



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

MAGISTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“ESTUDIO DE PROPIEDADES BIO-FUNCIONALES DE
PÉPTIDOS PROVENIENTES DE HEMOGLOBINA BOVINA Y
SU INCORPORACIÓN A PRODUCTOS EXTRUDIDOS”

Por:

RAÚL E. CIAN

Director: Dra. SILVINA R. DRAGO

Co-Director: Ing. ROLANDO J. GONZÁLEZ

2009

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen, por darme la Fe y la fuerza necesaria para poder sortear los obstáculos de la vida y así poder seguir adelante todos los días.

A mis Padres, por ser excelentes personas que decidieron darme la vida, brindándome amor, formándome como persona y educándome en el día a día. Gracias por apoyar siempre mis objetivos y darme la posibilidad de estudiar.

A mis hermanas, por ser incondicionales desde mis primeros pasos hasta hoy, brindándome amor y ayudándome a crecer personalmente.

A mis sobrinos, por ser la luz de mi vida, el motivo por el cual todo pasa a segundo plano.

A mis amigos del alma, aquellos que no se encuentran todos los días, por compartir momentos inolvidables, por ser mis hermanos y por sobre todo muy buenas personas.

A Silvina y Rolando, por darme siempre una oportunidad y la posibilidad de crecer como persona, enseñándome desde las cosas más simples hasta las más complejas. Por brindarme su tiempo y predisposición en todo momento para que yo pudiera seguir adelante con mis estudios.

A Adriana y a los chicos del ITA, por el compañerismo y la ayuda brindada en el día a día.

A la educación pública, y en especial a la Universidad Nacional del Litoral, por darme la posibilidad de formarme académicamente.

ÍNDICE

I - INTRODUCCIÓN	1
I-a HIDRÓLISIS	1
I-a.1 Aspectos generales	1
I-a.2 Enzimas	1
I-a.3 Clasificación de Enzimas	2
a) Origen	2
b) Acción catalítica	3
c) La naturaleza del sitio catalítico	4
I-a.4 Reacción enzimática	4
I-a.4.1 Características generales	4
I-a.4.2 Mecanismos de reacción involucrados	5
I-a.4.3 Parámetros de la reacción enzimática y métodos para su estimación	6
a) pH-stat	6
b) Osmometría	7
c) TCA	7
d) TNBS	7
e) OPA	7
I-a.4.4 Hidrolizados proteicos	8
I-a.4.4.1 Aspectos generales	8
I-a.4.4.2 Sustrato	8
a) Estructura	8
b) Fuente de Hemoglobina bovina	10
c) Utilización de la fuente proteica	11
I-b ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	12
I-b.1 Reacción de óxido-reducción	12
I-b.2 Radicales libres	12
1-b.2.1 Fuentes de radicales libres	13
a) Metabolismo	13
b) Reacciones Inflamatorias	14
c) Agentes Externos	14
1-b.2.2 Acción de los radicales libres y agentes oxidantes sobre las moléculas biológicas	14
I-b.3 Agentes Antioxidantes	15
I-b.4 Determinación de la Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	18

I-b.4.1 Eliminación de los radicales libres	18
a) Técnica que utiliza el radical catión ABTS ⁺	18
b) Técnica que utiliza el radical DPPH·	19
I-b.4.2 Otros principios	20
a) Técnica de Capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC)	20
b) Parámetro antioxidante de caza de radicales (TRAP)	20
c) Técnica de que mide las Sustancias Reactivas al Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	21
I-c DISPONIBILIDAD DE MINERALES	21
I-c.1 Hierro	21
I-c.1.1 Fuentes dietarias de hierro	21
a) Hierro hemínico	21
b) Hierro no hemínico	21
I-c.1.2 Funciones del hierro en el organismo	22
I-c.1.3 Deficiencia de hierro	22
I-c.2 Zinc	22
I-c.2.1 Funciones del zinc en el organismo	22
I-c.2.2 Deficiencia de zinc	23
I-c.2.3 Fuentes dietarias de zinc	23
I-d ALIMENTOS FUNCIONALES	23
I-d.1 Aspectos generales	23
I-d.2 Extrusión	25
a) Generalidades	25
b) Tipos de Extrusores	25
c) Factores que afectan al proceso de extrusión. Variables operativas y de diseño	25
d) Transformaciones del material durante la extrusión	26
II - OBJETIVOS	28
III - MATERIALES Y MÉTODOS	29
III-a Esquema de trabajo	29
III-b Materias primas	30
III-c Caracterización de las materias primas	30
III-d Elaboración de los hidrolizados	31
III-e Seguimiento de la reacción de hidrólisis	31
III-e.1 Determinación de GH. Medición de los grupos aminos libres	31
III-e.2 Índice de solubilidad en Ácido Tricloroacético (ITCA)	32
III-e.3 Técnica del pH-stat	32

III-f Inactivación y conservación de los hidrolizados	33
III-g Caracterización de los hidrolizados y estudio de propiedades biofuncionales	33
III-g.1 Evaluaciones fisicoquímicas	33
a) Calorimetría diferencial de barrido (DSC) del concentrado de hemoglobina y sus hidrolizados	33
b) Solubilidad	33
c) Contenido de grupos aminos libres en el extracto	34
d) Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL)	34
III-g.2 Determinación del contenido de hierro en los extractos a distintos pHs y en el hidrolizado total	34
III-g.3 Determinación del color de los extractos a distintos pHs y del hidrolizado total	34
III-g.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE – SDS)	35
III-g.5 Evaluación de propiedades bioactivas	35
III-g.5.1 Disponibilidad de minerales	35
a) Cálculo del pH del buffer PIPES	36
b) Determinación de minerales totales	37
III-g.5.2 Evaluación de actividad antioxidante	37
a) Determinación de la actividad antioxidante del CHB y de sus hidrolizados	38
b) Determinación de la concentración de CHB y de sus hidrolizados que produce una inhibición del 50% del radical (IC _{50%})	39
c) Determinación de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas a pHs: 4.5; 7.0 y 9.5	39
d) Determinación de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración	39
e) Determinación del contenido de aminoácidos aromáticos presentes en la fracción <5kDa obtenida por ultrafiltración	39
III-h Estudio de la incorporación de hidrolizados de CHB en alimentos	40
III-h.1 Elaboración de los productos extrudidos	40
III-h.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de productos extrudidos	40
III-h.2.1 Expansión del material extrudido	40
III-h.2.2 Volumen específico	41
III-h.2.3 Resistencia mecánica del producto	41
III-h.3 Evaluación de bioactividad de los productos expandidos	41
III-h.3.1 Estudio del efecto promotor de los hidrolizados del CHB en la disponibilidad de minerales de los productos expandidos	41
III-h.3.2 Determinación de la actividad antioxidante de los productos expandidos	41
IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

Capítulo 1. Caracterización de los hidrolizados del CHB	43
IV.1.a Caracterización de las materias primas	43
IV.1.b Seguimiento de la reacción de hidrólisis	45
IV.1.b.1 Determinación del Grado de Hidrólisis (GH)	45
IV.1.b.2 Determinación del ITCA	47
IV.1.b.3 Relación entre los indicadores de hidrólisis	49
IV.1.b.4 Electroforesis SDS-PAGE de las reacciones de hidrólisis	49
IV.1.c Caracterización de los hidrolizados	52
IV.1.c.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	52
IV.1.c.2 Solubilidad	54
IV.1.c.3 Evaluación de los extractos obtenidos a distintos pHs a partir de los hidrolizados y del sustrato	56
a) Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL)	56
b) Determinación del contenido de hierro en los extractos obtenidos a distintos pHs	57
c) Relación hierro / proteína soluble de los extractos obtenidos a distintos pHs	58
d) Determinación del color de los extractos a distintos pHs y del hidrolizado total	60
e) Mecanismos de hidrólisis	65
IV.1.d Conclusiones parciales	66
Capítulo 2. Evaluación de propiedades bioactivas de hidrolizados de CHB	69
IV.2.a Evaluación de actividad antioxidante (AO)	69
IV.2.a.1 Cinética de la actividad antioxidante del CHB y sus hidrolizados	69
IV.2.a.2 Influencia de la concentración proteica sobre la actividad antioxidante	72
IV.2.a.3 Relación entre el tamaño molecular de las especies proteicas y la actividad antioxidante	74
IV.2.b Evaluación de la disponibilidad del Fe y del Zn del CHB y sus hidrolizados ..	78
IV.2.b.1 Dializabilidad de Fe (DFe%)	78
IV.2.b.2 Dializabilidad de Zn (DZn%).....	80
IV.2.b.3 Relación Fe – Zn	81
IV.2.c Conclusiones parciales	81
Capítulo 3. Estudio de la incorporación de hidrolizados de CHB en alimentos extrudidos	85
IV.3.a Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los expandidos de maíz elaborados con el agregado de de hidrolizados de CHB	85
IV.3.b Evaluación de la actividad antioxidante de los expandidos de maíz elaborados con el agregado de de hidrolizados de CHB	86
IV.3.c Estudio del efecto promotor de los hidrolizados de CHB en la disponibilidad de minerales	87

IV.3.c.1 Dializabilidad del Fe.....	87
IV.3.c.2 Dializabilidad del Zn	88
IV.3.d Conclusiones parciales	89
V - CONCLUSIONES GENERALES	91
VI – BIBLIOGRAFÍA	94

ABSTRACT

The objective of this thesis was to obtain and to evaluate selected biofunctional properties of hydrolysed bovine hemoglobin concentrate and also to incorporate such hydrolysates to extruded products, evaluating their bioactivity after extrusion.

Four Hydrolysates were obtained using bovine hemoglobin concentrate (BHC) as substrate and the following enzymes: Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC) and Flavourzyme (F). Two Hydrolysates were obtained in a simple way, during 2 hours reaction time (P and FC) and the other two in a sequential way during 6 hours reaction time (P+F and FC+F).

The degree of hydrolysis (DH) was determined using different methods (free amino acids content by OPA, etc.). Then, Hydrolysates were characterized by physicochemical evaluations (solubility, etc), iron content, color, etc. Bioactive properties (iron and zinc availability, and antioxidant activity) were also evaluated.

Extrudates were obtained using maize grits and its mixture with BHC and its Hydrolysates. Extrusion was carried out with a 20 DN Brabender extruder in the following conditions: a 4:1 compression ratio screw, 160 rpm, 15% grits moisture, 175°C barrel temperature and 160 °C die temperature. Bioactive properties and physicochemical properties of extrudates (expansion, specific volume and mechanical resistance) were evaluated.

Results shown, that sequential way increased DH in comparison to “one enzyme only”. Besides that, hydrolysis increased solubility at isoelectric point region in comparison to BHC. As pH of extraction decreased, extracted iron also decreased. However, at pH 4,5, the use of P enzyme allows to concentrate iron in comparison to the substrate and others Hydrolysates. Color of different extracts was between red and yellow (with different tone) and depended on iron content of each extract. As pH decreased samples colours tended from brown to yellow.

Antioxidant activity (AA) of Hydrolysates was almost three times higher than that of substrate and the highest values corresponded to the sequential way. Such activity was dependent on protein concentration of samples (at higher concentration higher activity), being FC+F hydrolysate the most active (lowest value of IC₅₀). On the other hand, most active components (or responsible of a high AA) were those of low molecular weight (<5kDa).

A direct correlation was obtained between DH and iron dializability (FeD(%)), the highest value corresponded to P+F hydrolysate. Regarding Zn dializability, an increase of it was produced by proteolysis, being the highest value that of FC+F hydrolysate.

The addition of BHC or its Hydrolysates to extruded products did not modify their physical properties in comparison to maize extrudate, but increased the AA and mineral iron dializability. The highest values of AA and FeD(%) corresponded to sample containing FC+F hydrolysate. Regarding ZnD(%) values, it can be said that maize grits sample had the lowest value.

In conclusion, the use of protease in a sequential way was a good approach to increase and optimize antioxidant activity of BHC and dializability of Fe and Zn. Besides that, extrusion process is a good alternative to obtain products with biofunctional properties, being FC+F hydrolysate the one showing the highest AA and FeD(%)

RESUMEN

El objetivo general de la presente tesis fue obtener y evaluar propiedades biofuncionales selectas en hidrolizados de concentrado de hemoglobina bovina y posteriormente incorporar dichos hidrolizados a productos extrudidos y evaluar su bioactividad post-extrusión.

Para ello se elaboraron cuatro hidrolizados utilizando como sustrato el concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y las enzimas: Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC) y Flavourzyme (F). Dos hidrolizados se obtuvieron en forma simple durante dos horas de reacción (P y FC), y los otros dos restantes en forma secuencial durante seis horas de reacción (P+F y FC+F).

El grado de hidrólisis (GH) se determinó a través de distintos métodos (aminos libres por OPA, etc). Posteriormente los hidrolizados fueron caracterizados mediante evaluaciones fisicoquímicas (solubilidad, etc), contenido de hierro, color, etc. Luego se evaluaron las propiedades bioactivas de los mismos (disponibilidad de Fe y Zn; y actividad antioxidante)

Los expandidos se elaboraron a base de sémola de maíz a la que se le agregó el CHB o sus hidrolizados en un nivel de 0.5%. Para ello se utilizó un extrusor Brabender 20 DN con tornillo relación de compresión 4:1, 160 rpm, 15% de humedad, 175°C en el cañón y 160°C en la boquilla. A los expandidos obtenidos se les evaluaron las propiedades fisicoquímicas (expansión, volumen específico y resistencia mecánica del producto), y las propiedades bioactivas (anteriormente mencionadas).

Los resultados obtenidos mostraron que el sistema secuencial aumentó el GH en relación al uso de “sólo una enzima”. Además la hidrólisis incrementó la solubilidad de los hidrolizados en la región del punto isoeléctrico respecto del CHB. A medida que el pH de extracción disminuyó, también lo hizo la proporción de hierro extraído. Sin embargo, a pH 4.5, el uso de la enzima P permitió concentrar el hierro respecto del sustrato y los demás hidrolizados. El color de los diferentes extractos estuvo comprendido entre el rojo y el amarillo (en sus distintas tonalidades), y dependió del contenido de Fe de cada extracto. Conforme el pH descendió el color de las muestras tendió de marrón a amarillo.

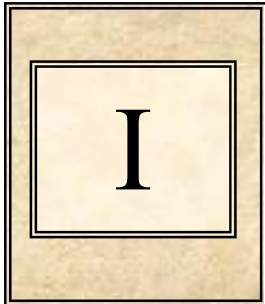
La actividad antioxidante (AO) de los hidrolizados fue casi tres veces superior a la del sustrato, correspondiendo los mayores valores a los sistemas secuenciales. Dicha actividad fue dependiente de la concentración proteica de las muestras (a mayor concentración,

mayor actividad), siendo el hidrolizado FC+F el más potente (menor valor de IC_{50}). Por otro lado las especies más activas o responsables de una elevada AO fueron las de bajo Peso Molecular (<5kDa).

Se obtuvo una correlación directa entre el GH de los hidrolizados y el valor de dializabilidad de Fe (DFe(%)), correspondiendo el mayor valor de dializabilidad al hidrolizado P+F. Para el Zn, se observó que la proteólisis produjo un aumento de dializabilidad, correspondiendo el mayor valor al hidrolizado FC+F.

El agregado del CHB o sus hidrolizados a los productos extrudidos no modificó las propiedades físicas de los expandidos respecto del control (Maíz), pero si incremento la AO y disponibilidad de minerales. Correspondiendo la mayor AO y DFe(%) al expandido con agregado del hidrolizado FC+F. Con respecto a la DZn(%), los valores correspondientes a los expandidos con agregado del CHB y de los distintos hidrolizados fueron significativamente superiores al del maíz.

Por lo tanto se pudo concluir que el empleo secuencial de proteasas fue una buena estrategia para incrementar y optimizar la potencia antioxidante del CHB, y la disponibilidad de Fe y Zn. Además el proceso de extrusión resultó ser una buena alternativa para obtener un producto con propiedades bio-funcionales, siendo el hidrolizado FC+F el que una vez incorporado a la matriz alimentaria exhibió la mayor actividad antioxidante y disponibilidad de hierro.



I - INTRODUCCIÓN

I-a HIDRÓLISIS

I-a.1 Aspectos generales: El interés en el aprovechamiento de subproductos agroindustriales ricos en proteínas ha conducido a desarrollar procesos de obtención de concentrados y aislados proteicos y al estudio de la mejora de las propiedades funcionales de las mismas (Vioque et al, 2001). Una de las alternativas para modificar las proteínas presentes en estos productos es la **hidrólisis**, la cual puede ser llevada a cabo tanto por métodos químicos (ácidos o alcalinos) y físicos, como por métodos enzimáticos. Sin embargo, la hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- **Selectividad:** las enzimas son específicas para un determinado tipo de enlace y por lo tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación (Guadix et al, 2000).

- **Condiciones moderadas de temperatura y pH:** que permiten mantener el valor nutritivo, dado que no se produce degradación de los productos de hidrólisis, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptofano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

- **Alta actividad catalítica:** implica menor energía de proceso.

Además, las enzimas son usualmente inactivadas después de su uso por el subsecuente proceso, haciendo innecesaria su remoción (Löffler, 1986).

Los hidrolizados proteicos se pueden utilizar como un ingrediente alimenticio básico, ya sea por sus propiedades funcionales, fácil digestibilidad, elevada solubilidad en agua, resistencia a agentes desnaturalizantes, elevado contenido proteico y gran potencial como saborizante. Por lo tanto, los métodos enzimáticos son una herramienta muy importante para modificar las proteínas, obtener hidrolizados y aprovechar sus propiedades (Aubes-Dufau et al, 1995).

I-a.2 Enzimas:

Las enzimas son proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos (catalizadores biológicos), disminuyendo el nivel de **energía de activación** propia de la reacción. Estas no reaccionan químicamente con el sustrato, ni alteran el equilibrio de la reacción. Solamente aumentan la velocidad con que ésta se produce (**Figura I.1**).

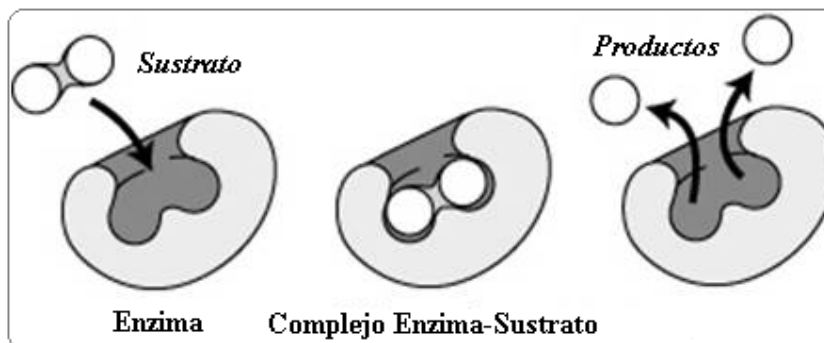


Figura I.1 – Esquema de catálisis llevada a cabo por una enzima. La enzima no reacciona químicamente con el sustrato, permaneciendo inalterada luego de la reacción (Guadix et al, 2000).

I-a.3 Clasificación de Enzimas:

Las enzimas proteolíticas, también llamadas proteasas, son *enzimas degradativas* que catalizan la hidrólisis de proteínas. Constituyen uno de los grupos funcionales más extensos de proteínas, con más de 560 miembros descritos (Barret et al, 1998; Supuran et al, 2002).

Debido a que las proteasas muestran una gran diversidad de mecanismos de acción y estructuras, es difícil establecer una clasificación general. Por ello, se ha propuesto describirlas según:

a) Origen:

- **Animal:** Estas enzimas son relativamente caras y su disponibilidad depende usualmente del comercio de estos animales (Löffler, 1986).

- **Vegetal:** La mayoría de las proteasas de *origen vegetal*, tales como papaína, son fáciles de extraer, pero su abastecimiento está también gobernado por la demanda de del vegetal (Löffler, 1986).

- **Microbiano:** Estas se pueden subclasificar en *bacterianas* o *fúngicas*. Las primeras son muy diversas y abundantes. Siendo las más conocidas y estudiadas las sintetizadas por las diferentes especies del género *Bacillus*. Las segundas son capaces de actuar en un amplio rango de valores de pH (4.0 a 11.0), y sobre una gran diversidad de sustratos. Sin embargo, son menos termo-resistentes que las de origen bacteriano (Rawlings & Barret, 1993).

