su parte, informaron el GH alcanzado por digestión

secuencial con pepsina y pancreatina de aislados proteicos de otras dos leguminosas: dos variedades de garbanzo ($\text{GH}=34,41$ y $40,78\%$, método TNBS) y de arveja ($\text{GH}=31,08\%$, método TNBS). Girón-Calle y Vioque (2010) reportaron un GH de 32% (método TNBS) para proteínas de garbanzo.

V.1.2. Perfiles electroforéticos/cromatográficos de A10PP

Se estudió el efecto de la hidrólisis enzimática con pepsina/pancreatina sobre las proteínas de A10PP por glicina y tricina-SDS-PAGE (Figura V.1.A y B). La hidrólisis enzimática ejerció un efecto principalmente en las fracciones de alto peso molecular del aislado A10. En la Figura V.1.A, para A10PP se observan bandas de 59, 52, 37 y 31 kDa residuales que no fueron completamente hidrolizadas por acción de las enzimas digestivas y, bandas difusas correspondientes a $\text{PM}<26$ kDa en las dos electroforesis, probablemente debidas a productos de la proteólisis (Figura V.1.B). De esta manera, se puede apreciar que el perfil electroforético de A10PP es diferente al de los hidrolizados de A10 con alcalasa en un alto (A10HH) y bajo grado de hidrólisis (A10LH), lo que podrá influir consecuentemente en la actividad antioxidante de los péptidos resultantes.

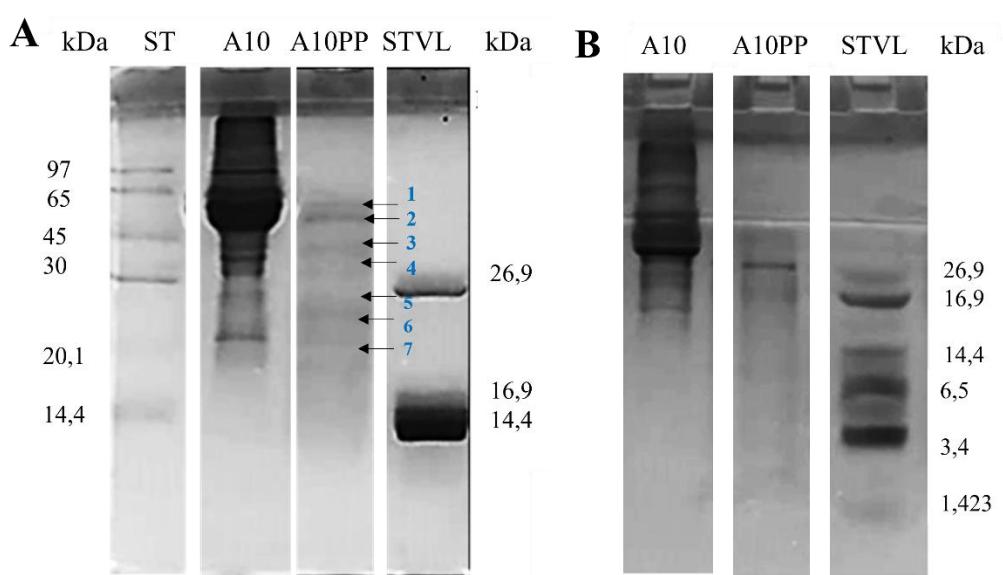


Figura V.1. Perfil electroforético de aislado proteico de caupí (A10) y su hidrolizado por digestión con pepsina/pancreatina (A10PP) en condiciones reductoras. A. SDS-PAGE 15%. B. Tricina-SDS-PAGE 16,5% / Urea 6 M. ST: patrón de bajo peso molecular. STVL: patrón de muy bajo peso molecular. Treinta μg de proteína/calle. Números con flechas: bandas proteicas residuales de masa moleculares entre 20,1 y 65 kDa.

En la Figura V.2, se muestra el perfil del fraccionamiento de A10, antes y después de la hidrólisis, utilizando cromatografía de exclusión molecular. En la Tabla V.2 se muestran además los pesos moleculares estimados de las fracciones peptídicas que eluyen en cada pico, así como el porcentaje del área relativa correspondiente a cada uno. Se observa que, en A10PP, el pico 1_{PP} correspondiente a polipéptidos con $V_e > 10$ kDa (volumen de exclusión) disminuyó en relación con el del aislado sin digerir y aumentó significativamente el número de moléculas de PM < 6,5 kDa (pico 2_{PP}). Los picos más abundantes comprenden péptidos de pesos moleculares entre 1,29 - 0,31 kDa en el pico 4_{PP} (28% del área total), seguido de péptidos entre 5,32 - 1,29 kDa que eluyen en el pico 3_{PP} (26% del área total). Además, se detectó la presencia de moléculas con masas moleculares entre 0,31 - 0,09 kDa (pico 5_{PP}) y por debajo de 0,04 kDa (pico 6_{PP}).

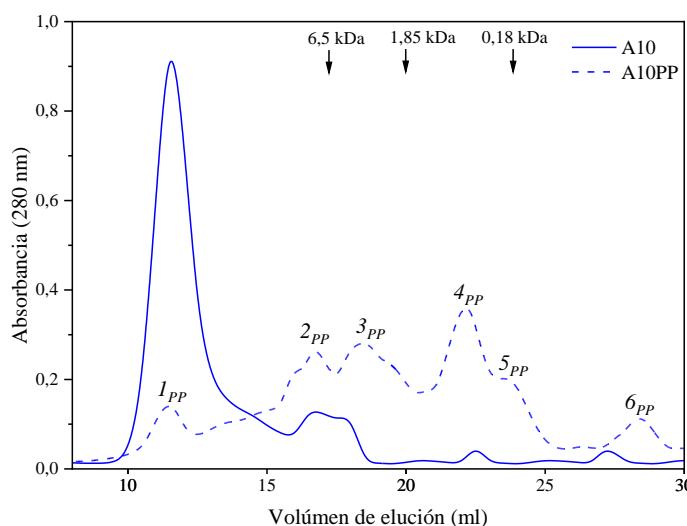


Figura V.2. Perfil cromatográfico de fracciones solubles (10 mg de proteína/ml) de aislados e hidrolizados de proteína de caupí con pepsina y pancreatina mediante filtración por gel (Superdex 30).

Tabla V.2. Análisis de los picos del chromatograma de A10PP.

Muestra	Fracción	Peso molecular estimado (kDa)	Área relativa (%)
A10PP	1_{PP}	> 10	9
	2_{PP}	> 6,5	17
	3_{PP}	5,32 - 1,29	26
	4_{PP}	1,29 - 0,31	28
	5_{PP}	0,31 - 0,09	12
	6_{PP}	0,04 - 0,01	7

V.1.2. Actividad antioxidante medida por ABTS

Se evaluó la actividad antioxidante de la fracción soluble en buffer fosfato 35 mM pH 7,8 de A10PP y se comparó con la muestra no digerida. Se obtuvieron curvas de dosis-respuesta para ABTS⁺ (% de inhibición de ABTS⁺), y se calcularon los valores de IC₅₀ (Figura V.3). La fracción soluble de A10 presentó valores de eliminación de ABTS⁺ menor a 50% en el rango de concentraciones estudiado (hasta 7 mg/ml), lo que no permitió calcular los valores de IC₅₀ (Figura. V.3). La digestión secuencial con pepsina-pancreatina produjo un incremento en la actividad antioxidante medida por ABTS de A10PP, alcanzando valores de eliminación de ABTS⁺ superiores al 90% en el rango de concentraciones estudiado (hasta 5,5 mg/ml) y la curva dosis-respuesta tuvo un ajuste logarítmico. El valor IC₅₀ de A10PP fue de 3,76 mg/ml. Este incremento en la actividad antioxidante podría estar asociado al enriquecimiento en moléculas peptídicas de bajo peso molecular.

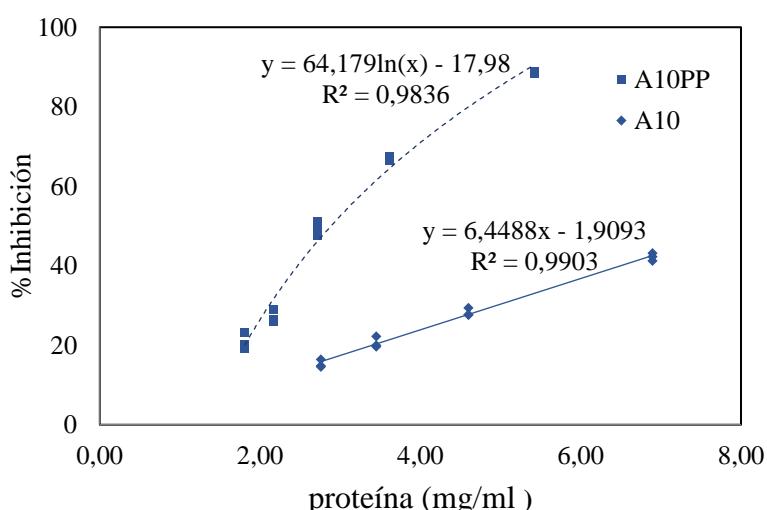


Figura V.3. Actividad antioxidante medida por ABTS.

Drago y col. 2016, reportaron un valor de TEAC de $294 \pm 3 \text{ } \mu\text{mol Trolox/g}$ para hidrolizado de proteínas de caupí con pepsina/pancreatina. Como se sabe, las propiedades antioxidantes de los péptidos están altamente influenciadas por la composición, secuencia y masa molecular. En hidrolizados de proteínas de amaranto, obtenidos en condiciones de hidrólisis con pepsina-pancreatina similares que las descriptas en esta tesis, se ha reportado una actividad antioxidante por ABTS ($\text{IC}_{50}=1,36 \text{ mg proteína /ml}$) y ORAC ($0,288 \text{ } \mu\text{g Trolox/}\mu\text{g proteína}$) mayor que la correspondiente a la proteína de partida (Orsini y col, 2011). Estos hidrolizados se caracterizaron por una importante aparición de moléculas con masas moleculares en el rango de 6,5 kDa (≈ 59 aminoácidos) y aminoácidos libres, con alta

proporción de la fracción de moléculas con masas cercanas a 1 kDa (\approx 9 aminoácidos), respecto a la proteína de partida.

V.2. Simulación de la digestión gastrointestinal (DGIS)

La harina (contenido proteico = $24,8 \pm 0,4\%$) y el aislado A10 (contenido proteico= $80 \pm 3\%$) fueron sometidos a DGIS mediante un protocolo estático estandarizado (Minekus y col., 2014; Egger y col., 2016), para obtener los digeridos gastrointestinales de harina de caupí (HD) y de A10 (A10D). Al final de la digestión, las muestras fueron liofilizadas y se determinó el grado de hidrólisis alcanzado (GH). HD presentó un GH de $20 \pm 1\%$ y A10D de $38 \pm 1\%$. El valor inferior de GH obtenido para la harina se debe probablemente a las interacciones entre las proteínas y otros componentes que podrían alterar la susceptibilidad de las proteínas a la hidrólisis (Zheng y col. 2014). También se puede considerar un posible efecto del tratamiento alcalino en la obtención del aislado (desnaturalización) que favorece la digestibilidad.

Sin embargo, el GH de A10D fue superior al obtenido para A10PP (24%), indicando que la inclusión de la fase oral, los cambios en la composición salina de los fluidos gástrico e intestinal, y la duplicación del tiempo de incubación en cada etapa de digestión del protocolo estático estandarizado, condujeron a un incremento significativo en el contenido de grupos amino libres y en consecuencia del grado de proteólisis

Cipollone y col. (2020) reportaron un GH alrededor del 30% tanto para harinas como para aislados proteicos de arvejas sometidos a DGIS, sin encontrar diferencias significativas ($p>0,05$) entre dos variedades estudiadas. En este caso, factores como la presencia de otros componentes no proteicos, el estado conformacional de las proteínas o el contenido de factores anti-tripsina presentes en las variedades de arveja no parecen haber tenido un efecto en el grado de hidrólisis.

Por otro lado, para harina y aislado proteico de amaranto se ha aplicado el mismo protocolo de DGIS, y se reportaron valores de GH más altos (45% y 60%, respectivamente), lo que sugiere una digestibilidad *in vitro* menor de las proteínas de caupí en comparación con las proteínas de amaranto (Rodríguez y col. 2020).

V.2.1. Perfil electroforético de HD y A10D

La Figura V.4 muestra los patrones electroforéticos de las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH = 7,8) de A10, A10D, H y HD. La composición proteica de las muestras antes de la digestión fue similar para H y A10 (Figura V.4.A-B). El perfil electroforético de H fue similar al de A10 con respecto a las bandas de PM mayores (>30 kDa), pero con mayor

intensidad en algunas bandas de menor PM, lo que sugiere que estos polipéptidos se perdieron parcial o totalmente durante la preparación del aislado proteico.

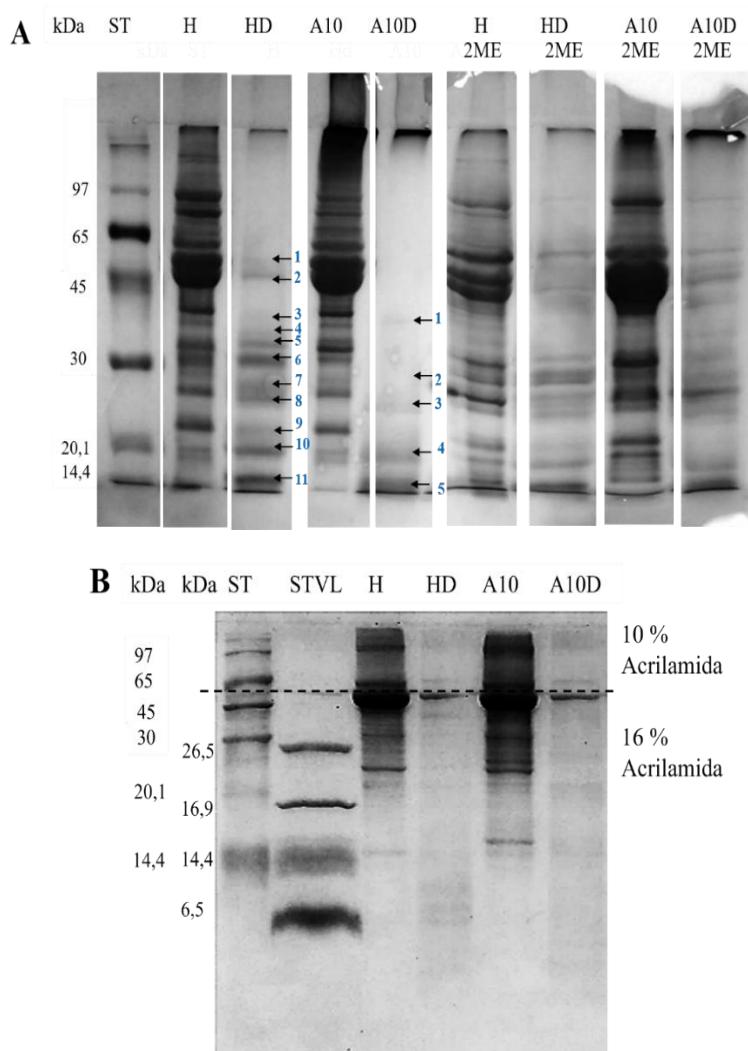


Figura V.4. Perfil electroforético de la harina de caupí y su aislado proteico antes y después de la DGIS en condiciones no reductoras. A. SDS-PAGE (15%). B. Tricina-SDS-PAGE (16%)-6M urea. ST: estándares de PM bajo. STVL: estándares de PM muy bajo. 2ME: 2-mercaptoetanol. Números con flechas: efectos relevantes.

Después de la digestión, se observó la desaparición de proteínas con masas moleculares >20 kDa en ambas muestras (A10D y HD), mostrando la hidrólisis principalmente de las fracciones de albúmina y vicilina, mientras que las fracciones proteicas de masas moleculares superiores a 100 kDa permanecieron sin cambios (Figura V.4 A). En HD, se observan bandas de 53, 48, 32, 30, 27, 24, 23 y menores a 20 kDa residuales que no fueron completamente hidrolizadas por acción de las enzimas digestivas, y bandas de 35, 26 y menores a 20 kDa

residuales en A10D (Figura V.4.A). Asimismo, se observaron péptidos con masas moleculares que van de 6 a 14 kDa en ambas muestras digeridas (Figura V.4.B). También se puede observar que las fracciones de vicilina (20 y 40 kDa) de H resistieron mejor el ataque hidrolítico de las enzimas gastrointestinales que las presentes en el aislado proteico. Esto está en correlación con los resultados de GH anteriormente descriptos.

V.2.2. Caracterización de las fracciones cromatográficas de HD y A10D

Se utilizó una columna Superdex 30 para resolver péptidos producidos por DGIS de peso molecular menor a 10 kDa. La Figura V.5 muestra los cromatogramas obtenidos de las muestras y de sus digeridos gastrointestinales (A10/A10D y H/HD). La fracción soluble de H mostró un pico principal correspondiente al volumen de exclusión ($PM > 10$ kDa), el pico correspondiente a moléculas con masas mayores a 6,5 kDa ($v=14,6$ ml) y pequeños picos que involucran moléculas correspondientes a 1,8 kDa ($v=19$ ml) y 0,8 kDa ($v=21,5$ ml) (Figura V.5.A). HD mostró cambios en el perfil respecto a H: una disminución significativa en el pico correspondiente al volumen de exclusión ($PM > 10$ kDa) y un aumento en la intensidad relativa de las moléculas con $PM < 5,7$ kDa (Figura V.5A). Esto corresponde al aumento de pequeños péptidos y la disminución de proteínas y péptidos grandes.

La Tabla V.2 describe los rangos de peso molecular estimados de las fracciones peptídicas que eluyen en cada pico, de acuerdo a los volúmenes de elución (V_e) de los marcadores moleculares. Se obtuvo así, una curva de calibración y se calcularon los porcentajes relativos de las áreas de cada pico en el cromatograma. Luego de la DGIS de la harina, el pico mayoritario fue el 4_{HD} (área relativa de 27%), con un rango de tamaño de 1,01 a 2,99 kDa que corresponde a péptidos de 9–26 residuos de aminoácidos (calculado utilizando un peso molecular promedio ponderado de 113), seguido de los picos 6_{HD} (área relativa 22%, 0,5–0,17 kDa, correspondientes a aminoácidos libres hasta péptidos de 4 aminoácidos) y 5_{HD} (área relativa 15%, 0,54–1,09 kDa o 5–10 residuos de aminoácidos).

El cromatograma de las fracciones solubles del aislado proteico A10 mostró un perfil de polipéptidos con un pico principal correspondiente al volumen de exclusión ($PM > 10$ kDa) y dos picos menores con PM con intensidades máximas a los 18 ml (4,1 kDa) y 22,5 ml (0,4 kDa) (Figura V.5.B). Después de la DGIS del aislado, se observó la disminución de moléculas > 10 kDa y el aumento de moléculas con PM entre 5,6 y 0,13 kDa. A10D presentó cinco picos principales siendo 4_{A10D} el pico mayoritario (área relativa de 35%, con un rango de tamaño de 0,68–1,1 kDa o 6–10 residuos de aminoácidos), seguido en proporción relativa por 3_{A10D} (área relativa 22%, 1,1–2,5 kDa o 10–22 residuos de aminoácidos).

Se pueden destacar algunas diferencias entre los productos de digestión de H y A10 (Figuras V.5). HD presentó una distribución mayor de picos en los cromatogramas en comparación con A10D, lo que indica la generación de mayor variedad de péptidos de tamaño medio durante la digestión para HD, con las concentraciones más altas de péptidos correspondientes a masas moleculares entre 1,01 y 2,99 kDa. Para la digestión de A10D, las fracciones con la concentración más alta de péptidos fueron aquellas correspondientes a masas moleculares entre 0,68 y 1,1 kDa.

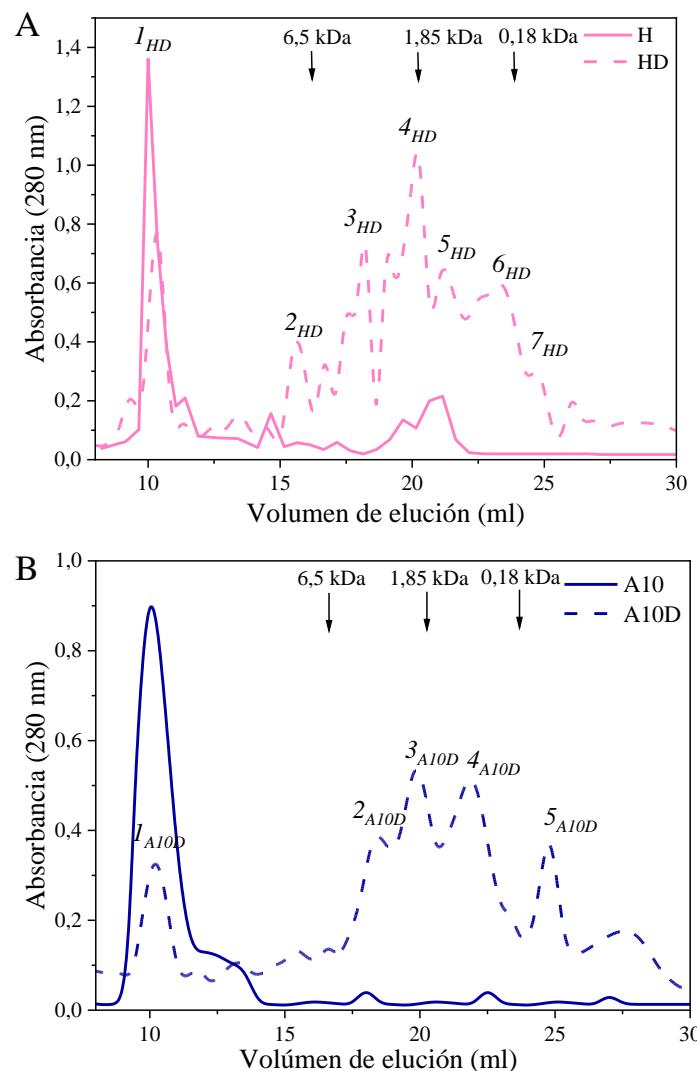


Figura V.5. Perfil cromatográfico de las fracciones solubles (10 mg de proteína/ml) de harina/aislado proteico de caupí y sus hidrolizados por DGIS mediante filtración por gel en (Superdex 30). A) Harina. B) Aislado proteico (A10).

Se han investigado las bioactividades y el transporte de mezclas de péptidos provenientes de proteínas alimentarias, aunque se han realizado pocos estudios sobre la degradación adicional en el tracto digestivo y la biodisponibilidad de dichas mezclas de péptidos. El peso

molecular de un producto proteico de digestión es un factor clave que determina si será absorbido o no a nivel intestinal. Roberts y col. (1999) demostraron en estudios de absorción realizados en ratas adultas que péptidos pequeños (di- y tripéptidos) e incluso más grandes (10–51 aminoácidos) generados en la dieta, pueden ser absorbidos intactos a través del intestino y producir efectos biológicos discretos a nivel tisular, aunque los efectos biológicos decrecen con el aumento del largo de la cadena peptídica debido probablemente a alteración fisiológica. Sin embargo, estudios con células Caco2-T27 mostraron que la vía paracelular es la principal ruta de transporte intestinal para péptidos de alto peso molecular (1600–500 Da), mientras que el transportador para di- y tripéptidos (PepT1) es principalmente responsable del transporte de péptidos de bajo peso molecular (<500 Da) (Wang y Li, 2017).

Contar con fracciones peptídicas caracterizadas en cuanto a tamaño molecular y actividad antioxidante, nos permitirá disponer de valiosa información para futuros estudios de absorción y formulaciones de alimentos funcionales.

Tabla V.2. Análisis de los picos de los cromatogramas de HD y A10D.

Muestra	Fracción	Peso molecular estimado (kDa)	Área relativa (%)
HD	I_{HD}	> 10	12
	2_{HD}	> 6,5	6
	3_{HD}	6,5 - 3,0	14
	4_{HD}	2,99 - 1,01	27
	5_{HD}	1,09 - 0,54	15
	6_{HD}	0,5 - 0,17	22
	7_{HD}	0,17 - 0,11	4
A10D	I_D	> 10	12
	2_D	5,6 - 2,5	17
	3_D	2,5 - 1,1	22
	4_D	1,1 - 0,68	35
	5_D	0,2 - 0,1	14

V.2.3. Actividad antioxidante de HD y A10D

La actividad antioxidante de las fracciones solubles de los digeridos de H y A10 se determinó por varios métodos y se comparó con las muestras sin digerir. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta y se calcularon los valores de IC₅₀ para ABTS (% de inhibición de ABTS⁺),

ORAC (% de eliminación ROO[•]), y HORAC (% de inhibición OH[•]). Por otra parte, se determinó el poder reductor por método FRAP. Los valores se presentan en la Tabla V.3.

En cuanto a la actividad antioxidante medida por ABTS, H y A10 presentaron una inhibición de menos del 50% del radical catión ABTS⁺ en el rango de concentración evaluado (hasta 3,2 y 8,5 mg/ml para H y A10, respectivamente) por lo que no fue posible determinar el valor IC₅₀ (Figura V.6 A y B). La DGIS incrementó el potencial antioxidante de la harina por ABTS, lo cual se puede verificar al comparar el valor de IC₅₀ de HD ($2,2 \pm 0,2$ mg/ml), con el % de inhibición alcanzado por H a esa misma concentración de proteínas (< 25%). Del mismo modo, luego de la DGIS, A10D presentó un valor de IC₅₀ de $1,32 \pm 0,03$ mg/ml.

Por el método ORAC, fue posible determinar la actividad antioxidante de H y A10, obteniéndose valores de IC₅₀ similares de $0,29 \pm 0,01$ y $0,27 \pm 0,02$ mg/ml para H y A10, respectivamente (Figura V.6 C y D). Luego de la DGIS, los productos de digestión presentaron un incremento en la actividad ORAC con un valor de IC₅₀ aproximadamente 2,5 veces menor que la obtenida para las muestras no digeridas (IC₅₀= $0,108 \pm 0,003$ y $\pm 0,11 \pm 0,01$ mg/ml para HD y A10D, respectivamente). Por lo tanto, la DGIS incrementó la capacidad de secuestro de radicales peroxilo por interrupción de la cadena radicalaria (mecanismo HAT) de los productos de digestión tanto de la harina como del aislado proteico de caupí. Debido a que HD y A10D presentaron una capacidad ORAC similar, las diferencias registradas en el grado de hidrólisis y las ligeras diferencias en la composición molecular, no se reflejaron en la actividad antioxidante global de los digeridos.

Estos resultados están en concordancia con los datos reportados para harina y aislado proteico de amaranto sometido a DGIS por Rodríguez y col. (2020). Asimismo, Cipollone y col. (2020), reportaron que la actividad antioxidante medida por ORAC para harinas y aislados proteicos de arveja, no mostró diferencias significativas por lo que indicaron que las harinas no contribuyeron con componentes solubles no proteicos adicionales capaces de modificar la actividad de captación de radicales libres de oxígeno (ROO[•]) en comparación con los aislados de proteínas, lo que sugiere que esta actividad se debe principalmente a polipéptidos u otros componentes asociados con la fracción proteica. Además, luego del proceso de digestión detectaron un aumento de aproximadamente cuatro veces en la actividad ORAC de las harinas y aislados de proteínas, que atribuyeron a la liberación de compuestos antioxidantes, presumiblemente péptidos, sin descartar la presencia de otros componentes antioxidantes.

A diferencia de lo observado en el ensayo ORAC, la actividad HORAC mostró diferencias entre la harina y el aislado proteico de caupí. H y A10 presentaron curvas de dosis-respuesta con ajuste lineal (Figura V.6 E y F). En el rango de concentración evaluado, sólo fue

possible determinar el valor de IC₅₀ para H, dado que A10 no logró inhibir el 50% de los radicales preformados (Tabla V.3). Estos resultados indican que en la harina se encuentran presentes compuestos capaces de quelar metales, los cuales luego se pierden –al menos parcialmente- en el proceso de obtención del aislado proteico. Estos componentes tendrían una actividad relevante como quelantes de metales, pero no como eliminadores de radicales.

Tabla V.3. Actividad antioxidante de H/HD y A10/A10D.

	ABTS	ORAC	HORAC	FRAP
	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	(mmol Fe ²⁺ /100g)
H	NC	0,27 ± 0,02 ^B	2,9 ± 0,1 ^C	1172 ± 71 ^B
HD	2,2 ± 0,2 ^A	0,108 ± 0,003 ^C	6,02 ± 0,02 ^A	1310 ± 80 ^A
A10	NC	0,29 ± 0,01 ^A	NC	541 ± 49 ^D
A10D	1,32 ± 0,03 ^B	0,11 ± 0,01 ^C	5,5 ± 0,1 ^B	993 ± 37 ^C

IC₅₀: concentración de proteínas en mg/ml que causa el 50% de la inhibición del radical

NC: valor no calculado

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (*p*<0,05).

La DGIS de la harina mostró un aumento significativo en el valor de IC₅₀ para el ensayo HORAC respecto a H, indicando menor actividad antioxidante, mientras que para el caso de A10, la digestión produjo un aumento de la actividad HORAC, indicando la liberación de moléculas con capacidad quelante de metales (Tabla V.3). Resultados similares han sido reportados por Cipollone y col. (2020), para harinas y aislados proteicos de arvejas y por Rodriguez y col (2020) para harina y aislado proteico de amaranto sometidos a DGIS.

El ensayo FRAP se utiliza para determinar la capacidad de una sustancia de donar electrones y reducir los iones férricos (Fe³⁺) a la forma ferrosa (Fe²⁺). En H, la actividad antioxidante medida por FRAP fue 2 veces superior a la determinada para A10 (Tabla V.3). Despues de la DGIS, el valor de FRAP para HD fue ligeramente superior respecto a H (*p*<0,05). Del mismo modo, el valor de FRAP para A10D aumentó significativamente respecto a A10. De esta manera se observa que la DGIS genera en H y en A10 un aumento de aminoácidos libres y fragmentos de péptidos que constituye una fuente adicional de electrones para mantener un alto potencial redox (Xiao y col., 2014).

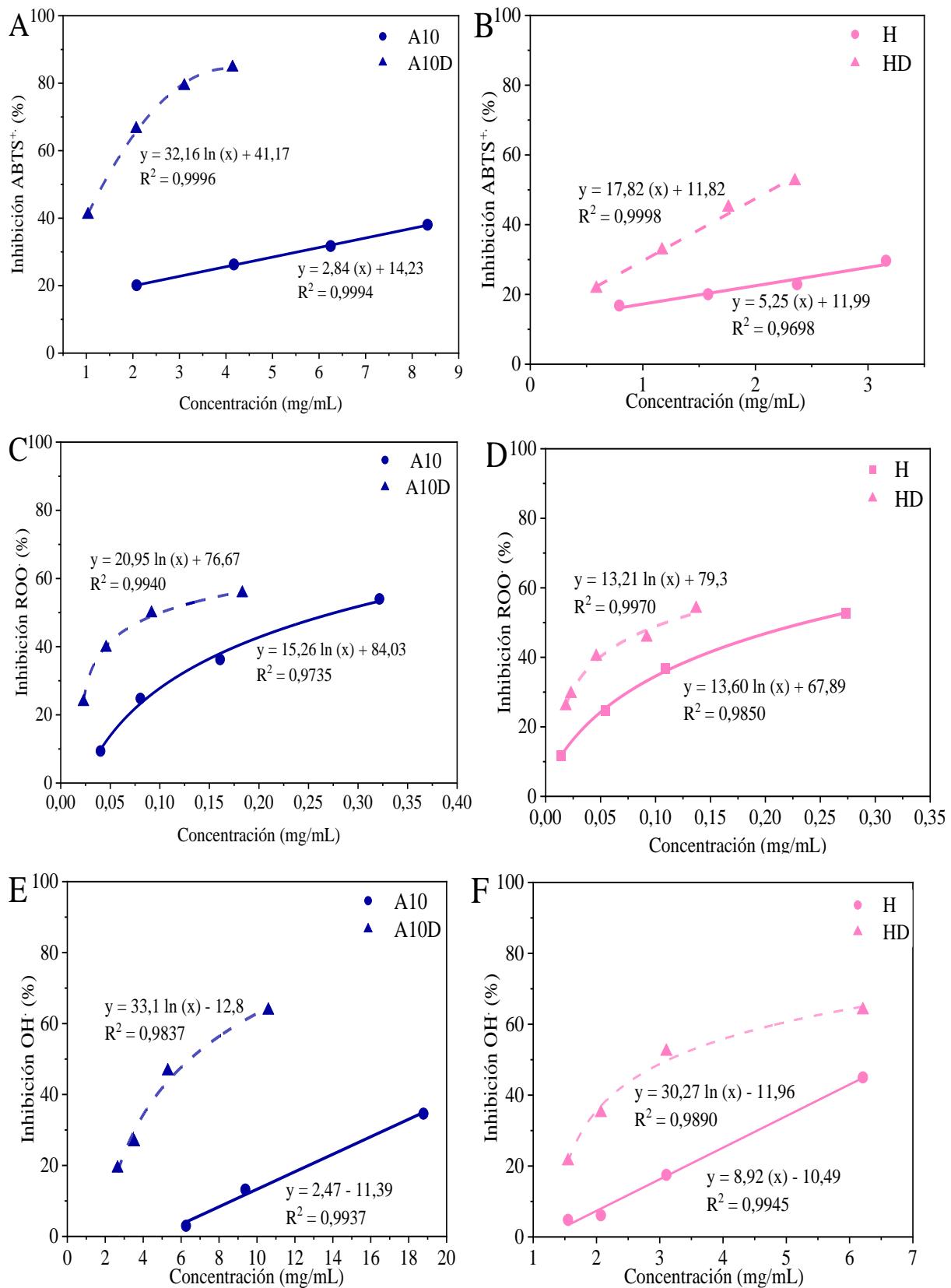


Figura V.6. Porcentaje de inhibición en función de la concentración de proteínas para: H, HD, A10 y A10D. A y B: ABTS⁺; C y D: ORAC; E y F: HORAC.

V.2.4. Actividad antioxidante de las fracciones cromatográficas de HD y A10D

Con el fin de recuperar péptidos bioactivos de los hidrolizados obtenidos por DGIS, se evaluó la actividad antioxidante por ABTS y ORAC de las fracciones eluídas de la columna de exclusión molecular (Tabla V.4). Debido a la baja concentración de péptidos presentes en las fracciones provenientes de HD, no fue posible detectar actividad ABTS superior al 50% de inhibición, sin embargo, por ORAC, las fracciones más activas fueron 5_{HD} (péptidos con PM entre 1,09-0,54 kDa) y 6_{HD} (péptidos con PM entre 0,5-0,17 kDa) con porcentajes de neutralización del radical ROO[•] de 67 ± 6 y 70 ± 3 , respectivamente.

Tabla V.4. Caracterización de la actividad antioxidante de las fracciones de cromatografía de exclusión molecular de HD y A10D.

Fracción	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABTS		ORAC	
		% inhibición	% inhibición	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
HD	I_{HD}	$0,29 \pm 0,03$	15 ± 1	62 ± 4	nd
	2_{HD}	$0,20 \pm 0,01$	20 ± 4	54 ± 2	nd
	3_{HD}	$0,16 \pm 0,00$	20 ± 1	58 ± 5	nd
	4_{HD}	$0,15 \pm 0,01$	23 ± 1	52 ± 6	nd
	5_{HD}	$0,12 \pm 0,01$	28 ± 1	67 ± 6	nd
	6_{HD}	$0,10 \pm 0,01$	31 ± 2	71 ± 3	nd
	7_{HD}	$0,03 \pm 0,00$	15 ± 2	18 ± 4	nd
A10	I_{A10D}	$0,32 \pm 0,01$	30 ± 1	>85	0,041
	2_{A10D}	$0,7 \pm 0,1$	$27,2 \pm 0,2$	>85	0,058
	3_{A10D}	$0,40 \pm 0,01$	$46,4 \pm 0,3$	>85	0,034
	4_{A10D}	$0,38 \pm 0,01$	71 ± 2	>85	0,034
	5_{A10D}	$0,09 \pm 0,01$	36 ± 1	50	nd

nd: valor no determinado

Con respecto a A10D, las fracciones I_{A10D} , 2_{A10D} , 3_{A10D} y 4_{A10D} analizadas presentaron porcentajes de neutralización del radical ROO[•] superior al 85% por los que se realizaron diluciones sucesivas a fin de evaluar la actividad ORAC en función de la concentración de proteínas. La fracción 4_{A10D} de A10D (péptidos con PM entre 1,1-0,68 kDa) presentó la mayor actividad ABTS y ORAC. Otros estudios han reportado significativa actividad ORAC en fracciones de harina y aislados sometidos a DGIS. En un estudio realizado por Rodríguez y col. (2020) sobre harina de amaranto sometida a DGIS, se encontró que las fracciones de CEM

con PM entre 0,87-0,34 kDa y 0,22-0,11 kDa mostraron alta actividad ORAC. Además, para el aislado proteico de amaranto sometido a DGIS, las fracciones con PM >10 kDa, entre 0,27 y 0,87 kDa, y <0,17 kDa también presentaron una actividad significativa (μg de Trolox equivalente/mg de proteína). En otro estudio realizado por Cipollone y col. (2024) sobre fracciones de CEM de harina de arveja sometida a DGIS, se observó que las fracciones con mayor actividad ORAC (entre 60 y 90% de inhibición de ROO) tenían una PM entre 0,14 y 4 kDa. Martineau-Côté y col. (2022) investigaron el efecto de la DGIS en las propiedades bioactivas (antioxidantes y antihipertensivas) de la harina de habas (*Faba bean*); utilizando ultrafiltración obtuvieron un permeato con PM <3 kDa que demostró actividad antioxidante por ABTS, DPPH, ORAC y FENTON.

V.2.5 Actividad antioxidante en cultivos celulares de HD y A10D

Se analizaron las fracciones solubles en buffer fosfato 35 mM (pH=7,8) obtenidas por resuspensión de HD y A10D liofilizados, seguido de centrifugación, y se los denominó *solubles* (HD^S y A10^S). Para poder evaluar el efecto citotóxico de los componentes de los fluidos utilizados en la DGIS (enzimas, electrolitos y sales biliares), se analizó un blanco de reactivos (Br), el cual fue obtenido siguiendo los mismos pasos del protocolo de DGIS reemplazando la muestra por agua. A partir de esta muestra se prepararon las fracciones solubles en buffer fosfato de la resuspensión de Br liofilizado y posterior centrifugación para obtener el sobrenadante soluble (Br *soluble*: Br^S).

Se siguió la metodología adoptada por Rodriguez y col., (2020) para la preparación de *solubles bioaccesibles* (fracción digerible) como una alternativa para reducir el contenido de sales biliares. Para ello, se trajeron los solubles (Br^S , HD^S y A10^S) con resina de colestiramina activada (10% p/v), para imitar la reabsorción intestinal humana de las sales biliares (1 h a temperatura ambiente y agitación constante), y se obtuvieron los *solubles bioaccesibles* Br^{SB} , HD^{SB} y A10^{SB} , luego de centrifugar y filtrar (0,22 μm) el sobrenadante. Se ensayaron varias diluciones de solubles de Br^{SB} para alcanzar concentraciones de los reactivos de digestión equivalentes a las presentes en las muestras de HD y A10D. La Tabla V.5 muestra la concentración de proteína soluble de las fracciones utilizadas en los ensayos con cultivos celulares.

Tabla V.5. Concentración de proteína soluble (mg/ml) en las fracciones solubles directas y bioaccesibles.

Muestra	Proteína Soluble (mg/ml)
HD ^{SD}	22,3 ± 0,2
A10D ^{SD}	16,50 ± 0,04
Br ^{SD}	1,2 ± 0,6
HD ^{SB}	15 ± 1
A10D ^{SB}	5,8 ± 0,3
Br ^{SB}	0,33 ± 0,03

A fin de analizar la composición de las fracciones bioaccesibles y si la resina eliminó también componentes proteicos, se determinó la concentración de proteína soluble. Luego del tratamiento con colestiramina el contenido de proteína soluble representó el 65% de la presente en HD (pérdida del 35%); en el caso de A10 representó en 35% (pérdida del 65%). Mientras que en Br el contenido de proteína soluble representó el 31%, por lo que la pérdida de polipéptidos/péptidos derivados de las enzimas digestivas fue de 69% en Br. Estos resultados sugieren que una alta proporción de la proteína soluble perdida en las muestras bioaccesibles podría deberse a que el tratamiento con colestiramina produjo la eliminación de los ácidos biliares junto a compuestos de naturaleza proteica provenientes de caupí y de las enzimas digestivas, probablemente por interacción con la resina de intercambio aniónico o con los ácidos biliares (Rodriguez, 2022).

V.2.6. Citotoxicidad en células Caco2-TC7

Los primeros ensayos realizados sobre los cultivos de células Caco2-TC7 evaluaron el efecto citotóxico de Br^{SB}, HD^{SB} y A10^{SB} (Tabla V.6 y Figura V.7). La citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH, como indicador de daño celular referido a la actividad máxima de LDH alcanzada en el control (+) de muerte (DMEM con Tritón X-100 0,1% v/v), y se estimó la viabilidad como el recíproco de la citotoxicidad. Se ensayaron varias diluciones de Br^{SB}, HD^{SB} y A10^{SB}.

En la muestra sin diluir y la dilución 1/5 de Br^{SB}, se observó una elevada citotoxicidad (Tabla V.6). Para las diluciones 1/10 y 1/20 de Br^{SB}, la citotoxicidad disminuyó a 58 y 21% respectivamente, indicando un % de viabilidad superior al 42%.

Santos-Hernández y col. (2018) evaluaron la viabilidad celular bajo las condiciones estandarizadas de la DGIS (con 10 mM en la mezcla final sales biliares) en para aislado de

proteína de suero lácteo, donde los digeridos gástricos mantuvieron la viabilidad celular a las concentraciones de muestras ensayadas (4, 1 y 0,25 mg/ml), pero los digeridos intestinales causaron una notable disminución de la misma, atribuyendo la citotoxicidad la presencia de sales biliares en estas muestras. Posteriormente, Santos-Hernández y col. (2020), realizaron la DGIS para aislado de proteína de arvejas, soja y lenteja reduciendo la concentración de sales biliares en la fase intestinal (2,5 mM en la mezcla final) a fin de utilizar los digeridos resultantes en estudios posteriores reduciendo la citotoxicidad.

Tabla V.6. Citotoxicidad (%) o su reciproco viabilidad (%) determinada por el ensayo de LDH de las fracciones solubles bioaccesibles (SB) sin diluir (SD) y diluciones.

Muestra	Dilución	LDH	LDH
		% citotoxicidad	% viabilidad
HD	SD	3,6 ± 1	96
	1 en 5	9 ± 4	91
	1 en 10	8 ± 3	92
	1 en 20	5 ± 3	99
A10D	SD	3 ± 2	97
	1 en 5	5 ± 3	95
	1 en 10	12 ± 3	88
	1 en 20	9 ± 4	91
Br	SD	100 ± 18	0
	1 en 5	88 ± 1	12
	1 en 10	58 ± 13	42
	1 en 20	21 ± 2	79

En el caso de los solubles bioaccesibles HD^{SB} y A10^{SB}, se observó tanto en las muestras sin diluir como en todas las diluciones ensayadas, una citotoxicidad menor al 5% y al 10%, respectivamente. Estos resultados muestran que el tratamiento con colestiramina fue efectivo para eliminar los componentes citotóxicos -en principio las sales biliares- de ambas muestras. Sin embargo, la alta toxicidad dada por los componentes de los fluidos digestivos en Br^{SB} podría deberse a la ausencia de proteínas, péptidos y otros componentes no proteicos (presentes en harina y aislado proteico), los cuales ejercerían un efecto amortiguador. Teniendo en cuenta los resultados de citotoxicidad obtenidos para Br^{SB}, se seleccionaron las diluciones 1/10 y 1/20

de HD^{SB} y A10^{SB} para los ensayos de determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células intestinales.

V.2.7. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células intestinales

Caco2-TC7

El ensayo de determinación del contenido intracelular de ROS consiste en la detección de fluorescencia derivada de la sonda dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), la cual es permeable en las células Caco2-TC7 y retenida en ellas luego de que se le remueven los grupos acetato por esterasas intracelulares. Esta sonda puede reaccionar con varias ROS incluyendo H₂O₂, radicales hidroxilos y peroxinitrito. Se adoptó como protocolo el descripto en la sección III.6.5.3, el cual permitió obtener diferencias detectables en el contenido de ROS intracelulares entre el control positivo o de máximo estrés oxidativo (ausencia de sustancia antioxidante, C1) y el control negativo (sin inducción de estrés oxidativo, C2). Se tuvo en cuenta los resultados de citotoxicidad de las muestras a fin de asegurar la utilización de muestras que no produjeran una pérdida importante de viabilidad celular. Asimismo, el tratamiento estresor utilizado, H₂O₂, a la concentración ensayada (500 μM), no produce una pérdida importante de viabilidad (García Fillería y Tironi, 2021).

Como se mencionó previamente, se tuvo en cuenta que el Br^{SB} (sin diluir y la dilución 1/5; ensayados en paralelo a HD^{SB} y A10D^{SB}) presentó una alta citotoxicidad (> 80%, Tabla V.6). Descartando las concentraciones de los Br con alta citotoxicidad, se pudieron obtener cambios de fluorescencia en las muestras superiores al de C1 (control de máxima oxidación) siendo el orden C1 < HD^{SB}/A10D^{SB} < Br^{SB} para cada dilución ensayada, efecto probablemente debido a la mayor generación de ROS en presencia de ácidos biliares o algún otro reactivo de digestión remanente (Figura V.8). Por lo tanto, para calcular los % de inhibición de las muestras se emplearon las correspondientes diluciones de Br^{SB} (1/20 y 1/10), como control de máxima oxidación en vez del C1.

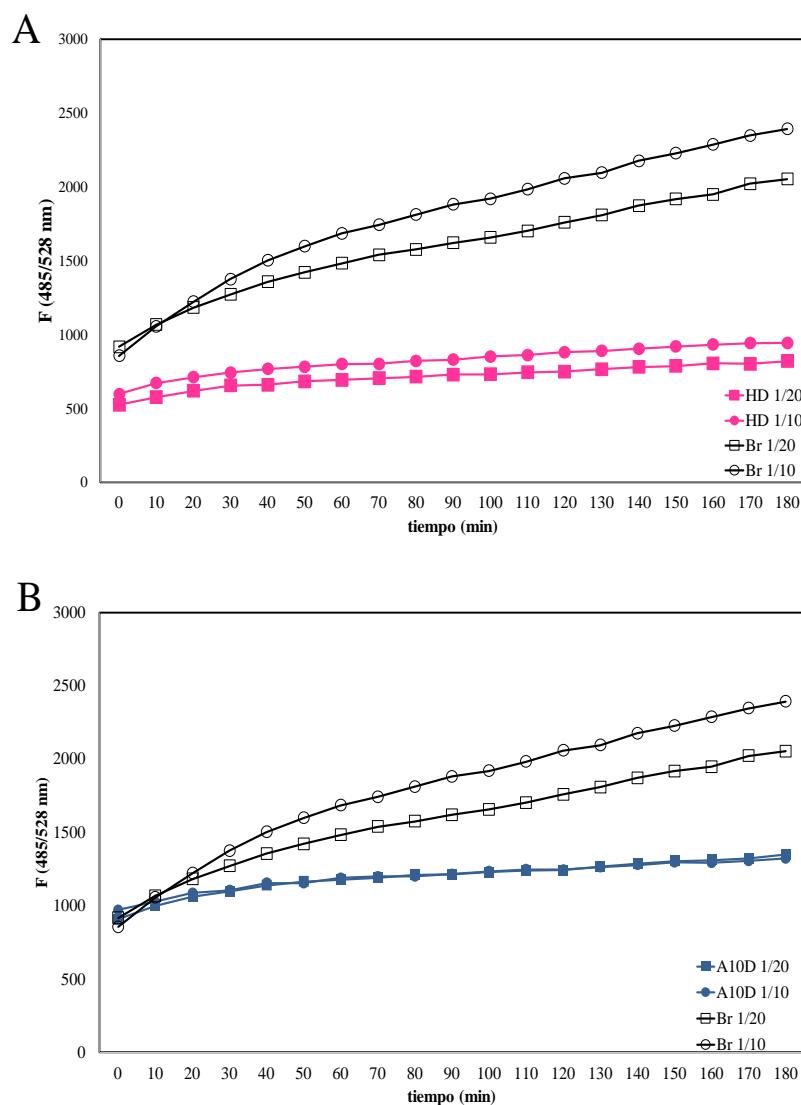


Figura V.8. Curvas de fluorescencia en función del tiempo A) HD^{SB} y B) A10D^{SB}.

La harina sometida a DGIS y luego del tratamiento con colestiramina (HD^{SB}), mostró una elevada inhibición de ROS (77,7%) en las células Caco2-TC7, a la mayor concentración ensayada (1,45 mg/ml; Figura V.9.A). Por su parte, la fracción soluble bioaccesible del aislado proteico (A10D^{SB}), mostró un valor de inhibición de ROS similar al de HD^{SB} (77,3%), pero en una concentración casi 3 veces menor (0,58 mg/ml; Figura V.9.B). Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en condiciones similares a las ensayadas en esta tesis para muestras provenientes de harina y aislado de amaranto sometidos a DGIS. Rodriguez y col. (2024) evaluaron el efecto antioxidante de harina y observaron una elevada inhibición de ROS (~80%) en un rango de concentración de proteína de 1,28 a 12,8 mg/ml. Por su parte, García Fillería y Tironi (2021), informaron un porcentaje de inhibición de ROS de ~70% del aislado proteico para una concentración de proteínas de 0,58 mg/ml. La inhibición de ROS

debida al tratamiento con péptidos de HD y A10D pudo ocurrir por medio de distintos mecanismos. Podría actuar ingresando a la célula y actuar como captadores de ROS dentro de la célula, o ingresar en la célula y producir un efecto en las vías de señalización que llevan a la inducción de enzimas o compuestos antioxidantes o podrían interactuar con la membrana plasmática e inducir vías de señalización que activan enzimas o compuestos antioxidantes.

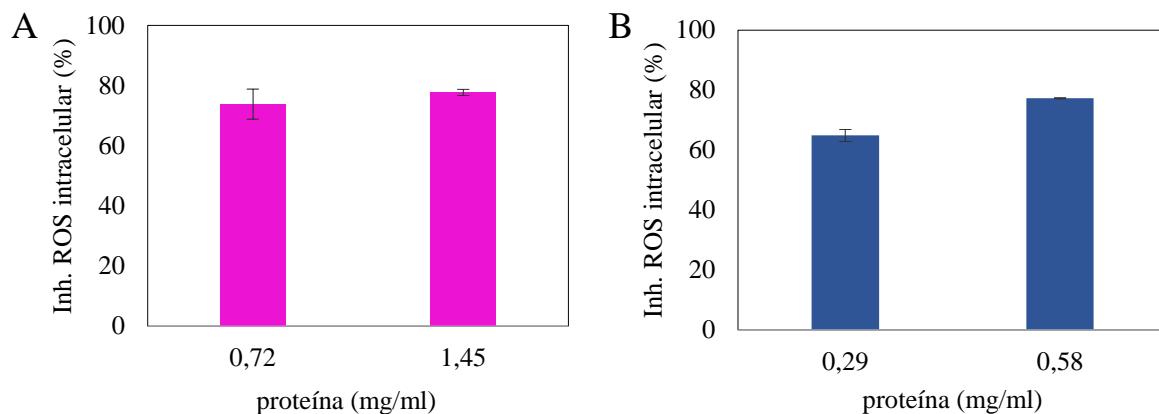


Figura V.9. Inhibición (%) del contenido de ROS en células Caco-2 TC7 tratadas con fracciones solubles bioaccesibles de harina y aislado proteico de caupí. **A)** HD^{SB} . **B)** A10D^{SB} . En todos los casos el % de inhibición de ROS se calculó con respecto al control de máxima oxidación del blanco de reacción correspondiente a cada dilución de las muestras.

V.2.8. Caracterización de secuencias peptídicas de fracción antioxidante de caupí

Las fracciones A10D y 4_{A10D} , que presentaron mayor actividad antioxidante ORAC, provenientes de la DGIS fueron analizadas por nanoLC-ESI-ORBITRAP. Los resultados fueron contrastados contra la base de datos UNIPROT para *Vigna unguiculata* sin encontrar coincidencias entre las secuencias. Por lo tanto, estas fracciones fueron sometidas a una digestión con tripsina para nuevamente ser analizadas por nanoLC-ESI-ORBITRAP. Con este abordaje se obtuvieron secuencias de péptidos presentes en las proteínas de origen correspondientes al identificador taxonómico 3917 de *Vigna unguiculata* (11 para 3_{A10D} y 25 para 4_{A10D}), que se muestran en las Tablas V.7 y V.8.

Los resultados obtenidos a partir de las fracciones de 3_{A10D} y 4_{A10D} , permitieron identificar un total de 24 y 84 péptidos tripticos, respectivamente. Se puede observar que hay ciertas secuencias que se solapan parcialmente, es decir, péptidos que provienen de la misma región de la proteína. Como se muestra en las Tabla V.7 y V.8, el peso molecular de los péptidos identificados en 3_{A10D} oscilaba entre 1043,6095 y 2438,1848 Da (lo cual equivaldría a péptidos

de 9 a 22 aminoácidos) mientras que en 4_{AIOD} oscilaba entre 976,4483 y 3038,4499 Da (lo cual equivaldría a péptidos de entre 9 y 28 aminoácidos). Las fracciones identificadas corresponden a una mezcla de péptidos con peso molecular similar ya que la resolución de la columna de exclusión molecular utilizada es baja para separar péptidos individuales (Figura V.5B).

Posteriormente, las secuencias de péptidos identificadas (Tabla V.7 y V.8) fueron buscadas en la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>): el 41% de éstos compartían parcialmente secuencias internas con péptidos antioxidantes para 3_{AIOD} , (desde dipéptidos hasta octapéptidos), y el 44% para 4_{AIOD} (Tabla V.9). Las Figura V.10 A y B muestra la composición aminoacídica de los péptidos resistentes con péptidos internos parcialmente antioxidantes al final de la digestión intestinal identificados por nanoLC-MS/MS. De todos los péptidos identificados, se calcularon las ocurrencias de aminoácidos. Las secuencias peptídicas con péptidos internos parcialmente antioxidantes de caupí de 3_{AIOD} y 4_{AIOD} , que fueron resistentes a la acción de las enzimas de la DGIS contenían principalmente aminoácidos hidrofóbicos (I, Y, M, L, A, F, W, V), representando un 46 y 44% del total, respectivamente. En la Tabla V.9 se presenta la hidrofobicidad de estos péptidos que calculó basándose en la secuencia de aminoácidos y la longitud de la secuencia de péptidos utilizando la herramienta bioinformática en línea *Peptide 2.0* (Peptide Hydrophobicity/Hydrophilicity Analysis Tool (peptide2.com)). La mayoría de los péptidos tenían una hidrofobicidad intermedia, que iba del 30 al 50%.

En general, el peso molecular de los péptidos activos disminuye a medida que avanza la digestión, lo que expone continuamente aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y básicos. Según Chen y col. (2012), los péptidos de bajo peso molecular (<3 kDa) tienen una alta actividad antioxidante, y pueden ser más beneficiosos para la absorción intestinal en humanos. La composición de aminoácidos también es un factor clave que afecta la actividad antioxidante de los péptidos. Los péptidos con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos pueden ingresar al órgano objetivo a través de interacciones hidrofóbicas con la membrana celular, y sus electrones abundantes pueden usarse para neutralizar los radicales libres. Los aminoácidos aromáticos pueden estabilizar los radicales libres deficientes en electrones al proporcionar protones y mantener su estabilidad a través de una estructura de resonancia, lo que mejora la capacidad para eliminar los radicales libres. Los aminoácidos básicos pueden prevenir la oxidación de ácidos grasos insaturados causada por los radicales libres.

Tabla V.7. Péptidos trípticos identificados por HPLC-MS/MS a partir de la fracción β_{A10D} de la CEM, proteína de origen, relación m/z y su localización en las proteínas de origen.

Proteína de origen (β_{A10D})		m/z (Da)	Secuencia	Nº de AA	Localización
ADP-ribosylation factor		775,08917	LGEIVTTIPTIGFNVETVEYK	21	39-59
GN=DEO72_LG4g2328		813,3988	HYFQNTQGLIFVVDSNDRER	20	80-99
PE=3 SV=1					
Arf/Sar family		783,38239	NISFTVWDVGGQDK	13	424-438
GN=DEO72_LG9g2257		775,08917	LGEIVTTIPTIGFNVETVEYK	21	404-424
PE=3 SV=1		545,31854	DAVLLVFANK	10	483-493
Tubulin alpha chain		782,67615	AFVHWYVGEGMEEGEFSEAR	19	403-422
GN=DEO72_LG2g4807		803,7373	FDGAINVDITEFQTNLVPYPR	21	244-264
PE=3 SV=1					
Isocitrate dehydrogenase [NADP]		678,34888 607,97766	TLEAEAAHGTVTR YNVAIKCATITPDEAR	13 16	304-316 69-74
GN=DEO72_LG7g2424					
PE=3 SV=1					
Actin beta/gamma	1	652,026	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	18	98-115
GN=DEO72_LG3g2898		566,76611	GYSFTTTAER	10	148-157
PE=3 SV=1		400,24026	AVFPSIVGRPR	11	31-41
Serine/threonine-protein phosphatase		449,72443 579,65887	AHQVVEDGYEFFAKR GKQSLETICLLAYK	15 15	245-259 94-108
GN=DEO72_LG2g5442					
PE=3 SV=1					
Elongation factor 1-alpha		560,80353	STTTGHЛИYK	10	21-30
GN=DEO72_LG5g1808		438,91901	EHALLSFTLGVK	12	135-146
PE=3 SV=1					
Heat shock a protein	1/8	744,35345	TTPSYVAFTDTER	13	40-53
GN=DEO72_LG10g4260		614,81897	VEIIANDQGNR	11	29-39
PE=4 SV=1					
Galactinol--sucrose galactosyltransferase		460,91483 595,98132	SCLLQFTDKR FQPVHDLTIGVEFGAR	11 16	751-761 762-777
GN=DEO72_LG1g951 PE=4					
SV=1					
Rab family		540,789	STIGVEFATR	10	43-52
GN=DEO72_LG1g28 PE=4		522,30835	VVLIGDSGVGK	11	15-25
SV=1					
RmlC-like jelly roll fold		584,8382	AILTLVNPDR	11	108-118
GN=DEO72_LG9g3346		730,31427	GQNNPFYFDSDR	12	41-52
PE=4 SV=1					

Tabla V.8. Péptidos trípticos identificados por HPLC-MS/MS a partir de la fracción 4_{A10D} de la CEM, proteína de origen, relación m/z y su localización en las proteínas de origen.