Si bien las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimenticia fueron proteasas pancreáticas de origen animal, con el transcurso del tiempo adquirieron mayor importancia las de origen microbiano (bacteriano o fúngico) (Guadix et al, 2000). En la

siguiente tabla se detallan las principales razones por las cuales se comenzó a utilizar este tipo de enzimas (**Tabla I.1**):

Tabla I.1 – Principales ventajas de las enzimas microbianas (Löffler, 1986).

Características	Consecuencias
Producción acelerada	Permite ajustar la escala de producción con las demandas del mercado
Fácil manipulación genética	Producción de enzimas recombinantes
Elevada variabilidad metabólica	Incremento en los niveles de producción

b) Acción catalítica:

De acuerdo con la “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992), las proteasas pertenecen al **grupo 3 (hidrolasas)** y dentro de éste al **subgrupo 4 (peptidasas)**. Según este criterio, las mismas se clasifican en:

- **Exopeptidasas:** cuando hidrolizan un enlace peptídico no sustituido próximo al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, denominándose **aminopeptidasas** o **carboxipeptidasas**, respectivamente.

- **Endopeptidasas:** cuando hidrolizan las cadenas peptídicas en regiones internas alejadas de los extremos amino o carboxi terminal (**Figura I.2**) (Guadix et al, 2000).

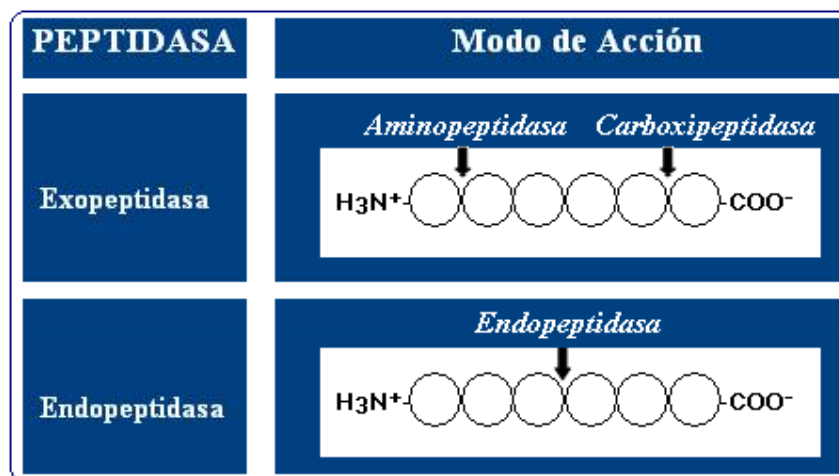


Figura I.2 – Descripción de los diferentes tipos de peptidasas (Enzyme Nomenclature List of International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992).

c) La naturaleza del sitio catalítico:

- **Serino proteasas:** se caracterizan por la presencia de residuos de serina en su sitio activo. El mecanismo catalítico de estas enzimas requiere, además del residuo de serina, otros residuos como histidina, aspártico o lisina para su acción (Supuran et al, 2002). Generalmente, son activas tanto a valores de pH neutros como alcalinos, pero exhiben su máxima actividad en esta última condición.

- **Metaloproteasas:** se caracterizan porque requieren de un ión divalente esencial para actuar. El cinc (Zn^{2+}) es el metal más frecuente, aunque también se ha descrito la presencia de cobalto (Co^{2+}) o manganeso (Mn^{2+}) (Barret et al, 1998). Presentan su mayor actividad a pH neutro y son inhibidas por quelantes de metales, tales como el etilendiaminotetracético (EDTA), además son inactivadas mediante diálisis (Supuran et al, 2002).

- **Cisteíno proteasas:** se distinguen por poseer en su sitio activo un grupo sulfhidrilo en lugar de un grupo hidroxilo. Son activas generalmente a pH neutro y no son sensibles a la acción de agentes quelantes.

- **Aspártico proteasas:** poseen un grupo carboxílico (Aspártico), en su sitio catalítico. Son también conocidas como proteasas ácidas ya que presentan actividad en un rango de pH de 2.0 a 6.0 (Belitz & Grosch, 1997).

I-a.4 Reacción enzimática:

I-a.4.1 Características generales:

La proteólisis es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie:

PROTEINAS → *proteosas* → *peptonas* → *péptidos* → *AMINOACIDOS*

Cada una de estas especies intermedias se diferencia básicamente de las otras en su solubilidad, la cual se corresponde aproximadamente con los tamaños moleculares medios y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN) (Knighst, 1985).

La enzima actúa sobre el enlace peptídico hidrolizándolo, liberando así el grupo amino y el grupo carboxilo (**Figura I.3**). En este tipo de reacciones, el equilibrio se desplaza hacia la derecha, por lo tanto se favorece termodinámicamente la degradación y no la síntesis ($\Delta G < 0$). La dirección hacia la hidrólisis puede ser atribuida al aumento de la

energía libre proveniente de la ionización de los grupos carboxilos y aminos. Esta ionización puede ser total o parcial dependiendo del pH del proceso de hidrólisis.

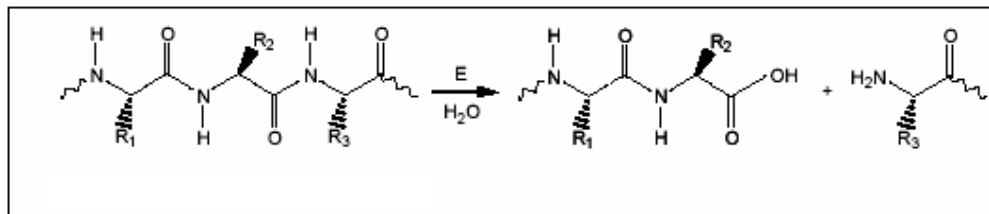


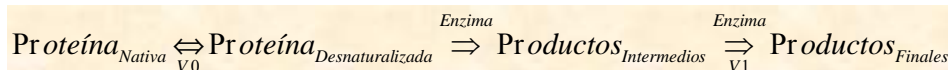
Figura I.3 – Esquema de la reacción enzimática catalizada por una proteasa. **R₁**, **R₂** y **R₃** son los grupos de aminoácidos laterales. **E**, es la enzima.

Si dicha ionización se suprime, puede ocurrir la síntesis de enlaces peptídicos, aún en presencia de un exceso de agua (Adler-Nissen, 1986). Los péptidos recientemente formados también pueden ser sustratos de la enzima (Adler-Nissen, 1993).

Por otro lado, la reacción de hidrólisis estará determinada por las condiciones de proceso usadas, es decir, la concentración de sustrato, la naturaleza de la enzima, la relación Enzima/Sustrato, el tiempo de reacción y condiciones físico-químicas como el pH y la temperatura. Además de la naturaleza de la enzima, también influyen la actividad específica y el tipo de actividad (Teichgraber et al, 1983; Poutanen, 1997).

I-a.4.2 Mecanismos de reacción involucrados:

Basándose en el modelo desarrollado por Linderstrom-Lang (Adler-Nissen, 1986) para reacciones de hidrólisis de proteínas globulares, se describen dos posibles mecanismos de reacción: **one by one** (uno a uno) y **zipper** (cremallera). Estos se definen en función de dos velocidades de reacción (**V₀** y **V₁**). La primera se corresponde a la reacción de conversión entre la proteína nativa y la misma desnaturalizada (**V₀**), mientras que la segunda se corresponde a la reacción de hidrólisis del producto intermedio para dar los productos de hidrólisis finales (**V₁**), como se describe a continuación:



El mecanismo **one by one** se da cuando la reacción reversible es la determinante de la velocidad (paso más lento), es decir **V₀ <<< V₁**. Por lo tanto, no es posible identificar cantidades apreciables de productos intermedios, ya que las moléculas se hidrolizan una por una para dar productos. En este caso la mezcla de reacción estará constituida por proteínas nativas y productos finales.

Por el contrario, si el paso de desnaturalización es muy rápido y la hidrólisis del producto intermedio es lenta ($V_1 \lll V_0$), las moléculas de proteína nativa son rápidamente convertidas en el producto intermediario, el cual es lentamente degradado a productos finales. La estructura proteica del sustrato se desestabiliza y deja más enlaces peptídicos expuestos, dando lugar a varios productos intermedios, por lo que la mezcla de reacción estará compuesta por productos intermedios y finales. Este mecanismo se denomina *zipper*. Por lo general, en la hidrólisis de la mayoría de las proteínas están involucrados mecanismos intermedios entre estos dos.

I-a.4.3 Parámetros de la reacción enzimática y métodos para su estimación:

Las características del hidrolizado serán determinadas por el uso que se le quiere dar a éste. Así, el grado y tipo de hidrólisis determinará el resto de las propiedades del hidrolizado (Vioque et al, 2001). Por tal motivo, el parámetro más importante en la hidrólisis enzimática de proteínas es el *Grado de hidrólisis (GH)*. Este se define como el porcentaje de uniones peptídicas escindidas:

$$GH = (h/h_t) \times 100\%$$

Donde:

- h_t , es el número total de uniones peptídicas por proteína y depende de la composición aminoacídica de la proteína.
- h , es el número de uniones peptídicas hidrolizadas.

Entre los métodos utilizados para monitorear el **GH** durante la reacción, se pueden destacar:

a) pH-stat:

La técnica de pH-stat (Jacobsen et al, 1957), permite seguir el GH mediante el agregado de base necesario para mantener el pH constante durante la reacción. La cantidad de base agregada es proporcional al GH. Es un método rápido, sencillo, no desnaturalizante y por sobre todo permite monitorear la proteólisis en tiempo real. Sin embargo, la exactitud de los valores del GH depende de la actividad de la enzima usada durante la reacción. Por ejemplo, cuando se utiliza una enzima con actividad *exopeptidasa* el método del pH-stat subestima el GH real (Spellman et al, 2002). Además, esta técnica se limita al seguimiento de reacciones de hidrólisis donde las condiciones de pH son superiores a la neutralidad (Adler-Nissen, 1986).

b) Osmometría:

Durante la reacción de hidrólisis, la depresión del punto de congelamiento de las mezclas se traduce en un cambio de osmolalidad, el cual se puede medir usando un osmómetro. Posteriormente, esta medida se correlaciona con el GH. Es un método rápido y con amplio rango de aplicación. Sin embargo, posee algunas limitaciones, no pudiendo utilizarse para soluciones muy viscosas o con elevada concentración de solutos. Además, la presencia de compuestos no proteicos puede afectar la correlación de ambos parámetros (osmolalidad – GH) (Nielsen et al, 2001).

c) TCA:

El nitrógeno liberado durante la reacción de hidrólisis es solubilizado en un agente precipitante, el ácido tricloroacético (**TCA**). Como resultado se obtiene la precipitación y/o remoción de las proteínas no modificadas, los polipéptidos largos y la enzima. Posteriormente el nitrógeno solubilizado se cuantifica utilizando Kjeldahl (AOAC, 1995), o bien alguna reacción colorimétrica, por ejemplo Biuret o Lowry (Spellman et al, 2002). El resultado neto de la digestión y el análisis muestran una progresión en la conversión de proteínas insolubles en TCA, a péptidos solubles y aminoácidos (Gunther, 1979; Lahl & Braun, 1994). Dicho método ha sido ampliamente utilizado en numerosos trabajos (Bernardi et al, 1991; Mannheim & Cheryan, 1992; Margot et al, 1994; Hoyle & Merritt, 1994; Bombara et al, 1994).

d) TNBS:

Este método se basa en la reacción de los grupos aminos primarios con el ácido trinitro-bencen-sulfónico (**TNBS**). La reacción tiene lugar bajo condiciones ligeramente alcalinas y se finaliza mediante la acidificación del medio (Adler-Nissen, 1979). Dicho método posee la desventaja de ser muy laborioso, requerir largos períodos de incubación y enfriamiento (Spellman et al, 2002). Por lo tanto, no es posible seguir la reacción en tiempo real. Además, dicho reactivo es inestable, tóxico y debe ser manipulado cuidadosamente ya que es explosivo (Nielsen, 2001).

e) OPA:

El **o-oftaldehído (OPA)**, reacciona con los grupos aminos primarios de los aminoácidos en presencia de un compuesto reductor (ditiotreitól, **DTT**). Como producto de reacción se genera un compuesto coloreado detectable a una longitud de onda de 340 nm. Esta medida de absorbancia permite cuantificar los grupos aminos libres generados durante

la hidrólisis y calcular el GH (Nielsen, 2001). Es un método rápido y simple. No requiere grandes etapas de incubación ya que los resultados se obtienen tan sólo a los 2 minutos de haber tomado la muestra. De esta manera, es posible medir el GH en el tiempo real. Sin embargo, la exactitud de los valores de GH obtenidos por dicho método puede depender del tipo de sustrato proteico utilizado para la hidrólisis (Spellman et al, 2002). Por último, el reactivo OPA es más estable y menos tóxico que el TNBS (Nielsen, 2001).

I-a.4.4 Hidrolizados proteicos:

I-a.4.4.1 Aspectos generales: Numerosos procesos industriales involucran la *modificación enzimática de proteínas*, siendo la producción de alimentos uno de ellos (Adler-Nissen, 1986).

La elección del sustrato, la proteasa empleada, y el grado al cual la proteína es hidrolizada afecta las *propiedades fisicoquímicas* del hidrolizado resultante (Spellman et al, 2002).

Asimismo, distintas enzimas pueden ocasionar efectos diferentes sobre las propiedades del sustrato (Gunther, 1979). En general, actúan alterando la solubilidad, disminuyendo la capacidad de formar geles y la viscosidad en solución, mejorando las propiedades de emulsificación y espumado, aunque disminuyendo la estabilidad de emulsiones y espumas (Kabirullah & Wills, 1981; Puski, 1975).

Normalmente la elección de la fuente proteica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que tendrá el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida (Guadix et al, 2000).

I-a.4.4.2 Sustrato: En el presente trabajo se escogió la *hemoglobina bovina* como sustrato, cuyas características se detallan a continuación.

a) Estructura: La hemoglobina bovina es una proteína globular conjugada cuyo grupo prostético es el hemo (Ericsson, 1983). El hemo es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro. El tipo de porfirina de la hemoglobina es la **protoporfirina IX**. La misma posee dos grupos ácidos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos de la estructura de la porfirina. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (2+), y puede formar cinco o seis enlaces de coordinación dependiendo de la unión del O₂ (u otro ligando), a la hemoglobina. Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal (anillos A, B, C y D). El quinto enlace de

coordinación se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina, denominada histidina proximal. El sexto enlace del átomo de Fe^{2+} es con el oxígeno, que además está unido a un segundo imidazol de una histidina, denominada histidina distal. Tanto el quinto como el sexto enlace se encuentran en un plano perpendicular al plano del anillo de porfirina (Pañuela, 2005) (**Figura I.4**).

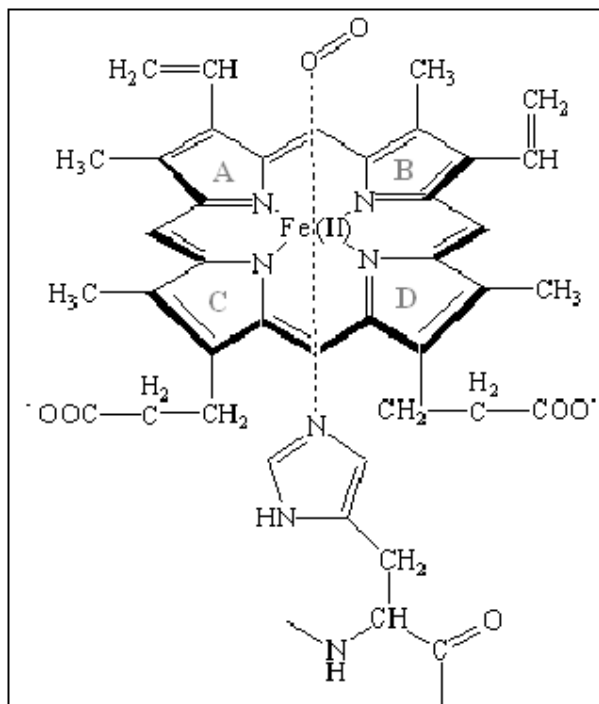


Figura I.4 – Estructura del grupo hemo presente en la molécula de hemoglobina como grupo prostético. Los anillos pirrólicos están denotados con las letras A, B C, y D, respectivamente. Además se muestran los dos grupos ácidos propiónicos, los dos vinilos y los cuatro metilos, como cadenas laterales unidas a los anillos pirrólicos. También es posible visualizar el nitrógeno del residuo de histidina (anillo imidazólico), de la cadena proteica. En el centro de la protoporfirina IX, se observa el átomo de hierro con estado de oxidación 2+ (Pañuela, 2005).

Cada molécula de hemoglobina consta de cuatro cadenas de aminoácidos (denominadas *globinas*), unidas de manera no covalente (Ericsson, 1983). Las cadenas polipeptídicas α contienen 141 aminoácidos, mientras que las cadenas β y γ poseen 146 aminoácidos, y difieren en la secuencia aminoacídica (Pañuela, 2005). La parte porfirínica del hemo se sitúa dentro de una saco hidrofóbico que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas (**Figura I.5**). Las estructuras obtenidas por difracción de rayos X muestran que en el saco hidrofóbico existen unas 80 interacciones entre 18 aminoácidos y el hemo.

La mayoría de estas interacciones no covalentes se presentan entre cadenas apolares de aminoácidos y las regiones no polares de la porfirina (Pañuela, 2005).

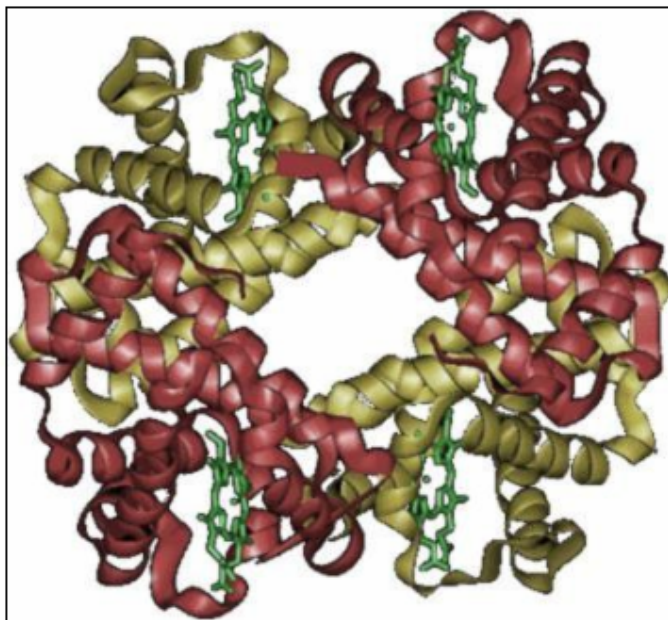


Figura I.5 – Estructura de la molécula de hemoglobina. El grupo hemo (en verde) se encuentra unido a las cadenas proteicas (en rojo y amarillo), en una zona altamente hidrofóbica de la proteína globular (saco hidrofóbico) (Pañuela, 2005).

b) Fuente de Hemoglobina bovina: La sangre animal posee aproximadamente un 18% de proteínas y la hemoglobina constituye más de la mitad de dicha fracción proteica (Liu et al, 1996). Además, contiene: 80.9% de agua, 0.23% de grasas, 0.07% de carbohidratos y 0.62% de minerales (Alencar, 1983). La composición de la sangre es similar a la de la carne, excepto en el contenido de Fe (36.3mg/100g de sangre), el cual es 10 veces la concentración en carne (Wismer-Pedersen, 1979; Alencar, 1983).

La sangre se puede fraccionar en plasma (65-70%) y hematíes (35-40%) (Halliday, 1973). Para este fraccionamiento se usa normalmente un anticoagulante que actúa complejando el calcio (Gunstone, 1980). Entre los diferentes anticoagulantes, el citrato de sodio en una concentración de 0.3% a 0.5% parece ser el más adecuado (Halliday, 1973, 1975). Para el consumo humano es importante que la recolección de la sangre se realice con el máximo cuidado, para que los niveles microbianos sean tan bajos como fuera posible (Duarte et al, 1999). Otra consideración importante, es evitar la coagulación y la hemólisis, dependiendo si se quiere usar el plasma o su concentrado proteico como ingrediente alimenticio.

El plasma posee 7.9% de proteínas, siendo las principales: albúminas (3.3%), Inmunoglobulinas, α y β globulinas (4.2%), y fibrinógeno (0.4%) (Halliday, 1975; Howell & Lawrie, 1983). El plasma deshidratado posee, en promedio, 7% de humedad, 80% de proteínas, 7.9% de minerales y 1% de grasas (Caldironi & Ockerman, 1982 a).

La fracción de hematíes contiene toda la **hemoglobina** y la mayoría del **Fe** en la forma de **hierro hemínico**.

c) Utilización de la fuente proteica: Las proteínas de la sangre han sido usadas como ingredientes alimenticios, tanto por sus propiedades funcionales (Caldironi & Ockerman, 1982 a, b; Maddipati & Marnett, 1987; Faraji et al, 1991; Lee et al, 1993), como por su valor nutritivo (Delaney, 1975; Del Río de Reyes et al, 1980; Wismer-Pedersen, 1979). Por otro lado, la hemoglobina puede ser usada como fuente proteica, sobre todo en pediatría, ya que posee un elevado contenido de histidina (tres veces más que la caseína hidrolizada), un amino ácido esencial para infantes (Aubes-Dufau et al, 1995).

Para combatir la anemia ferropénica, que afecta a millones de personas en el mundo (Carpenter & Mahoney, 1992), se han desarrollado distintos procesos para producir hierro hemínico a partir de la hidrólisis de hemoglobina bovina y así obtener un producto peptídico enriquecido con dicho grupo prostético (Ericsson, 1983). Estos péptidos enriquecidos poseen un mayor contenido de hierro que la hemoproteína de partida (Liu et al, 1996) y contribuyen a mantener el grupo hemo en una forma soluble, favoreciendo su disponibilidad para la absorción (Uzel & Conrad, 1998). Además, algunos estudios han indicado como suplemento de hierro a toda la sangre o solamente a los glóbulos rojos, principalmente por el elevado contenido de hemoglobina (Walter et al, 1993; Viteri et al, 1995; Hurrell et al, 1992; Duarte et al, 1999).

Algunos investigadores (Autio et al, 1984; Lee et al, 1993), han propuesto métodos para separar la hemoglobina en **globina** (su componente proteico) y posteriormente hidrolizarla (Duarte et al, 1999). Los hidrolizados obtenidos, comparados con la proteína de partida, exhiben una mayor solubilidad y habilidad para gelificar, formando geles con diferentes características.

Además, se sabe que la hemoglobina y sus hidrolizados son una fuente de péptidos bioactivos tales como péptidos opioides (Zhao et al, 1997), péptidos que estimulan el crecimiento bacteriano (Zhao et al, 1996), péptidos que transmiten fotosensitividad (In et al, 2002) y péptidos que exhiben actividad antioxidante (Chang et al, 2007).

I-b ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

I-b.1 Reacción de óxido-reducción:

Desde un punto de vista fisicoquímico, la **oxidación** consiste en la pérdida de electrones por parte de un átomo o una molécula, de manera que disminuye su carga negativa y aumenta la positiva. Lo contrario (adquisición de electrones por parte de un átomo o molécula con el consiguiente aumento de la carga negativa), es la **reducción**. De esta manera, son **oxidantes** aquellas especies que aceptan electrones, quedando así reducidas con una mayor carga negativa, y **reductoras** las que donan electrones, con lo que se oxidan y quedan con una carga negativa menor. Toda oxidación implica una reducción: si un átomo cede electrones otro los capta; por ello se habla de reacciones de **óxido-reducción** o **redox** (Figura I.6) (Crystal & Ramón, 1992).

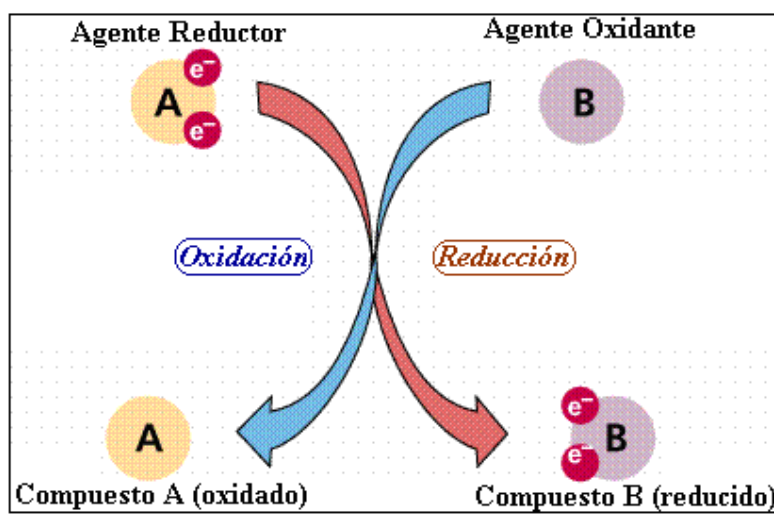


Figura I.6 – Reacción óxido-reducción. El componente A dona electrones al componente B. De esta manera el compuesto B se reduce y el A se oxida (Crystal & Ramón, 1992).

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células de metabolismo aeróbico, es el principal responsable de la producción de especies oxidantes. Sin embargo, no todas ellas tienen un origen endógeno (Ramón, 1993).

I-b.2 Radicales libres:

Un radical libre es cualquier molécula o átomo que tiene en su última capa uno o más electrones desapareados (número impar). Estos electrones desapareados confieren al radical una enorme reactividad química que le conducirá a interactuar rápidamente con otras moléculas con las que entre en contacto (Ramón, 1993). Esta interacción puede ser con otros radicales o bien con una especie química estable, y se puede dar de tres maneras:

- a) El radical puede ceder su electrón desapareado (radical reductor).
- b) El radical puede tomar un electrón de la molécula estable para aparear así su electrón (radical oxidante).
- c) El radical puede unirse a la molécula estable.

En cualquiera de los tres casos la situación resultante es la génesis de otro radical *químicamente agresivo*.

1-b.2.1 Fuentes de radicales libres:

Los radicales libres pueden provenir principalmente de tres fuentes: **a)** del metabolismo celular (actividad mitocondrial), **b)** de las reacciones inflamatorias, y **c)** de factores externos (**Figura I.7**) (Dávalos et al, 2004).

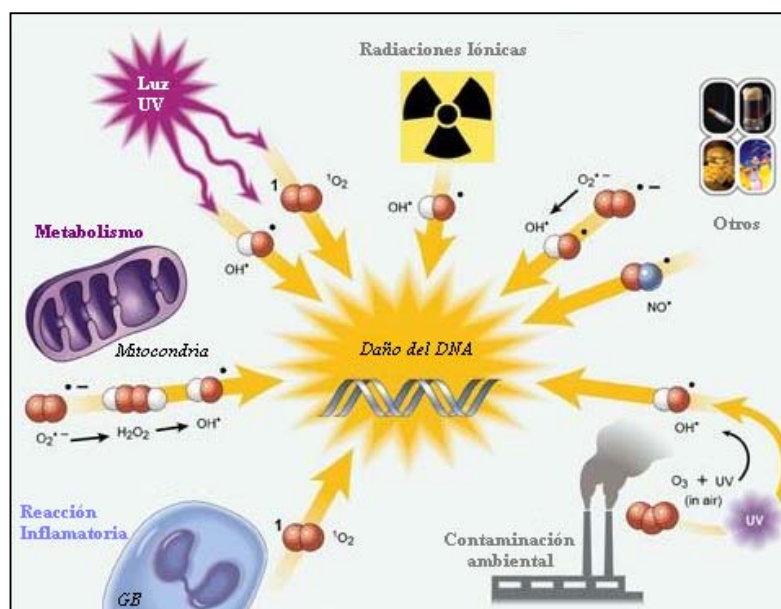


Figura I.7 – Principales fuentes de radicales libres (Dávalos et al, 2004).

a) Metabolismo: En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (95%) hasta agua, sin formación de intermediarios tóxicos mediante la *vía de la reducción tetravalente*. Mientras que un pequeño porcentaje ($\approx 5\%$) lo hace mediante la *reducción univalente*. En este último caso, se forman dos moléculas de agua y tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son radicales libres (el anión superóxido ($\cdot O_2$) e hidroxilo ($\cdot OH$)). El tercer producto es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no se considera un radical libre ya que posee en su último orbital los electrones apareados. Su particularidad consiste en que, sin ser realmente un radical libre

se "comporta" como una sustancia oxidante (Crystal & Ramón, 1992; Ramón, 1993). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de O₂ y parte de él se metaboliza siguiendo la *vía univalente*, generándose una gran cantidad de sustancias oxidantes (López Alonso et al, 1997).

b) Reacciones Inflamatorias: La segunda gran fuente de radicales libres también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células del sistema inmune. Los glóbulos blancos (macrófagos, eosinófilos, etc), poseen diversas enzimas líticas (proteasas, lipasas, nucleasas, etc.), y vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas (peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, etc), cuyo principal fin es eliminar a los elementos extraños. En los estados inflamatorios estas especies aumentan y pueden desequilibrar o desbordar los mecanismos antioxidantes naturales de las células, afectando su función y provocando lesiones irreversibles (Dávalos et al, 2004).

c) Agentes Externos: También los radicales libres se pueden generar por acción de agentes oxidantes que pueden proceder del exterior (Christen et al, 2000). Entre las principales fuentes se pueden mencionar: la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, y otros agentes (alcohol, tabaco, alimentos grasos, pesticidas, metales pesados, etc.) (Christen et al, 2000).

1-b.2.2 Acción de los radicales libres y agentes oxidantes sobre las moléculas biológicas:

- **Acción sobre los lípidos:** Es el proceso oxidativo más frecuente en el organismo y en los alimentos (Halliwell, 1997). Se produce cuando un radical libre se fija a un átomo de carbono de la cadena de alquilo de un ácido graso, iniciando lo que se conoce como peroxidación lipídica (**Figura I.8**).

La importancia de este hecho se debe a que las cadenas de ácidos grasos, particularmente los polinsaturados se fragmentan justamente por el carbono que se ha transformado en radical libre, con lo que las estructuras fosfolipídicas de las membranas se desorganizan y destruyen (Duthie et al, 1989; López Alonso, 1997; Duthie, 1999). Esto no sólo afecta a las membranas biológicas, con la consiguiente pérdida de funcionalidad (Ramón, 1993; López Alonso et al, 1997), sino que también, causa deterioros en la calidad de los productos alimenticios generándose gustos inaceptables (*off-flavor*), y disminuyendo la vida útil del alimento (Okada & Okada, 1998).

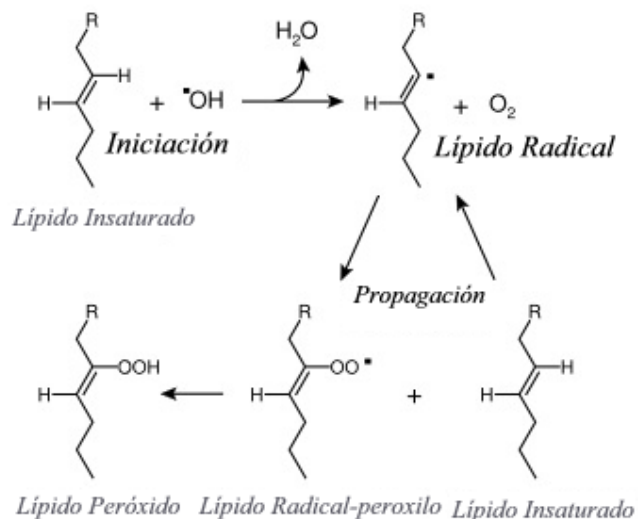


Figura I.8 – Esquema de peroxidación lipídica y generación de radicales libres (Halliwell, 1997).

- **Acción sobre proteínas:** Los radicales libres son capaces de peroxidar las cadenas de aminoácidos constitutivas de las proteínas, alterando su conformación espacial y por tanto su función (Ramón, 1993).

- **Acción sobre el ADN:** Las sustancias reactivas del oxígeno, y en particular el hidroxilo, son capaces de fijarse a las bases nitrogenadas del ADN, alterando su estructura, ocasionando su ruptura y desalineación (Kow, 1999).

I-b.3 Agentes Antioxidantes:

Un *antioxidante* es cualquier sustancia capaz de atenuar o frenar los efectos de oxidación provocados por las sustancias oxidantes (Sies, 1997; Duthie, 1999).

Para el caso de los radicales libres estos compuestos actúan como agentes reductores, ya que ceden electrones con el fin de aparear el o los electrones desapareados de la capa más externa. De esta manera se genera un compuesto más estable (Ramón, 1993)

- **Clasificación:** Los sistemas antioxidantes se dividen en dos grupos: Antioxidantes Internos y Antioxidantes Externos.

a) Antioxidantes Internos: se clasifican en enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión), y no enzimáticos (como la albúmina, ciertos ácidos grasos, nicotinamida, ADP, ceruloplasmina, tocoferoles, ácido ascórbico, carotenos y el ácido úrico) (Ramón, 1993).

b) Antioxidantes Externos: se clasifican en artificiales (BHA, BHT, η-propil galato, etc) y naturales (polifenoles, péptidos producidos a partir de las proteínas dietarias, etc) (Pihlanto, 2006).

- Aminoácidos y péptidos con propiedades antioxidantes:

Varios aminoácidos exhiben actividad antioxidante, entre los que se puede mencionar: **Tirosina, Triptofano, Fenilalanina, Histidina, Metionina y Cisteína (Figura I.9).**

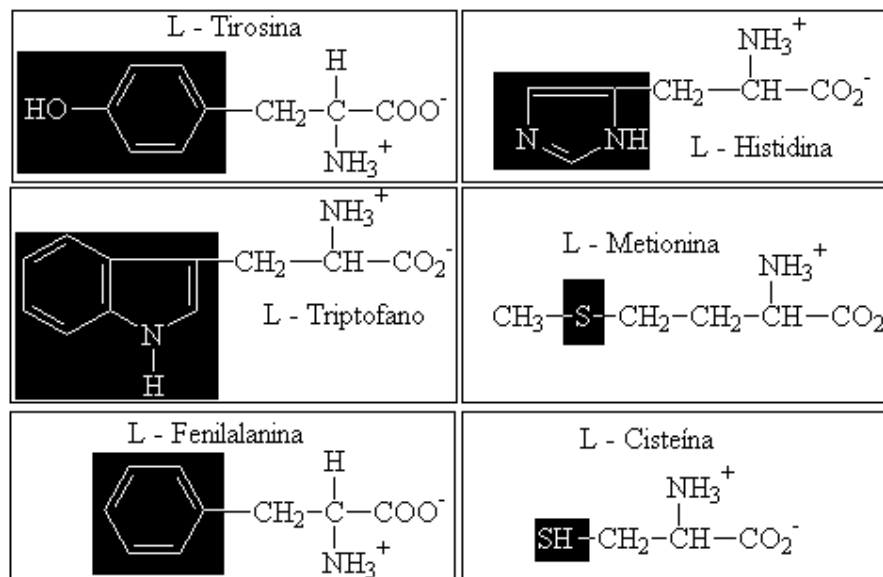


Figura I.9 – Aminoácidos que han demostrado tener actividad antioxidante. En negro se muestran los grupos involucrados en tal actividad (Wang et al, 2007).

La actividad antioxidante de los tres primeros se debe a la capacidad de los grupos fenólicos e indólicos, para actuar como donadores de hidrógeno. Los nuevos radicales generados (aminoácido-radical) son mucho más estables y poseen un tiempo de vida media más larga comparado con los simples radicales peróxidos. De esta manera cualquier reacción reversa o de propagación en cadena es inhibida (Pihlanto, 2006).

La **Histidina** exhibe fuerte actividad antioxidante debido a que puede actuar como agente quelante de metales (Fe^{3+} , Cu^{2+} , etc.), los cuales actúan como catalizadores de la peroxidación lipídica (Leung, 1998; Inanami et al, 1999). Además, también puede inhibir la oxidación mediante la descomposición del anillo imidazólico (Wang et al, 2007). Por otro lado, la **Metionina** es un aminoácido sulfurado muy propenso a la oxidación, generándose Metionin-sulfóxido y reduciendo al radical (Pihlanto, 2006).

Algunos péptidos generados a partir de la digestión proteica han demostrado tener actividad antioxidante. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de la soja contienen péptidos

antioxidantes, los cuales poseen entre 3 y 16 residuos aminoacídicos. Estos incluyen aminoácidos hidrofóbicos (*Valina* o *Leucina*), en las posiciones *N-terminales* y aminoácidos tales como *Histidina* o *Tirosina* en el interior de la secuencia. Además, a partir de esta proteína se han podido obtener péptidos ricos en Histidina, los que han exhibido actividad quelante de metales e inhibidores de las sustancias reactivas del oxígeno (Chen et al, 1996; Chen et al, 1998). Por otro lado, los péptidos obtenidos a partir de las caseínas también exhiben fuerte actividad antioxidante. Tal es el caso del péptido *Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu*, el cual tiene una potente actividad antioxidante frente al anión superóxido. Además, las caseínas poseen dominios polares que tienen residuos de *Serina* fosforilados, donde la secuencia característica es: *-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-*, estos dominios son efectivos para quelar cationes, tales como el Ca^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} , y formar complejos. Por lo tanto, las caseínas fosforiladas y/o sus péptidos en fase acuosa podrían ser una fuente de agentes quelantes naturales (Pihlanto, 2006). También se han identificado péptidos con capacidad antioxidante que derivan de otras proteínas lácteas, como es el caso del péptido: *Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile* aislado a partir de hidrolizados de β -lactoglobulina (Hernández-Ledesma et al, 2005). Como así también, péptidos que provienen de otras proteínas: hemoglobina bovina porcina (Chang et al, 2007), gluten de trigo (Wang et al, 2007), etc.

Como se ve, las fuentes proteicas a partir de las cuales se aíslan los péptidos con actividad antioxidante son muy diversas, abarcando desde las proteínas vegetales hasta las de origen animal (Vioque et al, 2006).

I-b.4 Determinación de la Actividad Antioxidante *in vitro*:

Existen una gran variedad de técnicas *in vitro* para detectar la presencia de compuestos antioxidantes y evaluar las propiedades multifuncionales de los mismos, tanto en los procesos fisiológicos como en los alimentos (Pihlanto, 2006). Estas técnicas difieren en sus principios de ensayos y en las condiciones experimentales (Alonso et al, 2002). Entre los métodos utilizados para monitorear la actividad antioxidante, se pueden destacar:

I-b.4.1 Eliminación de los radicales libres:

Estos métodos se basan en generar un radical libre estable y evaluar como es reducido por el compuesto o muestra objeto de estudio adicionada al medio (Alonso et al, 2002). La reducción puede realizarse por diferentes mecanismos, entre los que se pueden mencionar la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la transferencia de electrones (ET) (Paixão et al, 2007).

A continuación se detallan algunas técnicas empleadas para estimar la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes compuestos:

a) Técnica que utiliza el radical catión $ABTS^{\cdot+}$: Este ensayo se basa en la reducción del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ de color azul-verdoso, al Ácido 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS, incoloro) en presencia de un agente reductor. El radical monocation es generado previamente con persulfato de potasio (**Figura I.10**) (Re et al, 1999).

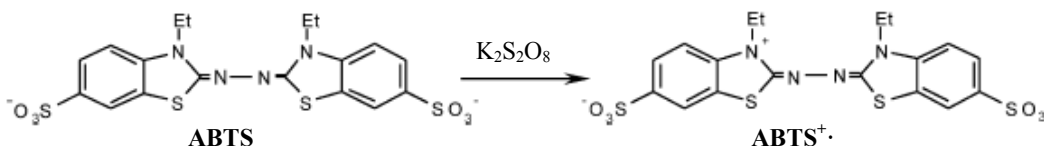


Figura I.10 – Reacción de generación del radical catión $ABTS^{\cdot+}$. Mediante la reacción del ácido ABTS con el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (Milardovic et al, 2007).

• **Ventajas del ensayo:**

- La química abarca la generación directa del radical monocation $ABTS^{\cdot+}$ sin la generación de radicales intermediarios (Re et al, 1999).
- Es un ensayo de decoloración y por lo tanto el radical cation es preformado antes de ser agregado a la mezcla de reacción. Es decir, no hay una continua generación en la mezcla de reacción frente a la muestra (Re et al, 1999).
- Es aplicable tanto a sistemas acuosos como lipofílicos (Re et al, 1999).

• **Desventajas del ensayo:**

- El radical generado es extraño a los sistemas biológicos (Pihlanto, 2006).