Proteína de origen	m/z (Da)	Secuencia	Nº de AA	Localización
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain GN=DEO72_LG3g960 PE=3 SV=1	1465,75464	TFQGPPHGIQVER	13	147-159
	3038,44989	ELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYCR	27	259-285
	1021,53129	DTDILAAFR	9	33-41
	1516,7617	DRFLFCAEAIFK	12	216-227
	1261,71506	DITLGFVDLLR	11	340-350
	2101,19504	DKLNKYGRPLLGCCTIKPK	18	160-177
	1846,00689	LEGERDITLGFVDLLR	16	335-350
	1245,63364	FLFCAEAIFK	10	218-226
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=DEO72_LG6g1990 PE=3 SV=1	2645,57125	LNGIALRVPTPNVSVDLVVQVSKK	25	295-319
	1254,61133	TFAEEVNAAFR	11	320-330
	1908,11644	VPTPNVSVDLVVQVSKK	18	302-319
	1611,91768	ARAAALNIVPTSTGAAK	17	266-282
	1555,68055	GTMTTTHSYTGDQR	14	241-254
	2702,59271	GKLNIGIALRVPTPNVSVDLVVQVSKK	27	293-318
	2114,03351	FGIIKGTMTTTHSYTGDQR	19	236-254
	2894,37712	SQAETGEIKGHYLNATAGTCEEMIKR	26	235-260
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain GN=DEO72_LG9g1975 PE=3 SV=1	1465,75464	TFQGPPHGIQVER	13	154-166
	3038,44989	ELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYCR	27	266-292
	1021,53129	DTDILAAFR	9	41-47
	2101,19504	DKLNKYGRPLLGCCTIKPK	18	167-184
	2830,38217	EYKLTYYTPEYETKDTDILAAFR	23	26-48
	1950,91604	GHYLNATAGTCEEMIKR	17	244-260
	1936,11135	VPTPNVSVDLVVNEKK	18	321-338
	1808,01639	VPTPNVSVDLVVNEKK	17	321-337
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=DEO72_LG11g3797 PE=3 SV=1	2545,4712	LNGIALRVPTPNVSVDLVVNEKK	24	314-337
	1611,91768	ARAAALNIVPTSTGAAK	17	285-301
	1555,68055	GTMTTTHSYTGDQR	14	260-273
	2730,58762	GKLNIGIALRVPTPNVSVDLVVNEKK	26	312-337
	1431,68628	IVGEEHYETAQR	12	379-390
	2190,2645	LSIFETGIKVVDLLAPYRR	19	146-164
	2034,16339	LSIFETGIKVVDLLAPYR	18	146-163
	1471,85526	TVLIMELINNIAK	13	179-191
H(+) -transporting two-sector ATPase GN=DEO72_LG11g734 PE=3 SV=1	2097,10086	GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR	22	88-109
	2066,00836	MSGGDHIHAGTVVGKLEGER	20	320-339
	1465,75464	TFQGPPHGIQVER	13	147-159
	1021,53129	DTDILAAFR	9	33-41

GN=DEO72_LG11g735 PE=3

SV=1	2101,19504	DKLNKYGRPLLGCTIKPK	18	160-177
Elongation factor 1-alpha	1586,9013	VHINIVVIGHVDSGK	15	6-20
GN=DEO72_LG5g1664 PE=3	1298,7467	EHALLAFTLGVK	12	135-146
SV=1	1799,95379	ARYDEIVKEVSSYLK	15	165-179
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1869,06915 1498,84753	VPTVDVSVVVDLTVRLEK VPTVDVSVVVDLTVR	17 14	237-153 237-250
GN=DEO72_LG11g1714				
PE=3 SV=1	2049,0685	FGIVEGLMTTVHSITATQK	19	170-188
ATP synthase subunit alpha	2273,22098	SVYEPLQTGLIAIDSMPIGR	21	142-162
GN=atpA PE=3 SV=1	1612,9017 1488,80165	IVNTGTVLQVGDIAR ASSVAQVVTTLQER	15 14	26-41 203-216
Phosphoglycerate kinase	1779,03746	LVASLPEGGVLLLENVR	17	176-192
GN=DEO72_LG6g935 PE=3	1206,73172	VILSSHILGRPK	11	129-139
SV=1	2356,27585	GVSLLLPSDVVIADKFAPDANSK	23	332-354
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1869,06915 1498,84753	VPTVDVSVVVDLTVRLEK VPTVDVSVVVDLTVR	16 14	238-254 238-251
GN=DEO72_LG5g1605 PE=3				
SV=1	2229,23115	KVIISAPSKDAPMFVVGVNEK	21	121-142
Phosphoglycerate kinase	1206,73172	VILSSHILGRPK	11	59-69
GN=DEO72_LG6g939 PE=3	1933,97665	LASLADIYVNDAFGTAHR	18	138-155
SV=1	2062,07161	KLASLADIYVNDAFGTAHR	19	137-155
Arf/Sar family	3477,85225	DAVLLVFANKQDLPNAMNAEITDKLGLHSLR 32		485-516
GN=DEO72_LG9g2257 PE=3				
SV=1	1089,63027	DAVLLVFANK	10	485-494
ATP-dependent Clp protease	1314,73759	RVLELSLEEAR	11	176-186
ATP-binding subunit ClpC	1430,82871	VITLDMGLLVAGTK	14	339-342
GN=DEO72_LG11g1611				
PE=3 SV=1	1158,63648	VLELSLEEAR	10	177-186
Molecular chaperone HtpG	1601,74756	SGDEMITSLKDYVTR	14	441-454
GN=DEO72_LG5g2855 PE=3	2195,17066	ITLFLKEDQLEYLEERR	17	174-190
SV=1	2039,06955	ITLFLKEDQLEYLEER	16	174-189
Elongation factor Tu	1354,66713	NTTVTGVEMFQK	12	338-349
GN=DEO72_LG11g1397	1435,66996	KYDEIDAAPEER	12	121-132
PE=3 SV=1	1810,88175	GITINTATVEYETENR	16	135-150
ATP synthase subunit beta	1399,76922	VGLTGLTVAEHFR	13	310-322
GN=DEO72_LG9g3584 PE=3				
SV=1	1390,68622	AHGGFSVFAGVGER	14	352-365
Heat shock a protein 1/8	2683,29581	VEIIANDQGNRTTPSYVGFTDTER	24	29-52
GN=DEO72_LG9g2091 PE=4				
SV=1	1473,68561	TTPSYVGFTDTER	13	40-52
	1001,56259	DVNAAVATIK	10	327-336

Tubulin alpha chain

GN=DEO72_LG4g2410 PE=3

SV=1	1701,90578	AVFVDLEPTVIDEVR	15	65-79
Fructose-bisphosphate aldolase	1114,5276	SAAYYQQGAR	10	173-182
GN=DEO72_LG3g3182 PE=3				
SV=1	1387,71758	LASIGLENTEANR	13	83-95
Actin beta/gamma 1	976,44828	AGFAGDDAPR	10	21-30
GN=DEO72_LG3g2898 PE=3				
SV=1	1132,52693	GYSFTTTAER	10	199-208
Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	1170,69149	VVAVIMVGGPTK	12	7-17
GN=DEO72_LG5g3060 PE=4				
SV=1	1484,86174	VVAVIMVGGPTKGTR	15	7-21
Cysteine synthase	2115,17093	RPENAGKLIVVVFPSFGER	19	286-304
GN=DEO72_LG1g1296 PE=3				
SV=1	1362,778	LIVVVVFPSFGER	12	293-304
Tubulin alpha chain	1001,56259	DVNAAVATIK	10	327-336
GN=DEO72_LG9g3456 PE=3				
SV=1	1715,92143	ALFVDLEPTVIDEVR	15	65-79
ATP-dependent RNA helicase	1114,68304	VLITTDLLAR	10	332-341
GN=DEO72_LG2g594 PE=3				
SV=1	1827,93881	GIYAYGFEKPSAIQQR	16	54-69

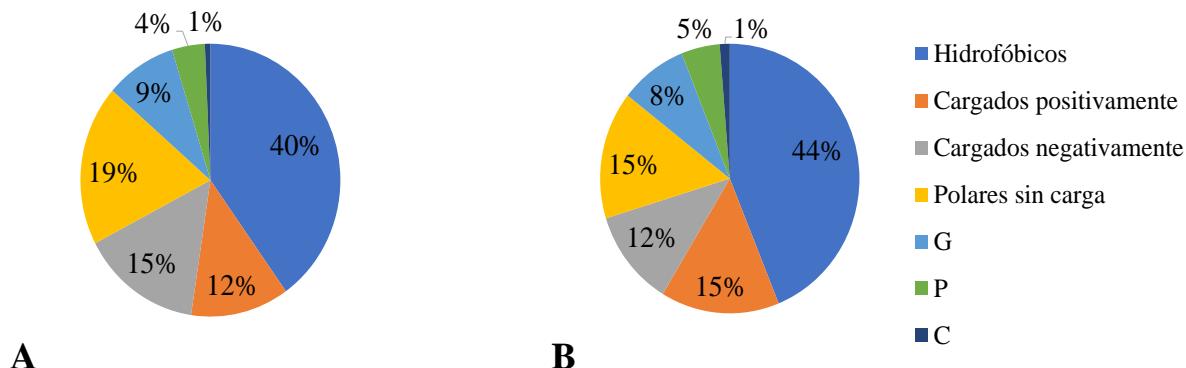


Figura V.10. Distribución de aminoácidos en las secuencias peptídicas identificados con potencial actividad antioxidante al final de la DGIS. **A:** 3_{A10D} y **B:** 4_{A10D}. Hidrofóbicos: I, Y, M, L, A, F, W, V. Cargados positivamente: R, H K. Cargados negativamente: D, E. Polares sin carga: Q, N, S, T. G: Gln. P: Pro. C: Cys.

Tabla V.9. Péptidos con potencial antioxidante identificados en las fracciones 3_{A10D} y 4_{A10D}, fraccionado por CEM.

Proteína de origen	m/z (Da)	Secuencia	Nº de AA	Péptidos con actividad antioxidante*	Hidrofobicidad (%)	peptide ranker
A103D						
ADP-ribosylation factor GN=DEO72_LG4g2328 PE=3 SV=1	813,3988	HYFQNTQGLIFVVDSNDR ER	20	YF	30	0,223
Arf/Sar family GN=DEO72_LG9g2257 PE=3 SV=1	783,38239	NISFTVWDVGGQDK	13	VW	35,71	0,194
Tubulin alpha chain GN=DEO72_LG2g4807 PE=3 SV=1	782,67615	AFVHWYVGEGMEEGEFS EAR	19	WY	40	0,310
Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=DEO72_LG7g2424 PE=3 SV=1	678,34888	TLEAEAAHGTVTR	13	AH	38,46	0,095
Actin beta/gamma 1 GN=DEO72_LG3g2898 PE=3 SV=1	652,026	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	18	VAPEEHPV	61,11	0,341
Serine/threonine-protein phosphatase GN=DEO72_LG2g5442 PE=3 SV=1	449,72443	AHQVVVEDGYEFFAKR	15	AH	40	0,327
RmlC-like jelly roll fold GN=DEO72_LG9g3346 PE=4 SV=1	579,65887	GKQSLETICLLLAYK	15	AY	40	0,505
Elongation factor 1-alpha GN=DEO72_LG5g1808 PE=3 SV=1	560,80353	STTTGHЛИYK	10	IK, HL, IY	20	0,092
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain GN=DEO72_LG3g960 PE=3 SV=1	1465,75464	TFQGPPPHGIQVER ELGVPIVMHDYLTTGGFTA	13	PHG, GPP	38,46	0,302
1516,7617	DRFLFCAEAIFK	12	EL	40,74	0,186	
1261,71506	DITLGFVDLLR	11	FC, LFC	58,33	0,667	
2101,19504	DKLNKYGRPLLGCYIKPK	18	LLR, LGF	54,55	0,387	
2101,19504	KP, GC	33,33	0,543			
1846,00689	LEGERDITLGFDLLR	16	KP, GC	43,75	0,306	
1245,63364	FLFCAEAIFK	10	LLR, LGF	70	0,690	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1611,91768	ARAAALNIVPTSTGAAK	17	GAA	58,82	0,163

GN=DEO72_LG6g1990						
PE=3 SV=1						
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	1465,75464	TFQGPPHGIQVER ELGVPIVMHDYLTGGFTA	13	GPP	38,46	0,302
GN=DEO72_LG9g1975	3038,44989	NTSLAHYCR	27	EL	40,74	0,186
PE=3 SV=1	2101,19504	DKLNKYGRPLLGCCTIKPK	18	KP, GC	33,33	0,542
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase						
GN=DEO72_LG11g3797						
PE=3 SV=1	1611,91768	ARAAALNIVPTSTGAAK	17	GAA	58,82	0,163
H(+) -transporting two-sector ATPase						
GN=DEO72_LG11g734						
PE=3 SV=1	1471,85526	TVLIMELINNIAK	13	EL	61,54	0,090
Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	2066,00836	MSGGDHIHAGTVVGKLE GER	20	HIH	30	0,261
GN=DEO72_LG11g735	1465,75464	TFQGPPHGIQVER	13	PHP, GPP	38,46	0,302
PE=3 SV=1	2101,19504	DKLNKYGRPLLGCCTIKPK	18	KP, GC	33,33	0,542
Elongation factor 1-alpha	1298,7467	EHALLAFTLGVK	12	LAF	58,33	0,343
GN=DEO72_LG5g1664						
PE=3 SV=1	1799,95379	ARYDEIVKEVSSYLK	15	LK, RY	33,33	0,168
ATP synthase subunit alpha GN=atpA PE=3						
SV=1	2273,22098	SVYEPLQTGLIAIDSMIPIG R	21	VY	52,38	0,06
Phosphoglycerate kinase						
GN=DEO72_LG6g935						
PE=3 SV=1	1206,73172	VILSSHLCRK	11	HL	45,45	0,320
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase						
GN=DEO72_LG5g1605						
PE=3 SV=1	2229,23115	KVIISAPSKDAPMFVVGV NEK	21	KVI, KD	57,14	0,076
Phosphoglycerate kinase	1206,73172	VILSSHLCRK	11	HL	45,45	
GN=DEO72_LG6g939	1933,97665	LASLADIYVNDAFGTAHR	18	IY, AH	50	0,248
PE=3 SV=1	2062,07161	KLASLADIYVNDAFGTAH R	19	IY, AH	47,37	0,243

Arf/Sar family						
GN=DEO72_LG9g2257	DAVLLVFANKQDLPNAM					
PE=3 SV=1	3477,85225	NAAEITDKLGLHSLR	32	LH, LHS	53,13	0,201
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	1314,73759	RVLELSLEAR	11	EL	45,45	0,067
GN=DEO72_LG11g1611						
PE=3 SV=1	1158,63648	VLELSLEAR	10	EL	50	0,082
Molecular chaperone Htp	1601,74756	SGDEMITSKDYVTR	14	KD, LK	21,43	0,152
GN=DEO72_LG5g2855						
PE=3 SV=1	2039,06955	ITLFLKEDQLEYLEER	16	LK	37,5	0,126
ATP synthase subunit beta						
GN=DEO72_LG9g3584						
PE=3 SV=1	1390,68622	AHGGFSVFAGVGER	14	AH	42,86	0,534
Fructose-bisphosphate aldolase						
GN=DEO72_LG3g3182	AY, YYQ,					
PE=3 SV=1	1114,5276	SAAYYQQGAR	10	AYY	30	0,461
Actin beta/gamma 1						
GN=DEO72_LG3g2898						
PE=3 SV=1	976,44828	AGFAGDDAPR	10	AGDDAPR	50	0,562
Tubulin alpha chain						
GN=DEO72_LG9g3456						
PE=3 SV=1	1715,92143	ALFVDLEPTVIDEV	15	LFV	60	0,187
ATP-dependent RNA helicase						
GN=DEO72_LG2g594	YA, KP,					
PE=3 SV=1	1827,93881	GIYAYGFEKPSAIQQR	16	YAY, IY, AY	37,5	0,372

*Se obtuvieron de BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, Abril 2024).

CONCLUSIONES

Las proteínas de caupí obtenidas a pH 10 fueron sometidas a un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* optimizado para aislado proteico, donde la hidrólisis secuencial con pepsina/pancreatina produjo un hidrolizado (A10PP) con un alto grado de hidrólisis. Este proceso generó cambios en el perfil peptídico, enriqueciendo la fracción de péptidos de bajo peso molecular y mejorando la actividad antioxidante medida por ABTS.

La aplicación de un método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* internacionalmente consensuado, que simula condiciones *in vivo* (fase oral, gástrica e intestinal) sobre harina y aislado proteico de caupí obtenidas a pH 10, donde la hidrólisis secuencial con amilasa, pepsina y pancreatina produjo hidrolizados con altos grados de hidrólisis. El grado de hidrólisis de la harina fue menor que el del aislado proteico, lo que sugiere que la presencia de otros componentes en la harina y/o la conformación de las proteínas de partida tuvo un efecto sobre este parámetro. Este efecto fue además evaluado en la composición polipeptídica de los perfiles electroforéticos y cromatográficos donde se observó una disminución o desaparición de las fracciones de mayor tamaño molecular, generándose péptidos más pequeños y aminoácidos libres, cambios que se notaron en mayor medida en los digeridos obtenidos a partir del aislado proteico.

El proceso de DGIS produjo un importante aumento de la capacidad secuestrante de radicales peroxilo (ORAC) y radicales ABTS, como así también presentó un aumento de la capacidad de prevenir la oxidación del Fe²⁺ (FRAP) en los digeridos de harina y de aislado proteico. La actividad antioxidante ORAC de ambos digeridos fue similar, mientras que, el digerido gastrointestinal del aislado proteico fue más activo en su actividad antioxidante por ABTS que el digerido de la harina y ocurrió lo contrario en cuanto a la actividad medida por FRAP.

Por otro lado, los péptidos liberados luego de la hidrólisis también podrían actuar como quelantes de metales. En el caso del ensayo de HORAC, tanto H como HD mostraron valores de IC₅₀ menores a los registrados para A10 y A10D, respectivamente, lo que sugiere que la harina aportaría algunos componentes solubles activos (ausentes en el aislado) con capacidad de prevenir la formación de radicales OH·. Sin embargo, esta actividad no aumentó significativamente luego de la DGIS. La presencia de moléculas de naturaleza no proteica en los digeridos, pueden contribuir a la actividad antioxidante, entre ellas compuestos fenólicos.

Para evaluar la actividad antioxidante celular de HD y A10D sobre cultivos de células Caco-2 TC7, se recurrió al uso de la resina colestiramina a fin de remover las sales biliares y obtener fracciones bioaccesibles no citotóxicas. Si bien, tanto las fracciones bioaccesibles de

A10D como HD lograron la inhibición del contenido de ROS intracelular en un 77%, este resultado fue alcanzado a partir de una concentración casi 3 veces menor de A10D respecto de HD, mostrando una mayor actividad antioxidante intracelular.

A partir de los digeridos de H y A10, se obtuvieron fracciones peptídicas de acuerdo a su masa molecular. La concentración peptídica fue menor en las fracciones de HD que en las de A10D, debido probablemente a una disminución en la solubilidad. La actividad antioxidante evaluada por ORAC y ABTS fue mayor para todas las fracciones de A10D en comparación con las de HD. Las fracciones con MM entre 2,5 y 0,68 kDa fueron las más activas (método de ORAC). A partir de éstas, se lograron identificar por espectrometría de masas, secuencias de péptidos trípticos que provenían de la digestión de 11 y 25 proteínas de caupí, halladas en los picos 3_{A10D} y 4_{A10D} , respectivamente.

CAPÍTULO VI

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE HARINA Y AISLADO PROTEICO DE CAUPI: EFECTO DE LA DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

En la primera sección del presente capítulo, se focalizó la investigación en el estudio de los compuestos fenólicos (CF) presentes en las muestras H y A10, para lo cual se realizaron cinco técnicas de extracción distintas. Los CF totales (CFT) obtenidos fueron cuantificados y su identificación se efectuó utilizando RP-HPLC. Por otra parte, se estudió el impacto de la DGIS sobre la liberación de CF en H y A10. Finalmente, se procedió con la evaluación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos de CF, tanto antes como después de la DGIS, mediante diversas metodologías.

VI.1. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

La extracción de CF en materiales vegetales está influenciada por su naturaleza química, el método de extracción empleado, el tamaño de las partículas de la muestra, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, así como la presencia de sustancias interferentes. Las propiedades intrínsecas de los solventes empleados y las condiciones de los procesos de extracción ejercen un impacto significativo, sobre la eficacia del proceso de extracción de CF. La polaridad del solvente juega un papel clave en el aumento de su solubilidad, lo que a su vez permite la migración desde la matriz al sistema del solvente, aumentando el rendimiento de extracción (Martínez-Ramos y col., 2020). Además, no se ha reportado que un único disolvente permita una extracción completa de los compuestos fenólicos solubles. Para el caupí, la bibliografía muestra diversos sistemas de extracción utilizados, con distintos sistemas solventes, temperaturas y tiempos de extracción (Tabla VI.1), resultando el CFT en un amplio rango de valores. Cai y col. (2003) reportaron el contenido de CFT en un rango de 340 a 3760 µg ácido gálico equivalente (AGE)/g para 17 variedades de caupí, utilizando un método de extracción con acetona al 80% a 95 °C durante 20 min, donde los valores más elevados de CFT se observaron en las variedades de caupí de color colorado y negro. Avanza y col. (2021) obtuvieron contenidos de CF muy elevados para *Vigna unguiculata*, variedad Colorado (65,68 mg AGE/g), con extracciones por maceración con 24 h de duración, usando acetona 70% v/v acidificada con ácido fórmico 1%.

En el presente estudio, en primera instancia, se optó por la utilización de una combinación de solventes próticos polares (metanol y agua, MA), los cuales exhiben la capacidad de actuar como donantes de puentes de hidrógeno debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura molecular. Por otra parte, se utilizó la combinación de metanol/agua con HCl (MH), a fin de extraer los CF solubles en solventes próticos polares más los CF del grupo glucósidos de flavanoles.

Tabla VI.1. Reporte de contenido de CFT (método de Folin-Ciocalteau, µg AGE/g) en harina de caupí obtenidos por diferentes metodologías de extracción.

CF	Variedad	Condiciones de extracción	Referencia
65690	Caupí Cuarentón, variedad colorado	acetona con ácido fórmico 1%, 24 h	Avanza y col. 2021.
19300	Caupí variedad <i>white star</i>	etanol 80%, 15 días, 3 veces	Zia-Ul-Haq y col. 2013.
17700	Caupí Cuarentón, variedad colorado	etanol, 24 h	Avanza y col. 2021.
2360-	4 variedades de <i>Vigna</i>	agua, 10 min	Liyanage y col. 2014.
6000	<i>unguiculata</i> (Waruni, Bombay, Dawala y MI35),		
340-	17 variedades de caupí	acetona 80%, 20 min 95 °C	Cai y col. 2003.
3760			
2340	<i>Vigna unguiculata</i> black-eyed pea	acetona:agua:ácido acético (70:29,5:0,5), 3 h, 2 veces	Zhang y col. 2020.
2140	Caupí comercial coloreado negro	acetona:agua:ácido acético (70:29,5:0,5), 3 h, 2 veces	Xu y col. 2012.
1368	<i>Vigna unguiculata</i>	agua, 40 min, 40 °C, 2 veces	Honaiser y col. 2022.
1270	Caupí	acetona 80%, 24 h	Sombié y col. 2018.
1196	<i>Vigna unguiculata</i> CB#46	etanol 80%, 2 h, 37 °C	Adjei-Fremah y col. 2015.
165	Caupí	acetona 70%, 24 h. Re-extráido con acetona 70%, 3 h)	Siddhuraju y col. 2007.
756	Caupí commercial negro	etanol 80%, 2 veces	Gutiérrez-Uribe y col. 2011.
704	<i>Vigna unguiculata</i>	metanol en HCl 1 M (85:15 v/v), 1 h, 21 °C	Honaiser y col. 2022.
317	Caupí comercial negro	etanol 80%, 2 veces, hidrólisis alcalina del pellet, 1 h	Gutiérrez-Uribe y col. 2011.

En la Tabla VI.2. se presentan los resultados del contenido de CFT en las condiciones de extracción mencionadas en el ítem III.8.1 de Materiales y Métodos. Los valores se expresaron en microgramos de AGE por gramo de muestra en base seca (µg AGE/g muestra BS) y en base proteica (µg AGE/g muestra BP). No se observaron diferencias significativas en el contenido

de CFT en la harina por ambos métodos de extracción. Por otra parte, los resultados obtenidos estuvieron dentro del amplio rango de valores previamente reportados para harinas de caupí, usando mezclas de solventes polares y tiempos cortos de extracción de 300 a 6000 µg AGE/g muestra BS (Tabla VI.1). Avanza y col. (2021), reportaron una reducción significativa en el CFT en extractos de caupí variedad colorado cuando se realizó con agua con el agregado de 2% de ácido fórmico respecto de una extracción realizada con agua. La variabilidad en el rango de contenido de CF reportados, está relacionado no sólo con las diferencias en los procesos de extracción, sino con la relación de muestra a solvente, la relación de solvente (metanol o etanol) a agua, el tiempo y temperatura de maceración y por otra parte a las diferencias debidas al tipo de suelo, condiciones climáticas, temporada de crecimiento y almacenamiento postcosecha.

Por otra parte, se incorporó acetona, un solvente aprótico polar, a un tercer sistema de extracción [MAA: mezcla metanol-acetona-agua (7:7:6)] como se describió en el ítem III.8.1 de Materiales y Métodos. Luego de la maceración, se procedió a la extracción de los CF siguiendo un proceso secuencial de hidrólisis alcalina y extracción con éter etílico a fin de obtener los compuestos libres (fracción CFL), esterificados (fracción CFE) y ligados a proteínas (fracción CFLP). Bajo las condiciones experimentales mencionadas, en la Tabla VI.2 se presentan los resultados de los rendimientos de extracción de CF totales para H. La cantidad total de CF extraídos con el sistema de extracción MAA (suma de las fracciones CFL+CFE+CFLP) fue de 748 µg AGE/g BS. La fracción de CFL presenta un contenido de CF significativamente más alto que las otras dos fracciones, seguida por la fracción de CFE y la fracción de CFLP. Nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente por Gutiérrez Uribe (2011), quien realizó una primera extracción de CF de harina de caupí con mezcla etanol:agua 80% y cuantificó en la fracción soluble un total de 750 µg AGE/g. Luego, a partir del pellet realizó la liberación de compuestos fenólicos ligados (hidrólisis con NaOH 1 N, posterior acidificación a pH 1 y extracción con acetato de etilo), obteniendo un valor de 317 µg AGE/g.

Tabla VI.2. Contenido de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteau, µg AGE/g) en extractos obtenidos por diferentes metodologías.

Sistema de extracción y fracciones de CF	H		A10	
	BS	BP	BS	BP
MA	1140 ± 46 ^{ab}	0,46	1113 ± 88 ^{ab}	0,14
MH	880 ± 32 ^a	0,35	1382 ± 153 ^b	0,17
MAA:				
CFL	343 ± 31 ^B	0,14	371 ± 31 ^B	0,05
CFE	226 ± 55 ^A	0,09	231 ± 14 ^A	0,03
CFLP	179 ± 2 ^A	0,07	947 ± 25 ^C	0,12

MA: metanol:agua 70:30; MH: metanol:HCl 1,2 M 50:50; fracciones de compuestos libres (CFL), esterificados (CFE) y ligados a proteínas (CFLP) obtenidos luego de la maceración con MAA metanol:acetona:agua (7:7:6). BS: base seca; BP: base proteica.

Se realizaron los mismos métodos de extracción sobre A10 a fin de evaluar la presencia de CF y sus interacciones con las proteínas de caupí. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla VI.2., tanto en términos de base seca como de base proteica. Al efectuar comparaciones basadas en el contenido de CF en base seca, se observaron valores similares ($p>0,05$) para H y A10 cuando la extracción se realizó con MA mientras que cuando la extracción se realizó en presencia de MH, el contenido de CFT de A10 fue 1,6 veces superior ($p<0,05$) que el contenido correspondiente a H. Sin embargo, si este contenido se expresa en una base proteica, el valor para A10 fue 3,2 y 2 veces menor que para H, para las extracciones con el método MA y MH respectivamente, lo que indicaría una pérdida de CFLP durante la preparación del aislado, debidas al tratamiento alcalino o a que son solubles.

El contenido de CFT de las fracciones CFL y CFE (método MAA) de A10 fue similar ($p>0,05$) que los correspondientes a dichas fracciones de H (Tabla VI.2). Por otra parte, el contenido de CF en la fracción CFLP de A10 fue mayor ($p>0,05$) respecto a H, aproximadamente 5 veces cuando se expresó en base seca (Tabla VI.2), y 1,6 veces mayor cuando se expresó en base proteica. No puede descartarse que, durante la preparación del aislado, éste se enriquece de otro tipo de compuestos (como péptidos o aminoácidos) capaces de reaccionar con el reactivo Folin, lo que explicaría este incremento.