• **Dependencias del ensayo:**

La adición de los antioxidantes reduce al radical cation preformado a ABTS en un grado y escala de tiempo que depende de (Re et al, 1999):

- La actividad antioxidante de la muestra.
- La concentración del antioxidante.
- La duración de la reacción.
- El tiempo final escogido para el ensayo.

b) Técnica que utiliza el radical $DPPH^{\cdot}$: Este método se basa en la reducción del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), mediante la acción de un agente reductor

(RH) (**Figura I.11**). Esta reacción redox es cuantificada espectrofotométricamente en medio orgánico. El máximo de absorbancia del radical se obtiene aproximadamente a los 515 nm (Huang et al, 2005).

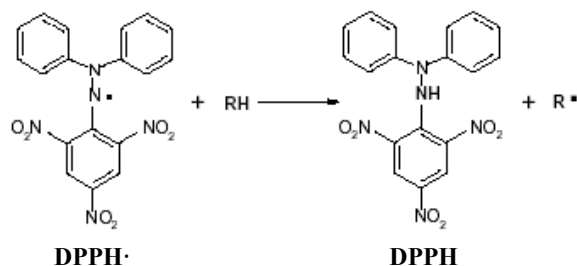


Figura I.11 – Reacción de reducción del radical DPPH, por acción de un agente reductor (RH) (Paixão et al, 2007).

- **Ventajas del ensayo:**

- El DPPH• es uno de los pocos radicales nitrogenados estables (Huang et al, 2005).
- Es una técnica sencilla y de gran aplicación, tanto para muestras botánicas como biológicas (Prior & Cao, 2000).

- **Desventajas del ensayo:**

- Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peróxidos (radicales naturales), pueden reaccionar lentamente o aún no reaccionar con el DPPH• (Huang et al, 2005).
- La reacción ocurre en medio orgánico y las proteínas pueden precipitar (Moure et al, 2006).
- El radical generado es extraño a los sistemas biológicos (Pihlanto, 2006).

I-b.4.2 Otros principios:

a) Técnica de Capacidad de absorbancia del radical oxígeno (ORAC): Este método se basa en medir una señal de fluorescencia que decrece en ausencia del agente antioxidante, como consecuencia de la acción de las sustancias reactivas del oxígeno. Estas últimas son producidas mediante la descomposición de los compuestos *azo* (Paixão et al, 2007). El agregado de un antioxidante absorbe las sustancias reactivas del oxígeno generadas, y de este modo la señal de fluorescencia persiste. Como agente fluorescente se puede usar β -ficoeritrina o bien (uso más reciente), fluoresceína (Ou et al, 2001).

- **Ventajas del ensayo:**

- Es más relevante desde un punto de vista biológico, ya que se utilizan radicales peróxidos lo cuales son más afines al cuerpo humano (Paixão et al, 2007).
- Tiene gran aplicación en muestras botánicas y biológicas (Prior & Cao, 2000).
- Puede ser empleado para medir la potencial actividad antioxidante en medios acuosos y lipofílicos (Paixão et al, 2007).

- **Desventajas del ensayo:**

- El tiempo de duración del ensayo es mucho mayor al demandado con otros ensayos (Paixão et al, 2007).
- Los iniciadores (azo-compuestos) utilizados para generar los radicales peróxidos son artificiales, por lo tanto son extraños a los alimentos u otros sistemas como los biológicos (Pihlanto, 2006).

b) Parámetro antioxidante de caza de radicales (TRAP): Este método se basa en la medida del tiempo de inducción de la oxidación de una dispersión lipídica expuesta a una fuente de producción de radicales libres bajo condiciones aeróbicas. Como fuente de radicales álcali-peróxidos se usa el Azobis(2-amidinopropane) (ABAP). El grado de oxidación se mide como una disminución de la concentración de oxígeno (Wayner et al, 1985). Este procedimiento ha sufrido modificaciones diversas, desde el empleo de otras fuentes de radicales hasta otras técnicas de monitoreo del proceso.

c) Técnica de que mide las Sustancias Reactivas al Ácido tiobarbitúrico (TBARS): El ensayo de TBARS se basa en la medida del malondialdehído (MDA) formado como consecuencia de la peroxidación lipídica y puede llevarse a cabo con preparados de membranas subcelulares, células intactas u otras formas. Este ensayo es inespecífico ya que no mide sólo la formación de MDA sino que también cuantifica otros oxo-compuestos pero puede usarse para estudiar las propiedades antioxidantes de un determinado compuesto (Pihlanto, 2006).

Como se usan varios métodos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* los resultados son expresados de diversas formas. Esto conduce a grandes problemas a la hora de efectuar comparaciones (Pihlanto, 2006).

I-c DISPONIBILIDAD DE MINERALES

I-c.1 Hierro:

I-c.1.1 Fuentes dietarias de hierro:

Hay dos tipos de hierro dietario, de acuerdo a los distintos mecanismos de absorción del organismo:

a) Hierro hemínico: se encuentra en carnes, pescado, aves y en los alimentos derivados de sangre animal. Se absorbe más eficientemente que el hierro no hemínico. Cuando es proporcionado en una comida su grado de absorción es tres veces mayor que la de las sales control y es menos vulnerable a las interacciones digestivas. Es absorbido en forma intacta en el intestino, atraviesa el ribete en cepillo mediante un transportador específico y es escindido dentro del enterocito mediante la acción de una hemo-oxigenasa. Luego pasa a formar parte del pool común de hierro inorgánico de los enterocitos (Vaghefi et al, 2002).

b) Hierro no hemínico: está en todas las plantas y productos animales. Posee baja biodisponibilidad y está influenciado notablemente por compuestos de la dieta que pueden actuar como promotores o inhibidores de su absorción (**Tabla I.2**) (Sadettin et al, 2004).

Tabla I.2 – Promotores e inhibidores de la absorción de hierro no hemínico.

Promotores de la absorción	- Ácido Ascórbico
	- Ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido cítrico, etc)
	- EDTA
	- Tejidos animales (aminoácidos)
Inhibidores de la absorción	- Fitatos, taninos y polifenoles
	- Proteínas vegetales, lácteas y del huevo
	- Calcio (a nivel de mucosa intestinal)

I-c.1.2 Funciones del hierro en el organismo:

Entre las principales funciones se pueden mencionar las siguientes:

- Forma parte de las hemoproteínas (hemoglobina: responsable de transportar el oxígeno en la sangre y mioglobina: almacena O₂ en el músculo) (Baran, 1995)

- Componente de enzimas tisulares tales como citocromos (metabolismo energético), catalasas y peroxidasas, etc (Rouault, 2005).

I-c.1.3 Deficiencia de hierro:

La mayor parte del hierro de la dieta se encuentra como no hemínico y su baja biodisponibilidad es una de las causas de la *anemia* por deficiencia de hierro. La deficiencia de hierro es una de las enfermedades nutricionales más comunes y afecta a millones de personas. La mayor prevalencia se da en los países en desarrollo. Las causas más frecuentes son las dietas ricas en cereales (donde la biodisponibilidad del Fe es baja), la pérdida de sangre como consecuencia de las enfermedades parasitarias, las demandas fisiológicas aumentadas, tales como en los niños en crecimiento o las mujeres, ya sea por la pérdida del mineral durante la menstruación o bien como consecuencia de una mayor demanda durante el embarazo (Carpenter & Mahoney, 1992).

I-c.2 Zinc:

I-c.2.1 Funciones del zinc en el organismo: Entre las principales funciones se pueden mencionar las siguientes:

- Interviene en el metabolismo, el crecimiento, la reproducción, la reparación de tejidos y en la inmunidad celular (Black, 1998).

- Forma parte de sistemas enzimáticos (metaloenzimas), relacionados con la utilización de la energía, la síntesis de proteínas y la protección oxidativa (Hambidge, 2000).

- Cumple funciones estructurales a través de metaloproteínas (proteínas “dedos de zinc”), las cuales intervienen en los procesos transcripcionales de genes específicos, etc. (Hambidge, 2000).

- Interviene en la embriogénesis y desarrollo fetal y en la producción de leche durante el embarazo (Fung et al, 1997).

I-c.2.2 Deficiencia de zinc:

La deficiencia de Zn existe tanto en países industrializados como en los países en vías de desarrollo. La misma conduce a un retardo en el crecimiento, depresión de la función inmune, incremento de la susceptibilidad a infecciones, resultados adversos en el embarazo y anormalidades del comportamiento (López de Romaña et al, 2003; Caulfield et al, 1998). Además puede estar asociada con déficit en la actividad, en la atención y el desarrollo motor, que ocurren comúnmente en niños con deficiencias nutricionales (Black, 1998).

Las principales causas de deficiencia de zinc son: la presencia de inhibidores de la absorción (más frecuente), inadecuada ingesta dietaria (elevado consumo de cereales y tubérculos), y síndromes de mala absorción o elevadas pérdidas por diarreas (Hambidge et al, 1998).

I-c.2.3 Fuentes dietarias de zinc:

Es aportado principalmente por las carnes rojas magra y los mariscos, y en menor medida por otras fuentes proteicas tales como: carne de cerdo, aves, pescados y leche. Sin embargo los alimentos vegetales poseen bajas cantidades de zinc, salvo los cereales enteros y las legumbres (Hunt, 2003).

En la siguiente tabla se resumen los principales promotores e inhibidores de la absorción del zinc (**Tabla I.3**).

Tabla I.3 – Promotores e inhibidores de la absorción de zinc.

Promotores de la absorción	- Ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido cítrico, etc) - EDTA - Proteínas cárnicas
Inhibidores de la absorción	- Fitatos y polifenoles - Calcio (complejos con fitatos y Zn)

I-d ALIMENTOS FUNCIONALES

I-d.1 Aspectos generales: El concepto de alimento funcional ha sido evaluado y discutido en profundidad y existen distintos trabajos de revisión de su definición (Robertfroid, 2000, 2002; IFT, 2005). En líneas generales, se reconoce básicamente como funcionales a productos nuevos, que contienen componentes bioactivos en concentraciones cuantificables, capaces de ejercer un efecto positivo sobre la salud más allá de su capacidad de nutrir, y que son consumidos como parte de la dieta habitual. La definición del IFT (Institute of Food Technologists) es más amplia, tendiendo al concepto de alimentos saludables, considerando el posible efecto de la dieta en su conjunto. Este enfoque incluye a alimentos modificados, así como los fortificados y suplementos dietarios (Olivera Carrión, 2007).

Los alimentos funcionales ejercen su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico. Se comportan como potenciadores del

desarrollo y la diferenciación, moduladores del metabolismo de nutrientes (lípidos, hidratos de carbono, etc), la expresión génica, el estrés oxidativo (Rodríguez Silveira et al, 2003).

Entre los más relevantes y sobre los que recae la más sólida evidencia científica, están los *probióticos* (Ashwell, 2002), los *prebióticos* (Gibson & Roberfroid, 1995), los *simbióticos* (Olivera Carrión, 2007), la *fibra soluble e insoluble*, los *ácidos grasos polinsaturados y fitosteroles* (Rodríguez Silveira et al, 2003), los *derivados fenólicos* (Wojdyło et al, 2007; Paixão et al, 2007), etc.

La transformación de un alimento en *funcional* puede realizarse eliminando algún componente nocivo (alergeno, grasa saturada), fortificándolo con sustancias beneficiosas (cereales con minerales, pan con fibra, leche con calcio), mediante la adición de un elemento no presente de forma habitual en el mismo (aceite con antioxidantes), la sustitución de un compuesto perjudicial por otro deseable (grasas por inulina, leche desnatada con ácidos grasos ω -3) o a nivel de optimización de la biodisponibilidad/estabilidad (Marriott, 2000).

Actualmente los alimentos funcionales disponen de un lugar de aceptación y reconocimiento entre la población. Por lo que la aparición y desarrollo de nuevos productos en el país sigue la tendencia internacional de un crecimiento sostenido (Rodríguez Silveira et al, 2003).

El proceso de extrusión se ha utilizado ampliamente para el desarrollo de numerosos alimentos a base de cereales precocidos (Poltronieri et al, 2000; Zimmermann et al, 2005; Moreira-Araújo et al, 2008) y también podría constituir un alternativa interesante para formular alimentos funcionales.

I-d.2 Extrusión:

a) Generalidades: La extrusión es un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría y con un caudal másico pre-establecido (González et al, 2002). Puede asegurarse que este proceso es eficiente, no sólo desde el punto de vista de la versatilidad (ya que puede realizar simultáneamente operaciones de mezclado, cocción, texturización y secado parcial), sino también desde el punto de vista de la utilización de la energía, mano de obra y espacio requerido para la instalación (González et al, 2002, İbanog, 2006).

b) Tipos de Extrusores: Existe una variedad de diseños de extrusores, pero básicamente pueden clasificarse en dos grandes tipos: monotornillo (“single screw

extruder”) y doble tornillo (“twin screw extruder”). El extrusor monotornillo domina la industria alimentaria pero la aplicación de extrusores de doble tornillo está creciendo por la gran flexibilidad en el control de los parámetros del producto y proceso. Los extrusores monotornillo presentan inestabilidad, ya que es un proceso manejado por fricción, mientras que los de doble tornillo son más útiles para procesos por pasos (amasado, mezclado, etc.) y para trabajar con almidones modificados.

c) Factores que afectan al proceso de extrusión. Variables operativas y de diseño:

La siguiente tabla resume los principales factores que afectan al proceso de extrusión y las variables operativas y de diseño involucradas (**Tabal I.4**).

Tabla I.4 – Factores que afectan al proceso de extrusión y las variables operativas y de diseño del mismo.

Factores que afectan al proceso de extrusión	<ul style="list-style-type: none">- Niveles de humedad- Tamaño de partícula del material de alimentación- Otros ingredientes (aceites y emulsificantes)
Variables operativas y de diseño del proceso de extrusión	<ul style="list-style-type: none">- Geometría del tornillo- Velocidad del tornillo- Temperatura del cilindro

d) Transformaciones del material durante la extrusión:

- **Antes del proceso de extrusión:** Se lleva a cabo la humectación de las harinas. Esta tiene por objetivo comenzar a humectar el almidón para facilitar su posterior gelificación.

- **Durante el proceso de extrusión:** El material es introducido al extrusor, es transportado a lo largo del mismo y en segundos, es convertido en un fluido viscoelástico, que al salir por la boquilla, se transforma en un sólido expandido. La combinación de esfuerzos de corte, temperatura y presión provoca cambios estructurales, más o menos intensos, según sean las condiciones de extrusión (Mitchell & Areas, 1992). Es importante destacar que la transformación del flujo sólido en flujo viscoso es necesaria para que se produzcan estos cambios estructurales, particularmente en el almidón (**Figura I.12**).

- **Salida del producto extrudido:** La expansión que se produce al salir por la boquilla, es consecuencia de la evaporación casi instantánea del agua contenida en el material, la cual se encuentra en estado líquido, a pesar de la alta $T(^{\circ}\text{C})$, ya que la presión es suficientemente alta ($> 50 \text{ Kg/cm}^2$). El cambio de presión a la salida (presión atmosférica), exige que el agua (a $T \gg$ de 100°C) se vaporice (“flashing”), provocando el “arrastre” (expansión) del material viscoelástico. Las propiedades mecánicas del producto expandido, dependerán de la distribución y tamaño de los alvéolos y del espesor de pared de los mismos.



Figura I.12 – Transformaciones del material durante la extrusión (extrusor monotornillo).

En el proceso de extrusión, el *almidón* es el componente que juega el papel más importante, ya que los cambios que sufre afectan la expansión y textura final del producto extrudido (Lay & Kokini, 1991). El estado final (o *grado de cocción*) alcanzado por el almidón, como consecuencia de las transformaciones estructurales (fusión, fragmentación y dextrinización), es muy dependiente de las condiciones de extrusión y del tipo de material empleado (tamaño y dureza de las partículas de sémola, cereal con el cual se obtuvo la sémola, etc.).

Entre las variables de extrusión más importantes se destacan: relación de compresión del tornillo y velocidad del tornillo, relación agua/almidón (o humedad del material a la entrada del extrusor), la temperatura y el diámetro de la boquilla (Kokini et al, 1992). En general se puede afirmar que existe una relación directa entre el grado de cocción y la temperatura de extrusión.

Según cómo se lleve a cabo la extrusión, pueden obtenerse diferentes productos. Si el proceso de extrusión se lleva a cabo a baja humedad se obtienen productos de expansión directa como “snacks”, harinas precocidas aptas para sopas cremas y formulaciones de

textura suave tipo papillas. En cambio, si la extrusión se realiza a alta humedad se obtienen cereales para desayuno, harinas precocidas para preparar productos de textura granular como polentas, “arepas” (especie de pan de forma circular, hecho con maíz ablandado a fuego lento y luego molido, o con harina de maíz precocida, que se cocina sobre una plancha), “tortilla”, etc. (González et al, 1991, 1998 y 2000; Zhang & Hosney, 1998).

Los hidrolizados de hemoglobina bovina con propiedades bio-funcionales pueden ser incorporados a productos extrudidos de maíz. De esta manera se genera un nuevo producto con características funcionales. Principalmente por la complementación nutricional que existe entre las proteínas de los cereales y las hemoproteínas (Cheftel et al, 1989); por el aporte de hierro hemínico (Uzel & Conrad, 1998); y por la provisión de péptidos con propiedades antioxidantes (Chang et al, 2007).



II

OBJETIVOS



II - OBJETIVOS

Obtención y evaluación de propiedades bio-funcionales selectas en hidrolizados de concentrado de hemoglobina bovina. Incorporación a alimentos extrudidos y evaluación de su bioactividad.

- **Objetivos específicos:**

1. Evaluar la acción proteolítica de diferentes enzimas bajo el esquema de hidrólisis simple y secuencial, usando dos endoproteasas (una de rango alcalino y otra de rango ácido) y una exoproteasa (de rango neutro).
2. Evaluar la solubilidad de los hidrolizados y caracterizar las fracciones solubles en cuanto a su contenido de proteínas, aminos libres, hierro, tamaño peptídico (electroforesis, PCL), color.
3. Evaluar la actividad antioxidante de distintas fracciones de hidrolizados de concentrado de hemoglobina bovina, obtenidas por fraccionamientos por pH o por ultrafiltración.
4. Determinar la disponibilidad de minerales (hierro y zinc) de los hidrolizados obtenidos.
5. Evaluar el efecto de la incorporación de los hidrolizados del concentrado de hemoglobina bovina en las propiedades físicas de los productos expandidos a base de maíz.
6. Determinar el efecto del proceso de extrusión en la actividad antioxidante de los expandidos elaborados con maíz-hidrolizados del concentrado de hemoglobina bovina.
7. Estudiar el efecto promotor/inhibidor de los hidrolizados del concentrado de hemoglobina bovina en la disponibilidad de minerales (hierro y zinc).