Las interacciones complejas en la matriz alimentaria ocurren normalmente durante la digestión gastrointestinal, afectando la bioaccesibilidad y, por lo tanto, la biodisponibilidad de los compuestos alimentarios. Estas interacciones pueden influir en los CF, cuyas estructuras

químicas, ligandos ionizables y estados de polimerización pueden ser afectados por variaciones en las condiciones ácido-básicas, la actividad enzimática y el sinergismo fenólico (Zehfus y col., 2021). Para estudiar este efecto, los digeridos de H y A10 obtenidos mediante DGIS fueron sometidos a los mismos protocolos de extracción que los materiales de partida (muestras sin digerir). Los resultados se presentan en la Tabla VI.3, donde para el cálculo de los valores de CFT correspondientes a HD y A10D, se consideró el aporte de la masa de las sales y enzimas (provenientes de los fluidos digestivos) incorporados a las muestras de partida en la DGIS.

Tabla VI.3. Contenido de compuestos fenólicos totales (método de Folin-Ciocalteau, µg AGE/g BS) en extractos obtenidos por diferentes metodologías antes y después de la DGIS.

Sistema de extracción y fracciones de CF	H	HD	A10	A10D
MA	1140 ± 46 ^{ab}	6620 ± 500 ^d	1113 ± 88 ^{ab}	13515 ± 439 ^e
MH	880 ± 32 ^b	5937 ± 15 ^c	1382 ± 153 ^a	20245 ± 419 ^f
MAA:				
CFL	343 ± 31 ^B	652 ± 56 ^C	371 ± 31 ^B	2724 ± 95 ^E
CFE	226 ± 55 ^A	245 ± 19 ^A	231 ± 14 ^A	586 ± 31 ^C
CFLP	179 ± 2 ^A	225 ± 4 ^A	947 ± 25 ^D	370 ± 43 ^B

MA: metanol:agua 70:30; MH: metanol:HCl 1,2 M 50:50; fracciones de compuestos libres (CFL), esterificados (CFE) y ligados a proteínas (CFLP) obtenidos luego de la maceración con metanol:acetona:agua (7:7:6). BS: base seca, considerando el aporte de la masa de las sales y enzimas de los fluidos digestivos.

El contenido de CFT de H aumentó significativamente luego de la DGIS cuando la extracción se realizó con MA (5,8 veces) y con MH (6,7 veces). Cuando la extracción se realizó con la mezcla MAA, se observó incremento significativo en el contenido de CF luego de la DGIS solo en la fracción de CFL de HD (~2 veces) y no se observaron cambios para las fracciones CFE y CFLP. Hachibamba y col. (2013) reportaron un incremento del 170% y una disminución del 12% para harina de caupí de fenotipo “yellow” y “reddish brown” sometida a cocción seguida de DGIS, respectivamente, en comparación con el CFT de la harina (extractos preparados con acetona al 80% con 1% de ácido fórmico). Por otra parte, Li y col. (2022), evaluaron el contenido de CFT de harina de cuatro variedades de caupí y reportaron marcados incrementos luego de la DGIS, específicamente, en el caso de la variedad “black eyed bean”

de 500 µg AGE/g (en extractos acuosos, durante 24 h, seguida de la hidrólisis ácida y alcalina del pellet resultante) a 2500 µg AGE/g (contenidos en el sobrenadante obtenido tras la DGIS). Los diversos componentes presentes en la harina pueden proporcionar estabilidad frente a diferentes condiciones de pH, sin embargo, por acción de las enzimas digestivas se produce la hidrólisis de sus macromoléculas (proteínas y carbohidratos) permitiendo así la liberación de fenoles previamente conjugados (Thakur y col., 2020).

La DGIS en A10 originó modificaciones en el contenido de CFT extraídos con los distintos métodos de extracción y para cada fracción estudiada (Tabla VI.3). Cuando la extracción se realizó con MA hubo un incremento de 12 veces y cuando la extracción se realizó con MH de 14,6 veces en comparación con el aislado proteico sin digerir. Además, las fracciones de CFL y CFE extraídos de A10D mostraron un mayor contenido de CF que los de A10 con incrementos de 7,3 y 2,5 veces, respectivamente (Tabla VI.3). Mientras que la fracción de CFLP presentó un contenido de CF 2,5 veces menor.

VI.2. Identificación de compuestos fenólicos

Se realizó un análisis mediante RP-HPLC en el laboratorio de Bioquímica Vegetal del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM) para la identificación y cuantificación de CF. Un total de 21 compuestos pertenecientes a las familias de ácidos fenólicos (AHC: ácidos hidroxicinámicos y AHB: ácidos hidroxibenzoicos), flavanoles, flavonoles, flavanonas y OH-tirosol fueron identificados y comparados con estándares de referencia. En la Figura VI.1 se presentan las proporciones de las familias estudiadas para H y A10 con los métodos MA y MH.

En el extracto MA de H se identificaron 13 CF (Tabla VI.4). Los compuestos mayoritarios fueron los flavanoles (-)-epigallocatequina y (+)-catequina, seguidos por procianidina B1 y (-)-galocatequina galato y en menor concentración se detectó (-)-epigallocatequina galato en menor concentración. También se detectaron los flavonoles kaempferol-3-glucósido, querctina-3-galactósido y querctina-3-glucósido, y la flavanona hesperetina. Entre los ácidos hidroxicinámicos, se encontraron principalmente ácido ferúlico y ácido caftárico, seguidos por ácido *p*-cumárico, mientras que el ácido gálico fue el principal ácido hidroxibenzoico identificado.

Por otro lado, en el extracto MH de H se identificaron 11 CF, de los cuales 9 estaban presentes en el extracto MA de H (Tabla VI.5). Ambos métodos de extracción de CF mostraron diferencias en la composición y concentración de los compuestos identificados para H. La procianidina B1 fue el compuesto mayoritario, aunque en este extracto se detectó en una concentración 3,5 veces mayor en comparación con el extracto MA. Se encontró también, una

mayor concentración de ácido gálico en MH, siendo 2 veces superior en comparación con MA. Además, en MH se observaron incrementos en los flavonoles quercetina-3-galactósido y quercetina-3-glucósido, que aumentaron 5 y 7 veces respectivamente en comparación con MA. Por otra parte, la naringenina también fue detectada en MH, aunque no se encontró hesperetina, que sí estaba presente en MA.

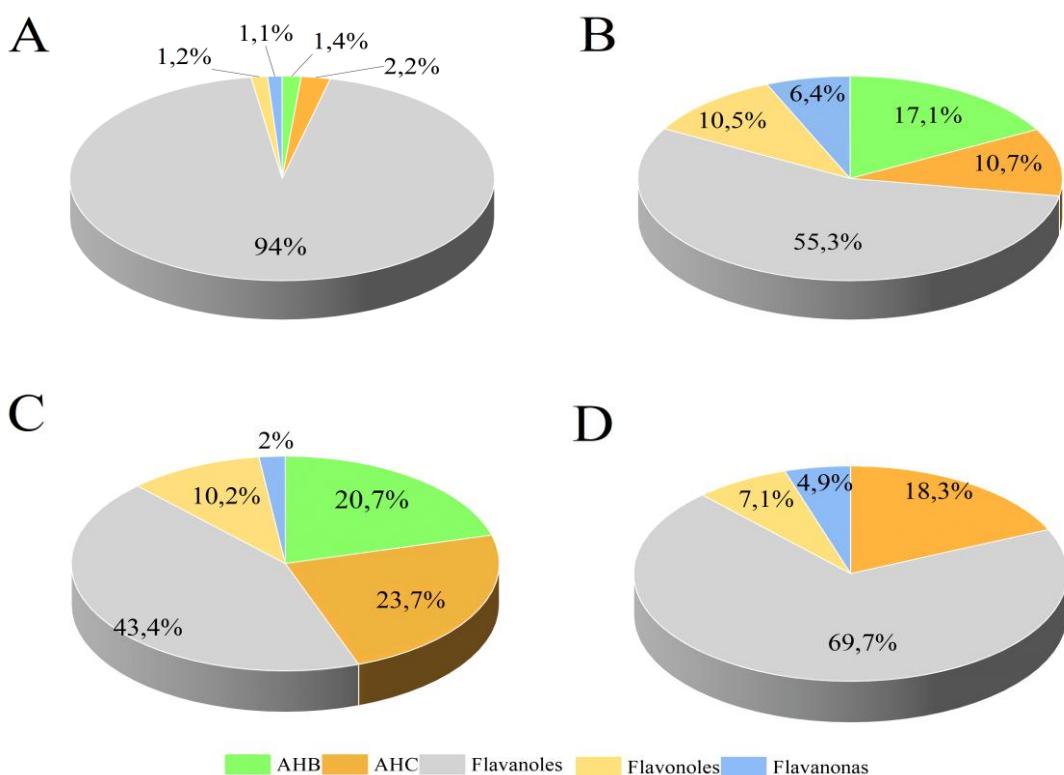


Figura VI.1. Familias de compuestos fenólicos. A) H extracción MA; B) A10 extracción MA; C) H extracción MH; D) A10 extracción MH.

Los principales compuestos polifenólicos identificados en la fracción CFL de H (Tabla VI.6) incluyen los flavonoles (-)-epigallocatequina, procianidina B1 y (-)-gallocatequina, seguidos por (+)-catequina y (-)-epigallocatequina galato en menor proporción. Entre los flavonoles se detectaron quercetina-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido y quercetina-3-galactósido, así como las flavanonas hesperetina y naringina. En esta fracción solo se identificaron los ácidos ferúlico y cafeico. Además, se detectó OH-tirosol. En la fracción de CFE (Tabla VI.7), los flavonoles también fueron los compuestos mayoritarios, aunque la cantidad total detectada corresponde a la mitad de la cantidad detectada en la fracción CFL (36 vs 72 µg/g para CFE y CFL, respectivamente). Entre los ácidos fenólicos se encontraron ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido caftárico; el contenido total de ácidos

fenólicos de la fracción CFE representó 3 veces más que el correspondiente a la fracción CFL (16 vs 5 µg/g para CFE y CFL, respectivamente). Además, se detectaron kaempferol-3-glucósido y quercetina-3-glucósido, así como las flavanonas naringina y naringenina. La fracción CFLP de H (Tabla VI.8) mostró la presencia de solo 8 CF, entre los cuales (-)-epigalocatequina galato fue el principal. Sólo en esta fracción de H se detectaron ácido siríngico y rutina.

Previamente se reportó que, en semillas de caupí, los flavonoles son los compuestos polifenólicos más abundantes, especialmente los derivados de la quercetina (glucósidos de quercetina) y los glucósidos de kaempferol y miricetina, cuando se realizó una extracción con acetona 70% acidificado con ácido fórmico 1%, 12 h a 4 °C (Ojwang y col., 2012). Además, los ácidos fenólicos constituyen una parte importante de los compuestos fenólicos totales y se presentan como derivados del AHB y AHC (Cai y col., 2003, extracción con metanol, 2 h a 95 °C, seguida de hidrólisis con NaOH). En extractos de semillas de caupí variedad Cuarentón, obtenido por extracción con líquido presurizado (usando como solvente etanol 50% a 170 °C), se detectaron ácido *p*-hidroxibenzoico, catequina y un isómero del ácido protocatecuico, como los compuestos más abundantes (Avanza y col., 2021). Por su parte, Hachibamba y col (2013) detectaron 29 CF compuestos fenólicos en dos tipos de caupí (extracción con acetona 70% v/v acidificada con ácido fórmico 1%), de los cuales 8 eran ácidos fenólicos y sus derivados, 5 flavonoles, 14 flavonoles y 2 dihidroflavonoles; siendo los mayoritarios ácido protocatecuico, ácido feruloildárico, catequina y epicatequina y compuestos derivados de quercetina.

Si bien el perfil de CF de A10 con la extracción MA es similar al presentado en H, en A10 se observó una marcada disminución del contenido de flavonoles. Los CF identificados fueron principalmente flavonoles, entre los cuales destacan: (+)-catequina, procianidina B1, (-)-epigalocatequina y (-)-epigalocatequinagalato. También se identificaron en menor cantidad ácido gálico (al doble de concentración que en H), ferúlico, caftárico y *p*-cumárico; varios flavonoles como kaempferol-3-glucósido, quercetina-3-glucósido y quercetina-3-galactósido, y la hesperetina (Tabla VI.4).

El tratamiento MH permitió identificar (-)-epigalocatequina, (-)-galocatequina galato y (-)-epigalocatequinagalato, además de (+)-catequina y procianidina B1. En cuanto a los ácidos fenólicos, se identificaron ácido *p*-cumárico, ácido caftárico y ácido cafeico. También se detectó quercetina-3-galactósido y naringenina (Tabla VI.5).

El perfil de CF de la fracción CFL de A10 (Tabla VI.6) se mantuvo similar al de H, siendo la (-)-epigalocatequina y la (-)-galocatequina galato los flavonoles principales; el contenido total de ácidos fenólicos fue dos veces superior en A10 respecto de H y además se

vieron incrementados los contenidos de los flavonoles y flavanonas. En la fracción CFE de A10 (Tabla VI.7), los componentes principales fueron: (-)-gallocatequina galato, (-)-epigallocatequinagalato, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico. Para la fracción CFLP de A10, se detectaron principalmente ácidos fenólicos, seguidos por (-)-epigallocatequinagalato (Tabla VI.8).

Estos resultados indican que durante la preparación de la muestra A10, algunos compuestos fenólicos solubles originalmente presentes se perdieron; esto podría explicarse teniendo en cuenta que la extracción de proteínas se realiza a pH=10, una condición que podría romper las interacciones entre CF y otros componentes presentes en la harina. La cuantificación de compuestos fenólicos totales detectados por HPLC reveló disminución de CF detectados para H respecto para A10 en el solvente MA (367 µg/g a 62,3 µg/g, respectivamente), en el solvente MH (54,5 µg/g a 33,8 µg/g, respectivamente), para la fracción de CFL (86,6 µg/g a 74,9 µg/g, respectivamente) y por el contrario, un aumento de CFLP detectados para A10 respecto a H (9,4 µg/g a 13,2 µg/g, para H y A10, respectivamente). Rodriguez y col., 2020, informaron que, durante la preparación de aislados proteicos a partir de harina de amaranto, algunos compuestos fenólicos solubles y unidos a proteínas se pierden durante la extracción a pH básico (pH =9). Por otro lado, se informaron cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil de CF de extractos obtenidos por extracción con etanol 50% asistida por ultrasonido de harina y aislado proteico de arvejas que se relacionaron con pérdidas por solubilización, modificaciones químicas en el medio alcalino y/o absorción en la fracción insoluble debidas a las condiciones de preparación del aislado proteico (Cipollone y col., 2024).

VI.3. Efecto de la DGIS en el perfil de compuestos fenólicos

Se estudió además el efecto de la DGIS en la composición polifenólica. Para la cuantificación de los compuestos en los digeridos gastrointestinales, si bien en las Tablas VI.4-8 se presentan los resultados expresados como µg compuesto/g digerido (BS), cabe remarcar que en los mismos se encuentran tanto los sólidos provenientes de las muestras como aquellos provenientes de los reactivos de digestión (enzimas, sales, sales biliares). La proporción de sólidos provenientes de la harina fue ~90% de H en HD y de ~60% provenientes del aislado en A10D. Por lo tanto, para corregir este efecto de dilución por los reactivos y tener valores expresados en base a masa de muestra, los valores mostrados en las tablas deberían multiplicarse por 1,1 en el caso de HD y 1,6 para A10D.

Después de la DGIS, en HD se observó un notable aumento en la cantidad total de CF identificados por HPLC, incrementándose 10 veces con respecto a H en el extracto MA (Tabla

VI.4). En HD se encontraron sólo 10 CF de los 13 compuestos identificados previamente en H. Entre los ácidos fenólicos, el ácido gálico mostró un incremento de 100 veces en HD comparado con H. Este hecho puede ocurrir porque los ácidos fenólicos podrían liberarse de complejos formados con componentes de la matriz como proteínas y carbohidratos, y luego de la digestión, volverse bioaccesibles. Se verificó la aparición de ácido cafeico, que no había sido identificado en H. Con respecto a los flavanoles, la DGIS redujo significativamente su contenido: la procianidina B1 disminuyó 26 veces, la (+)-catequina 10 veces y la (-)-epigalocatequina 40 veces; no se detectó galocatequinagalato, pero se observó un aumento de 3,5 veces en (-)-epigalocatequinagalato. Dentro del grupo de los flavonoles, se detectó quercetina-3-galactósido como el compuesto mayoritario y principal dentro de los CF de HD. Además, se detectó quercetina, que no había sido identificada previamente en H, y se observó un aumento marcado en el contenido de quercetina-3-glucósido. También se detectó OH-tirosol que no fue encontrado antes de la DGIS.

En los extractos MH provenientes de HD, se observó la presencia de 7 compuestos de los 12 presentes en H antes de la DGIS. HD mostró un aumento significativo en el contenido de flavanoles, siendo la (-)-epigalocatequina el compuesto principal (Tabla VI.5). No se detectaron procianidina B1, (+)-catequina ni ácidos hidroxibenzoicos, mientras que se detectó ácido caftárico y apareció en este extracto ácido *p*-cumárico (éste último no presente en H). Dentro del grupo de los flavanoles, en HD se observó la aparición de quercetina, no detectada en H, y una disminución en el contenido de quercetina-3-glucósido y quercetina-3-galactósido.

Con la extracción MAA, la cantidad de CFL detectados en HD disminuyó 4,2 veces respecto de los detectados en H (Tabla IV.6), y de los 13 compuestos identificados en H previo a la DGIS se observaron 10. En este caso, se observó una reducción a la mitad del contenido de ácidos hidroxicinámicos y una reducción de 5 veces en el contenido de flavanoles. Entre los flavonoles detectados en HD, se encontró quercetina-3-glucósido en menor cantidad que en H, y cantidades equivalentes de hesperetina en ambas muestras. También se encontró OH-tirosol en la misma cantidad.

Para la fracción CFE de HD, el contenido total de CF se incrementó (en este caso de los 14 compuestos presentes antes de la DGIS, se observaron 9) (Tabla IV.7). Se detectó un marcado incremento en el contenido de ácido cafeico y *p*-cumárico. Asimismo, se observó la disminución del contenido de procianidina B1 en 4,6 veces, y el contenido de (+)-catequina se mantuvo. Aunque el contenido de (-)-epigalocatequina fue 4 veces menor en HD respecto a H, el contenido de (-)-epigalocatequinagalato se duplicó. En cuanto a los flavonoles, se detectó

quercetina-3-glucósido y un incremento de 6,7 veces en el contenido de naringenina respecto a H. También se detectó rutina, no encontrada antes de la DGIS.

En la fracción de CFLP de HD el contenido total de CF se mantuvo respecto a H; se verificó la presencia de 4 compuestos de los 8 identificados previamente (Tabla IV.8). El ácido caftárico apareció en esta fracción junto con un incremento de ácido ferúlico. Se mantuvo sin cambios el contenido de (+)-catequina, se presentó (-)-epigalocatequinagalato en menor proporción que en H sin DGIS, y se encontró (-)-galocatequinagalato. Los flavonoles detectados fueron miricetina, quercetina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido; antes de la DGIS solo se había detectado quercetina-3-glucósido.

Para el extracto de A10D obtenido con el método MA, se recuperó solo el 52% del contenido total de CF identificados en A10 (Tabla IV.4). En particular, se observó una disminución en el contenido de ácido ferúlico, procianidina B1, (+)-catequina y (-)-epigalocatequina, mientras que hubo un aumento en (-)-epigalocatequinagalato. En cuanto a los flavonoles, la miricetina fue detectada en A10D, pero no en A10, y se notó una disminución en kaempferol-3-glucósido, naringina y hesperetina. En el extracto de A10D obtenido con el método MH, se recuperó solo el 44% del contenido total de CF respecto de A10 (Tabla IV.5). De los 10 compuestos identificados en A10, se observó la presencia de 6 compuestos después de la DGIS. En A10D se detectaron ácido gálico y ácido ferúlico, los cuales no fueron observados previamente en A10. No se detectaron ácido cafeico ni *p*-cumárico, mientras que el ácido caftárico permaneció sin cambios. Se observó una reducción significativa en (-)-epigalocatequina (46 veces menor en comparación con A10) y un aumento en (-)-epigalocatequinagalato. En cuanto a los flavonoles, no se detectaron quercetina-3-galactósido ni naringina, que sí estaban presentes en A10, mientras que quercetina-3-galactósido y kaempferol-3-galactósido fueron detectados después de la DGIS.

En la fracción de CFL de A10D, se observó un incremento en el contenido total de CF (aumento de 12,6 veces respecto de A10, Tabla IV.6). De los 10 compuestos identificados en A10 para esta fracción, en A10D se observaron 9 y se identificaron 2 compuestos nuevos. Se detectó la aparición de ácido gálico y ácido cafeico, la desaparición de ácido *p*-cumárico y una disminución en el contenido de ácido ferúlico. Después de la DGIS, no se detectaron (-)-epigalocatequina ni (-)-galocatequinagalato, mientras que la concentración de (-)-epigalocatequina galato se duplicó. En el grupo de los flavonoles, se observó un aumento notable en quercetina-3-glucósido (121 veces superior) y la aparición de quercetina.

Para la fracción CFE de A10D, se observó una disminución en el contenido de ácido *p*-cumárico (2,8 veces menor) y ácido ferúlico (2 veces menor) respecto de A10 (Tabla IV.7).

Sin embargo, hubo un incremento en el contenido de procianidina B1 (2 veces superior) y (+)-catequina (15,5 veces mayor), y no se detectó (-)-epigalocatequina galato. En cuanto a los flavonoles, se detectaron miricetina, quercetina-3-galactósido y naringina, que no habían sido identificados previamente en esta fracción para A10 sin DGIS, mientras que no se detectaron quercetina-3-glucósido ni hesperetina. La rutina permaneció sin cambios. La fracción CFLP de A10D mostró un aumento significativo en el contenido total de CF, de 16,4 veces respecto de A10 (Tabla IV.8). No se detectaron ácidos fenólicos. Se identificaron procianidina B1 y (+)-catequina, que no se habían detectado previamente en A10 sin DGIS. El cambio más significativo se observó en los flavonoles, donde se detectó quercetina, que no estaba presente en A10, y un aumento de 490 veces en quercetina-3-galactósido, así como un incremento de 4 veces en quercetina-3-glucósido en comparación con A10. Naringina no fue detectada en A10D.

La DGIS ocasionó cambios significativos en la composición y cantidad de CF detectados en los extractos, variando según los solventes utilizados para la extracción. Se observaron incrementos notables en algunos compuestos y disminuciones en otros, ya que durante la fase gástrica, el pH ácido conduce a la ruptura de cadenas proteicas y compuestos polisacáridos, principalmente fibras, causando la liberación de CF, y luego, a nivel intestinal el pH alcalino y la acción de la pancreatina producen la transformación en compuestos con diferentes estructuras y bioactividad y, solo una pequeña fracción permanece unida a la matriz alimentaria (Lanzoni y col., 2024). El incremento de ácidos fenólicos durante la digestión simulada, puede deberse a la estabilidad debido a sus estructuras simples, a que se ve facilitada la liberación de estas sustancias desde la matriz alimentaria; y a que algunas sustancias complejas pueden descomponerse y transformarse en compuestos fenólicos simples (Liu y col., 2020). Sin embargo, se ha informado inestabilidad de los flavan-3-oles monoméricos (catequina y epicatequina) en las condiciones de pH intestinales (Bouayed y col., 2012). Prinyawiwatkul y col. (1996), reportaron que la bioaccesibilidad y absorción de las catequinas es dependiente de la presencia de otros componentes alimentarios (por ejemplo polisacáridos y flavonoles). Por otra parte, las pérdidas de flavonoides y ácidos fenólicos después de la digestión intestinal podrían explicarse por la inestabilidad de estos compuestos en condiciones alcalinas y atribuirse al hecho de que estos compuestos experimentan varios cambios, como la oxidación, la polimerización y la transformación (Rodriguez y col., 2020).

Tabla VI.4. Contenido de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g BS}$) detectados por RP-HPLC en los extractos MA de harina (H) y aislado proteico (A10) de caupí con y sin DGIS.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	H	A10	HD	HD *	A10D	A10D*
Ác fenólicos						
Ácido gálico	$5,3 \pm 0,2$	$10,6 \pm 0,6$	525 ± 38	$577,7$	10 ± 1	15
Ácido siríngico						
Ácido caftárico	$2,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	2,2	$2,0 \pm 0,1$	3,2
Ácido cafeico			$5,4 \pm 0,2$	6,0		
Ácido <i>p</i> -cumárico	$0,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$0,010 \pm 0,002$	0,020		
Ácido ferúlico	$5,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	2,4	$0,030 \pm 0,003$	0,050
Flavanoles						
Procianidina B1	49 ± 2	$7,3 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,1$	2,1	$4,0 \pm 0,2$	6,5
(+)-catequina	133 ± 7	18 ± 1	14 ± 1	15,9	$1,20 \pm 0,1$	1,9
(-)epigalocatequina	143 ± 8	$8,5 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,1$	3,9	$2,7 \pm 0,1$	4,3
(-)epigalocatequina galato						
galato	$3,1 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,01$	$11 \pm 0,1$	12	$4,6 \pm 0,2$	7,4
(-)galocatequina galato		17 ± 1				
Flavonoles						
Quercetina			14 ± 1	15		
Miricetina					$2,6 \pm 0,1$	4,1
Quercetina-3-galactósido	$0,79 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$	2806 ± 123	3087	$0,31 \pm 0,01$	0,49
Quercetina-3-glucósido	$0,18 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,1$	50 ± 2	55	$1,16 \pm 0,05$	1,86
Kaempferol-3-glucósido						
glucósido	$3,6 \pm 0,1$	$4,12 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,1$	1,8	$0,060 \pm 0,004$	0,100
Rutina						
Flavanonas						
Naringenina						
Hesperetina	$4,0 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$			$1,35 \pm 0,08$	2,16
Naringina						
Otros						
OH-tiosol			$0,54 \pm 0,3$	0,59		

< concentración  > concentración

* valores expresados en base a masa de muestra, sin reactivos provenientes de la DGIS.

Tabla VI.5. Contenido de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ BS) detectados por RP-HPLC en los extractos MH de harina (H) y aislado proteico (A10) de caupí con y sin DGIS.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	H	A10	HD	HD*	A10D	A10D*
Ác fenólicos						
Ácido gálico	11,3 \pm 0,1				2,4 \pm 0,1	3,9
Ácido siríngico						
Ácido caftárico	2,2 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	2,4	2,2 \pm 0,1	3,5
Ácido cafeico	6,4 \pm 0,2	0,69 \pm 0,02				
Ácido <i>p</i> -cumárico		3,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,5		
Ácido ferúlico	4,3 \pm 0,3				0,75 \pm 0,03	1,2
Flavanoles						
Procianidina B1	14 \pm 1	1,4 \pm 0,1			1 \pm 0,1	1,5
(+)-catequina	2,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1			1,8 \pm 0,1	2,7
(-)-epigalocatequina	3,0 \pm 0,2	12 \pm 1	794 \pm 44	873	0,25 \pm 0,01	0,4
(-)-epigalocatequina galato	4,4 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	4,1	5,7 \pm 0,2	9,1
(-)-galocatequina galato		6,6 \pm 0,4			4,1 \pm 0,2	6,6
Flavonoles						
Quercetina			5,0 \pm 0,2	5,5		
Miricetina						
Quercetina-3-galactósido	4,3 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	1,7		
Quercetina-3-glucósido	1,3 \pm 0,1		0,010 \pm 0,001	0,010	0,14 \pm 0,01	0,22
Kaempferol-3-glucósido					0,75 \pm 0,03	1,20
Rutina						
Flavanonas						
Naringenina	1,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1				
Hesperetina						
Naringina						
Otros						
OH-tiosol						

< concentración  > concentración

* valores expresados en base a masa de muestra, sin reactivos provenientes de la DGIS.

Tabla VI.6. Contenido de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g BS}$) detectados por RP-HPLC en los extractos MAA CFL de harina (H) y aislado proteico (A10) de caupí con y sin DGIS.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	H	A10	HD	HD*	A10D	A10D*
Ác fenólicos						
Ácido gálico					$0,95 \pm 0,03$	1,52
Ácido siríngico						
Ácido caftárico		$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	1,6	$1,3 \pm 0,1$	2,2
Ácido cafeico	$1,5 \pm 0,1$				$0,010 \pm 0,001$	0,020
Ácido <i>p</i> -cumárico		$4,1 \pm 0,2$				
Ácido ferúlico	$3,3 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,3$	$0,55 \pm 0,02$	0,60	$0,50 \pm 0,03$	0,80
Flavanoles						
Procianidina B1	12 ± 1	$3,0 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	2,8	$3,0 \pm 0,1$	4,8
(+)-catequina	$3,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$0,83 \pm 0,03$	0,91	$1,12 \pm 0,05$	1,79
(-)epigalocatequina	44 ± 2	$24,02 \pm 0,01$	$5,6 \pm 0,2$	6,2		
(-)epigalocatequina galato	$1,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	1,3	$5,6 \pm 0,3$	8,9
(-)galocatequina galato	10 ± 1	13 ± 1	$3,7 \pm 0,2$	4,0		
Flavonoles						
Quercetina					$3,26 \pm 0,05$	5,2
Miricetina						
Quercetina-3-galactósido	$0,28 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$				
Quercetina-3-glucósido	$4,2 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,2$	$0,05 \pm 0,02$	0,06	621 ± 38	993
Kaempferol-3-glucósido	$2,7 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,3$			$6,1 \pm 0,3$	9,8
Rutina						
Flavanonas						
Naringenina						
Hesperetina	$2,9 \pm 0,1$	$3,24 \pm 0,14$	$2,9 \pm 0,1$	3,2	$2,5 \pm 0,2$	4,0
Naringina	$0,020 \pm 0,002$	$2,44 \pm 0,11$			$0,05 \pm 0,03$	0,08
Otros						
OH-tiosol	$2,0 \pm 0,1$		2 ± 1	2		

< concentración  > concentración

* valores expresados en base a masa de muestra, sin reactivos provenientes de la DGIS.

Tabla VI.7. Contenido de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ BS) detectados por RP-HPLC en los extractos MAA CFE de harina (H) y aislado proteico (A10) de caupí con y sin DGIS.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	H	A10	HD	HD*	A10D	A10D*
Ác fenólicos						
Ácido gálico	1,9 ± 0,1					
Ácido siríngico						
Ácido caftárico	1,5 ± 0,1		1,4 ± 0,1	1,6		
Ácido cafeico	1,5 ± 0,1		26 ± 2	29		
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,8 ± 0,2	4,2 ± 0,3	19 ± 1	21	1,5 ± 0,1	2,4
Ácido ferúlico	7,9 ± 0,4	9 ± 1			4,8 ± 0,3	7,7
Flavanoles						
Procianidina B1	5,1 ± 0,3	0,65 ± 0,03	1,1 ± 0,1	1,2	1,4 ± 0,1	2,2
(+)-catequina	2,1 ± 0,1	0,59 ± 0,05	2,1 ± 0,2	2,3	9 ± 1	15
(-)epigalocatequina	12 ± 1		2,8 ± 0,2	3,1		
(-)epigalocatequina galato		4,8 ± 0,2				
(-)galocatequina galato	17 ± 1	14 ± 1	35 ± 1	39	13 ± 1	20
Flavonoles						
Quercetina						
Miricetina					1,7 ± 0,1	2,8
Quercetina-3-galactósido	1,8 ± 0,1				4,2 ± 0,3	6,8
Quercetina-3-glucósido	0,50 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19		
Kaempferol-3-glucósido	1,1 ± 0,1					
Rutina			19 ± 1	21	5,3 ± 0,3	8,5
Flavanonas						
Naringenina	0,71 ± 0,03					
Hesperetina		2,8 ± 0,2				
Naringina	1,9 ± 0,1		12 ± 1	14	2,5 ± 0,2	4,1
Otros						
OH-tiosol						

< concentración  > concentración

* valores expresados en base a masa de muestra, sin reactivos provenientes de la DGIS.

Tabla VI.8. Contenido de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g BS}$) detectados por RP-HPLC en los extractos MAA CFLP de harina (H) y aislado proteico (A10) de caupí con y sin DGIS.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	H	A10	HD	HD*	A10D	A10D*
Ác fenólicos						
Ácido gálico	0,060 \pm 0,001	1 \pm 0,1				
Ácido siríngico	3,4 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2				
Ácido caftárico		1,4 \pm 0,1	1,37 \pm 0,05	1,51		
Ácido cafeico	0,090 \pm 0,006					
Ácido <i>p</i> -cumárico		0,27 \pm 0,02				
Ácido ferúlico	0,19 \pm 0,01	2,4 \pm 0,2	0,60 \pm 0,03	0,66		
Flavanoles						
Procianidina B1					1,3 \pm 0,1	2,1
(+)-catequina	1,25 \pm 0,07		1,2 \pm 0,1	1,3	0,86 \pm 0,05	1,38
(-)epigalocatequina						
(-)epigalocatequina galato	3,08 \pm 0,05	2,3 \pm 0,2	0,78 \pm 0,04	0,86	1,4 \pm 0,1	2,2
(-)galocatequina galato			2,6 \pm 0,2	2,8		
Flavonoles						
Quercetina					2,7 \pm 0,2	4,3
Miricetina			1,8 \pm 0,1	2,0		
Quercetina-3-galactósido	0,4 \pm 0,1				206 \pm 13	328
Quercetina-3-glucósido	0,05 \pm 0,01	0,52 \pm 0,03	0,35 \pm 0,02	0,38	2,1 \pm 0,2	3,3
Kaempferol-3-glucósido			0,41 \pm 0,03	0,45		
Rutina	1,26 \pm 0,06		1,4 \pm 0,1	1,5		
Flavanonas						
Naringenina						
Hesperetina						
Naringina		1,6 \pm 0,1				
Otros						
OH-tirosol						

< concentración  > concentración

* valores expresados en base a masa de muestra, sin reactivos provenientes de la DGIS.

VI.4. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos y fracciones polifenólicas se evaluó mediante el ensayo de FRAP y de neutralización de ABTS^{·+} y el método ORAC.

En cuanto a la actividad FRAP, la DGIS de HD produjo un aumento significativo ($p<0,05$) del extracto MH y CFLP, mientras que para la fracción CFE se mantuvo sin cambios y, para la fracción CFLP, disminuyó respecto a la H previo a la digestión (Tabla VI.9). Cuando se evaluó la actividad específica expresada como Trolox equivalente (TE = $\mu\text{mol TE}/\text{mg de AGE}$) a fin de asociar la actividad a la concentración de CF en los extractos, se observó una disminución de la misma en las muestras digeridas en comparación con las sin digerir, en todos los extractos de harina y de aislado proteico con excepción de los correspondientes a CFLP, sugiriendo una posible degradación/pérdida durante la digestión de moléculas capaces de reducir al hierro (Figura VI.2).

Tabla VI.9. Efecto de la DGIS sobre la actividad antioxidante FRAP de fracciones obtenidas por diferentes métodos de extracción con solventes de compuestos fenólicos de harina (H) y aislado proteico de caupí (A10D).

		MA	MH	CFL	CFE	CFLP
μmol TE/mg AGE	H	$6,1 \pm 0,6^{\text{a}}$	$3,96 \pm 0,03^{\text{a}}$	$9,6 \pm 0,6^{\text{a}}$	$18 \pm 1^{\text{a}}$	$5,9 \pm 0,5^{\text{b}}$
	HD	$1,20 \pm 0,04^{\text{b}}$	$1,23 \pm 0,01^{\text{c}}$	$2,31 \pm 0,02^{\text{b}}$	$14,2 \pm 0,3^{\text{b}}$	$7,3 \pm 0,1^{\text{a}}$
	A10	$6,1 \pm 0,4^{\text{a}}$	$2,3 \pm 0,2^{\text{b}}$	$10,4 \pm 0,7^{\text{a}}$	$16 \pm 1^{\text{ab}}$	$1,62 \pm 0,04^{\text{d}}$
	A10D	$0,6 \pm 0,1^{\text{b}}$	$0,55 \pm 0,01^{\text{d}}$	$2,31 \pm 0,02^{\text{b}}$	$9 \pm 1^{\text{c}}$	$3,2 \pm 0,2^{\text{c}}$
μmol TE/ g BS	H	$7 \pm 1^{\text{a}}$	$3,50 \pm 0,03^{\text{c}}$	$3,3 \pm 0,2^{\text{c}}$	$4,0 \pm 0,3^{\text{b}}$	$1,0 \pm 0,1^{\text{c}}$
	HD	$7,9 \pm 0,3^{\text{a}}$	$7,3 \pm 0,1^{\text{b}}$	$1,4 \pm 0,1^{\text{d}}$	$3,5 \pm 0,1^{\text{b}}$	$1,70 \pm 0,03^{\text{a}}$
	A10	$6,8 \pm 0,5^{\text{a}}$	$3,2 \pm 0,3^{\text{c}}$	$3,9 \pm 0,3^{\text{b}}$	$3,7 \pm 0,3^{\text{b}}$	$1,50 \pm 0,03^{\text{a}}$
	A10D	$8 \pm 1^{\text{a}}$	$11,2 \pm 0,2^{\text{a}}$	$6,3 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,1 \pm 0,4^{\text{a}}$	$1,2 \pm 0,1^{\text{b}}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

De acuerdo con estos resultados, Honaiser y col. (2023) reportaron la disminución en la actividad FRAP luego de la DGIS de extractos acuosos y metanólicos acidificados (1,0 M HCl, 85:15, v/v) de caupí. Li y col. (2022) evaluaron la actividad FRAP en extractos de compuestos polifenólicos provenientes de harina cocida de cuatro variedades de *Vigna* y el efecto de la DGIS en esta actividad en las distintas etapas de digestión luego de su cocción. En ese trabajo se reportó la mayor actividad FRAP en los extractos provenientes de muestras sin digerir y la menor se observó en las provenientes de las fases oral y gástrica, mientras que luego de la fase

intestinal la actividad FRAP se vió incrementada, sin alcanzar los valores iniciales. Estos autores sugirieron que, después de la fase oral, esta actividad podría estar más asociada a los flavanoles y, en menor medida, con los ácidos fenólicos en las muestras ya que el contenido de flavanoles disminuyó notablemente durante las fases oral y gástrica, lo que podría ser la razón principal de la disminución significativa de los valores de FRAP del estudio. En nuestro caso, el contenido de compuestos flavanoles aumentó para la H luego de la DGIS.

Luego de la DGIS se observó un incremento en la actividad antioxidante en base seca para la actividad ABTS⁺ en todos los extractos obtenidos a partir A10D y HD respecto de A10 y de H, mientras que sólo en la fracción de CFLP se mantuvo la actividad en la harina (Tabla VI.10). Sin embargo, al expresar por unidad de concentración de CF, se observó un incremento significativo ($p<0,05$) para los extractos de HD y A10D por el método MA, sin cambios significativos en los extractos obtenidos por el método MH. En las fracciones obtenidas por el método MAA, se observaron incrementos en las fracciones de CFL y CFE de ambos digeridos, y en CFLP solo de A10D. Hachibamba y col. (2013) reportaron un aumento (96 y 130%) de la capacidad de eliminación de radicales ABTS⁺⁺ en harina de dos variedades de caupí obtenida de muestras cocidas sometidas a una simulación de la digestión gastrointestinal simulada en comparación con muestras no cocidas y previo a la digestión. Este incremento en la actividad fue relacionado con un aumento de compuestos fenólicos que se liberan de las formas de glucósidos a agliconas y también con la presencia de otras sustancias reductoras no fenólicas, como aminoácidos y péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas.

Tabla VI.10. Efecto de la DGIS sobre la actividad antioxidante ABTS de fracciones obtenidas por diferentes métodos de extracción con solventes de compuestos fenólicos de harina (H) y aislado proteico de caupí (A10D).

		MA	MH	CFL	CFE	CFLP
μmol TE/mg AGE	H	15 ± 1 ^c	22 ± 2 ^{ab}	41 ± 3 ^{bc}	nd	50 ± 4 ^b
	HD	32,4 ± 0,2 ^b	24,6 ± 0,3 ^a	71 ± 2 ^a	42 ± 4 ^a	39 ± 1 ^c
	A10	15 ± 2 ^c	19 ± 1 ^{bc}	46 ± 4 ^b	nd	40,0 ± 0,2 ^c
	A10D	39 ± 1 ^a	16,9 ± 0,1 ^c	35,7 ± 0,2 ^c	24 ± 3 ^b	57 ± 2 ^a
μmol TE/g BS	H	16 ± 2 ^c	19 ± 2 ^d	14 ± 1 ^c	nd	9 ± 1 ^c
	HD	215 ± 1 ^b	146 ± 1 ^b	47 ± 2 ^b	10 ± 1 ^b	8,9 ± 0,3 ^c
	A10	17 ± 2 ^c	27 ± 2 ^c	17 ± 1 ^c	nd	37,9 ± 0,2 ^a
	A10D	529 ± 14 ^a	342 ± 2 ^a	97,3 ± 0,5 ^a	14 ± 1 ^a	21,0 ± 0,9 ^b

Promedio ± desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En el caso de la capacidad antioxidante ORAC expresada con el valor IC₅₀ ($\mu\text{mol AGE/g BS}$), luego de la DGIS, se observó un comportamiento variable de los diferentes extractos de HD y A10D (Tabla VI.11). En el caso de HD, la actividad de neutralización de los radicales ROO⁻ no presentó variaciones en el extracto MH, mientras que en el extracto MA, la DGIS mejoró significativamente ($p<0,05$) la misma. En los extractos CFL, CFE y CFLP, la actividad ORAC no se modificó después de la DGIS. Para A10D, la actividad ORAC aumentó significativamente después de la DGIS en los extractos MA, MH y CFL; sin embargo, no se registraron mejoras de esta actividad en las fracciones CFE y CFLP.

Tabla VI.11. Efecto de la DGIS sobre la actividad antioxidante ORAC de fracciones obtenidas por diferentes métodos de extracción con solventes de compuestos fenólicos de harina (H) y aislado proteico de caupí (A10D).

		MA	MH	CFL	CFE	CFLP
IC₅₀ ($\mu\text{g AGE/g BS}$)	H	$12,4 \pm 3,0^{\text{a}}$	$15,8 \pm 1,0^{\text{b}}$	$9,8 \pm 2,4^{\text{a}}$	$4,8 \pm 0,1^{\text{b}}$	$2,0 \pm 0,6^{\text{b}}$
	HD	$8,16 \pm 2,0^{\text{bc}}$	$15,4 \pm 2,8^{\text{b}}$	$9,5 \pm 2,3^{\text{a}}$	$7,3 \pm 0,4^{\text{ab}}$	Nd
	A10	$17,2 \pm 3,8^{\text{a}}$	$113,3 \pm 18,6^{\text{a}}$	$14,0 \pm 3,6^{\text{a}}$	$6,5 \pm 1,1^{\text{ab}}$	$10,3 \pm 4,5^{\text{ab}}$
	A10D	$9,0 \pm 1,5^{\text{c}}$	$18,6 \pm 3,5^{\text{b}}$	$4,8 \pm 0,1^{\text{b}}$	$7,9 \pm 1,5^{\text{a}}$	$15,9 \pm 1,3^{\text{b}}$

Promedio \pm desvío estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Según los resultados presentes, aunque la DGIS de H y A10 liberó CF que aumentaron el valor de los CFT, las actividades de eliminación de radicales libres no fueron significativamente más altas en todos los extractos. Los extractos MA de HD y A10D presentaron incrementos en la actividad ABTS y ORAC. HD mostró aumento en la concentración de ácido gálico y quercetina-3-galactósido. Sin embargo, en A10D el aumento de la actividad detectada no se relaciona con incrementos en los CF detectados, podría considerarse el aporte de los peptidos y aminoácidos a esta actividad. Asimismo, los extractos MH de HD y A10D que presentaron aumentos en la actividad ABTS y ORAC, se podrían asociar al elevado contenido de epigallocatequina en HD y nuevamente para A10D el incremento en la actividad se vincularía a otros compuestos distintos a los CF que se hayan solubilizado en la mezcla de reacción. En los extractos MAA, solo la fracciones CFE de HD y A10D presentaron incrementos en las actividades ABTS y ORAC, debido a ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, galocatequina, rutina y naringina, que no estaban presentes antes de la DGIS.

En el caso de A10D, se identificaron principalmente gallocatequina, rutina, naringina, miricetina y quercetina-3-galactosido. Estudios previos en extractos de CF de muestras de origen vegetal han informado un comportamiento variable en la actividad antioxidante, medidas por reacciones tanto con mecanismos HAT como SET, después de la DGIS. Los comportamientos observados estarían relacionados con los diferentes perfiles de CF y sus correspondientes propiedades estructurales. El comportamiento antioxidante de los CF está dominado en mayor medida por los sustituyentes que presentan. La alta actividad de eliminación de radicales libres de los ácidos fenólicos depende tanto del número como de la posición relativa de los grupos OH que están enlazados con el anillo aromático; por ejemplo, la actividad de los ácidos hidroxibenzoicos depende del número de grupos OH: trihidroxi>dihidroxi>monohidroxi (Wojtunik-Kulesza y col., 2020). Por su parte, los flavonoides pueden actuar como antioxidantes por quelación de metales (dependiendo de la estructura, el tipo de ion metálico y el pH de la reacción), captación de radicales libres e inhibición de enzimas prooxidantes responsables de generar aniones superóxido (por ejemplo, xantina oxidasa, proteína quinasa C) (Wojtunik-Kulesza y col., 2020).

CONCLUSIONES

La harina y el aislado proteico A10 fueron sometidas a diferentes protocolos de extracción de compuestos fenólicos. El tipo y cantidad de CF extraídos estuvo influenciado por los métodos de extracción donde se observó que ocurrieron pérdidas de algunos ácidos fenólicos y flavonoides solubles durante la preparación de A10 por solubilización, modificación química en el medio alcalino y/o absorción en la fracción insoluble.

Después la DGIS, la harina de caupí incrementó la cantidad total de CF detectados con las extracciones MA, MH y CFE de MAA. Se observaron aumentos principalmente de ácido gálico y quercetina-3-galactósido en el sistema MA y de (-)-epigallocatequina en el sistema MH de HD. Sin embargo, en A10D los incrementos fueron en quercetina-3-glucósido en CFE y quercetina-3-galactósido en CFLP del extracto MAA.

Se demostraron cambios en las actividades antioxidantes de los extractos de CF después de la DGIS dependientes de las condiciones de extracción. En general se observaron aumentos en las actividades ABTS y ORAC para los extractos MA y MH de HD y A10D, atribuibles a CF y a la solubilización de péptidos y aminoácidos antioxidantes generados por la acción de las enzimas digestivas. Para la extracción con mezcla MAA, principalmente se observó aumento en la actividad antioxidante para los extractos de CFE de HD y A10D.

CAPÍTULO VII

EVALUACIÓN DEL USO POTENCIAL DE HIDROLIZADOS DE CAUPÍ COMO INGREDIENTES FUNCIONALES (ANTIOXIDANTES) EN PRODUCTOS CÁRNICOS

La oxidación de lípidos es uno de los principales factores limitantes para la calidad y aceptabilidad de la carne y los productos cárnicos. Este proceso conduce a la decoloración, pérdida de jugo, desarrollo de malos olores y sabores, y la producción de compuestos potencialmente tóxicos (Morrisey y col., 1998). Con la creciente demanda del consumidor de productos cárnicos precocidos, un control adecuado de la oxidación es de particular importancia. Para la carne cocida, los procesos térmicos pueden promover la oxidación de lípidos al interrumpir las membranas celulares y liberar prooxidantes, induciendo así el "sabor a recalentado" durante el almacenamiento refrigerado y el posterior recalentamiento (Sato y Hegarty, 1971). Una de las formas de minimizar la oxidación de lípidos y el "sabor a recalentado" en las carnes cocidas es utilizar antioxidantes.

En los capítulos anteriores, hemos observado propiedades antioxidantes de los componentes derivados del caupí tanto de la harina como del aislado proteico y de sus extractos fenólicos y el efecto que la digestión gástrica simulada y la alcalasa, tuvieron en la generación de especies con actividad antioxidante evaluada mediante distintos mecanismos de generación de agentes oxidantes. Además de estas propiedades, se han reportado mejoras en las propiedades funcionales tales como el índice de solubilidad en agua, capacidad de retención de aceite y actividad emulsionante en hidrolizados de caupí respecto al aislado sin hidrolizar. Esto sugiere que la incorporación de hidrolizados proteicos a formulaciones de alimentos, introduciría mejoras en la funcionalidad debido a una mayor exposición de cadenas laterales de aminoácidos reactivos y/o de parches hidrofóbicos, y a la disponibilidad de péptidos generados *de novo* durante la hidrólisis.

Estas propiedades funcionales de los hidrolizados de caupí, resultan particularmente interesantes de evaluar en formulaciones cárnicas cocidas. Por lo tanto, en este capítulo, nos proponemos evaluar el impacto de la incorporación de aislado de proteínas de caupí (A10), de hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (A10LH) y de harina de caupí (H), tanto en sistemas modelo cárnicos de pescado y de carne vacuna picada tipo hamburguesas, en la inhibición de la formación de TBARS, así como su efecto en los parámetros de calidad.

VII.1. Preparados de carne de pescado picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de caupí

La naturaleza altamente perecedera del pescado, debido al valor de pH cercano a la neutralidad y a la alta actividad de agua de sus tejidos, favorece el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, durante el almacenamiento refrigerado de pescado el factor limitante de la vida útil es el deterioro microbiológico. Por otra parte, la oxidación de lípidos es el principal proceso de

deterioro de la calidad del pescado y sus productos, además de la degradación de proteínas. El uso de atmósferas modificadas y bajas temperaturas desacelera el deterioro en la calidad organoléptica percibido a través de un olor y sabor fuertes (Marchetti, 2014).

VII.1.1. Formulación

La carne que se utilizó (sin piel ni espinas) fue del pescado *Pterodoras granulosus*, conocido comúnmente como armado común, capturado del río Paraná y procesado en el día. En la Tabla VII.1 se pueden observar las formulaciones de carne de pescado picada tipo hamburguesas ensayadas. Se realizaron un total de 10 hamburguesas por formulación, incluyendo los controles (Figura VII.1). Las hamburguesas fueron moldeadas en recipientes circulares (4,3 cm de diámetro por 1,24 cm de espesor) y pesadas. Se envasaron en bolsas de polietileno de baja densidad permeables al oxígeno, se almacenaron en heladera de 4-8 °C durante 9 días. Durante el almacenamiento, periódicamente se tomaron muestras de forma aleatoria de cada formulación para proceder a los ensayos. Se evaluó el efecto de la incorporación de harina, A10 y A10LH al 2%, en la oxidación lipídica, el pH, color y textura de las preparaciones sin cocción y almacenadas en refrigeración a 4-8 °C por 9 días. Se incluyó una formulación identificada como “control” (C) sin reemplazo, que fue utilizada como referencia en los ensayos.

Tabla VII.1. Formulación (g/100 g) de carne de pescado picada tipo hamburguesa con la adición de ingredientes derivados de caupí: harina, aislado (A10) o hidrolizado (A10LH).

	Carne	Sal	A10	A10LH	H
CP	98,5	1,5	0	0	0
A10 2%	96,5	1,5	2	0	0
A10LH 2%	96,5	1,5	0	2	0
Harina 2%	96,5	1,5	0	0	2

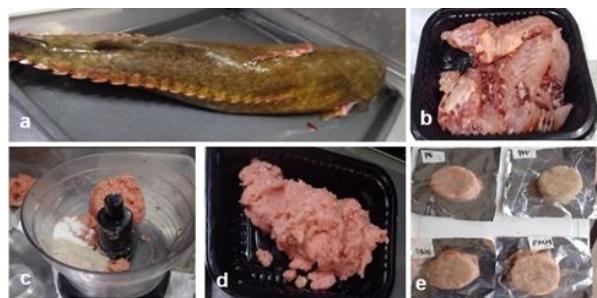


Figura VII.1. Secuencia (a-e) de la preparación de las distintas formulaciones de carne de pescado picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de caupí (harina, A10 y A10LH).

VII.1.1.2 Parámetros de calidad de preparados de carne de pescado picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de caupí

VII.1.1.2.1 Mediciones de pH

El efecto de la incorporación de ingredientes derivados del caupí en los valores de pH de las preparaciones de carne de pescado picada tipo hamburguesa, almacenadas en condiciones de refrigeración se muestra en la Figura VII.2.

La preparación control mostró un pH inicial de $6,05 \pm 0,02$ al día 0, presentó una disminución significativa al día 2 y luego los valores de pH se mantuvieron constantes hasta el final del almacenamiento (día 9). En algunos estudios se ha determinado que el descenso en los valores de pH podría estar relacionado con la proliferación de bacterias acidolácticas durante el almacenamiento.

Las formulaciones con el agregado de harina al 2% presentaron un comportamiento similar al control durante el almacenamiento. La incorporación de ingredientes proteicos del caupí A10 y A10LH al 2% presentaron valores iniciales de pH superiores al control al día 0, en particular las formulaciones con A10LH al 2% tuvieron valores iniciales pH más altos lo que podría deberse a los valores de pH de las muestras incorporadas: pH 7 de A10 y pH 10 de A10LH (aproximadamente). También presentaron una disminución significativa al día 2, sin embargo, a partir del día 6 el pH tuvo incrementos constantes y este efecto fue mayor en presencia de A10LH, alcanzando valores de pH significativamente más altos ($p<0,05$) respecto a la formulación control al día 9 (incrementos de un 5 y 10,5% para A10 y A10LH, respecto al control).

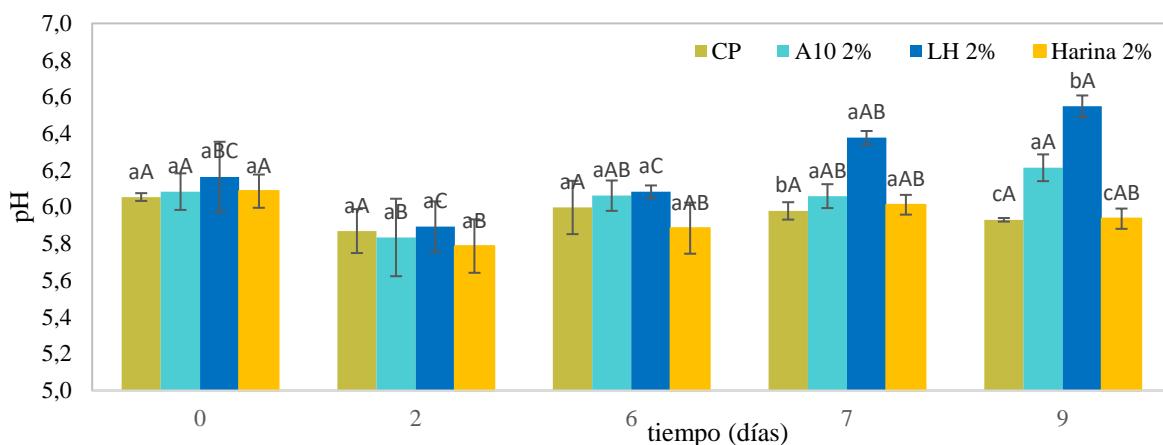


Figura VII.2. Variación de pH en función del tiempo de almacenamiento de carne de pescado picada tipo hamburguesa refrigerada. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre las distintas formulaciones en el mismo día de almacenamiento, mientras que las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0,05$) en la misma formulación a lo largo del tiempo de almacenamiento

VII.1.1.3. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) como indicador de la oxidación lipídica fue descripto por primera vez por Kohn y Liversedge (1944). Patton y Kutz (1951) fueron los que establecieron que el malondialdehído (MDA) era el responsable de formar un complejo cromógeno color rosa con el TBA con un máximo de absorbancia a 532 nm.

El MDA es el principal producto de la oxidación lipídica, sirviendo de indicador del avance de las reacciones de oxidación en carne y productos cárnicos (Raharjo y Sofos, 1993). Sin embargo, la reacción entre el TBA y el MDA no es específica, y otros compuestos carbonilos resultantes del proceso de oxidación pueden reaccionar con el TBA, sobreestimando los resultados (Rey y col., 2005). Por otra parte, el calentamiento provoca la peroxidación lipídica mediante la alteración de la estructura celular del músculo, la inactivación de enzimas antioxidantes y la liberación de oxígeno y hierro de la mioglobina. Las membranas alteradas por el calor quedan fácilmente expuestas al oxígeno, seguido de una rápida peroxidación lipídica (Igene y col., 1985). Además, la alta temperatura proporciona una disminución de la energía de activación para la oxidación y descompone los hidroperóxidos preformados en radicales libres, lo que promueve procesos adicionales de peroxidación lipídica y el desarrollo de sabores desagradables (Kanner 1994). Min y Ahn (2005), demostraron que la cocción induce

la oxidación de lípidos al encontrar mayores valores de TBARS y valor peróxido en hamburguesas cocidas en comparación con las crudas.

El efecto del agregado de ingredientes derivados del caupí en la estabilidad oxidativa de las preparaciones con carne picada de pescado tipo hamburguesa, almacenadas en condiciones refrigeradas, se muestra en la Figura VII.2. La muestra control al día 0 presentó niveles bajos de oxidación medidos por TBARS (0,2 mmol MDA/kg), con un valor al final del almacenamiento 2,4 veces superior al del día 0. El índice de TBA proporciona una medida del grado de oxidación de grasas. Consultando la bibliografía, se reportó que los principales componentes del músculo de este pez de agua dulce, capturado en los ríos aledaños a la ciudad de Santa Fe, sin discriminar según sexo, edad o zonas del músculo, son humedad ($82 \pm 1\%$), proteínas ($15 \pm 1\%$), lípidos ($2 \pm 1\%$), y cenizas ($1,2 \pm 0,1\%$). De esta manera, el armado de río puede ser caracterizado como una especie magra (Freire y col., 2009), lo que explica los valores bajos de TBARS en las preparaciones control de hamburguesas recién elaboradas.

El agregado de A10 al 2%, presentó valores de TBARS similares a la muestra control al día 0 y a lo largo del almacenamiento. La incorporación de A10LH al 2%, presentó asimismo valores de TBARS similares a la muestra control hasta el día 6 pero con un posterior aumento respecto al control, presentando valores 3,1 y 2,4 veces superior al control los días 7 y 9 de almacenamiento, respectivamente.