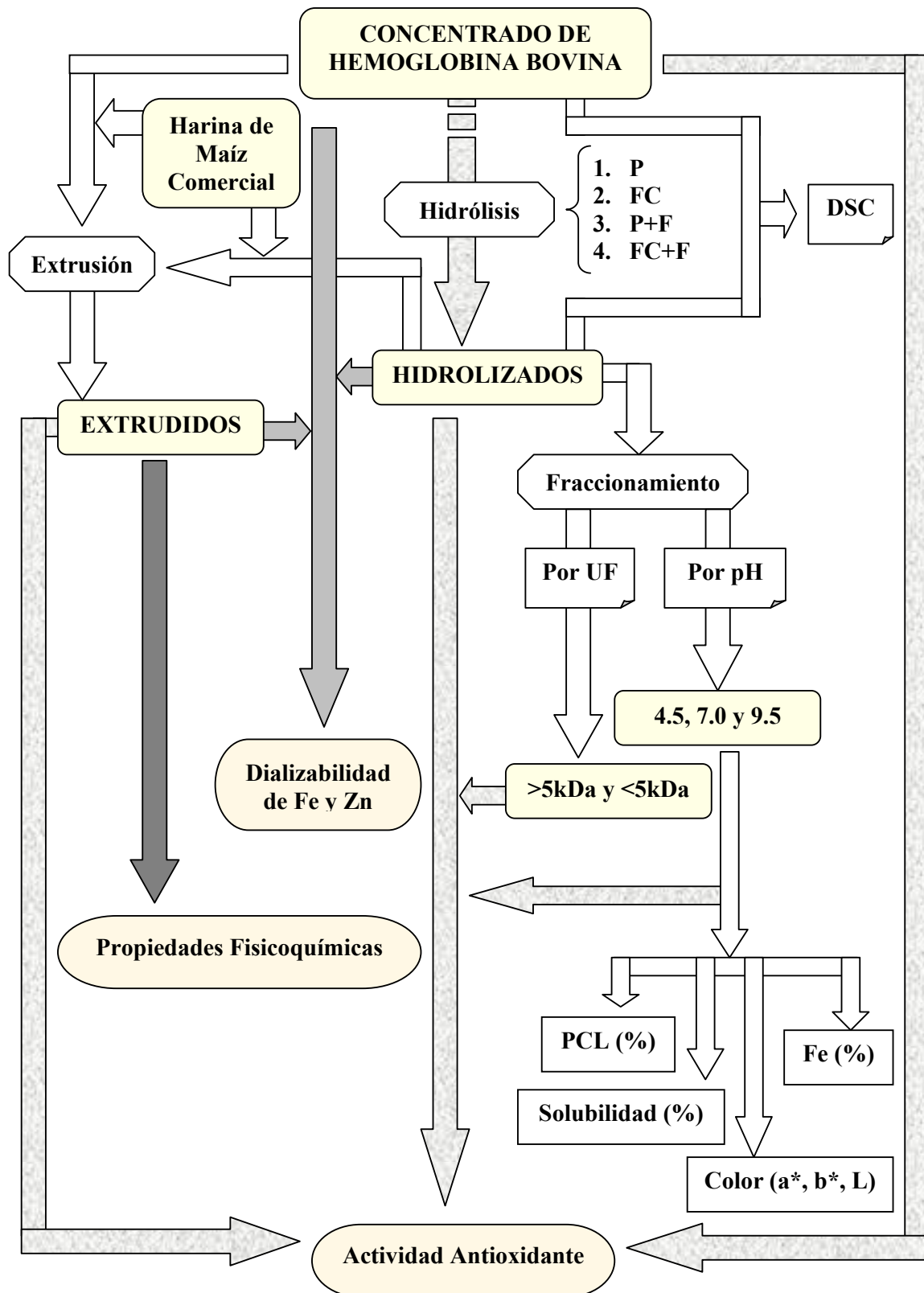
III

MATERIALES Y
MÉTODOS



III - MATERIALES Y MÉTODOS

III-a Esquema de trabajo: En el siguiente esquema se resumen brevemente las principales experiencias realizadas en la presente tesis:



III-b Materias primas:

- **Sustrato:** Se utilizó un concentrado proteico de hemoglobina bovina (CHB) suministrada por la empresa **Yeruvá S.A** (Esperanza, Santa Fe, Argentina)

- **Enzimas:** En la **Tabla III.1** se muestran las enzimas utilizadas, su origen, tipo de actividad y el rango de pH y temperatura de trabajo informados por el fabricante. Las condiciones óptimas de las enzimas utilizadas no se informan por razones de confidencialidad.

Tabla III.1 – Enzimas comerciales utilizadas.

Enzima	Actividad	Origen	pH	Temperatura (°C)
Protex 6L (P)	Endoproteasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	7.0 - 10.0	25 - 70
Fungal Protease Concentrate (FC)	Endoproteasa + Exoproteasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	4.0 - 9.0	25 - 60
Flavourzyme (F)	Exoproteasa + Endoproteasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	4.0 - 9.0	25 - 60

- **Productos Extrudidos:** para la elaboración de los productos expandidos se utilizó harina de maíz comercial.

III-c Caracterización de las materias primas:

- **Determinación de la composición centesimal:** La determinación de la composición centesimal (humedad, proteínas, extracto etéreo y cenizas) del concentrado de hemoglobina bovina se realizó siguiendo los métodos de la AOAC (1995) y de la harina de maíz comercial utilizando las técnicas de la AACC (1983).

- **Determinación del contenido de hierro:** El contenido de hierro del CHB se determinó empleando espectroscopia de absorción atómica, previa mineralización por vía seca. Las cenizas se levantaron con HCl 20% (V/V) y la lectura se realizó utilizando un espectrómetro de absorción atómica (Instrumentation Laboratory IL 551, Mass, USA).

- **Titulación del concentrado de hemoglobina bovina:** La titulación se realizó mediante el agregado de HCl y NaOH 0.4N a una dispersión del CHB al 5% (P/P) en

proteínas y siguiendo la evolución del pH con peachímetro Altronix. La zona de inflexión de la curva fue tomada como la zona del punto isoelectrico de la proteína.

III-d Elaboración de los hidrolizados:

- **Condiciones de hidrólisis:** Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostatzado de tipo batch de 800ml de capacidad. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de base (NaOH) o ácido (HCl). Las enzimas empleadas para esta etapa experimental fueron Protex 6L, Fungal Protease Concentrate y Flavourzyme, trabajando bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura de cada una de ellas. Se trabajó a una concentración de sustrato de 8% (P/P) y a una relación E/S de 0.1% para Protex 6L, 0.5% para Fungal Protease Concentrate y 1% para Flavourzyme. La Actividad Enzimática no se informa por razones de confidencialidad.

Se prepararon cuatro hidrolizados de CHB. Para ello se utilizaron dos hidrolisis simples (una sola enzima: P o FC), y dos hidrólisis secuenciales (uso de dos enzimas: P + F o FC + F), siguiendo el siguiente esquema:

- **Hidrólisis P:** Hidrólisis con la enzima Protex 6L durante 2 horas. Tiempo total de reacción 2 horas.
- **Hidrólisis FC:** Hidrólisis con la enzima Fungal Protease Concentrate durante 2 horas. Tiempo total de reacción 2 horas.
- **Hidrólisis P+F:** Hidrólisis con la enzima Protex 6L durante 2 horas. Luego se adicionó la enzima Flavourzyme dejándola actuar durante 4 horas más. Tiempo total de reacción 6 horas.
- **Hidrólisis FC+F:** Hidrólisis con la enzima Fungal Protease Concentrate durante 2 horas. Luego se adicionó la enzima Flavourzyme dejándola actuar durante 4 horas más. Tiempo total de reacción 6 horas.

III-e Seguimiento de la reacción de hidrólisis:

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de hidrólisis (GH) a través de la medición de aminos libres, el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA) y la técnica del pH-stat (sólo para Protex 6L).

III-e.1 Determinación de GH. Medición de los grupos aminos libres: Para la determinación del grado de hidrólisis (GH), se extrajeron muestras a distintos tiempos de

hidrólisis, realizándose una dilución 1/10 con SDS al 5% y calentando 10min a 90°C. Los grupos aminos libres se midieron utilizando la técnica de Nielsen et al. (2001), que utiliza el o-ftaldehído (OPA) (Sigma-P1378) y L-serina (Sigma-S4500) como estándar. El grado de hidrólisis se determinó según:

$$GH = (h - h_0) / h_t \times 100\% \quad (1)$$

Donde:

- h_t , es el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (8,23 mEq/g proteína).
- h , es el número de uniones peptídicas hidrolizadas.
- h_0 , es el contenido de aminos libres en la proteína de partida.

III-e.2 Índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA): El índice de solubilidad en ácido tricloroacético se determinó utilizando una solución de TCA al 20% y realizando una dilución al 1/2 con la muestra. Posteriormente se agitó, se dejó reposar durante 30min y se centrifugó a 3000xg, durante 15 minutos, a una temperatura entre 0-10°C. En el sobrenadante se cuantificó proteínas empleando el método de Kjeldahl o la reacción colorimétrica descrita por Lowry et al. (1951). El ITCA (Adler-Nissen, 1986), se calculó como:

$$ITCA = \frac{N_s}{N_T} \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

N_s : Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA).

N_T : Nitrógeno total.

III-e.3 Técnica del pH-stat: El control de la hidrólisis enzimática de proteínas a pH alcalino puede ser realizado de forma sencilla y precisa por medida del consumo de base necesario para mantener el pH de la reacción constante (Adler-Nissen, 1986, Sousa et al, 2003). Dicho consumo de base provee el grado de hidrólisis (GH), en forma directa, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad (3)$$

Donde:

h_{tot} : Número total de enlaces peptídicos hidrolizables del sustrato proteico (8,23 mEq /g proteína).

h : Número de uniones peptídicas hidrolizadas

B : Consumo de base en mililitros.

N_b : Normalidad de la base.

α : Promedio del grado de disociación de los grupos α -NH (que a pH 9 es 1).

MP : Masa proteica en gramos.

III-f Inactivación y conservación de los hidrolizados:

Una vez finalizada la hidrólisis, la enzima fue inactivada por tratamiento térmico de acuerdo a las condiciones descriptas por el fabricante (**Tabla III.2**).

Tabla III.2 – Condiciones del tratamiento térmico.

Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Protex 6L	80 - 85	5 - 10
Fungal Protease Concentrate (FC)	90°C	10
Flavourzyme (F)	85	5

Los hidrolizados fueron fraccionados en distintos contenedores, congelados a -20°C y posteriormente liofilizados.

III-g Caracterización de los hidrolizados y estudio de propiedades biofuncionales:

III-g.1 Evaluaciones fisicoquímicas:

a) Calorimetría diferencial de barrido (DSC) del concentrado de hemoglobina y sus hidrolizados: Las características térmicas del CHB y sus hidrolizados se determinaron por calorimetría diferencial de barrido en un equipo de análisis térmico. Las calibraciones de temperatura y celda se realizaron usando *Indio* como patrón. Se emplearon portamuestras de Aluminio cerradas herméticamente usando para ello un sellador Perkin-Elmer N° 0219-0062. Se colocaron 2mg de CHB o de hidrolizado y se adicionaron 6µl de agua destilada. El barrido de temperatura de 30 a 130°C se realizó a una velocidad de 10°C/min en un equipo Perkin Elmer DSC-6. Los datos fueron registrados con un software Pyris DSC-6. Un porta-muestra vacío se uso como

referencia. De los termogramas obtenidos se calculó la temperatura de desnaturalización (T_d) (Paredes-López et al, 1988).

Estos ensayos fueron realizados en los laboratorios de Química de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (Mérida–México), bajo la dirección del Dr. Luis Chel-Guerrero.

b) Solubilidad: Para determinar la solubilidad de los distintos hidrolizados y de la proteína sin hidrolizar a diferentes pHs (4.5, 7.0 y 9.5), se siguió la técnica de Drago & González (2001). Para ello se preparó una suspensión al 8%, se llevó al pH deseado y se agitó durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 3000xg. En el sobrenadante se determinó el contenido de proteínas ($N \times 6.25$), utilizando la técnica de semi-micro-Kjeldahl. La solubilidad se calculó como el porcentaje de proteínas en la fracción soluble, respecto al contenido de proteínas de la muestra.

La fracción soluble a distintos pHs de cada hidrolizado constituye el extracto a dicho pH (fraccionamiento por pH).

c) Contenido de grupos aminos libres en el extracto: En la fracción soluble a distintos pHs de cada hidrolizado se determinó el contenido de aminos libres, empleando la técnica de OPA (Nielsen et al, 2001). El contenido de grupos aminos libres por gramo de proteína soluble (mEq/g_p), se calculó como:

$$\frac{mEq}{g_p} = \frac{mEq/ml}{g_p/ml} \quad (4)$$

d) Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL): De acuerdo a 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 (1) se puede obtener:

$$GH = \frac{n-1}{PCL_0-1} \times 100\% \quad (5a)$$

Como $PCL_0 = n \times PCL$, la expresión queda:

$$GH = \frac{\frac{PCL_0 - 1}{PCL}}{PCL_0 - 1} \times 100\% \longrightarrow GH = \frac{\frac{1}{PCL} - \frac{1}{PCL_0}}{1 - \frac{1}{PCL_0}} \times 100\% \quad (5b)$$

Para proteínas alimentarias el valor de PCL_0 es del orden de 200 – 300 (correspondiendo un PM: 25000 a 40000 para las subunidades). Por lo tanto, el valor de $1/PCL_0 \approx 0$ ya que PCL_0 tiende a ∞ . De esta manera, la ecuación anterior queda como:

$$GH = \frac{1}{PCL} \times 100\% \longrightarrow PCL = \frac{1}{GH} \times 100\% \quad (5c)$$

Se puede asumir que las proteínas insolubles no son hidrolizadas. Por lo tanto la ecuación anterior se puede expresar como:

$$PCL = \frac{\text{Fracción}_{\text{SOLUBLE}}}{GH} \times 100\% \quad (5d)$$

III-g.2 Determinación del contenido de hierro en los extractos a distintos pHs y en el hidrolizado total:

El contenido de hierro se determinó empleando una técnica colorimétrica (kit Fer-Color –Wiener Lab) basada en la reacción del hierro con el reactivo color *piridil bis-fenil triazina sulfonato* (PBTS), en buffer succinato pH 3.7 y en presencia de un agente reductor (ácido mercaptoacético), dando un complejo color magenta que se mide a 560 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy-Genesys). La medición del contenido de Fe se realizó sobre las muestras mineralizadas por vía seca, solubilizadas con HCl 20% (V/V) y neutralizadas.

III-g.3 Determinación del color de los extractos a distintos pHs y del hidrolizado total:

Se procedió a determinar el color de los extractos obtenidos a distintos pHs (4.5, 7.0 y 9.5) y de los hidrolizados. Las determinaciones se hicieron empleando un colorímetro (MINOLTA CM-508d), con ángulo de observador: 10°; iluminante: D65 y SCE (Componente especular excluido).

III-g.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE – SDS):

El CHB sin hidrolizar y las alícuotas obtenidas a distintos tiempos de hidrólisis para P, FC, P+F y FC+F fueron evaluados en cuanto a sus perfiles electroforéticos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se realizó de acuerdo a Laemmli (1970), en un sistema de buffer en gradiente 10-15%.

Se utilizó un equipo Mini-Protean II. Electrophoresis cell-Bio-Rad con una fuente Modelo 200/2.0 Bio-Rad.

Las placas de gel se fijaron y tiñeron con una solución de 0.125% de Coomassie Blue R-250, 50% metanol y 10% ácido acético en agua.

Los pesos moleculares de las proteínas de las diferentes bandas fueron estimadas mediante el uso de un kit de calibración de pesos moleculares proteicos Pharmacia. Las proteínas estándar usadas y sus pesos moleculares fueron los siguientes: Fosforilasa b (94 kDa), Albumina (67 kDa), Ovoalbumina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (30 kDa), Inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -Lactoalbúmina (14.4 kDa).

Las muestras fueron diluidas con el buffer de muestra (0.125M tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y Azul de Bromofenol 0.5%), se calentaron en baño de agua a 100°C durante 90 segundos y se sembraron entre 5 y 20 μ l en cada vial, dependiendo de la concentración de proteínas.

III-g.5 Evaluación de propiedades bioactivas:

III-g.5.1 Disponibilidad de minerales:

La disponibilidad potencial de hierro y zinc se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Miller et al. (1981), modificada por Wolfgor et al. (2002). La muestra se preparó al 2.5% de sólidos. Se llevó a pH 2.0 con HCl 4.5N, se agregaron 0.8ml de una solución de pepsina (Sigma P-7000) al 16% en HCl 0.1N y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para incrementar gradualmente el pH, se agregó una bolsita de diálisis de 24 cm de longitud de cut off 6-8 kDa (Spectra/Pore), conteniendo una solución de buffer PIPES (piperazine-N, N'-bis[2-ethanesulfonic acid]) (Sigma P3768) cuyo pH se calculó según Drago et al. (2005), como se detalla más adelante. Dicho buffer permitió llevar a 6.5 \pm 0.2 el pH final del sistema luego de la doble digestión.

Luego de los 50 minutos se agregaron 6,25ml de una solución de bilis (Sigma-B-8631) – pancreatina (Sigma P-1750) (2.5% de bilis y 0.4% de pancreatina en NaHCO₃ 0.1N) y nuevamente se incubó durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la digestión, se retiraron las bolsitas, se enjuagaron con agua destilada y el dializado se trasvasó y pesó. Posteriormente se midió el contenido de Fe y Zn por espectroscopia de absorción atómica (Instrumentation Laboratory IL 551, Mass, USA).

La disponibilidad potencial de hierro se calculó como la cantidad de hierro dializado expresada como porcentaje del contenido de hierro total en la muestra:

$$DFe(\%) = (mgFe_D / mgFe_M) \times 100 \quad (6)$$

Donde:

DFe(%): Porcentaje de hierro dializado.

mg Fe_D: mg de hierro dializado.

mg Fe_M: mg de hierro en la muestra.

- De igual forma se calculó la disponibilidad potencial de zinc (DZn(%)).

a) Cálculo del pH del buffer PIPES:

- Cálculo de los equivalentes totales:

$$mEq_T = mEq_{HCl} + mEq_P + mEq_E + mEq_H \quad (7)$$

Donde:

mEq_T: mEq totales.

mEq_{HCl}: mEq de HCl = $N_{HCl} \times Vol_{HCl}$.

mEq_P: mEq de Pepsina = $N_{HCl} \times V_{adición. pepsina}$

mEq_E: mEq Endógenos

mEq_H: mEq de Hidrólisis

La determinación de los mEq endógenos se realizó midiendo la acidez titulable de la muestra. Esta medida se realiza si el pH de la muestra difiere de 6.5, titulando con NaOH 0.1N hasta pH 6.5. En las muestras de hidrolizados el valor de los mEq endógenos resultó despreciable y en los productos expandidos fue de 0.018 mEq.

Para la determinación de los equivalentes de ácido o base generados por la digestión enzimática, a 0.5g de CHB digerida con pepsina se le adicionó 6.25ml de la solución de bilis – pancreatina y se llevó hasta pH 6.5 con NaOH 0.1N. Luego se digirió durante 2 h a 37°C. Al finalizar esta digestión, se tituló con NaOH 0.1N o HCl 0.1N hasta pH 6.5. Este valor se consideró en el cálculo del pH del buffer, como los mEq generados por la hidrólisis. En esta matriz alimentaria el valor obtenido fue de 0.0198 mEq. En el caso de los productos expandidos a base de maíz, se trabajó sobre 2.5g de muestra y el valor obtenido fue de -0.05 mEq.

Se preparó una solución de buffer de 0.15N y se llevó al pH adecuado (ver cálculo del pH).

- Cálculo del pH (para buffer PIPES 0.15 N):

$$pH = -\log \left[\frac{Ka \times X}{3 - X} \right] \quad (8)$$

Donde:

$$X: \left[\frac{A \cdot 3}{A + 1} \right] - mEq_T$$

$$A: [10^{(PIPES \text{ pKa} - \text{pH final deseado})}] = 10^{(6.8 - 6.5)} = 1.995$$

mEq_T : mEq Totales.

Ka : Constante ácida de disociación del PIPES

- Preparación del buffer PIPES:

$$Peso_{PIPES} = N_{PIPES} \times V_{PIPES} \times PM_{PIPES} \times F \quad (9)$$

Donde:

$Peso_{PIPES}$: Peso del buffer PIPES en gramos.

N_{PIPES} : Normalidad del buffer PIPES.

V_L : Volumen del buffer PIPES en litros.

PM_{PIPES} : Peso molecular del PIPES (346,3g/mol)

F : Factor de conversión en mol por equivalentes.

b) Determinación de minerales totales: Para determinar la concentración de minerales (Fe y Zn), la muestra se llevó a mufla a 550°C durante 4 horas. Las cenizas fueron levantadas con 10ml de HCl 20% (v/v). El contenido de ambos minerales se determinó por espectroscopia de absorción atómica (Instrumentation Laboratory IL 551, Mass, USA).

III-g.5.2 Evaluación de actividad antioxidante:

En todos los casos, para estimar la actividad antioxidante, se utilizó el método de inhibición del radical catión ABTS⁺ propuesto por Pukalskas et al. (2002). En una primera etapa se genera el radical catión ABTS⁺, haciendo reaccionar 10ml de ácido ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-A1888) 2mM con 40µl de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 70mM. Luego se deja reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 - 17 horas. Posteriormente, se realiza una dilución del reactivo con PBS de tal manera que la absorbancia sea de 0.800 ± 0.030 y se lleva a cabo la reacción

redox entre el $ABTS^{\cdot+}$ y el agente reductor, el cual puede ser la muestra o el estándar. Al reducirse, el radical catión de color azul-verdoso ($ABTS^{\cdot+}$) se decolora. Este fenómeno es registrado a una longitud de onda de 734 nm empleando para ello un espectrofotómetro (Milton Roy-Genesys).

- **La inhibición del radical se calculó como:**

$$I = (A_{ABTS(t=0)} - A_{ABTS(m)}) / (A_{ABTS(t=0)}) \quad (10)$$

Donde:

I: tasa de Inhibición.

$A_{ABTS}(t_0)$: Absorbancia del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ a tiempo cero.

$A_{ABTS}(t_n)$: Absorbancia del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ a tiempo n .