La incorporación de harina al 2% presentó valores muy superiores al control y a las formulaciones con ingredientes proteicos derivados de caupí desde el día 0 (14,5 veces mayor respecto al control) y durante el almacenamiento. Los niveles de TBARS se incrementaron en 1,7 veces el día 2; 2,2 veces el día 7 y 1,9 veces el día 9 respecto al día 0 en las formulaciones con harina. El aumento neto para la preparación con el agregado de harina fue de 2,63 mg MDA/kg entre el día inicial y el final, mientras que el aumento correspondiente al control fue solo de 0,28 mg MDA/kg de hamburguesa. Valores inferiores a 2,5 mg MDA/kg producto no implican rancidez (Domínguez y col., 2019). En hamburguesas de carne de cerdo y harina de porotos, se reportaron valore de TBARs elevados en comparación con las muestras control (Argel, 2022). Este comportamiento se comparó con formulaciones de carne y harina de legumbres (lentejas, arvejas y garbanzos) donde el incremento de las TBARS fue relacionado con la mayor retención de agua en los preparados con harina respecto a los controles. El agua retenida permitiría una mayor movilidad de los peróxidos de bajo peso molecular y sustancias radicalarias hidrosolubles. Otros factores que contribuirían al aumento de los valores de TBARs es el aporte de minerales prooxidantes y lipooxigenasas presentes en la harina (Baugret y col., 2016; Weiss y col., 2010; Purohit y col., 2016).

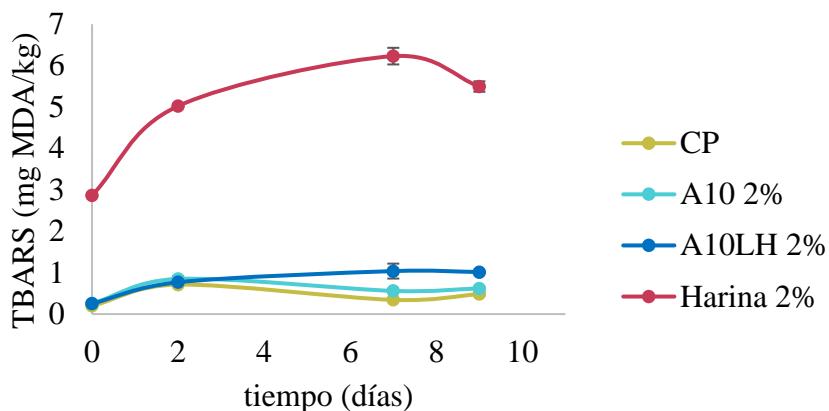


Figura VII.2. Variación de la oxidación lipídica medida por método TBARS en función del tiempo de almacenamiento.

VII.1.1.4. Color

En la Tabla VII.3 se observan los cambios de los parámetros de color L* (luminosidad), a* y b* (coordenadas cromáticas) y H* (tono) y C* (saturación del color) para las preparaciones de carne de pescado picada tipo hamburguesas elaboradas con agregados de harina, A10 y A10LH y la preparación control durante su almacenamiento refrigerado.

La preparación control presentó un valor de luminosidad (L*) inicial de $58,9 \pm 0,9$, superior al presentado por las muestras con el agregado de A10 y A10LH pero inferior al presentado por la formulación con H. Durante el almacenamiento, las preparaciones control mostraron una disminución al día 2 que se mantuvo constante hasta el día 7 (última medición realizada). De manera similar, las preparaciones con agregado de A10 y A10LH mostraron una disminución al día 2 y un posterior incremento, alcanzando el mismo valor de L* para ambas muestras al día 7. Por otra parte, la incorporación de harina en las preparaciones mostró un valor superior de luminosidad respecto al control durante los 7 días de evaluación. De este modo, podemos decir que la incorporación de ingredientes proteicos a los preparados no condujo a cambios significativos respecto al control en el parámetro L*, mientras que la incorporación de harina al 2% se volvieron más claras (mayores valores de L*, $p<0,05$) a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento refrigerado.

Con respecto a la medición de a* (+a* indica rojo, -a* indica verde) al día cero, los preparados control y con agregado de A10 mostraron valores superiores a los que contenían harina y A10LH. Se observó una disminución ($p<0,05$) en los valores de a* desde el día 2 hasta el día 7 en todas las preparaciones, resultando más acentuada en las muestras con harina. En cuanto al parámetro b*, la muestra control presentó una disminución al día 2 y posterior

incremento al día 7, mientras que el agregado de A10 y A10LH no mostró cambios significativos en dicho valor a lo largo del almacenamiento. Cuando se agregó harina, las preparaciones se tornaron amarillas, lo que se vio reflejado en un mayor valor de b*, desde su incorporación y con un incremento hacia el día 7.

Tabla VII.3. Variación de parámetros de color en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

	Muestra	DIA		
		0	2	7
L*	CP	59 ± 1 ^a	55 ± 1 ^b	57 ± 1 ^b
	Harina 2%	61 ± 2 ^a	58,8 ± 0,5 ^a	64 ± 1 ^a
	A10 2%	56,1 ± 0,5 ^a	54,3 ± 0,7 ^b	60 ± 1 ^{ab}
	A10LH 2%	57,8 ± 0,4 ^a	54,7 ± 0,5 ^b	60 ± 1 ^b
a*	CP	16,4 ± 0,4 ^a	11,9 ± 0,3 ^a	8,5 ± 0,1 ^{ab}
	Harina 2%	13 ± 1 ^c	6,7 ± 0,1 ^c	6,2 ± 0,3 ^b
	A10 2%	15,4 ± 0,1 ^b	11,1 ± 0,4 ^b	7,9 ± 0,2 ^{ab}
	A10LH 2%	12,7 ± 0,3 ^c	11,4 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,5 ^a
b*	CP	11,5 ± 0,3 ^c	8,8 ± 0,3 ^c	10 ± 1 ^b
	Harina 2%	12,8 ± 0,2 ^a	12,2 ± 0,2 ^b	16 ± 1 ^a
	A10 2%	11,5 ± 0,3 ^b	10,3 ± 0,2 ^b	10 ± 1 ^b
	A10LH 2%	9,9 ± 0,4 ^d	10,4 ± 0,2 ^a	10 ± 1 ^b
H*	CP	215,1 ± 0,2 ^c	216,7 ± 0,2 ^d	230,6 ± 0,4 ^b
	Harina 2%	225,2 ± 0,2 ^a	241,3 ± 0,3 ^a	249 ± 1 ^a
	A10 2%	217,6 ± 0,3 ^b	223 ± 1 ^b	231 ± 1 ^b
	A10LH 2%	218,1 ± 0,4 ^b	222 ± 0,4 ^c	229 ± 2 ^c
C*	CP	3687 ± 29 ^a	3383 ± 54 ^c	3453 ± 31 ^b
	Harina 2%	3727 ± 31 ^a	3571 ± 27 ^a	3840 ± 52 ^a
	A10 2%	3515 ± 29 ^a	3360 ± 36 ^{bc}	3637 ± 26 ^{ab}
	A10LH 2%	3574 ± 20 ^a	3387 ± 28 ^b	3630 ± 40 ^b

Promedio ± desvío estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencia significativa ($p<0,05$).

El tono (H*), fue inicialmente menor para la formulación control respecto a las demás y aumentó durante el almacenamiento hasta el día 7. De igual manera, el agregado de A10 y A10LH presentó la misma tendencia de aumento, alcanzando valores de H* igual al control al

día 7. En la preparación con harina, el tono fue significativamente superior respecto al control, desde el inicio y, aumentó significativamente alcanzando un valor de 249 ± 1 frente al valor del control de 230 ± 1 , en el día 7 de almacenamiento. Finalmente, la cromaticidad (C^*) presentó un valor inicial similar en todas las formulaciones que sólo se mantuvo constante en las preparaciones con agregado de harina.

VII.1.1.5. Textura

En esta tesis, se registraron valores de TPA de preparaciones almacenadas en refrigeración y llevadas a temperatura ambiente, utilizando recipientes circulares de 4,3 cm de diámetro y 1,25 cm de altura. En las Fig. VII.3 se presentan los valores de los parámetros de textura evaluados en las preparaciones de carne de pescado picada tipo hamburguesas con ingredientes derivados del caupí y sus controles, en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

En cuanto a la dureza (Fig. VII.3A), la formulación control presentó el menor valor al día 0, y presentó un aumento significativo ($p<0,05$) con el tiempo de almacenamiento. La incorporación de harina, A10 y A10LH a los preparados, presentaron valores de dureza inicial similar, que se mantuvo hasta el día 2, y aumentaron hacia el día 7 de almacenamiento; los valores de dureza fueron 1,4 veces menor para harina y 1,6 veces menor para A10/A10LH que el control al día 7.

La cohesividad, se mantuvo constante para la muestra control durante el almacenamiento. La incorporación de A10 y A10LH, presentó un valor similar al control hasta el día 2 y luego ambas muestras mostraron una disminución hasta el día 7. Para la preparación con harina, la cohesividad fue menor al control en los días 0 y 2, con un posterior aumento hasta el día 7. En cuanto a la elasticidad, la incorporación de cualquiera de los 3 ingredientes de caupí, ocasionó disminución de este parámetro respecto al control desde el inicio y hasta el día 7 del almacenamiento. Las formulaciones control presentaron la mayor adhesividad; mientras que con la adición de ingredientes de caupí se generaron formulaciones con similar adhesividad, pero menores respecto al control en el día 0. La adhesividad de las formulaciones control y con el agregado de harina disminuyó en el día 7 de almacenamiento (adhesividad 1,4 veces menor el control y 1,3 veces menor para harina, respecto al día 0), mientras que con el agregado de A10LH la adhesividad aumentó.

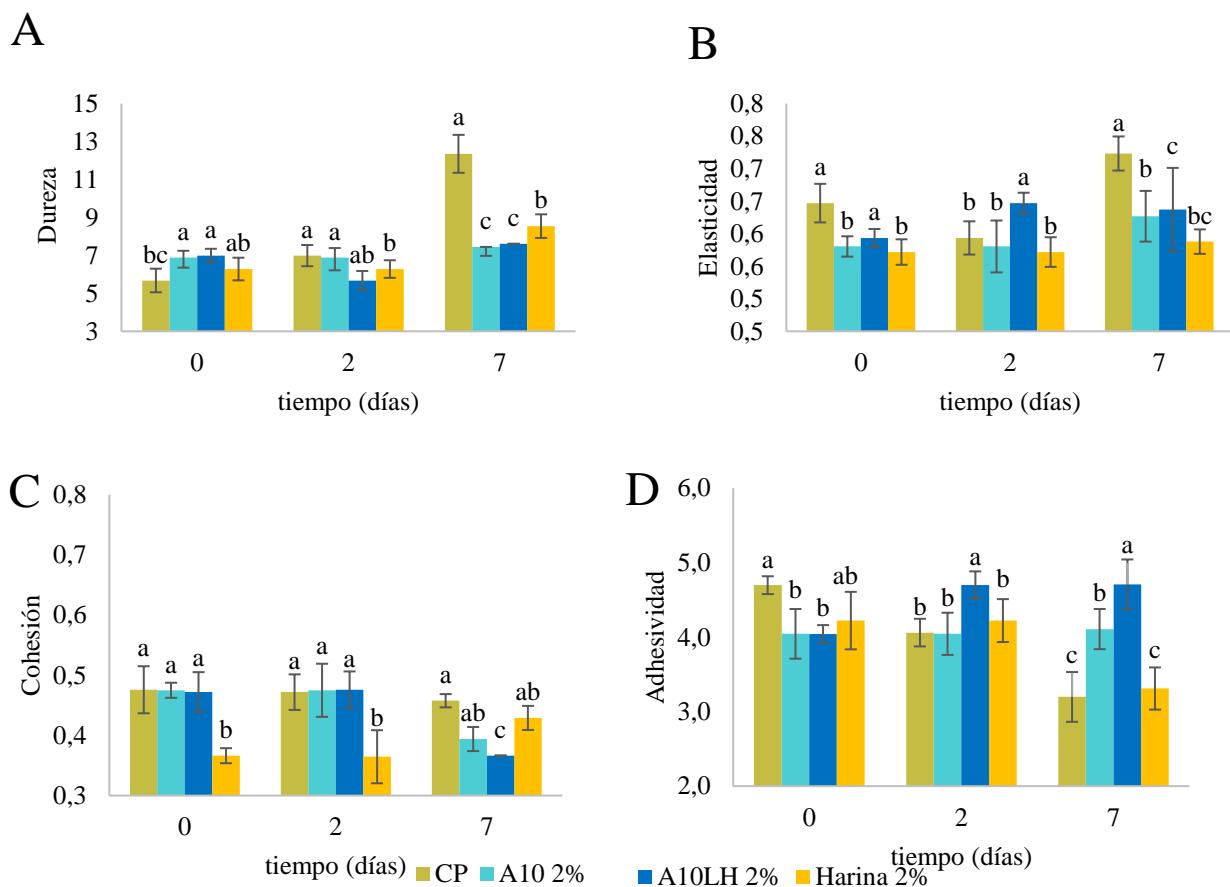


Figura VII.3. Parámetros obtenidos del análisis de perfil de textura de las formulaciones estudiadas, en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de carne de pescado picada tipo hamburguesa. Las letras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre las distintas formulaciones a lo largo del tiempo de almacenamiento

VII.2. Preparados de carne vacuna picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes proteicos derivados de caupí

En base a los resultados obtenidos para las formulaciones con carne de pescado se decidió proseguir con preparados de carne vacuna tipo hamburguesa debido al contenido de grasa de este tejido y se consideró trabajar con muestras cocidas ya que los procesos térmicos favorecen el desarrollo de las TBARS. Finalmente, la selección de la proporción a incorporar de ingredientes derivados de caupí fue de acuerdo a reportes en otras legumbres (Hogan y col. 2009; Xiong y Sun, 2015), descartando la utilización de harina debido al aumento inespecífico (discutido previamente) en los valores de TBARS en las formulaciones con pescado.

VII.2.1. Formulación

En la Tabla VII.4 se pueden observar las formulaciones de carne vacuna picada tipo hamburguesas ensayadas. Debido a limitaciones en la cantidad total de muestra que se puede procesar simultáneamente, se prepararon en dos lotes experimentales independientes, evaluando los siguientes aspectos en cada uno: (i) efecto de la incorporación de A10 y A10LH al 1%, (ii) efecto de la incorporación de A10 y A10LH al 4%, en la oxidación lipídica, el pH, textura, color y pérdidas de peso por cocción de carne vacuna picada tipo hamburguesa cocidas y refrigeradas a 4-8°C por 20 días. En cada caso, se incluyó una formulación identificada como “control” (C) sin reemplazo, que fue utilizada como referencia en los ensayos.

Tabla VII.4. Formulación (g/100 g) de carne vacuna picada tipo hamburguesa con la adición de ingredientes derivados de proteína de caupí: aislado (A10) o hidrolizado (A10LH)

Formulación	Carne	Sal	A10	A10LH	Agua
C 1%	90	1	0	0	9
A10 1%	89	1	1	0	9
A10 LH 1%	89	1	0	1	9
C 4%	90	1	0	0	9
A10 4%	86	1	4	0	9
A10 LH 4%	86	1	0	4	9

La preparación de las hamburguesas se realizó utilizando un sistema de cocción en baño termostatizado previamente descripto (Zhou y Shi, 2013; Silveira Coelho y col., 2019) (Figura VII.4). El corte de carne vacuna que se utilizó fue costeleta adquirida en un comercio local. Este corte está descripto bajo el código 4108 del Anexo del nomenclador para carnes bovinas (SENASA, 1999). Se extrajeron completamente los huesos y los depósitos de grasa, se procesó y se realizaron las diferentes formulaciones. Luego, las hamburguesas fueron introducidas en tubos de centrífuga de 50 ml, pesadas y centrifugadas a 100xg durante 10 min para eliminar el aire atrapado. Las muestras en los tubos se cocinaron hasta alcanzar una temperatura interna de 71 °C en un baño de agua termostatizado. La temperatura interna fue monitoreada mediante un termómetro de tamaño de aguja insertado en el centro térmico de los tubos durante la cocción. Las muestras de carne cocida fueron luego retiradas y pesadas nuevamente.

En total se prepararon 10 hamburguesas para cada formulación, se envasaron en bolsas de polietileno selladas, se almacenaron en heladera de 4-8 °C durante 20 días. Durante el

almacenamiento, periódicamente se tomaron muestras de forma aleatoria de cada formulación para proceder a los ensayos.

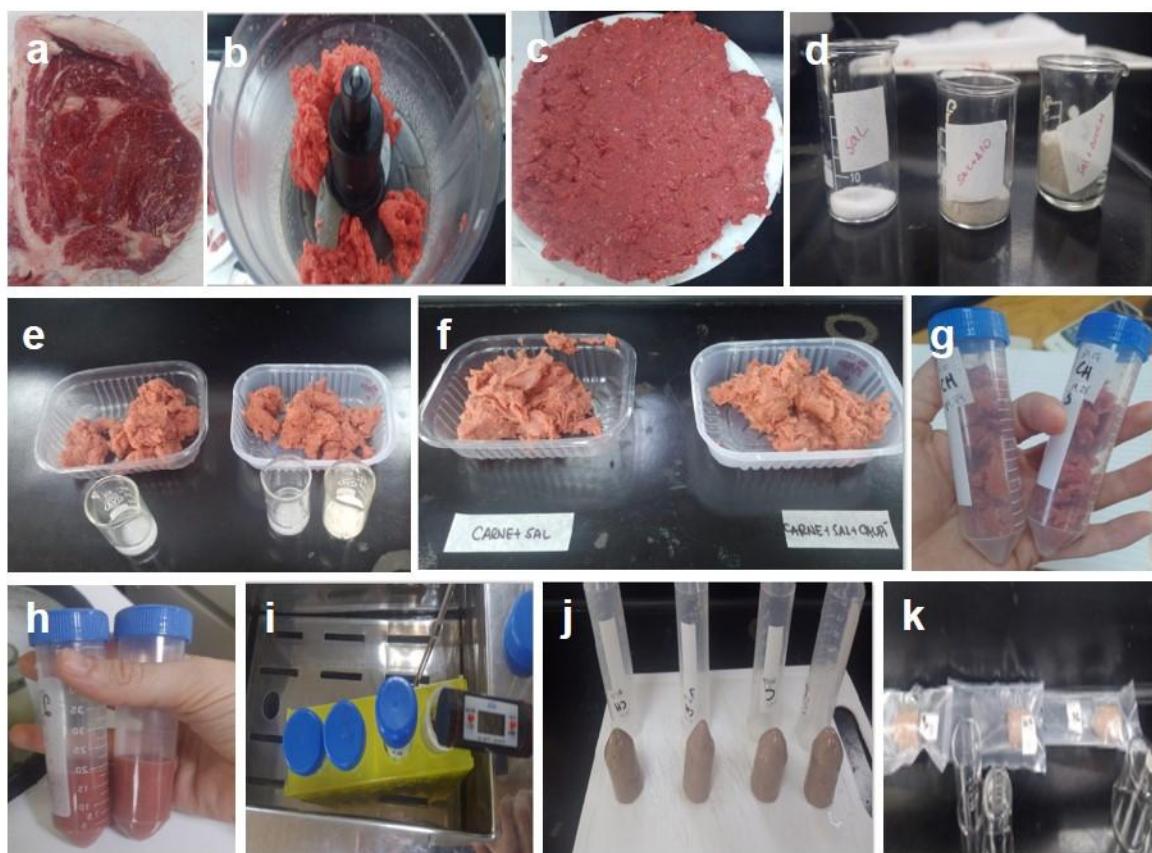


Figura VII.4. Secuencia (a-k) de la preparación de las distintas formulaciones de carne vacuna picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes derivados de proteína de caupí (A10 y A10LH).

VII.2.2. Parámetros de calidad de preparados de carne vacuna picada tipo hamburguesa con el agregado de ingredientes proteicos derivados de caupí

VII.2.2.1 Rendimiento de cocción

Se obtuvo la pérdida de peso durante la cocción (Tabla VII.5). Se registraron valores de rendimiento de cocción que oscilaban entre 84,31 y 84,99% para formulaciones al 1% y 86,1 y 97,1%, para formulaciones al 4%. El agregado de un 4% de ingredientes derivados de caupí condujo a menores pérdidas por cocción que el agregado de 1% y este efecto fue significativamente mayor ($p<0,05$) para el hidrolizado proteico (A10LH). Las pérdidas de peso durante la cocción de hamburguesas de carne se deben principalmente a la disminución del contenido de agua y grasa, y estas pérdidas dependen del proceso de transferencia de masa

durante el tratamiento térmico. En este sentido, se ha demostrado previamente que una hidrólisis limitada de proteínas (GH de 1 al 10%) mejora la solubilidad, además de las propiedades funcionales de la proteína original, como ser el poder emulsificante, espumante o de absorción de agua o aceite. Hidrolizados con una buena capacidad de absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas (Mannheim y col., 1992).

Tabla VII.5. Efecto de ingredientes derivados de proteínas de caupí en la pérdida de peso durante la cocción de muestras de carne vacuna picada tipo hamburguesa.

Muestra	Pérdida de peso (%)	Rendimiento de cocción (%)
C 1%	3,1 ± 0,3 ^a	84 ± 1 ^d
A10 1%	3,1 ± 0,5 ^a	85 ± 2 ^{cd}
A10LH 1%	3,5 ± 0,4 ^a	84 ± 2 ^d
C 4%	2,3 ± 0,3 ^b	86 ± 1 ^c
A10 4%	1,2 ± 0,3 ^d	95 ± 3 ^b
A10LH 4%	0,6 ± 0,1 ^c	97 ± 1 ^a

Promedio ± desvío estándar. Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencia significativa ($p<0,05$).

VII.2.2.2 Mediciones de pH

El efecto de la incorporación de ingredientes derivados del caupí en los valores de pH de las preparaciones de carne vacuna picada tipo hamburguesa, cocidas y almacenadas en condiciones de refrigeración se muestra en la Figura VII.5.

El pH inicial (día 0) y final (día 20) de las muestras control fue de 5,74 a 5,58 y de 5,82 a 5,74 para formulaciones al 1 y 4%, respectivamente, sin diferencias significativas ($p>0,05$). En este trabajo se observó que no hubo efecto en los valores de pH debido a la incorporación de A10 ni A10LH al 1% ($p>0,05$), en comparación con el control. Sin embargo, cuando se agregó A10 al 4%, aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de pH respecto al control al inicio del almacenamiento, se notaron incrementos en los valores de pH desde el día 6 hasta el día 12 ($p<0,05$), con una posterior disminución hasta el día 20. Por otro lado, la preparación con la incorporación de A10LH al 4% presentó valores de pH significativamente más altos ($p<0,05$) respecto a la formulación control al día 0. El aumento en el pH inicial en la formulación con una mayor proporción de A10LH podría deberse al valor de pH de la muestra incorporada: aproximadamente pH=10 de A10LH.

Otros autores informaron que no hubo diferencias significativas entre las hamburguesas de carne cruda enriquecidas con aislados de proteína de arveja, proteína de arroz y proteínas de lentejas (con incorporaciones al 3% y 7%, de cada proteína) y las muestras control, cuando se realizaron determinaciones de pH durante 12 días y a una temperatura de almacenamiento de 4°C (Baugreet y col., 2016).

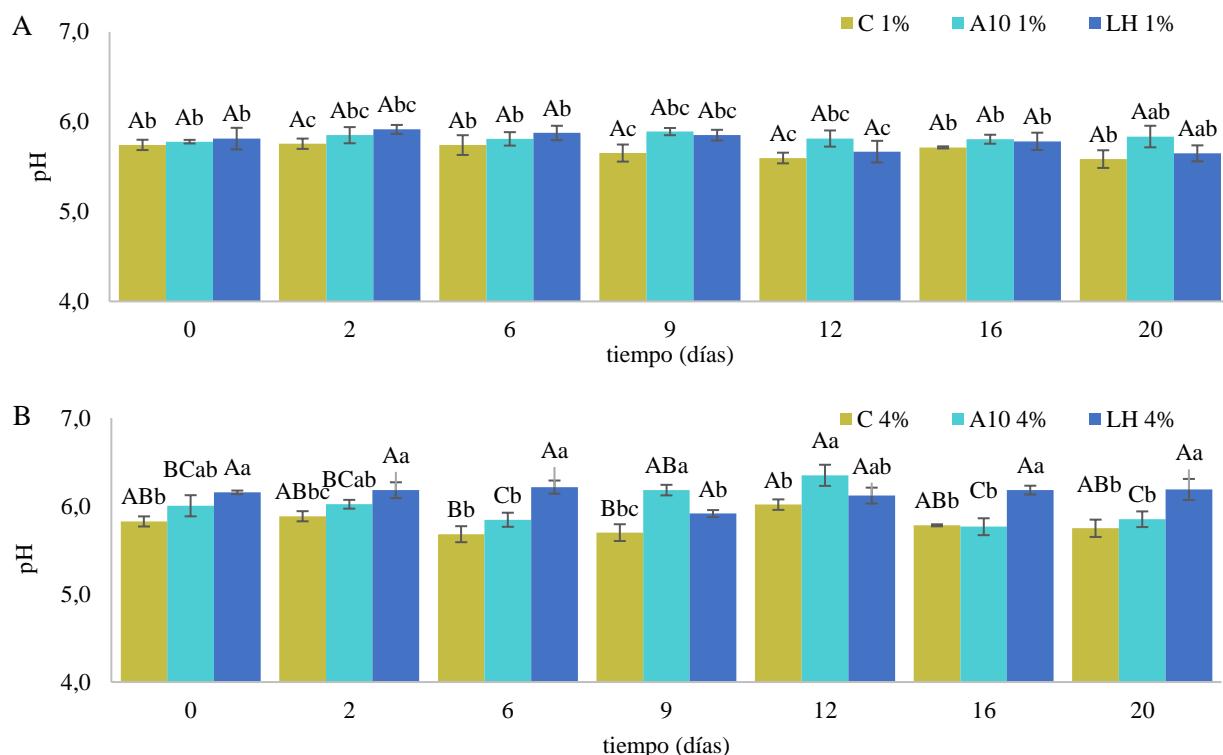


Figura VII.5. Variación de pH en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de carne vacuna picada tipo hamburguesa con agregados de A10 y A10LH al 1% (**A**) y al 4% (**B**). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes formulaciones para igual día de almacenamiento ($p<0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los días de almacenamiento para igual formulación ($p<0,05$).

VII.2.2.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El efecto del agregado de ingredientes derivados del caupí en la estabilidad oxidativa de las preparaciones con carne picada vacuna tipo hamburguesa, cocidas y almacenadas en condiciones refrigeradas, se muestra en la Figura VII.6. El agregado de A10 y A10LH al 1%, presentó valores de TBARS similares a la muestra control al día 0. Sin embargo, con el agregado de A10 y A10LH al 4% los niveles iniciales de oxidación fueron más altos respecto a las hamburguesas de carne cocidas control ($p<0,05$).

Durante el almacenamiento, las preparaciones control mostraron un marcado incremento en los valores de TBARS hasta el día 20, tanto para las muestras control al 1% como al 4%. El aumento en los niveles de oxidación observados se debe a que cuando las células se lesionan durante el picado, la cocción o la congelación, favorecen los procesos oxidativos (Gray y col., 1996).

Las formulaciones control correspondientes a 1% y 4% mostraron comportamientos distintos entre sí. Esto se debe a que fueron preparadas en momentos diferentes y a partir de muestras de carne distintas, las cuales podrían variar en su contenido de lípidos. En general, la formulación control preparada con el lote al 1% experimentó una mayor oxidación con el tiempo en comparación con el control preparado al 4%.

La incorporación de A10 al 1%, mantuvo niveles similares de oxidación hasta el día 6 de almacenamiento y desde el día 9 al 16 presentó valores menores de oxidación respecto al control. Se aprecian diferencias significativas ($p<0,05$) al analizar el agregado de A10 al 4% con marcadas reducciones en los valores de TBARS respecto al control, durante todos los días de almacenamiento.

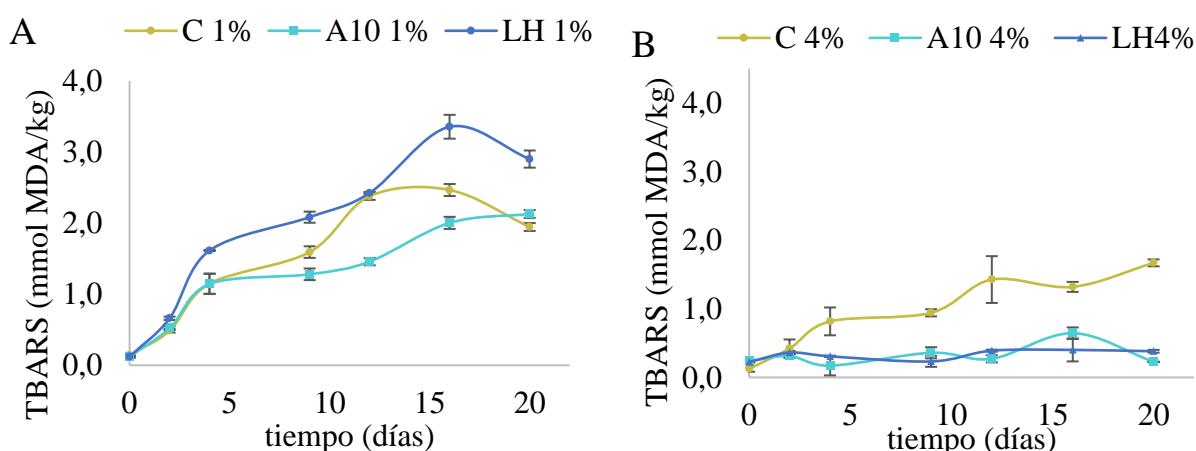


Figura VII.6. Variación de la oxidación lipídica medida por método TBARS en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de carne vacuna picada tipo hamburguesa con agregados de A10 y A10LH al 1% (A) y al 4% (B).