Para estimar la **Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)**, se utilizó como estándar al Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Aldrich Chemical – 23,881-3), construyéndose una curva de Inhibición vs. Concentración de Trolox (mM), en el rango de 0 - 2,5mM. Los valores fueron registrados a los 6 minutos de iniciada la reacción redox.

a) Determinación de la actividad antioxidante del CHB y de sus hidrolizados: Se realizó una dispersión de la muestra al 5% en PBS (pH 7.4) que se agitó con vortex durante 2 minutos y luego se centrifugó. Posteriormente se descartó el precipitado y sobre el sobrenadante se determinó el contenido de proteínas mediante la técnica de Lowry et al. (1951). La actividad antioxidante se evaluó a una concentración proteica de 5mg/ml. Para medir la cinética de decoloración, se registraron los valores de absorbancia, luego de iniciada la reacción a cada minuto y durante 6 minutos.

Se hicieron regresiones matemáticas con el software OriginPro® 7.0 que ajustaron con el modelo de **BoxLucasI**, descrito por la siguiente ecuación:

$$y = a \times (1 - e^{-bt}) \quad (11)$$

Donde:

a y **b**: Parámetros de regresión y **t**: tiempo (minutos).

A partir de la regresión se obtuvieron: el valor de Inhibición máxima (I_{\max}) y la velocidad inicial ($V_{(0)}$) de reacción para cada muestra, según se describe a continuación:

$$y_{(t \rightarrow \infty)} = a = I_{\max} \quad (12)$$

$$\frac{dy}{dt} = a \times b \times e^{-bt} \longrightarrow \frac{dy}{dt}(t = 0) = a \times b = V_{(0)} \quad (13)$$

b) Determinación de la concentración de CHB y de sus hidrolizados que produce una inhibición del 50% del radical (IC_{50%}): Para ello se procedió de la misma forma que en el inciso **a)**. Se hicieron diluciones seriadas de manera de evaluar la actividad antioxidante a diferentes concentraciones proteicas, desde 1mg/ml a 15mg/ml de proteínas. La capacidad antioxidante se evaluó a los 6 minutos de reacción.

Se hicieron regresiones matemáticas que ajustaron con el modelo de **BoxLucas1**, descrito anteriormente, y que permitieron obtener el valor de **IC_{50%}**.

c) Determinación de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas a pHs: 4.5, 7.0 y 9.5: Se realizó una dispersión al 2.6% en buffer PBS (pH 7.4) de los extractos a diferentes pHs obtenidos como se describió en el punto **III-g.1.b)**. Se centrifugó a 3000xg durante 10min y al sobrenadante se le determinó el contenido de proteínas por Lowry et al. (1951). La capacidad antioxidante se evaluó a una concentración proteica de 5mg/ml a los 6 minutos de reacción. Además a dichas fracciones se le determino el tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) (ver **III-g.1.d)**)

d) Determinación de la actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración: Se realizó una dispersión de los hidrolizados liofilizados al 2.6% en PBS (pH 7.4) que se centrifugó a 3000xg durante 10min. El sobrenadante fue ultrafiltrado con el equipo de ultrafiltración: Molecular/Por® *Stirred Cell* S-43-70, empleando una membrana Molecular/Por® Cellulose Ester, cuyo cut-off fue de 5kDa. El proceso se llevó a cabo durante 150min, recolectándose aproximadamente 20ml de filtrado. A cada fracción obtenida (Inicial, Retenido: >5kDa y Permeado: <5kDa), se le determinó el contenido de proteínas por Lowry et al. (1951). La capacidad antioxidante se evaluó a una concentración proteica de 2mg/ml a los 6 minutos de reacción. Además a dichas fracciones se le determino el tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) (ver **III-g.1.d)**)

e) Determinación del contenido de aminoácidos aromáticos presentes en la fracción <5kDa obtenida por ultrafiltración: El contenido de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) presentes en la fracción de <5kDa obtenida por ultrafiltración a partir del CHB y sus hidrolizados, fue determinado a modo de *screening* espectrofotométricamente según Cole (1969), utilizándose los siguientes coeficientes de extinción y longitudes de onda para cada

aminoácido: *Triptofano*: ϵ : 5600 y λ : 280nm, *Tirosina*: ϵ : 1400 y λ : 274nm; *Fenilalanina*: ϵ : 200 y λ : 257nm.

III-h Estudio de la incorporación de hidrolizados de CHB en alimentos:

En primer lugar, se evaluó el efecto que tiene el agregado de hidrolizados del CHB en las propiedades físicas del producto expandido. Posteriormente, se evaluaron la capacidad antioxidante y la disponibilidad de minerales. Asimismo, se evaluó el producto adicionado de CHB al mismo nivel de reemplazo que los hidrolizados, como control.

III-h.1 Elaboración de los productos extrudidos: Los expandidos se elaboraron a base de sémola de maíz a la que se le agregó el concentrado de hemoglobina bovina o sus hidrolizados en un nivel de 0.5%. La elección del nivel de reemplazo se basó en ensayos previos, relativos tanto a la operatividad del extrusor como a las características sensoriales de los productos.

La obtención de los productos se hizo con un extrusor Brabender 20 DN con tornillo relación de compresión 4:1, 160 rpm, 9.3% de humedad, 175°C en el cañón y 160°C en la boquilla.

Las muestras se acondicionaron al menos 1 hora antes de cada ensayo, a los niveles de humedad establecidos, utilizando para tal fin un mezclador planetario Brabender p 600.

III-h.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de productos extrudidos:

III-h.2.1 Expansión del material extrudido: En todos los casos se midió el diámetro de los trozos de extrudidos con un calibre manual Vernier (Stronger) en 10 zonas distintas escogidas al azar. La expansión se calculó como la relación entre el diámetro promedio del extrudido y el diámetro de la boquilla según:

$$E = \frac{d}{D} \quad (14)$$

Donde:

D: Diámetro de la boquilla (3 mm).

d: Diámetro promedio del extrudido (mm).

III-h.2.2 Volumen específico: El volumen específico de las muestras extrudidas se determinó en base seca según la siguiente fórmula (González et al, 2002):

$$V_{esp} = \frac{V}{P} = \frac{(A \times L)}{P} = \frac{(d^2 \times \pi)}{4} \times \frac{L}{P} \quad (15)$$

Donde:

V_{esp} : Volumen específico (cm^3/g).

V : Volumen promedio del extrudido (cm^3) = $(A \times L)$

P : Peso promedio del extrudido (g).

A : Área promedio del extrudido (cm^2) = $(d^2 \times \pi) / 4$.

L : Longitud promedio del extrudido (cm).

III-h.2.3 Resistencia mecánica del producto: La determinación de la resistencia a la compresión de un trozo de extrudido de 6 cm de longitud se realizó utilizando una maquina universal de ensayos marca Instron modelo 4411, con una celda de carga de 500kgf y a una velocidad de compresión de 10 mm/min, de acuerdo con Park et al. (1993). Cada determinación se realizó por quintuplicado. Estos ensayos fueron realizados en los laboratorios de Química de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (Mérida–México), bajo la dirección del Dr. Luis Chel-Guerrero.

III-h.3 Evaluación de bioactividad de los productos expandidos:

III-h.3.1 Estudio del efecto promotor de los hidrolizados del CHB en la disponibilidad de minerales de los productos expandidos: Para estudiar el efecto promotor de la disponibilidad de minerales de los productos expandidos se utilizó la técnica de dializabilidad de Miller et al. (1981), modificada por Wolfgor et al. (2002). La muestra se preparó al 10% de sólidos en H_2O bidestilada. Posteriormente se prosiguió como se describió anteriormente en el punto **III-g.5.1**. Para este caso en particular el cálculo de los mEq totales se consideraron 0.05 mEq de hidrólisis básicos y 0.018 mEq endógenos ácidos.

III-h.3.2 Determinación de la actividad antioxidante de los productos expandidos: Para estimar la capacidad antioxidante, se utilizó el método de inhibición del radical catión ABTS^+ . La inhibición del radical se calculó como se describió en el punto **III-g.5.2**. Se pesaron 20mg de muestra y se le adicionó 10 μl de Buffer PBS (pH 7.4). Luego se le adicionó 990 μl de radical catión ABTS^+ diluido y se agitó con vortex durante 5 segundos. Luego se centrifugó 3min a 10.000xg en centrífuga Hermlez-160m y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 734 nm a los 6 minutos de reacción.

Para estimar la **Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)**, se utilizó como estándar al Trolox, construyéndose una curva de Inhibición vs. μmol de Trolox, en el rango de 0 – 0.025 μmol .

III-i Análisis estadísticos:

Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$) y test de LSD (Least Significant Difference) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Plus 3.0.



IV

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN



IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. Caracterización de los hidrolizados del CHB.

IV.1.a Caracterización de las materias primas:

- Determinación de la composición centesimal del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y de la harina de maíz comercial:

En la **Tabla IV.1** se muestra la composición centesimal del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y de la harina de maíz comercial. Los datos obtenidos son semejantes a los reportados en la bibliografía (Duarte et al, 1999; Senser, et al 1999).

Tabla IV.1 – Composición del CHB y de la Harina de Maíz comercial.

Composición centesimal (% en BS)	CHB (g / 100 g)	Harina de Maíz Comercial (g / 100 g)
Humedad	3,36 ± 0,02	12,15 ± 0,03
Proteínas	92,3 ± 0,3	6,9 ± 0,1
Lípidos (extracto etéreo)	0,069 ± 0,02	0,44 ± 0,02
Cenizas	2,77 ± 0,18	0,27 ± 0,05
Hierro (mg/kg)	1700	-----
Hidratos de Carbono*	-----	80,24*

X ± SD. *Determinado por diferencia.

El contenido de hierro del CHB es inferior al citado en la bibliografía (Hurrell, 1997). Esto puede deberse a que el sustrato está constituido por Hemoglobina Bovina y proteínas del plasma, como se ve en la corrida electroforética del CHB (**Figura IV.2**).

- Titulación del sustrato:

Como se puede ver en la **Figura IV.1**, el punto isoeléctrico de la proteína (CHB) estaría comprendido en un rango de pH entre 7.0 – 8.0. Este dato es semejante al informado por Njoku (2007). El conocimiento del punto isoeléctrico es un dato útil ya que puede indicar a que pH se tiene la menor solubilidad del sustrato. Lo que podría estar relacionado con una menor susceptibilidad a la hidrólisis enzimática (Cheftel et al, 1989).

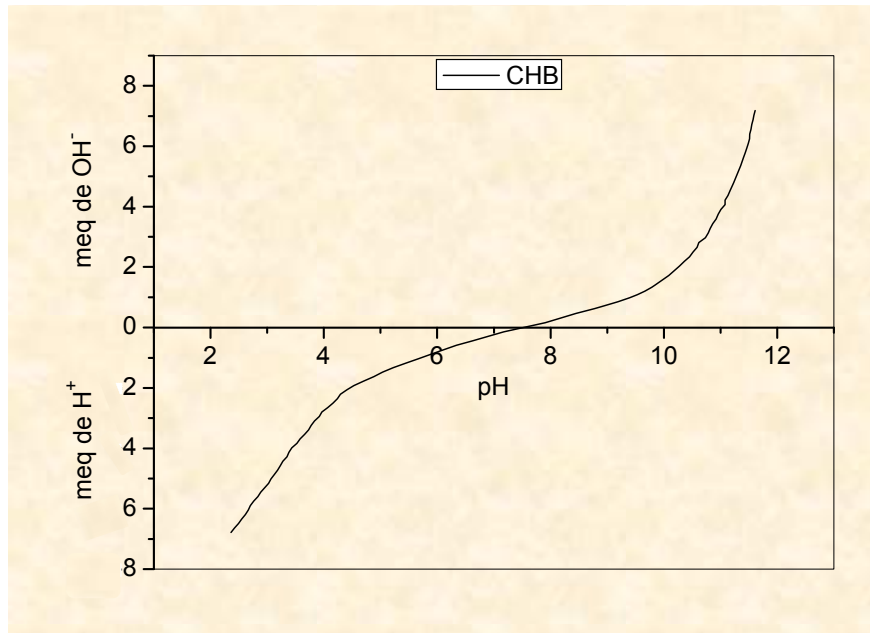


Figura IV.1 – Titulación del concentrado de hemoglobina bovina.

- Electroforesis del sustrato:

En la **Figura IV.2** se observa la electroforesis del concentrado de hemoglobina bovina y de las proteínas del plasma. Puede verse que la muestra del CHB presenta bandas de peso molecular (PM) que corresponden a las proteínas del plasma, ya que las cadenas de hemoglobina tienen un PM comprendido entre 14.4 y 20.1 kDa.

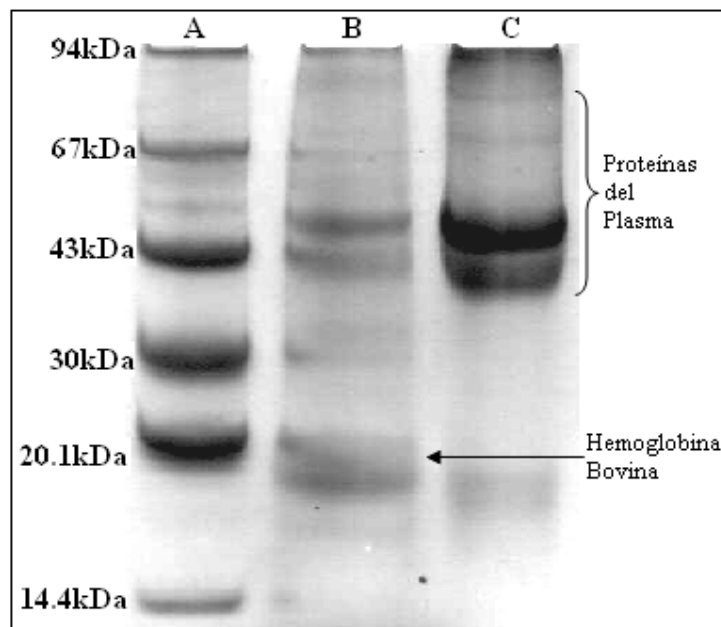


Figura IV.2 – Electroforesis SDS-PAGE. Patrón (A), Concentrado de hemoglobina bovina (B) y plasma (C).

En la **Figura IV.3** se muestra una electroforesis que utiliza un patrón con otro rango de PM donde se presenta un electroferograma de esta proteína (Liu et al, 1996) y se confirman los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

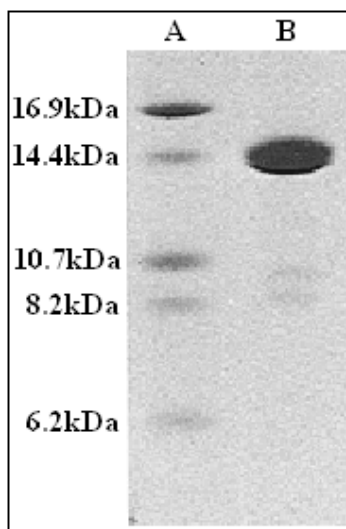


Figura IV.3 – Electroforesis SDS-PAGE-Tricina de hemoglobina bovina (B), patrón (A) (Liu et al, 1996).

IV.1.b Seguimiento de la reacción de hidrólisis:

IV.1.b.1 Determinación del Grado de Hidrólisis (GH):

En la **Figura IV.4** se muestran las curvas de hidrólisis simple para cada enzima (GH vs. tiempo), usando para el seguimiento de la reacción, la medición de aminos libres por OPA.

Como se puede observar en la **Figura IV.4**, a medida que transcurre el tiempo de reacción el grado de hidrólisis (GH) aumenta. Si bien el comportamiento de cada enzima es diferente, a las 2 horas el GH para ambas enzimas es similar. Cabe aclarar que la enzima Fungal Protease Concentrate (FC) además de poseer actividad endopeptidasa también presenta actividad exopeptidasa, lo que favorece la liberación rápida de aminoácidos, di- y tri-peptidos, y son responsables del mayor valor de GH respecto de la enzima Protex 6L (P) (actividad endopeptidasa únicamente), en etapas tempranas de la reacción.

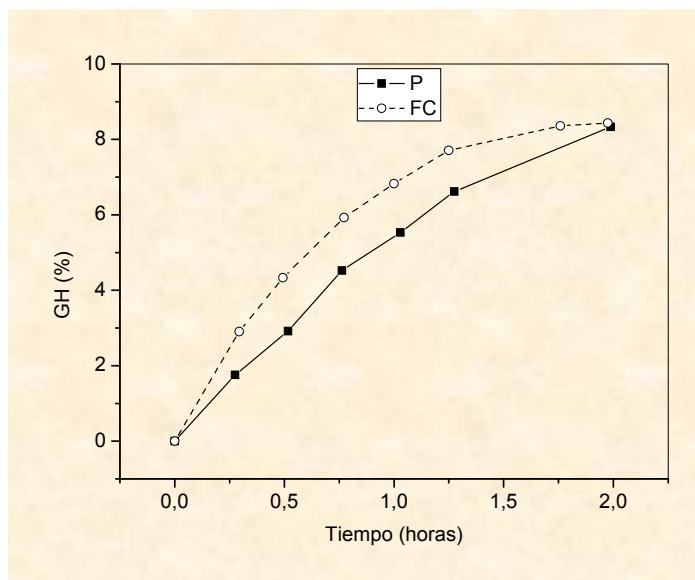


Figura IV.4 – Seguimiento de la reacción de hidrólisis simple mediante la medición de grupos aminos libres por OPA.

Como se puede apreciar en la **Tabla IV.2** la Velocidad inicial (V_0) obtenida con la enzima FC es significativamente superior ($p < 0.05$) a la hallada para la enzima P.

Tabla IV.2 – Velocidades iniciales de hidrólisis (V_0) del CHB.

Enzima	Velocidades iniciales de hidrólisis (V_0) (mEq de L-Serina/min)
FC	$0,9709 \pm 0,047^b$
P	$0,5648 \pm 0,053^a$

$X \pm SD$. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El GH obtenido para ambas hidrólisis secuenciales fue mayor al obtenido con las dos hidrólisis simples (P y FC) (**Figura IV.5**).

Los GH alcanzados en las hidrólisis secuenciales son 19.98% y 16.67% para la hidrólisis con P+F y FC+F, respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados por Chang et al. (2007), para hidrolizados de hemoglobina porcina obtenidos secuencialmente con Alcalasa (E/S: 2%, pH: 8.5; 4 horas) + Flavourzyme (E/S: 1%, pH: 7.5; 6 horas). En dicho trabajo el GH (Titulación con Formol), al cabo de las 10 horas totales de reacción fue de 13.14%. Esto indica que los sistemas P+F y FC+F poseen una mayor eficacia hidrolítica, ya que el tiempo total de proteólisis es inferior (6 horas) al del trabajo citado.

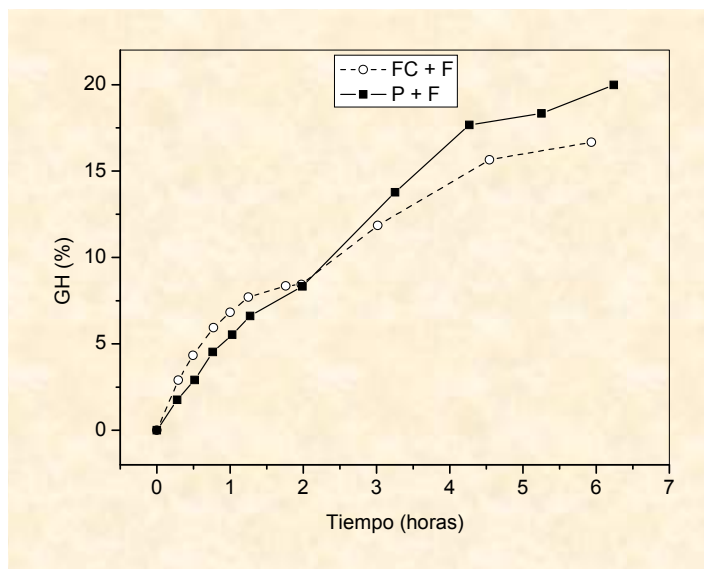


Figura IV.5 – Seguimiento de la reacción de hidrólisis secuencial llevada a cabo con las enzimas Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F), mediante la medición de aminos libres por OPA.

Cabe aclarar que el marcado incremento en el GH se debe principalmente a la acción de la enzima **Flavourzyme**, la cual está constituida por una mezcla *endopeptidasa - exopeptidasa*. Este tipo de mezclas puede hidrolizar las uniones peptídicas de una molécula proteica de manera más exhausta que una endopeptidasa solamente (In et al, 2002).

IV.1.b.2 Determinación del ITCA:

Los valores obtenidos de ITCA a los tiempos finales de cada reacción se resumen en la siguiente tabla (**Tabla IV.3**):

Tabla IV.3 – Valores de ITCA obtenidos a los tiempos finales de reacción.

Hidrolizado	ITCA (%)
P	26,87
FC	18,73
P + F	31,89
FC + F	39,10

En la **Figuras IV.6 y IV.7** se muestran las curvas de hidrólisis seguidas con el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA) para los sistemas simples y secuenciales,

respectivamente. Como se puede observar, tanto para P como para P+F hay un incremento de la solubilidad en TCA a medida que avanza la reacción. Esto implica que con el transcurso de la hidrólisis se generan cada vez mayor cantidad de péptidos solubles frente al agente precipitante, siendo de tamaño intermedios en el hidrolizado de P (endopeptidasa) y de tamaños intermedios y pequeños en el hidrolizado P+F (endopeptidasa + exopeptidasa). Sin embargo, para el caso de P+F, luego de las cuatro horas de reacción el ITCA permanece constante a pesar de que la proteólisis sigue aumentando (**Figura IV.5**). Esto podría estar relacionado con el tamaño de las especies proteicas obtenidas al cabo de ese tiempo y el método colorimétrico utilizado para estimar el ITCA (técnica de *Lowry*). Con el tiempo de reacción la enzima F degrada cada vez más las fracciones proteicas dando como producto di- y tri-peptidos, los cuales podrían no ser detectados.

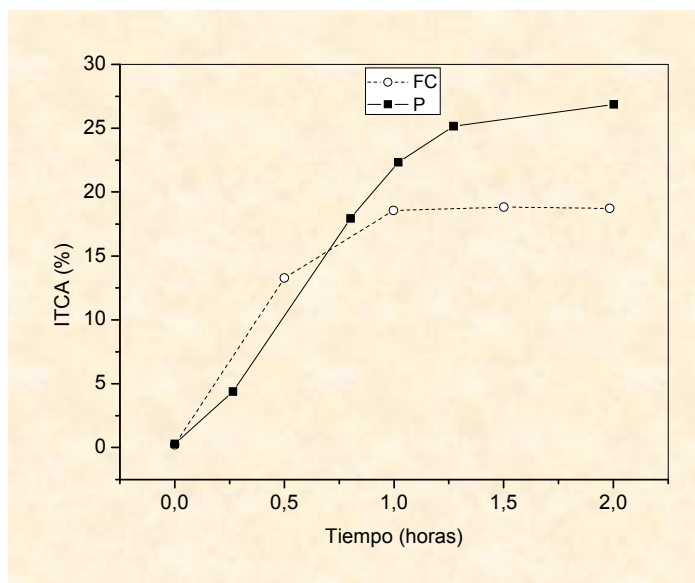


Figura IV.6 – Seguimiento de la reacción de hidrólisis simple llevada a cabo con las enzimas P y FC, mediante el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA).

En la curva de FC se puede apreciar un incremento del ITCA en la primera hora de reacción. Posteriormente, la solubilidad se modifica levemente, a pesar de que el GH sigue aumentando (**Figura IV.4**). Con el sistema FC+F ocurre algo similar, es decir el agregado de F a las 2 horas de reacción produce un gran incremento del ITCA, pero al cabo de las 3 horas de hidrólisis dicho índice permanece casi constante. Esta invariabilidad del ITCA con el tiempo, para ambos sistemas, podría estar ligada a lo que se mencionó anteriormente

para la hidrólisis de P+F (tamaño de las especies proteicas obtenidas – método de determinación del ITCA).

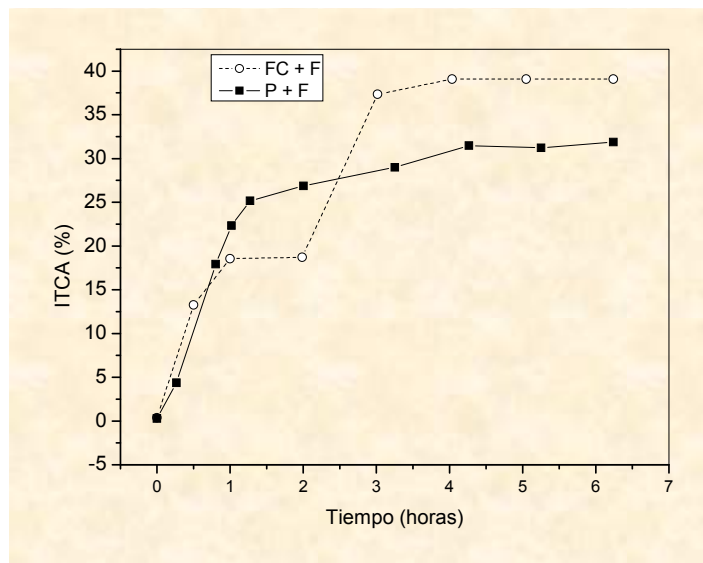


Figura IV.7 – Seguimiento de la reacción de hidrólisis secuencial llevada a cabo con las enzimas P+F y FC+F, mediante el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA).

IV.1.b.3 Relación entre los indicadores de hidrólisis:

Se pudo obtener una buena correlación entre los resultados obtenidos con las técnicas de seguimiento de la hidrólisis mediante la medición de aminos libres por OPA y el índice de solubilidad en ácido tricloroacético en todo el rango del tiempo evaluado. Siendo las ecuaciones de regresión lineal las siguientes:

$$y_P = 3,5358x + 0,4034; r^2 = 0.9631$$

$$y_{FC} = 1,8481x + 5,3587; r^2 = 0.9586$$

$$y_{P+F} = 0,4957x + 22,31; r^2 = 0.9911$$

$$y_{FC+F} = 2,2353x + 2,543; r^2 = 0.9904$$

Donde: y , es el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (ITCA), y x , el GH obtenido a partir de la medición de aminos libres por OPA.

Sin embargo, las pendientes de las rectas son diferentes, lo que indica que la sensibilidad del ITCA es distinta según la naturaleza de los péptidos generados por las distintas enzimas. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente obteniéndose la mayor sensibilidad del ITCA con los hidrolizados de P.

La hidrólisis con la enzima P transcurre en medio alcalino, por lo que también se puede seguir la reacción a través la técnica del pH-stat. Como se puede ver en la **Figura IV.8.a**,

hay una relación lineal entre el pH-stat y la medición de aminos libres por OPA. El mismo resultado fue observado por Adler-Nissen (1986), para hidrolizados de proteínas de soja obtenidos con Alcalasa 0.6L (pH: 9.5) y utilizando la técnica del TNBS para medir aminos libres.

En la **Figura IV.8.b** se muestra la relación entre el seguimiento de la hidrólisis mediante la técnica del pH-stat y el índice de solubilidad en ácido tricloroacético. Como se puede observar hubo una buena correlación entre ambos métodos (r^2 : 0.9723).

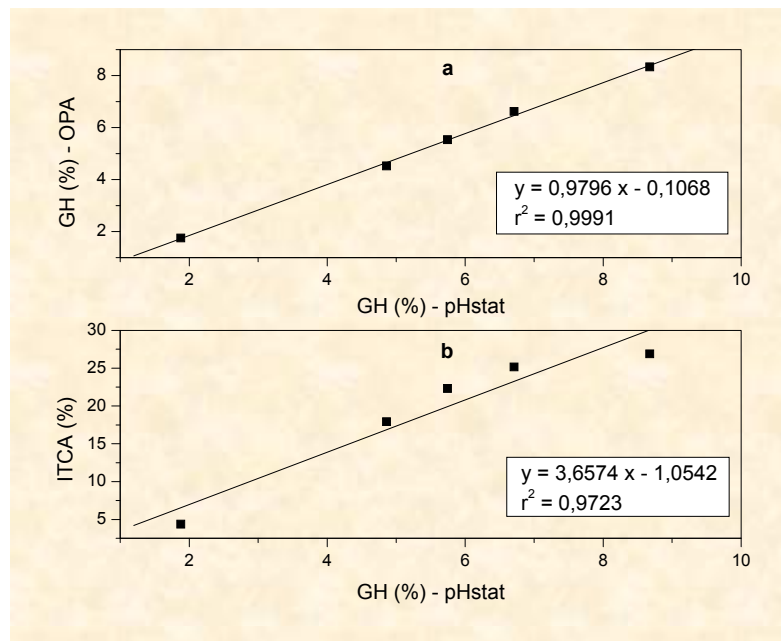


Figura IV.8 – Relación entre la técnica del pH-stat y la medición de aminos libres por OPA (a), y la técnica del pH-stat y el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (b), para la reacción de hidrólisis con la enzima P.

Esto sugiere que los péptidos formados durante las etapas iniciales de la hidrólisis sirven como sustratos para la formación de péptidos de menor tamaño. Este resultado coincide con lo reportado por Kong et al. (2007), para hidrolizados de gluten de trigo y utilizando como enzima Alcalasa 2.4L. En dicho trabajo el coeficiente de correlación entre ambos parámetros fue de r^2 : **0.9843**.

IV.1.b.4 Electroforesis SDS-PAGE de las reacciones de hidrólisis:

En las **Figuras IV.9 y IV.10** se muestran las electroforesis de los distintos tiempos de hidrólisis para FC y P, respectivamente.

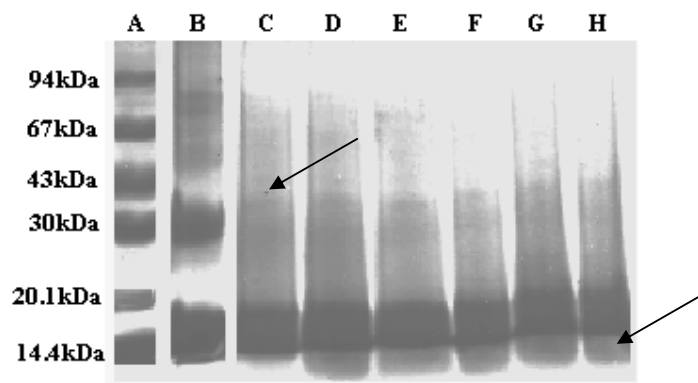


Figura IV.9 – Electroforesis SDS-PAGE de la reacción de hidrólisis de FC. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos e inactivadas en SDS 5% a 85°C. Patrón (A), 0min (B), 15min (C), 30min (D), 60min (E), 75min (F), 90min (G) y 120min (H).

En el caso de la hidrólisis con FC, luego de 15 minutos de reacción desaparecen las bandas correspondientes a las proteínas del plasma. A su vez, se puede apreciar una reducción de la banda de hemoglobina y la aparición de componentes de PM inferior a los 14.4k Da (productos de degradación).

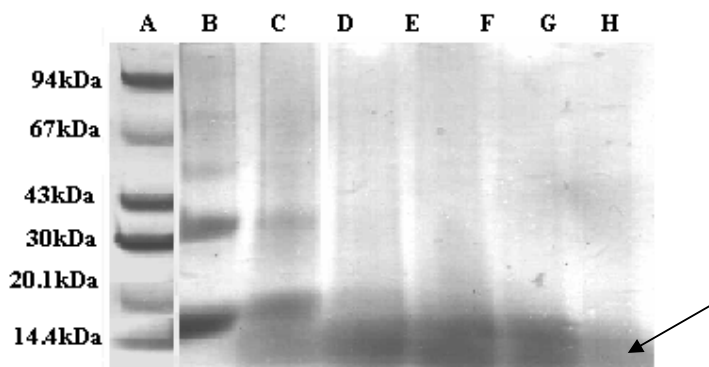


Figura IV.10 – Electroforesis SDS-PAGE de la reacción de hidrólisis de P. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos e inactivadas en SDS 5% a 85°C. Patrón (A), 0min (B), 15min (C), 60min (D), 75min (E), 90min (F) y 120min (G).

Para P, a 60 minutos de reacción ya no se observan las bandas correspondientes a las fracciones de proteínas plasmáticas. A diferencia de lo visto para FC, hay una degradación más efectiva de la hemoglobina bovina, lo que se manifiesta en el gel como la desaparición progresiva de la banda correspondiente a la hemoproteína. Además, se puede observar que a partir de los 15 minutos de reacción comienzan a aparecer componentes de bajo PM (menores a 14.4 kDa) como consecuencia de la proteólisis.

Para el caso de la hidrólisis secuencial FC+F (**Figura IV.11**) se vio una notable degradación de las bandas correspondientes a las proteínas del plasma y de la hemoglobina bovina. Lo mismo se observó para P+F (no se muestra la electroforesis). Sin embargo, la hidrólisis de la hemoglobina no es total, ya que se observa la banda característica a las 6 horas de hidrólisis.

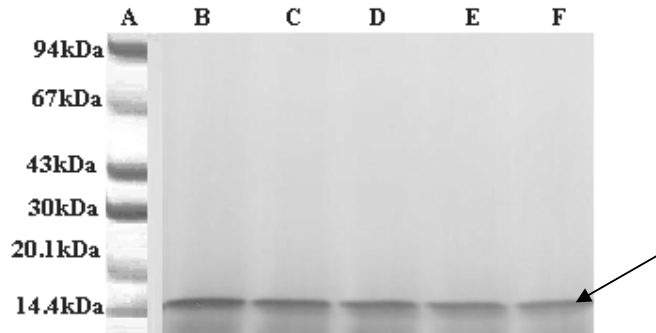


Figura IV.11 – Electroforesis SDS-PAGE de la reacción de hidrólisis de FC+F. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos e inactivadas en SDS 5% a 85°C. Patrón (A), 2 horas (B), 3 horas (C), 4 horas (D), 5 horas (E) y 6 horas (F).

IV.1.c Caracterización de los hidrolizados:

IV.1.c.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC):

En las **Figura IV.12**, **IV.13** y **IV.14**, se muestran las calorimetrías diferencial de barrido del CHB, de los hidrolizados de P y FC, y de los hidrolizados de P+F y FC+F, respectivamente.

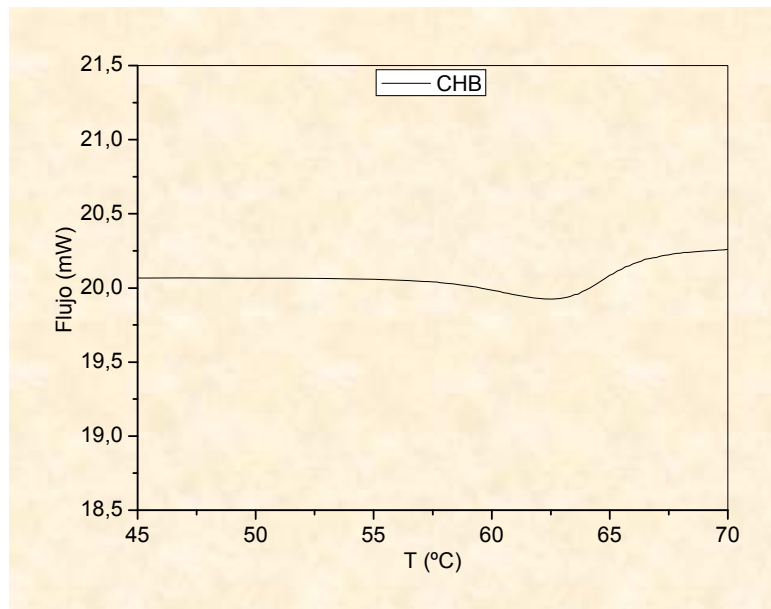


Figura IV.12 – Calorimetría diferencial de barrido del concentrado de hemoglobina bovina.

Como se puede observar en la **Figura IV.12** el pico de desnaturalización del CHB a pH 7.0 se corresponde a una temperatura de desplegamiento de $63.0^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (Td). Dicho valor se condice con los resultados reportados por Michnik et al. (2005), para hemoglobina bovina. Por otra parte se realizó un DSC al plasma solamente y se observó que el pico de desnaturalización obtenido coincidió con el del CHB (datos no mostrados).

En la **Tabla IV.4** se muestran los valores de la temperatura de desnaturalización del CHB a distintos pH, correspondientes a los tiempos cero de hidrólisis de las enzimas y pH neutro. En los termogramas del sustrato se observó un corrimiento del pico de desnaturalización en función del pH de reacción de hidrólisis, y consecuentemente se obtuvieron valores de temperatura de desplegamiento significativamente diferentes, pero que están comprendidas en el rango característico de la hemoglobina bovina (Suryaprakash et al, 2001).

Tabla IV.4 – Temperatura de desnaturalización del CHB en función del pH.

pH del Sustrato	Temperatura de desnaturalización ($^{\circ}\text{C}$) (Td)
4.5	$73,2 \pm 0,8^c$
7.0	$63,0 \pm 0,3^a$
9.5	$65,7 \pm 0,3^b$

X \pm SD. Valores con diferentes letras indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

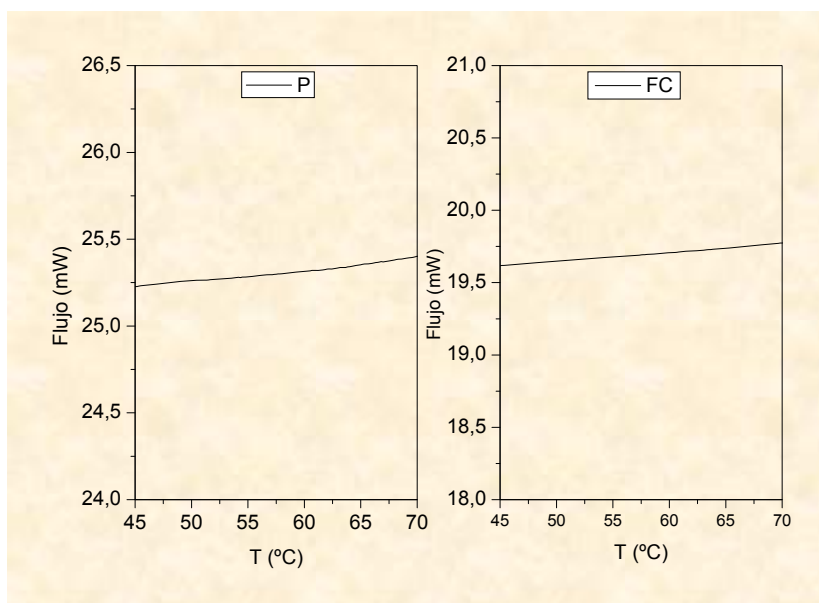


Figura IV.13 – Calorimetría diferencial de barrido del hidrolizado de P y FC.

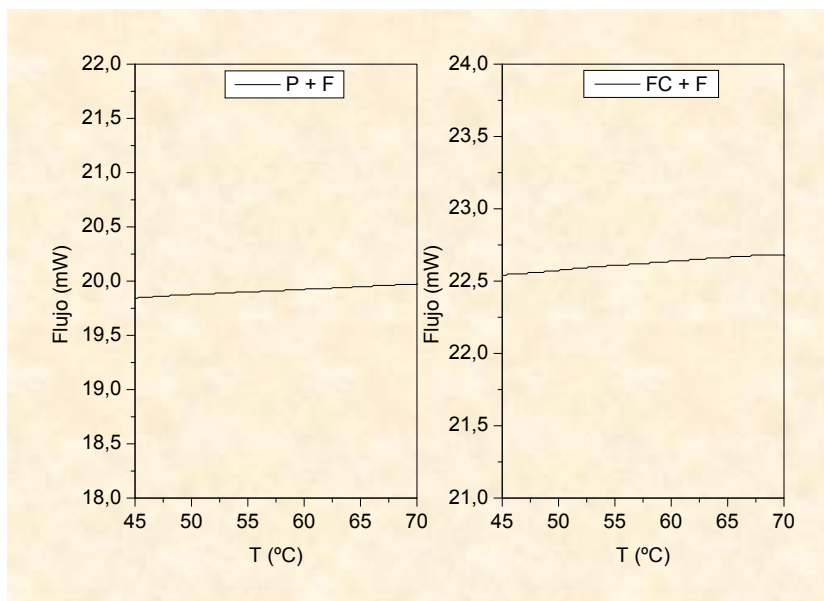


Figura IV.14 – Calorimetría diferencial de barrido del hidrolizado de P+F y FC+F.