Por otra parte, la incorporación de A10LH al 1% tuvo un comportamiento particular ya que no inhibió la oxidación de las muestras e incluso presentó valores superiores al control al 1% a partir del día 6 exhibiendo un efecto prooxidante durante el almacenamiento. Sin embargo, las formulaciones con A10LH al 4%, lograron inhibir la formación de sustancias

reactivas al ácido tiobarbitúrico, siendo capaces de retrasar significativamente ($p<0,05$) la oxidación de lípidos en las hamburguesas de carne cocidas almacenadas.

Existen numerosos reportes sobre la incorporación de aislados proteicos y/o hidrolizados de origen vegetal y animal a hamburguesas de carne, con el objetivo de retrasar la oxidación lipídica. Baugreet y col. (2016) informaron que la oxidación lipídica de hamburguesas de carne vacuna cruda enriquecidas con aislados de proteína de arveja; PPI) y de proteína de arroz (RP) fue significativamente afectada en función del tiempo de almacenamiento. La adición de PPI (3%) aumentó significativamente los valores de TBARS, indicando mayor oxidación lipídica, mientras que las hamburguesas enriquecidas con RP tuvieron una oxidación menor que el control, mostrando potencial como ingrediente estabilizador lipídico en productos cárnicos.

Wang y Xiong (2005) reportaron que la incorporación de proteína de papa y de su hidrolizado proteico a hamburguesas de carne vacuna cocidas previenen significativamente la oxidación lipídica, inhibiendo la formación de TBARS, durante el almacenamiento por 7 días. Además, informaron una reducción del 27% en la formación de peróxidos durante el almacenamiento en las hamburguesas con proteína de papa y completa inhibición en las que contenían la proteína hidrolizada.

Un último ejemplo es de Hogan y col. (2009), que utilizaron tres fracciones de hidrolizado de proteínas de leche (Val-F2, Val-F3 y NP-2), con actividad antioxidante y quelante de metales, para evaluar la actividad inhibitoria sobre la oxidación lipídica en productos cárnicos cocidos. Los dos tratamientos de 200 y 800 $\mu\text{g/g}$ de Val-F3 redujeron significativamente la peroxidación lipídica de la carne medida por TBARS, mientras que las muestras de Val-F2 y NP-2 mostraron una ligera reducción al inicio del tratamiento. La fracción Val-F3 a una concentración de 200 $\mu\text{g/g}$ mostró ser más efectiva en la inhibición de la oxidación que a 800 $\mu\text{g/g}$, a medida transcurrián los días de almacenamiento. En los días 8 y 15 el tratamiento con 800 $\mu\text{g/g}$ de Val-F3 no exhibió un efecto inhibidor de la oxidación lipídica de la carne, lo cual se reflejó en valores significativamente más altos de TBARS respecto al tratamiento con 200 $\mu\text{g/g}$. Estas observaciones indicaron que Val-F3 fue un antioxidante más efectivo a una concentración más baja. Se sabe que algunos antioxidantes en alta concentración pueden promover o acelerar la autooxidación (Pratt, 1996).

VII.2.2.4 Color

El color, la apariencia y la presentación del producto son muy importantes para el consumidor y tienen una gran influencia en las decisiones de compra (Nassu y col., 2012).

Idealmente, los productos cárnicos funcionales novedosos deberían tener características de color similares a sus alternativas convencionales.

En la Tabla VII.6. se observan los cambios de los parámetros de color luminosidad (L^*), coordenadas cromáticas (a^* y b^*), saturación de color (C^*) y tono (H^*) para las preparaciones de carne vacuna picada tipo hamburguesas elaboradas con agregados de aislado e hidrolizado proteicos y la preparación control durante su almacenamiento refrigerado. Las mediciones fueron realizadas en los días 2, 6, 9 y 20 de almacenamiento.

Para el valor de luminosidad ($+L^*$ = más luminoso, $-L^*$ = más oscuro), las hamburguesas con A10 y A10ALH agregados al 1%, presentaron valores similares al control ($p>0,05$) desde el día 2 hasta el día 9, en tanto que, las hamburguesas con agregados del 4% disminuyeron ($p<0,05$) su valor de L^* a partir del día 6 del almacenamiento refrigerado. La incorporación de A10LH al 4% presentó la mayor disminución de L^* respecto al control, tornándose las muestras, más oscuras. Estos resultados coinciden con lo informado por Xiong y Sun (2015) quienes también observaron que la incorporación de un 2% de ingredientes derivados de arveja (proteínas, hidrolizados y harina) a sistemas cárnicos disminuyó ($p<0,05$) la luminosidad de las muestras cocidas frescas en comparación con el control, desde el día 0 y durante todo el período de almacenamiento.

Asimismo, el tono (H^*) y la cromaticidad (C^*) (Tabla VII.6) tuvieron una marcada disminución ($p<0,05$) en las formulaciones con A10 y A10LH al 4% durante todo el tiempo de almacenamiento refrigerado, respecto a las muestras control y a las muestras con agregados al 1%.

Con respecto a la medición de la coordenada cromática a^* ($+a^*$ indica rojo, $-a^*$ indica verde), todas las muestras con incorporación de proteínas e hidrolizados proteicos de caupí aumentaron su valor de a^* respecto a la muestra de control ($p<0,05$) el día 2 (Tabla VII.6). Por lo tanto, el color superficial de la carne cocida con los productos de caupí era más rojo que el de la muestra control, lo que es un atributo deseable por el consumidor quien prefiere los alimentos de carne rojo brillante en lugar de morado o marrón. En cuanto al tiempo de almacenamiento, se observó una disminución ($p<0,05$) en los valores de a^* desde el día 6 hasta el día 12 en las hamburguesas enriquecidas con A10 y A10LH (1 y 4%), aunque esta disminución se observó también en los controles. Durante el almacenamiento refrigerado (hasta el día 9), la disminución del parámetro a^* en los productos cocidos, podría explicarse por la oxidación de la mioglobina y/o oximioglobina, y debido a la formación de metamioglobina (Özer y Secen, 2018; Utrera y col., 2014). Para el día 20 las preparaciones al 1% alcanzaron el mismo valor de a^* que la muestra control.

Tabla VII.3. Variación de parámetros de color en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de carne vacuna picada tipo hamburguesa.

	Muestra	DIA			
		2	6	9	20
L*	C 1%	55 ± 1a	55 ± 1 ^a	53 ± 2 ^{bc}	52 ± 1 ^{bc}
	A10 1%	52,8 ± 0,4 ^c	55 ± 1 ^a	54 ± 2 ^{ab}	52 ± 1 ^b
	A10LH 1%	55,1 ± 0,4 ^a	54,4 ± 0,3 ^a	55 ± 1a	50,6 ± 0,5 ^c
	C 4%	54 ± 1 ^b	55 ± 2 ^a	52 ± 2 ^c	54 ± 1 ^a
	A10 4%	52 ± 1 ^c	51 ± 1 ^b	20 ± 2 ^d	51,1 ± 0,5 ^{bc}
	A10LH 4%	48,7 ± 0,4 ^d	48 ± 1 ^c	48,6 ± 0,3 ^d	50 ± 1 ^d
a*	C 1%	8,6 ± 0,4 ^d	7,3 ± 0,4 ^e	7,4 ± 0,3 ^d	7,6 ± 0,4 ^{de}
	A10 1%	9,4 ± 0,2 ^c	9,2 ± 0,3c	9 ± 1 ^c	8,0 ± 0,2 ^c
	A10LH 1%	10,0 ± 0,4 ^c	10,5 ± 0,3 ^b	10 ± 1 ^b	7,5 ± 0,6 ^e
	C 4%	9,3 ± 0,4 ^{cd}	8 ± 1 ^d	8,7 ± 0,2 ^c	9,4 ± 0,2 ^a
	A10 4%	12 ± 1 ^b	11 ± 1 ^b	10,8 ± 0,4 ^a	7,9 ± 0,1 ^{cd}
	A10LH 4%	14 ± 2 ^a	8 ± 1 ^d	7,4 ± 0,6 ^d	9 ± 1 ^b
b*	C 1%	9,4 ± 0,5 ^b	7,9 ± 0,4 ^c	8,2 ± 0,5 ^b	7,6 ± 0,4 ^b
	A10 1%	8,6 ± 0,3 ^d	8,3 ± 0,3 ^b	8 ± 1 ^b	7,7 ± 0,3 ^b
	A10LH 1%	8,9 ± 0,4 ^{cd}	9,8 ± 0,3 ^a	9 ± 1 ^a	7 ± 1 ^c
	C 4%	9,0 ± 0,6 ^{bcd}	8 ± 1 ^{bc}	7,9 ± 0,3 ^b	9 ± 1 ^a
	A10 4%	9,1 ± 0,3 ^{bc}	8,5 ± 0,4 ^b	7,8 ± 0,3b	7,9 ± 0,1 ^b
	A10LH 4%	11 ± 1 ^a	6,1 ± 0,4 ^d	7 ± 1c	6,3 ± 0,4 ^d
H*	C 1%	0,830 ± 0,001 ^a	0,82 ± 0,01 ^a	0,84 ± 0,01 ^a	0,790 ± 0,001 ^a
	A10 1%	0,700 ± 0,001 ^b	0,730 ± 0,001 ^c	0,75 ± 0,01 ^b	0,77 ± 0,01 ^a
	A10LH 1%	0,73 ± 0,01 ^b	0,750 ± 0,001 ^b	0,76 ± 0,01 ^c	0,74 ± 0,02 ^b
	C 4%	0,770 ± 0,001 ^a	0,78 ± 0,04 ^a	0,77 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,01 ^a
	A10 4%	0,60 ± 0,04 ^c	0,64 ± 0,01 ^d	0,62 ± 0,01 ^d	0,78 ± 0,01 ^a
	A10LH 4%	0,64 ± 0,04 ^d	0,63 ± 0,04 ^e	0,74 ± 0,01 ^c	0,64 ± 0,02 ^c
C*	C 1%	53 ± 1a	55 ± 1a	53 ± 2 ^b	52 ± 1 ^{bc}
	A10 1%	53,7 ± 0,3 ^c	56 ± 1a	55 ± 2 ^a	53 ± 1 ^b
	A10LH 1%	56 ± 1a	55 ± 1a	56 ± 2 ^a	51 ± 2 ^{cd}
	C 4%	55 ± 1 ^b	55 ± 2 ^b	52 ± 2 ^{bc}	55 ± 1 ^b
	A10 4%	54 ± 1 ^c	53 ± 1 ^b	51 ± 1 ^c	52 ± 1 ^{bc}
	A10LH 4%	51 ± 1 ^d	48 ± 1 ^c	49,2 ± 0,3 ^d	50 ± 1 ^d

Por otro lado, la incorporación de A10 y A10LH al 4% resultó en un aumento del 30 y 35% respecto al control del parámetro a^* al día 2, respectivamente. Este valor de a^* mayor al control se mantuvo hasta el día 9 para A10, mientras que el valor de a^* para A10LH disminuyó, indicando cierta protección a la oxidación por parte de los ingredientes de caupí. Al final del almacenamiento (día 20), no se observaron diferencias significativas respecto al control.

En cuanto al parámetro b^* (+ b^* indica amarillo, - b^* indica azul), no presentó diferencias significativas entre la formulación control y las preparaciones con A10 y A10LH al día 2. El valor de b^* disminuyó, en pequeña medida y de manera similar, en todos los tratamientos después del día 6. La incorporación de A10LH al 1% fue la que presentó menor variación del parámetro b^* y su incorporación al 4%, presentó el mayor cambio, respecto a los controles.

En general, una disminución de la luminosidad y del tono amarillo y un aumento del tono rojo de preparaciones de derivados cárnicos, son variaciones de aspecto que podrían ser aceptadas positivamente en productos cárnicos procesados. De acuerdo a los resultados de esta tesis, se puede concluir que, la incorporación de aislados e hidrolizados proteicos de caupí, en preparados de carne vacuna picada tipo hamburguesas (cocidas y refrigeradas) tendrían un efecto beneficioso en los atributos de color que deberían ser en un futuro evaluados por un panel sensorial.

VII.2.2.5 Textura

Las proteínas de la carne (proteínas fibrilares, principalmente miosina y algunos colágenos) presentan diferentes propiedades funcionales que son cruciales para la calidad de consumo de los productos cárnicos procesados, por ejemplo, las características de textura responsables de su masticabilidad y sensación en boca. En general, durante el proceso de elaboración, gracias a la fuerza iónica provista por la incorporación de ingredientes como NaCl y fosfatos, y por acción de la energía mecánica del picado, una gran cantidad de proteínas fibrilares se solubilizan, interactúan con el agua y entre ellas y con hidrocoloides (en caso que se incorporen), y pueden emulsificar las partículas pequeñas de grasa formadas. Posteriormente, cuando el producto es cocido, las proteínas y otros agentes gelantes (en caso de agregarse), forman finalmente un producto cárneo gelificado (Mateo y col., 2021).

El análisis de perfil de textura [TPA, por sus siglas en inglés; propuesto originalmente por Friedman y col. (1963) y Szczesniak y col. (1963)], consiste en registrar la respuesta de una muestra a dos compresiones sucesivas, imitando el proceso de masticación (Bourne, 1968). En esta tesis, se registraron valores de TPA de hamburguesas cocidas, almacenadas en

refrigeración y llevadas a temperatura ambiente, utilizando cilindros de 2,4 cm de diámetro y 0,5 cm de altura, inmediatamente después de su corte. En la Fig. VII.7 se presentan los valores de los parámetros de textura evaluados en las preparaciones cocidas de carne vacuna picada tipo hamburguesas con ingredientes derivados del caupí y sus controles. Las mediciones fueron realizadas en los días 2, 6, 9 y 20 de almacenamiento.

En cuanto a la dureza (Fig. VII.7A y B), al comparar las formulaciones control con el agregado de A10 al 4% y A10LH al 1 y 4%, no se observaron diferencias significativas en los valores de dureza inicial ($p>0,05$) (valor promedio, 19,3 N). Sin embargo, la formulación con la incorporación de A10 al 1% mostró una dureza inicial significativamente menor (15,19 N). A lo largo del tiempo, las formulaciones con ingredientes incorporados al 1% experimentaron un aumento en la dureza hacia el día 6 (valor promedio 32,7 N), seguido de una disminución hacia el día 9 (valor promedio 15,64 N) y un posterior incremento hacia el día 20, alcanzando el valor de dureza inicial (24,19 N), sin diferencias significativas respecto al control ($p<0,05$).

Por otro lado, las formulaciones con incorporaciones de A10LH 4% mostraron una disminución de la dureza en los días 6 y hasta el final del almacenamiento (día 20), mientras que con el agregado de A10 no se observaron diferencias significativas respecto al control.

La cohesividad describe como el grado en que la hamburguesa de carne puede deformarse antes de romperse. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y controles, tanto al inicio como hasta el día 9 (Fig. VII.7C y D).

La elasticidad indica la velocidad a la que la hamburguesa de carne deformada vuelve a su forma original después de la primera compresión. Solo se observó disminución significativa por la adición de A10LH al 4% al día 20, mientras que no se presentaron diferencias significativas entre ningún otro tratamiento y los controles (Fig. VII.7E y F).

En general, las incorporaciones de ingredientes de caupí no ocasionaron cambios texturales significativos respecto a los controles. Otros autores como Baugreet y col. (2016) utilizaron aislado proteico de arvejas, harina de lenteja y proteínas de arroz en hamburguesas, obteniendo productos con mayor contenido de proteínas y de textura blanda de fácil consumo por personas mayores. Por su parte, Mokni Ghribi y col. (2018) formularon salchichas con el agregado de distintos concentrados proteicos de garbanzo, obteniendo un producto con mayor contenido de proteínas y mejoras en el rendimiento en la cocción. Mientras que en el análisis sensorial se encontró que esta adición no presentó diferencias respecto al producto control.

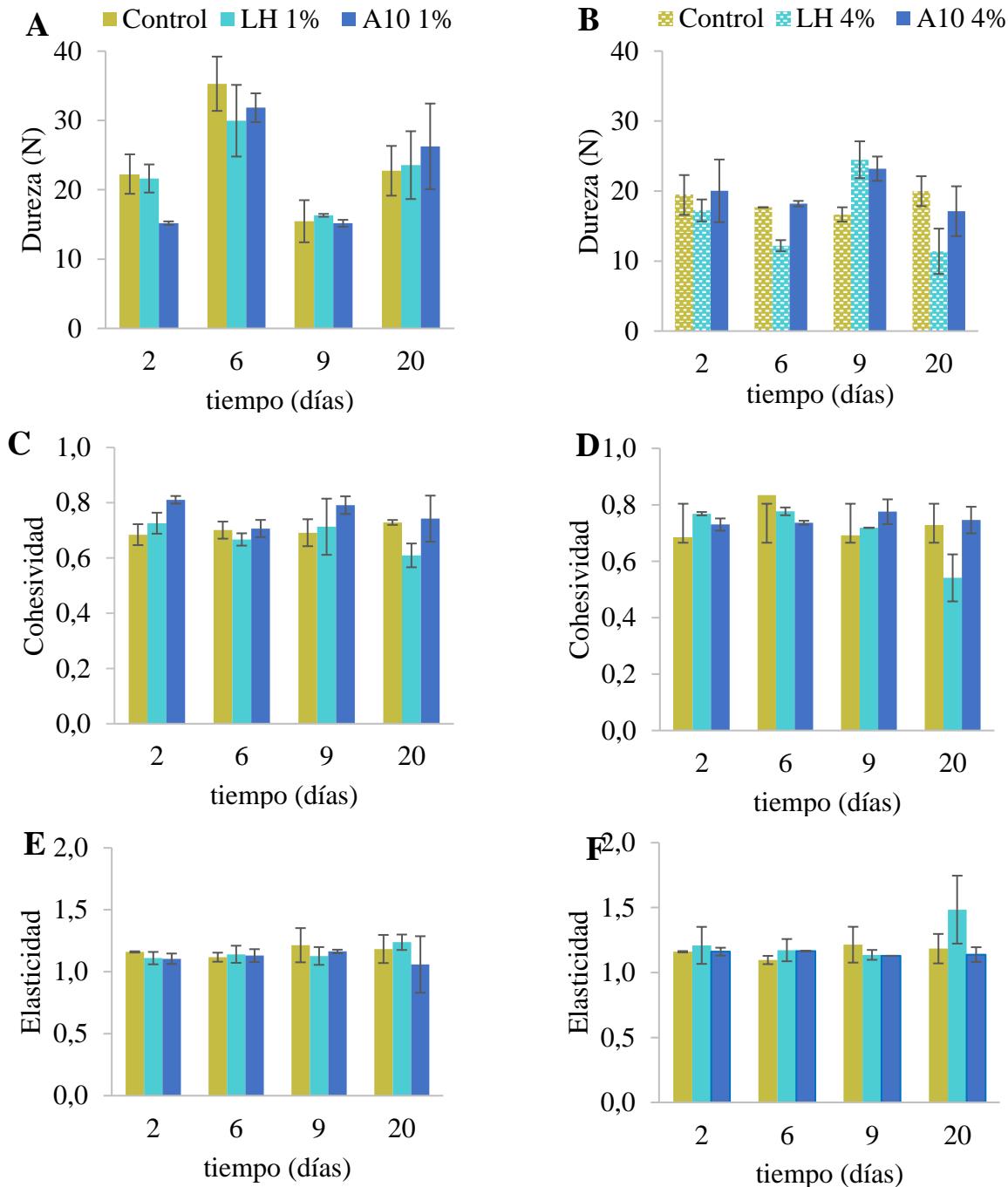


Figura VII.7. Parámetros obtenidos del análisis de perfil de textura de las formulaciones estudiadas, en función del tiempo de almacenamiento refrigerado de carne vacuna picada tipo hamburguesa.

CONCLUSIONES

Mediante la formulación de preparaciones tipo hamburguesas con carne de pescado con ingredientes derivados de caupí, fue posible analizar el efecto del agregado de harina, A10 y A10LH al 2% en la oxidación de lípidos, y en parámetros de color y textura. Los niveles de oxidación fueron evaluados durante 9 días. A10 mantuvo los valores iniciales, mientras que A10LH mostró incrementos significativos y el agregado de harina mostró valores de TBARs elevados desde el inicio del almacenamiento. La incorporación de A10 y A10LH presentaron cambios menores en el color y diminución en la dureza de las formulaciones respecto al control durante el almacenamiento. El agregado de harina resultó en una mayor luminosidad y aumento en el color amarillo respecto a la formulación control.

En las formulaciones con carne vacuna cocida, la incorporación de A10 y A10LH, solo la incorporación de estos ingredientes al 4% mostró cambios en la oxidación de lípidos, y en parámetros de color y textura. La adición de A10 mostró una significativa inhibición de la formación de TBARS y un aumento en la tonalidad roja, sin cambio en los parámetros de textura. Asimismo, la incorporación de A10LH a las formulaciones tuvo impacto en la inhibición de la oxidación desde los primeros días de almacenamiento, sin modificaciones en características de color y textura respecto al control.

Es necesario continuar con el estudio de nuevas formulaciones utilizando mayores concentraciones de A10 y A10LH, así como realizar análisis microbiológicos para optimizar la calidad y estabilidad de las preparaciones.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

GENERALES

En el presente trabajo de tesis se ha analizado y discutido la obtención de hidrolizados proteicos de caupí variedad Cuarentón por digestión con alcalasa y por digestión gastrointestinal simulada y su actividad antioxidante.

En primer lugar, se trabajó con proteínas obtenidas a dos pH de extracción distintos 8 y 10 que luego del tratamiento con dos concentraciones de alcalasa dieron lugar a hidrolizados con alto (HH) y bajo grado de hidrólisis (LH). Se ha demostrado que el efecto del pH de extracción de las proteínas tuvo influencia en el grado de proteólisis alcanzado en los hidrolizados de bajo grado de hidrólisis, generándose secuencias polipeptídicas menores a mayor pH de extracción (mayor grado de desnaturización). Además, la hidrólisis con alcalasa condujo a un aumento en la solubilidad proteica de los hidrolizados de bajo grado de hidrólisis en la zona del punto isoeléctrico de las proteínas.

El tratamiento con alcalasa a bajo grado de hidrólisis afectó en mayor medida a A10 que a A8, evidenciándose cambios diferenciales en las características conformacionales a nivel de las estructuras secundaria (proporción de lámina β , α -hélices y giros β) y terciaria (exposición de triptófanos al medio). Sin embargo, en el tratamiento con alcalasa con alto grado de hidrólisis, no tuvo incidencia el pH inicial de extracción de las proteínas en los cambios fisicoquímicos y estructurales de ambos hidrolizados.

El proceso de hidrólisis con alcalasa dio lugar a una mejora en las propiedades antioxidantes tanto para captar radicales libres como para inhibir la etapa de iniciación de la oxidación. A partir del análisis cromatográfico de los hidrolizados, se demostró que moléculas con masas moleculares menores a 6,5 kDa fueron las responsables de incrementar la actividad. Del estudio estructural de la fracción cromatográfica de A10HH con mayor actividad antioxidante (medida por ORAC), se identificaron 13 secuencias trípticas provenientes de 4 proteínas de origen de *Vigna unguiculata* con masas moleculares entre 1100 y 2450 Da (de 9 a 21 aminoácidos). Éstas secuencias presentaron alineamiento con secuencias internas de péptidos antioxidantes (desde 2 a 7 residuos aminoacídicos compartidos) reportados en base de datos de péptidos bioactivos.

En segundo lugar, se realizó la DGIS estandarizada de harina y uno de los aislados proteicos, seleccionando A10 por la mayor desnaturización proteica durante la extracción que favoreció la acción hidrolítica de las enzimas. El grado de hidrólisis alcanzado luego de la digestión de la harina fue menor que en A10D lo que sugiere que, la presencia de otros componentes en la harina y/o la conformación de las proteínas de partida, tuvo un efecto sobre este parámetro.

La DGIS causó un incremento notable en la capacidad antioxidante medida por ORAC en HD y A10D. Sin embargo, A10D mostró una mayor actividad antioxidante en el ensayo ABTS en comparación con HD, mientras que HD presentó una mayor actividad en el ensayo FRAP que A10D. Se evalúo además la actividad antioxidante sobre cultivos de células intestinales Caco-2 TC7 a partir de las fracciones bioaccesibles, obteniéndose la inhibición del contenido de ROS en un 77% para ambos digeridos, mostrando A10D una mayor actividad a una concentración 3 veces menor, respecto de HD.

Del estudio estructural de las fracciones cromatográficas de A10D se demostró que moléculas con masas moleculares entre 0,68 y 2,5 kDa fueron las más activas como antioxidantes (método de ORAC). A diferencia de lo ocurrido con los hidrolizados de alcalasa, el estudio estructural de las dos fracciones con mayor actividad antioxidante identificadas, correspondieron a una mezcla de péptidos con un total de 24 y 84 péptidos trípticos con masas moleculares entre 1044 y 2438 Da (de 9 a 22 aminoácidos) y entre 976 y 3038 Da (9 y 28 aminoácidos), respectivamente. El 41% y el 44% de estos péptidos de las respectivas fracciones compartieron parcialmente secuencias internas con péptidos antioxidantes (desde dipéptidos hasta octapéptidos) reportados en base de datos de péptidos bioactivos.

La harina y el aislado proteico A10 fueron sometidas a diferentes protocolos de extracción de compuestos fenólicos. El tipo y cantidad de CF extraídos estuvo influenciado por los métodos de extracción donde se observó que ocurrieron pérdidas de algunos ácidos fenólicos y flavonoides solubles durante la preparación de A10 por solubilización, modificación química en el medio alcalino y/o absorción en la fracción insoluble. Después la DGIS, la harina de caupí incrementó la cantidad total de CF detectados con los distintos solventes usados en la extracción, principalmente ácido gálico, (-)-epigalocatequina y galactósido de quercentina en el sistema MA. Sin embargo, en A10 solo se observó modificaciones en el perfil de quercentina-3-glucósido en CFE y quercentina-3-galactósido en CFLP.

Se demostraron cambios en las actividades antioxidantes de los extractos de CF después de la DGIS dependientes de las condiciones de extracción. En general se observaron aumentos en las actividades ABTS y ORAC para los extractos MA, atribuibles a CF y a la solubilización de péptidos y aminoácidos antioxidantes generados por la acción de las enzimas digestivas. Para la extracción con mezcla MAA, principalmente se observó aumento en la actividad antioxidante para los extractos de CFE de HD y A10D.

Se evaluó la incorporación de harina de caupí e ingredientes proteicos derivados, A10 y A10LH, en formulaciones con pescado crudo y, por otro lado, la incorporación de A10 y

A10LH en dos proporciones (1 y 4%) en formulaciones con carne vacuna cocida, mantenidas en refrigeración.

En las formulaciones con pescado, si bien no hubo incrementos marcados en la oxidación medida por TBARs de las formulaciones control (debido al bajo contenido de lípidos) fue posible observar que la incorporación de A10 mantuvo los niveles de TBARs durante todo el almacenamiento. En cambio A10LH y la harina, mostraron incrementos significativos y valores de TBARs elevados desde el inicio del almacenamiento, respectivamente. Durante almacenamiento refrigerado, las formulaciones con A10 y A10LH fueron menos duras y no experimentaron marcados cambios en los parámetros de textura. Para las formulaciones con carne vacuna los niveles de oxidación de las muestras control aumentaron en el almacenamiento. El agregado de A10 y A10LH al 4%, mostró inhibición de la oxidación y cambios positivos en los parámetros de color y textura durante el periodo de almacenamiento. Se requieren futuros ensayos para optimizar el nivel de ingredientes de caupí a incorporar en relación a la calidad y estabilidad de las formulaciones y realizar análisis microbiológico para establecer el período de vida útil.

En este trabajo de tesis se han logrado generar nuevos conocimientos sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas antioxidantes de ingredientes derivados de caupí variedad Cuarentón: harina, aislados e hidrolizados proteicos, péptidos y compuestos fenólicos. Estos compuestos antioxidantes pueden limitar el daño oxidativo, tanto en alimentos preparados (usándolos como antioxidantes naturales), así como proteger de la oxidación a las células del organismo cuando son ingeridos en la dieta. Se espera que estos conocimientos puedan ser transferidos a efectos de ser incorporados como suplementos o ingredientes funcionales en productos alimentarios fabricados para fines específicos o bien su uso como potenciales componentes benéficos para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J.I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure, and functional properties. *Food Research International*, 46(1), 360–369.
- Adamson, N.J., & Reynolds, E.C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 202-207.
- Adjei-Fremah, S., Jackai, L. E., & Worku, M. (2015). Analysis of phenolic content and antioxidant properties of selected cowpea varieties tested in bovine peripheral blood. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 10(4), 235–245.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- Adler-Nissen, J., & Sejr Olsen, H. (1979). The Influence of Peptide Chain Length on Taste and Functional Properties of Enzymatically Modified Soy Protein. (A. E. Pour-El, Ed.), *In Functionality and Protein Structure*. American Chemical Society (2nd ed., pp. 125–146). Washington, DC: The Chemical Society.
- Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Reyes-Ramírez, H., Enríquez-Vara, J. N., & García-Morales, S. (2020). Bioactive compounds, antioxidant activity, and antinutritional content of legumes: A comparison between four Phaseolus species. *Molecules*, 25(15).
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334–341.
- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 328-334.
- Aluko, R. (2012). Functional foods and nutraceuticals (pp. 37–61). New York, NY: Springer Science+Business Media LLC.
- Ambigaipalan, P. & Shahidi F. (2015). Antioxidant potential of date (*Phoenix dactylifera* L.) seed protein hydrolysates and carnosine in food and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 63(3). 864-71.

- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49(5), 633–649.
- AOAC. (1990). *Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, INC.* (Eds 15 th.). Arlington, Virginia, USA.
- Argel, N. S. (2022). Diseño y desarrollo de productos cárnicos magros adicionados con fuentes vegetales de elevado valor nutricional. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Avanza, M.V., Acevedo, B.A., Chaves, M.G., Aphalo, P., & Añón, M.C. (2015). Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of nea-cowpea (*Vigna unguiculata L.*): a comparative study. *Int. J. Food Nutr. Sci.*, 4, 240-247.
- Avanza, M.V., Álvarez-Rivera, G., Cifuentes, A., Mendiola, J.A., & Ibáñez, E. (2021). Phytochemical and functional characterization of phenolic compounds from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) obtained by green extraction technologies. *Agronomy*, 11(1).
- Avanza, M., Acevedo, B., Chaves, M., & Añón, M. (2013). Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 148–157.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101.
- Bashir, K. M. I., Sohn, J. H., Kim, J. S., & Choi, J. S. (2020). Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (*Scomber japonicus*) muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 323.
- Baugreet, S., Kerry, J.P., Allen, P., & Hamill, R.M. (2017). Optimisation of protein-fortified beef patties targeted to the needs of older adults: a mixture design approach. *Meat science*, 134, 111-118.
- Baugreet, S., Kerry, J.P., Botinestean, C., Allen, P., & Hamill, R.M. (2016). Development of novel fortified beef patties with added functional protein ingredients for the elderly. *Meat Science*, 122, 40-47.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. In *Analytical Biochemistry*, 239.
- Bodin, A., Framboisier, X., Alonso, D., Marc, I., & Kapel, R. (2015). Size-exclusion HPLC as a sensitive and calibrationless method for complex peptide mixtures quantification. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1006, 71–79.

- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466–1472.
- Bourne, M. C. (1968). Texture profile of ripening pears. *J. Food Sci.*, 33, 223-226.
- Bressani, R., Elias, L. G., & Navarrete, D. A. (1961). Nutritive Value of Central American Beans. IV. The Essential Amino Acid Content of Samples of Black Beans, Red Beans, Rice Beans, and Cowpeas of Guatemala. *Journal of Food Science*. 26(5), 525–528.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014.
- Burrell, M. M. (1993). “Enzymes of molecular biology.” Totowa: Humana Press.
- Cai, R., Hettiarachchy, N. S., & Jalaluddin, M. (2003). High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1623–1627.
- Calderón de la Barca, A. M., Ruiz-Salazar, R. A., & Jara-Marini, M. E. (2000). Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Soy Protein to Improve its Amino Acid Composition and Functional Properties. *Journal of Food Science*, 65(2), 246–253.
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., & Richardson, R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 72(2), 303-311.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43(2), 911–921.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P., & Nucara, A. (2008). Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, 108(1), 361–368.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Cardamone, M., & Puri, N.K. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochemical Journal*, 282, 589–593.

- Carvalho, M., Gouvinhas, I., Castro, I., Matos, M., Rosa, E., Carnide, V., & Barros, A. (2021). Drought stress effect on polyphenolic content and antioxidant capacity of cowpea pods and seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(2), 197–207.
- Castañeda-Pérez, E., Jiménez-Morales, K., Quintal-Novelo, C., Moo-Puc, R., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2019). Enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L bean with in vitro antidiabetic potential. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16(8), 1773–1781.
- Chan, C., & Phillips, R. D. (1994). Amino Acid Composition and Subunit Constitution of Protein Fractions from Cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1857–1860.
- Chan, K. M., & Decker, E. A. (1994). Endogenous Skeletal Muscle Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 403–426.
- Chatterjee, A., & Mandal, D. K. (2003). Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648, 174–183.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1998). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49–53.
- Chen, N., Yang, G., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344–349.
- Cipollone, M. A., & Tironi, V. A. (2020). Yellow pea flour and protein isolate as sources of antioxidant peptides after simulated gastrointestinal digestion. *Legume Science*, 59, 1–10.
- Cipollone, M.A., Fontana, A., Fillería, S.G., & Tironi, V. A. (2024). Characterization, bioaccessibility and antioxidant activities of phenolic compounds recovered from Yellow pea (*Pisum sativum*) flour and protein isolate. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79(2), 401–409.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047–2053.
- Creusot, N., & Gruppen, H. (2007). Enzyme-induced aggregation and gelation of proteins. *Biotechnology Advances*, 25(6), 597–601.

- Cui, C., Zhao, M., Yuan, B., Zhang, Y., & Ren, J. (2013). Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 78(12), C1871–C1877.
- Dávalos, A., Dávalos, D., Miguel, M., Bartolomé, B., López, R., López-Fandiño, L., & Fandiño, F. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9).
- Dent, T., Campanella, O., & Maleky, F. (2023). Enzymatic hydrolysis of soy and chickpea protein with Alcalase and Flavourzyme and formation of hydrogen bond mediated insoluble aggregates. *Current Research in Food Science*, 6.
- Deshpande, S. S. (1992). Food legumes in human nutrition: A personal perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 333-363.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008. Córdoba, Argentina: FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W., & Lorenzo, J.M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8, 429.
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., & Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6300–6308.
- Drago, S. R., Franco-Miranda, H., Cian, R. E., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2016). Bioactive properties of *Phaseolus lunatus* (Lima Bean) and *Vigna unguiculata* (Cowpea) hydrolyzates incorporated into Pasta. Residual activity after pasta cooking. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(3), 339–345.
- Duke, J. A. (1981). Hanbook of legumes of world economic importance. Plenum Press. New York.
- Duranti, M., & Gius, C. (1997). Field Crops Research Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53.
- Ehlers, J. D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) walp.]. *Field Crops Research*, 1, 187–204.
- Elharadallou, S. B., Khalid, I. I., Gobouri, A. A., & Abdel-Hafez, S. H. (2015). Amino acid composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) flour and its protein isolates. *Food and Nutrition Sciences*, 6(9), 790–797.

- Erben-Russ, M., Bors, W., Saran, M., (1987). Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *International Journal of Radiation Biology*. 53, 393–412.
- Evangelho, J. A. D., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., Berrios, J. J. D., Dias, A. R. G., & Zavareze, E. D. R. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460–467.
- Fabian, H., & Mäntele, W. (2006). Infrared Spectroscopy of Proteins. En P. Griffiths, & J. M. Chalmers (Ed.). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 5: 3399-3425. John Wiley & Sons.
- Fernández Sosa, E.I., Chaves, M.G., Quiroga, A.V., & Avanza, M.V. (2021). Comparative study of structural and physicochemical properties of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) protein isolates and its major protein fractions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(1), 37-45.
- Ferreyra, S., Bottini, R., & Fontana, A. (2021). Tandem absorbance and fluorescence detection following liquid chromatography for the profiling of multiclass phenolic compounds in different winemaking products. *Food Chemistry*, 338.
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., & Oteiza, P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 435–445.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1682–1687.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E., & Szczesniak, A.S. (1963). The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food science*, 28(4), 390-396.
- G.G., Gardner, P.T., & Kyle, J.A., (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 62, 599–603.
- Garay, E.C.R., Caballero Mendoza, C., González, D., Dueck Toews, J., González Balbuena, J. M., Santacruz Oviedo, V. R., & Ruiz, F. (2015). Producción de variedades de poroto en dos localidades del Chaco Central. *Investigación Agraria*, 17(1), 18–26.
- García Fillería, S.F., & Tironi, V.A. (2017). Prevention of in vitro oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 34, 197–206.

- García, M.C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M.L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328-349.
- Gerrard, J.A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Food Science & Technology*, 13, 391–399.
- Ghribi, A.M., Amira, A.B., Gafsi, I.M., Lahiani, M., Bejar, M., Triki, M., Zouari, A., Attia, H., & Besbes, S. (2018). Toward the enhancement of sensory profile of sausage “Merguez” with chickpea protein concentrate. *Meat science*, 143, 74-80.
- Gonçalves, A., Goufo, P., Barros A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E.A., Ferreira, L., Rodrigues M. (2016). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2941-51.
- González-Osuna, M. F., Bernal-Mercado, A. T., Wong-Corral, F. J., Ezquerra-Brauer, J. M., Soto-Valdez, H., Castillo, A., Rodríguez-Figueroa, J. C., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2024). Bioactive Peptides and Protein Hydrolysates Used in Meat and Meat Products’ Preservation—A Review. *ACS Food Science and Technology*, 4(5), 1003-1016.
- Gopinathan, M.C., Babu, C.R., Chatterjee, S.R., & Abrol, Y.P. (1987). Nutritional potential of *Vigna minima* (Roxb.) Ohwi and Ohashi. *Plant Foods for Human Nutrition*, 36, 345–355 (1987).
- Gray, J.I., Gomaa, E.A., & Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, 111-123.
- Guerra, A. C. M., Murillo, W., & Mendez, A. J. J. (2017). Antioxidant potential use of bioactive peptides derived from mung bean hydrolysates (*Vigna radiata*). *African Journal of Food Science*, 11(3), 67–73.
- Gutiérrez-Uribe, J. A., Romo-Lopez, I., & Serna-Saldívar, S. O. (2011). Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 290–297.
- Hachibamba, T., Dykes, L., Awika, J., Minnaar, A., & Duodu, K. G. (2013). Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(12), 2638–2649.
- Hai, Y., Zhang, Y., Liang, Y., Ma, X., Qi, X., Xiao, J., Xue, W., Luo, Y., & Yue, T. (2020). Advance on the absorption, metabolism, and efficacy exertion of quercetin and its

- important derivatives: Absorption, metabolism and function of quercetin. *Food Frontiers*, 1(4), 420–434.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246, 2, 501-514.
- Hernandez-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo, L. (2005). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H., & Zhou, K. (2009). Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, 117(3), 438–443.
- Honaiser, T.C., Arcari, S.G., Fabiane, K.C., Rocha, M. de M., Fedrigo, I.M.T., & Arisi, A.C.M. (2023). Synergism and phenolic bioaccessibility during in vitro co-digestion of cooked cowpea with orange juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(8), 4476–4484.
- Horax, R., Hettiarachchy, N.S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004). Functional properties of protein Isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Food Science*, 69 ,119–121.
- Horax, R., Hettiarachchy, N.S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004). Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Journal of Food Science*, 69, 114-118.
- Humel, B.C. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 1393-1399.
- Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Guzmán, F., Alvarez, C.A., Zavaleta, A.I., Izaguirre, V., & Hernández-Ledesma, B. (2019). Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of *Erythrina edulis* (pajuro) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2420–2427.
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335.
- Islam, M. S., Hongxin, W., Admassu, H., Noman, A., Ma, C., & Anwei, F. (2021). Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Science and Nutrition*, 9(8), 4031–4047.

- Jayathilake, C., Visvanathan, R., Deen, A., Bangamuwage, R., Jayawardana, B.C., Nammi, S., & Liyanage, R. (2018). Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (13), 4793–4806.
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499–2574.
- Jover, P.L. (2003). Tecnología de producción y manejo poroto caupí. Información para extensión INTA-EEA Colonia Benítez, Chaco.
- Jover, P.L. (2006). Poroto caupí. Información para extensión INTA - EEA Colonia Benítez, Chaco.
- Kaja, S., Payne, A.J., Singh, T., Ghuman, J.K., Sieck, E.G., & City, K. (2016). An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 73, 1–6.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.
- Karami, Z., Peighambardoust, S.H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, 100450.
- Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., & Liceaga, A. (2018). Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. *Food Chemistry*, 254, 36–46.
- Kim, S.K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2, 1, 1–9.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 6, 620–650.
- Kohn, H.I., & Liversedge, M. (1944). On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *Journal of Pharmacology*, 82, 292–300.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 9, 945–960.
- Laemmli, U.K. (1970). Clavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 277(5259), 680–685.

- Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (S. S. B. Media., Ed.) (p. 335). New York: Springer Science Business Media
- Lakowicz, J.R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Science. Business Media.
- Lanzoni, D., Grassi Scalvini, F., Petrosillo, E., Nonnis, S., Tedeschi, G., Savoini, G., Buccioni, A., Invernizzi, G., Baldi, A., & Giromini, C. (2024). Antioxidant capacity and peptidomic analysis of in vitro digested *Camelina sativa* L. Crantz and *Cynara cardunculus* co-products. *Scientific Reports*, 14(1).
- León-López, L., Escobar-Zúñiga, Y., Salazar-Salas, N.Y., Rochín, S.M., Cuevas-Rodríguez, E.O., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2020). Improving polyphenolic compounds: Antioxidant activity in chickpea sprouts through elicitation with hydrogen peroxide. *Foods*, 9(12).
- Li, M., Bai, Q., Zhou, J., de Souza, T. S. P., & Suleria, H. A. R. (2022). In vitro gastrointestinal bioaccessibility, bioactivities and colonic fermentation of phenolic compounds in different *Vigna* beans. *Foods*, 11(23).
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118 (2), 403–410.
- Liu, X., Shi, J., Yi, J., Zhang, X., Ma, Q., & Cai, S. (2021). The effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion on phenolic bioaccessibility and bioactivities of Prinsepia utilis Royle fruits. *LWT*, 138.
- Liu, X., Shi, J., Yi, J., Zhang, X., Ma, Q., & Cai, S. (2021). The effect of in vitro simulated gastrointestinal digestion on phenolic bioaccessibility and bioactivities of Prinsepia utilis Royle fruits. *LWT*, 138.
- Liyanage, R., Perere, O.S., Weththasinghe, P., Jayawardana, B.C., Vidanaarach, J.K. & Sivakanesan, R. (2014). Nutritional properties and antioxidant content of commonly consumed cowpea cultivars in Sri Lanka. *Journal of Food Legumes*, 27(3), 215-217.
- Liyana-Pathirana, C.M., & Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1256–1264.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–267.

- Mannheim, A., & Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: Preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 1163–1169.
- Marchetti, L. (2014). Alternativas tecnológicas para el desarrollo de productos cárnicos emulsionados saludables. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Marechal, R., Mascherpa, J.M., & Stainier, F. (1978). Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (*Papilionaceae*) sur la base données morphologiques et polliniques, traitées pour l'analyse informatique. *Boissiera*, 28, 1-273.
- Marques, M.R., Soares Freitas, R.A.M., Corrêa Carlos, A.C., Siguemoto, É.S., Fontanari, G.G., & Arêas, J.A.G. (2015). Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. *Food Chemistry*, 168, 288–293.
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioproducts Processing*, 122, 41–54.
- Mateo, J., Caro, I., Kasiayan, S., Salvá, B.K., Carhuallanqui, A., & Ramos, D.D. (2021). Potential of Pulse Flours as Partial Meat Replacers in Heat-Treated Emulsion-Type Meat Sausages. *Frontiers in Animal Science*, 2, 693086.
- Mathew, S., Abraham, T.E., & Zakaria, Z.A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5790–5798.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581–587.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function.*, 5(6), 1113–1124.
- Mohammadi, M., Salami, M., Yarmand, M., Emam-Djomeh, Z. & McClements, D.L. (2022). Production and characterization of functional bakery goods enriched with bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of lentil protein. *Food Measure*, 16, 3402–3409.
- Mohan, V.R., & Janardhanan, K. (1993). Chemical and nutritional evaluation of raw seeds of the tribal pulses *Parkia roxburghii* G. Don. and *Entada phaseoloides* (L.) Merr. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44(1), 47–53.

- Mokni Ghribi, A., Ben Amira, A., Maklouf Gafsi, I., Lahiani, M., Bejar, M., Triki, M., Zouari, A., Attia, H., & Besbes, S. (2018). Toward the enhancement of sensory profile of sausage “Merguez” with chickpea protein concentrate. *Meat Science*, 143, 74–80.
- Morandi Vuolo, M., Silva Lima, S., & Maróstica Junior, M.R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 33–50.
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Galvin, K., Kerry, J.P., & Buckley, D.J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, 73-86.
- Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J.C. (2005). Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7600–7608.
- Muhamyankaka, V., Shoemaker, C. F., Nalwoga, M., & Zhang, X. M. (2013). Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. *International Food Research Journal*, 20(5), 2227–2240.
- Mune Mune, M.A., & Sogi, D.S. (2016). Emulsifying and Foaming Properties of Protein Concentrates Prepared from Cowpea and Bambara Bean Using Different Drying Methods. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 371–384.
- Mune Mune, M.A., Minka, S.R., & Mbome, I.L. (2014). Optimising functional properties during preparation of cowpea protein concentrate. *Food Chemistry*, 154, 32–37.
- Mwasaru, M.A., Muhammad, K., Bakar, J., & Che Man, Y.B. (1999). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates: I. Physicochemical properties. *Food Chem.*, 67, 435–443.
- Nassu, R.T., Dugan, M.E.R., He, M.L., McAllister, T.A., Aalhus, J.L., Aldai, N., & Kramer, J.K.G., (2011). The effects of feeding flaxseed to beef cows given forage based diets on fatty acids of longissimus thoracis muscle and backfat. *Meat Science*, 89, 469- 477.
- Ngoh, Y.Y., & Gan, C.Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331–337.
- Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006.
- Nwokolo, E., & Smartt, J. (1996). Food and Feed from Legumes and Oilseeds (1st ed.). Chapman & Hall.

- OECD Environment Directorate. (2018). Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of COWPEA (*Vigna unguiculata*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Other Constituents. *OECD Environment, Health and Safety Publications Series*, (30).
- Ojwang, L.O. (2012). Anti-inflammatory properties of cowpea phenotypes with different phenolic profiles a dissertation. Col-lege Station, TX: Texas A&M University.
- Ojwang, L.O., Dykes, L., & Awika, J.M. (2012). Ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry profiling of anthocyanins and flavonols in cowpea (*Vigna unguiculata*) of varying genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3735–3744.
- Orsini Delgado, M.C. (2015). Amaranto como ingrediente funcional: propiedades antioxidantes de proteínas y péptidos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Orsini Delgado, M.C., Galleano, M., Añón, M.C., & Tironi, V.A. (2015). Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1), 27–34.
- Orsini Delgado, M.C., Tironi, V.A., & Añón, M.C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT. Food Science and Technology*, 44(8), 1752–1760.
- Osborne, T. (1924). The Vegetable Proteins. Segunda edición. Longmans y Green, Nueva York.
- Oseguera-Toledo, M.E., Gonzalez de Mejia, E., & Amaya-Llano, S.L. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, 76, 839–851.
- Ou, B., Hampsch-woodill, M., & Prior, R.L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Prior, R.L., & Huang, D. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2772-2777.
- Özer, C.O., & Secen, S.M. (2018). Effects of quinoa flour on lipid and protein oxidation in raw and cooked beef burger during long term frozen storage. *Food Science and Technology*, 38, 221-227.

- Pasquet, R.S. (1993). Classification infraspecifique des formes spontanées de *Vigna unguiculata* (L.). *Bulletin du Jardin botanique National de Belgique*, 62, 127-173.
- Patton, S., & Kutz, G.W. (1951). 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*, 34, 669–674.
- Peyrano, F., Speroni, F., & Avanza, M.V. (2016). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 38–46.
- Peyrano, F., de Lamballerie, M., Avanza, M.V., & Speroni, F. (2017). Calorimetric Study of Cowpea Protein Isolates. *Food Biophysics*, 12(3), 1-9.
- Pouzo, L. B. (2015). Estrategias para mejorar el perfil de ácidos grasos en carne vacuna y su impacto sobre la estabilidad oxidativa. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Pratt, D. E. (1996). Antioxidants: Technical and regulatory considerations. Y.H. Hui (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products*, 3, 523–546. New York: John Wiley & Sons.
- Prinyawiwatkul, W., McWatters, K.H., Beuchat, L.R., & Phillips, R.D. (1996). Cowpea Flour: A Potential Ingredient in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(5), 413–436.
- Purohit, A.S., Reed, C., & Mohan, A. (2016). Development and evaluation of quail breakfast sausage. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 447-453.
- Qi, M., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *Journal of Food Science*, 62, 1110-1115.
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C., & Lawrence, J. (2009). Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology, OMICS International*, 1–33.
- Raharjo, S., & Sofos, J. N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*, 35, 145–169.
- Rangel, A., Domont, G.B., Pedrosa, C., & Ferreira, S.T. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5792 –5797.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R.D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 4(46), D624-D632.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rey, A.I., Hopia, A., Kivistö, R., & Kahkonen, M. (2005). Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubus chamaemorus*), beetroot (*Beta vulgaris* “*Vulgaris*”) or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 363–370.
- Robinson, R.G. (1983). Yield and composition of field bean and adzuki bean in response to irrigation, compost, and nitrogen. *Agronomy Journal*, 75, 31-35.
- Rodríguez, M. (2023). Evaluación de harina de amaranto como ingrediente antioxidante para la preparación de matrices alimentarias funcionales. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Rodríguez, M., & Tironi, V.A. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International*, 173.
- Rodríguez, M., Bianchi, F., Simonato, B., Rizzi, C., Fontana, A., & Tironi, V.A. (2023). Exploration of grape pomace peels and amaranth flours as functional ingredients in the elaboration of breads: phenolic composition, bioaccessibility, and antioxidant activity. *Food and Function*, 15(2), 608–624.
- Rodríguez, M., García Fillería, S. F., & Tironi, V. A. (2020). Simulated gastrointestinal digestion of amaranth flour and protein isolate: Comparison of methodologies and release of antioxidant peptides. *Food Research International*, 138.
- Santos, J. (2009). PROTEÍNAS Estructuras fascinantes (pp:126–132). Buenos Aires, Argentina: INET.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- Sato, K., & Hegarty, G. R. (1971). Warmed-over flavor in cooked meats. *Journal of Food Science*, 36, 1098.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22.
- Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H., & Raith, K. (2007) “Peptic digestion of β-casein: Time course and fate of possible bioactive peptides”. *Journal of Chromatography A*, 1166(1–2), 108–115.

- Sefa-Dedeh, S., & Yiadom-Farkye, N.A. (1988). Some functional characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata*), bambara beans (*Voandzeia subterranea*) and their products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21, 266–268.
- Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A., & Betancur-Ancona, D.A. (2011). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry*, 46(4), 864–872.
- Segura-Campos, M. R., Espinosa-García, L., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2012). Effect of enzymatic hydrolysis on solubility, hydrophobicity, and in vivo digestibility in cowpea (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Food Properties*, 15(4), 770–780.
- Segura-Campos, M., Ruiz-Ruiz, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2012). Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. *CYTA - Journal of Food*, 11(3), 208–215.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10–19.
- Silva, F. G. D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M., & Miralles, B. (2016). Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 140–146.
- Silveira Coelho, M., de Araujo Aquino, S., Machado Latorres, J., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. *Food Hydrocolloids*, 91, 19–25.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sombié, P. A. E. D., Compaoré, M., Coulibaly, A. Y., Ouédraogo, J. T., de La Salle Tignégré, J. B., & Kiendrébéogo, M. (2018). Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) genotypes from Burkina Faso. *Foods*, 7(9).
- Souza e Silva, S. M., Maia, J. M., de Araujo, Z. B., & Freire Filho, F. R. (2002). Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). EMBRAPA Meio-Norte, Comunicado Técnico, 149. ISSN 7646, Teresina, PI.
- Spellman, D., Kenny, P., O'Cuinn, G., & Fitzgerald, R. J. (2005). Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with *Bacillus licheniformis* proteinase activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1258–1265.

- Steffe, J. F. (1996). Introduction to rheology. In J. F. Steffe (Ed.). *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press. pp., 1-93.
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182(C), 50–68.
- Sun, W., & Xiong, Y. L. (2015). Stabilization of cooked cured beef color by radical-scavenging pea protein and its hydrolysate. *LWT*, 61(2), 352–358.
- Szczesniak, A.S. (1963). Classification of Textural Characteristicsa. *Journal of Food Science*, 28(4), 385-389.
- Tahmasebi, M., Labbafi, M., Emam-Djomeh, Z., & Yarmand, M.S. (2016). Manufacturing the novel sausages with reduced quantity of meat and fat: The product development, formulation optimization, emulsion stability and textural characterization. *LWT- Food Science and Technology*, 68, 76-84.
- Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. In *Trends in Food Science and Technology*, 97, 366–380.
- Timko, M.P., Singh, B. (2008). Cowpea, a Multifunctional Legume. In: Moore, P.H., Ming, R. (eds) *Genomics of Tropical Crop Plants. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 1. Springer, New York, NY.
- Tironi, V.A., & Añón, M.C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43(1), 315–322.
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M.D.M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194–202.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246.
- Tungmannithum, D., Drouet, S., Lorenzo, J.M., & Hano, C. (2021). Green extraction of antioxidant flavonoids from pigeon pea (*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.) seeds and its antioxidant potentials using ultrasound-assisted methodology. *Molecules*, 26(24).
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E.D., Testai, E., & Stammati, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human?. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 13–20.
- Utrera, M., Morcuende, D., & Estévez, M. (2014). Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties. *Meat science*, 96(3), 1250-1257.

- Utrera, M., Morcuende, D., Ganhão, R., & Estévez, M. (2015). Role of phenolics extracting from Rosa canina L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4), 854-864.
- Vaillancourt, R.E., & Weeden, N.F. (1992). Chloroplast DNA polymorphism suggests nigerian center of domestication for the cowpea, *Vigna unguiculata* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 79, 1194-1199.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., & Musílek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 90, 1, 1-37.
- Vasconcelos, I.M., Maia, F.M.M., Farias, D.F., Campello, C.C., Carvalho, A.F.U., De Azevedo Moreira, R., & de Oliveira, J.T.A. (2010). Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 54-60.
- Verdcourt, B. (1970). Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa. IV. Kew Bulletin 24: 507-569.
- Verma, A.K.; Rajkumar, V.; & Kumar, S. (2019). Effect of amaranth and quinoa seed flour on rheological and physicochemical properties of goat meat nuggets. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 5027-5035.
- Verma, M.M., Ledward, D.A., & Lawrie, R.A. (1984). Utilization of chickpea flour in sausages. *Meat Science*, 11(2), 109-121.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132–136.
- Wang, K., Li, G., & Zhang, B. (2018). Opposite results of emulsion stability evaluated by the TSI and the phase separation proportion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 558, 402–409.
- Wang, L.L., & Xiong, Y.L. (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9186–9192.
- Wang, M.L., Gillaspie, A.G., Morris, J.B., Pittman, R.N., Davis, J., & Pederson, G.A. (2008). Flavonoid content in different legume germplasm seeds quantified by HPLC. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 6(1), 62–69.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat science*, 86(1), 196-213.

- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. *Nutrients*, 12(5), 1401.
- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509–1518.
- Xiong, S., Yao, X., & Li, A. (2013). Antioxidant properties of peptide from cowpea seed. *International Journal of Food Properties*, 16(6), 1245–1256.
- Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, MR, Wang, X., Martínez, M., Anadón, A., & Martínez, M.A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chemistry*, 353, 129488
- Xu, B., & Chang, S.K.C. (2012). Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*, 134(3), 1287–1296.
- Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., & Almutaimi, A. (2019). Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 343–352.
- Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., & Almutaimi, A. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 343–352.
- Yang, X. R., Zhang, L., Ding, D. G., Chi, C. F., Wang, B., & Huo, J. C. (2019). Preparation, Identification, and Activity Evaluation of Eight Antioxidant Peptides from Protein Hydrolysate of Hairtail (*Trichiurus japonicas*) Muscle. *Marine Drugs*, 17(1), 1–18.
- Zeb A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), 13394.
- Zehfus, L.R., Gillespie, Z.E., Almendáriz-palacios, C., Low, N.H., & Eskiw, C.H. (2021). Haskap berry phenolic subclasses differentially impact cellular stress sensing in primary and immortalized dermal fibroblasts. *Cells*, 10(10).
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. In Current Opinion in Food Science (Vol. 8, pp. 33–42). Elsevier Ltd.

- Zhang, X., Huang, Y., Ma, R., Tang, Y., Li, Y., & Zhang, S. (2023). Structural properties and antioxidant activities of soybean protein hydrolysates produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell envelope proteinase. *Food Chemistry*, 410.
- Zhang, Y., Meenu, M., Yu, H., & Xu, B. (2020). An investigation on phenolic and antioxidant capacity of under-utilized food legumes consumed in China. *Foods*, 9(4), 438.
- Zhao, J., Xiong, Y. L., & Mcnear, D. H. (2013). Changes in structural characteristics of antioxidative soy protein hydrolysates resulting from scavenging of hydroxyl radicals. *Journal of Food Science*, 78(2), 152–159.
- Zhou, K., Canning, C., & Sun, S. (2013). Effects of rice protein hydrolysates prepared by microbial proteases and ultrafiltration on free radicals and meat lipid oxidation. *LWT*, 50(1), 331–335.
- Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., & De Feo, V. (2013). Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. *Molecules*, 18(2), 2005–2017.
- Zou, T., He, T., Li, H., Tang, H., & Xia, E. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 1–14.