Como se puede ver en los termogramas de los hidrolizados (**Figuras IV.13 y IV.14**) el pico de desnaturalización que aparece en el CHB no está presente. Esta diferencia, respecto del termograma de la proteína nativa, puede deberse a la hidrólisis enzimática y/o a la inactivación térmica de la enzima post-proceso. En el primer caso, la enzima rompe las uniones peptídicas, lo que produce cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. Estos cambios modifican la reacción de desnaturalización térmica de la molécula proteica hidrolizada, lo que se ve como una ausencia de picos de desnaturalización (Molina Ortiz et al, 2001). Además, cuando se lleva a cabo la inactivación enzimática se alcanzan temperaturas superiores a 80°C lo que podría conducir a la desnaturalización del sustrato, siendo esta condición la causa más probable de pérdida del pico. Por otro lado, con los termogramas de la hemoglobina sin hidrolizar a los distintos pH se confirmó que no es el pH el responsable de la pérdida del pico endotérmico.

IV.1.c.2 Solubilidad:

Como se observa en la **Figura IV.15**, el CHB presentó menor solubilidad a pH 7.0 que a los otros pH evaluados. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de dicha proteína se encuentra en el rango de pH neutro. Bajo esas condiciones, la molécula carece de carga neta y por lo tanto su interacción con el solvente es muy débil, lo que se evidencia como una baja solubilidad. Sin embargo, a pHs superiores o inferiores al punto isoeléctrico la proteína adquiere cargas netas negativas o positivas y las moléculas de agua reaccionan con ellas, contribuyendo así a

su solubilización, lo que se ve reflejado tanto a pH 4.5 como 9.5. Además, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienen tendencia a repelerse y por tanto a disociarse y desdoblarse, lo que favorece aún más la solubilización, ya que se impide la agregación (Cheftel et al, 1989).

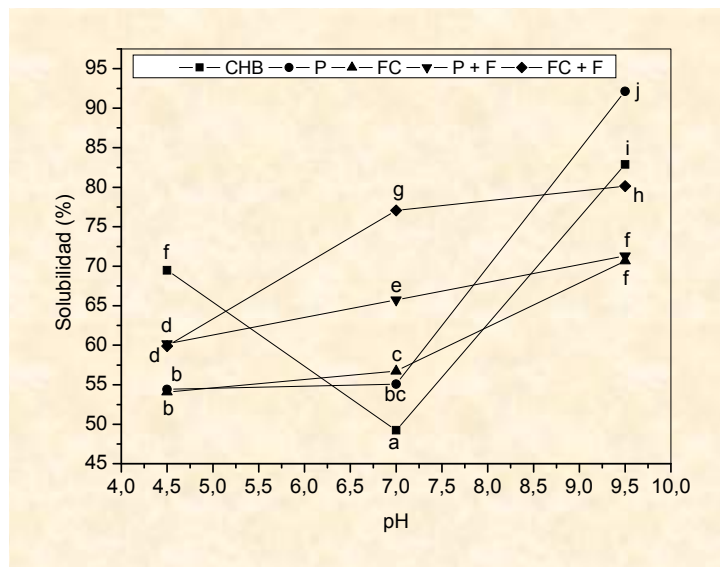


Figura IV.15 – Determinación del porcentaje de solubilidad a pH 4.5, 7.0 y 9.5 al concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Los puntos con diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

Para los hidrolizados, el aumento de solubilidad respecto al CHB dependió del pH evaluado, pero en todos los casos la solubilidad a pH 7.0 fue significativamente mayor que para el CHB. Esto puede deberse a que la proteólisis favorece la exposición de grupos polares del sustrato, antes ocultos, y a la generación de componentes de menor peso molecular, lo que incrementa la solubilización de las diferentes especies proteicas (Kabirullah & Wills, 1981; Puski, 1975).

A pH 4.5 se observó una disminución significativa en la solubilidad de todos los hidrolizados respecto del CHB. La precipitación de los péptidos presentes en los hidrolizados del CHB a pH 4.5 podría implicar que el punto isoeléctrico medio de las fracciones peptídicas generadas es diferente al de la proteína nativa y cercano a este pH. Estas fracciones al precipitar arrastran consigo al grupo hemo cuya solubilidad a pH ácido depende directamente de las interacciones hemo – péptidos (ver IV.1.c.3.b)). Diferentes autores han observado estos fenómenos y los han explicado como una disminución de la

carga de los péptidos y la formación de interacciones hidrofóbicas (Liu et al, 1996; Léonil et al, 1994; Ericsson, 1981; Margalit & Rotenberg, 1984). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lebrun et al. (1998), para hidrolizados de hemoglobina bovina, el cual observo una disminución de solubilidad a pH 5.5 (pI medio peptídico). Cabe agregar que los hidrolizados sufren un tratamiento térmico adicional respecto del CHB, cuando las enzimas son inactivadas (Temperatura: > 80°C y tiempo: > 5 minutos, ver Tabla III.2), lo que puede contribuir con la disminución de la solubilidad (Toldrá et al, 2004).

A pH 9.5, la solubilidad del hidrolizado de P fue significativamente mayor respecto de los demás hidrolizados y el CHB, lo que podría estar relacionado al pH de hidrólisis de la enzima, alcanzándose mayor valor al pH donde se efectúa la hidrólisis. Sin embargo, para las hidrólisis secuenciales la solubilidad fue significativamente inferior respecto del sustrato. Esto puede deberse a que la hidrólisis con la enzima F transcurre a pH 7.0. A este pH se podrían formar agregados que luego no se solubilizarían durante el ensayo de solubilidad a pH 9.5 (Toldrá et al, 2004).

IV.1.c.3 Evaluación de los extractos obtenidos a distintos pHs a partir de los hidrolizados y del sustrato:

a) Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL):

En la **Figura IV.16** se puede observar el valor de PCL de los extractos obtenidos a los distintos pH para cada muestra. Se debe destacar que esta es una medida media del tamaño y que enmascara la verdadera distribución de tamaños peptídicos.

Tanto para el CHB como para sus hidrolizados no hubo variación significativa del PCL respecto del pH evaluado, para una misma muestra. Es decir el PCL permanece invariable con el pH. Además se puede ver que las fracciones de los hidrolizados de P y FC poseen péptidos de tamaños promedios mayores a los obtenidos para los sistemas secuenciales (P+F y FC+F). Esto es lógico ya que la enzima F promueve la liberación de di- y tri- péptidos, además de los aminoácidos libres, lo que contribuye con la disminución del PCL (%) (Chang et al, 2007). Otros autores también han reportado valores similares de PCL (%) para hidrolizados obtenidos secuencialmente a partir de distintos tipos de sustratos proteicos. Tal es el caso de Sakanaka et al. (2004), quienes hallaron un valor de PCL de 2.6 para hidrolizados de proteínas de yema de huevo obtenidos con Alcalasa + Exopeptidasa durante 6 horas de reacción.

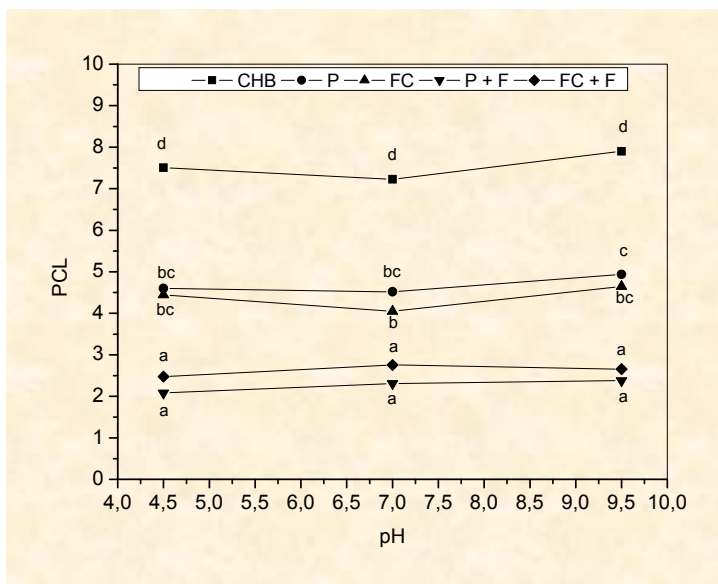


Figura IV.16 – Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) a pH 4.5, 7.0 y 9.5 para el concentrado de hemoglobina bovina y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Los puntos con diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

b) Determinación del contenido de hierro en los extractos obtenidos a distintos pHs:

En la **Figura IV.17** se muestra el porcentaje de Fe extraído al realizar el fraccionamiento por pH.

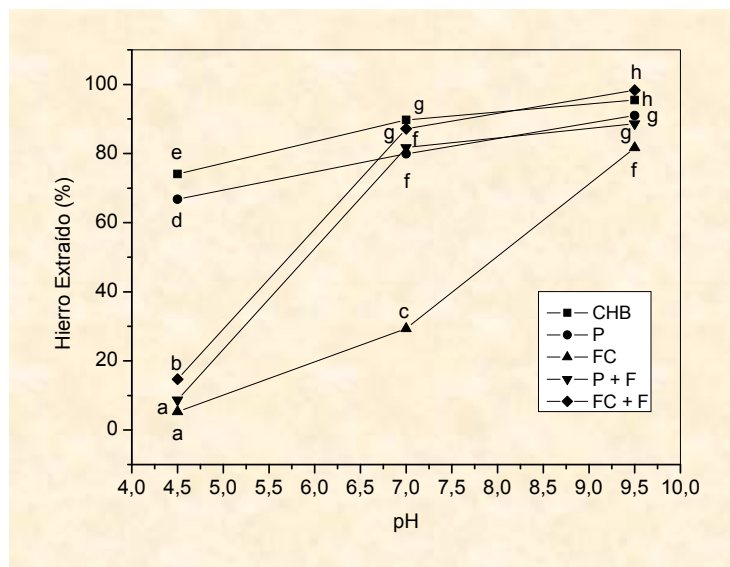


Figura IV.17 – Hierro extraído (%) a pH 4.5, 7.0 y 9.5 para el concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

A medida que el pH de extracción aumenta, la proporción de hierro extraído se incrementa significativamente en todas las muestras. Sin embargo, el CHB presentó los mayores porcentajes de Fe extraído a todos los pHs (con excepción del hidrolizado FC+F a pH 7.0 y 9.5, que presentó a esos pH el mismo porcentaje). Durante la hidrólisis de la hemoglobina bovina puede ocurrir la polimerización del grupo hemo. Estos polímeros pueden permanecer solubles o no dependiendo del pH (Lebrun et al, 1998) y además su solubilidad está influenciada por la naturaleza de las fracciones peptídicas generadas durante el proceso de hidrólisis (Vaghefi et al, 2002).

A pH 9.5 se extrae la mayor proporción de hierro, independientemente del tipo de muestra. Esto se debe a que a pHs superiores a 8.0 los polímeros del grupo hemo son solubles, independientemente de las interacciones proteicas que puedan tener lugar (Lebrun et al, 1998). Por el contrario, conforme el pH disminuye (menor a 8.0) la solubilidad de este grupo prostético se torna muy dependiente de las asociaciones hemo – péptidos, lo que se ve reflejado a pH 4.5, donde se obtiene el menor valor de hierro extraído. Adicionalmente, se debe tener en cuenta el tamaño peptídico de las diferentes fracciones generadas, ya que cuanto mayor es la proteólisis (mayor GH), menor es el tamaño de las especies proteicas y más débil se tornan las interacciones hemo – péptidos, ya que los péptidos pequeños generados no alcanzan a evitar la polimerización de los grupos hemo (Vaghefi et al, 2002). Esto se ve claramente a pH 4.5 para los hidrolizados FC+F y P+F, donde se obtienen valores muy bajos de hierro extraído, lo que quiere decir que al haber una mayor hidrólisis las interacciones hemo – péptidos se ven debilitadas y por consiguiente polimeriza y precipita el grupo hemo.

La influencia del pH sobre el contenido de hierro extraído para el hidrolizado FC es diferente que para las otras muestras, presentando el porcentaje de Fe extraído más bajo a pH 7.0. Esto podría deberse a que la hidrólisis transcurre a pH ácido y el hemo polimerizado durante el proceso, permanecería insoluble en los ensayos de solubilidad posteriores, solubilizándose en mayor medida a pH alcalinos.

c) Relación hierro / proteína soluble de los extractos obtenidos a distintos pHs:

En la **Figura IV.18** se muestra la relación entre el contenido de Fe (mg) y la proteína soluble para cada extracto obtenido a distintos pHs. Como se puede ver la mayor relación *Fe/proteína soluble* se correspondió al extracto del CHB obtenido a pH 7.0. Esto quiere decir que bajo estas condiciones de pH, el sustrato sin hidrolizar mantiene en

solución al hierro hemínico en forma más eficiente que los hidrolizados obtenidos a partir de este.

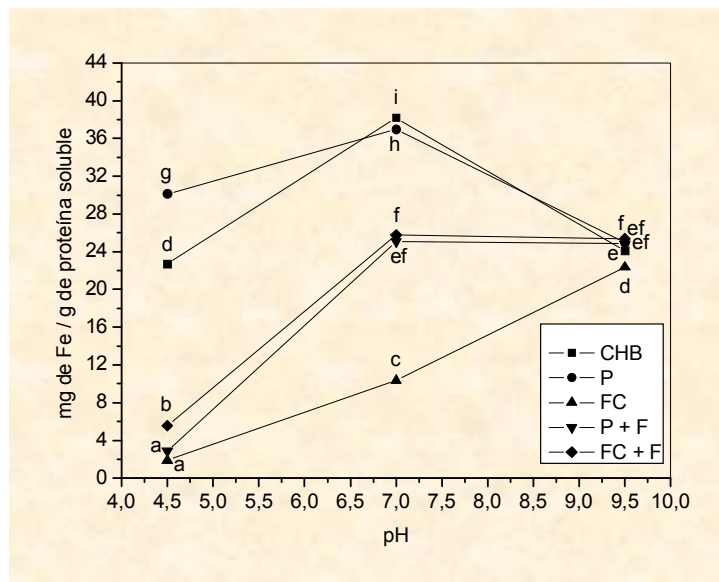


Figura IV.18 – Relación entre el contenido de Fe (mg) y la proteína soluble (g) a pH 4.5, 7.0 y 9.5 para el concentrado de hemoglobina bovina y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Los puntos con diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

No obstante se debe destacar que con el hidrolizado P se logró obtener una elevada relación $Fe/proteína\ soluble$, lo que haría pensar que sus especies proteicas tienen la habilidad de mantener al hierro hemínico en solución. Esto último se puede ver mas claramente a pH 4.5, en donde la mayor relación $Fe/proteína\ soluble$ se corresponde a dicho hidrolizado. De esta manera las fracciones peptídicas generadas durante la proteólisis logran mantener al grupo hemo en solución evitando que polimerice y que precipite como consecuencia del pH ácido, dando como resultado una fracción proteica rica en hierro hemínico. Esto último se puede comprobar al observar el color de dicho extracto y compararlo con el de los demás hidrolizados para el mismo valor de pH (4.5) (**Figura IV.19**).

Para los demás hidrolizados a pH 4.5 no fue posible concentrar el Fe hemínico, lo que hace suponer que los péptidos generados no son capaces de solubilizar al grupo hemo a pH ácido.



Figura IV.19 – Foto de los extractos liofilizados obtenidos a partir de los distintos hidrolizados (P, FC, P+F y FC+F), a pH 4.5.

d) Determinación del color de los extractos a distintos pHs y del hidrolizado total:

El análisis de color de los extractos obtenidos a distintos pHs (4.5, 7.0 y 9.5) se realizó en base al espacio de color definido por la norma CIE (Comisión International d'Eclairage): plano cromático de coordenadas a^* (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes) y plano cromático de coordenadas b^* (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), situándose perpendicular a ellos el eje L^* (luminosidad) (**Figura IV.20**).

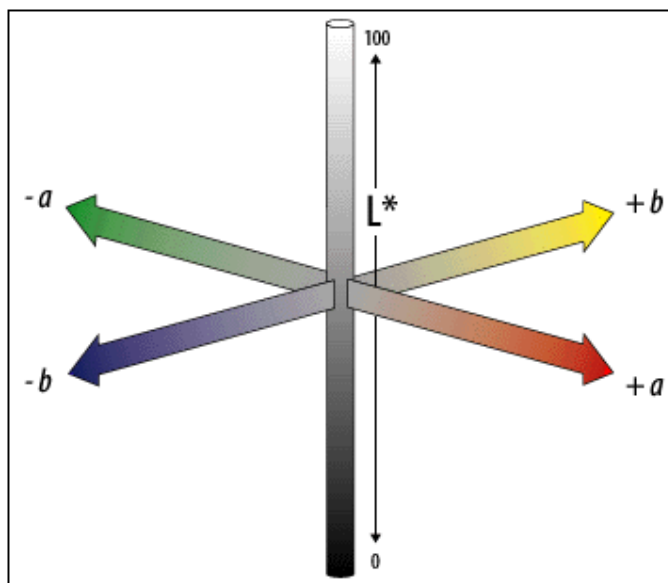


Figura IV.20 – Diagrama de Hunter, donde L^* corresponde a la claridad (negro - blanco), a^* y b^* a la cromaticidad (a^* : rojo-verde; b^* : amarillo – azul) (Calvo & Durán, 1997).

En la presente tesis solo se obtuvieron valores positivos tanto de a^* como de b^* . Por lo tanto el color de los diferentes extractos vario de rojo a amarillo en sus distintas tonalidades. Por otra parte, los valores de L^* fueron desde 24 hasta 70.

A partir de a^* y b^* se cálculo C^* (Croma: saturación del color) y h (ángulo *Hue*: tono del color) mediante un sistema de coordenadas cilíndricas (**Figura IV.21**). El cromatismo representa el módulo o longitud del vector y el ángulo *Hue* la rotación del mismo. Cuanto mayor es el valor de C^* más saturado son los colores, es decir más separados se encuentran del centro del gráfico. Por otro lado un valor de h de 90° representa un tono amarillo, mientras que objetos con valores de h menores tienden a tonos más naranjas o incluso rojos (para a^* y b^* positivos) (Gnanasekharan et al, 1992).

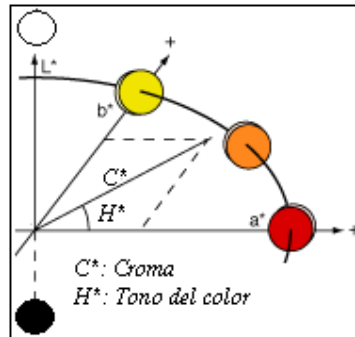


Figura IV.21 – Determinación de C^* y h a partir de los parámetros a^* y b^* , empleando un sistema de coordenadas cilíndricas (Calvo & Durán, 1997).

En la **Tabla IV.5** se muestran los valores de L^* , b^* , a^* , h y C^* ; de los distintos extractos (4.5, 7.0 y 9.5) obtenidos a partir del concentrado de hemoglobina bovina y sus hidrolizados.

Tabla IV.5 – Valores de L^* , b^* , a^* , h y C^* ; obtenidos para cada extracto.

Extractos	L^*	b^*	a^*	h	C^*
CHB 4,5	$25,1 \pm 0,6^b$	$4,6 \pm 0,1^c$	$8,2 \pm 0,2^j$	$29,1 \pm 0,3^e$	$9,4 \pm 0,2^{bc}$
CHB 7,0	$26,6 \pm 0,1^c$	$5,0 \pm 0,2^c$	$9,5 \pm 0,1^k$	$27,4 \pm 0,8^g$	$10,8 \pm 0,1^b$
CHB 9,5	$24,6 \pm 0,6^b$	$3,5 \pm 0,7^b$	$6,1 \pm 0,1^f$	$29,9 \pm 0,5^c$	$7,0 \pm 0,2^c$
P 4,5	$33,2 \pm 0,1^g$	$9,0 \pm 0,2^g$	$4,8 \pm 0,1^d$	$61,9 \pm 0,3^f$	$10,2 \pm 0,2^j$
P 7,0	$27,4 \pm 0,5^d$	$5,6 \pm 0,1^d$	$5,5 \pm 0,1^e$	$45,5 \pm 1,4^d$	$7,8 \pm 0,1^f$
P 9,5	$26,6 \pm 0,1^c$	$4,6 \pm 0,6^c$	$3,5 \pm 0,1^c$	$52,7 \pm 0,4^b$	$5,8 \pm 0,5^h$
FC 4,5	$68,4 \pm 0,1^k$	$22,1 \pm 0,1^j$	$3,6 \pm 0,1^c$	$80,7 \pm 0,1^j$	$22,4 \pm 0,1^e$
FC 7,0	$43,3 \pm 0,1^h$	$18,1 \pm 0,1^h$	$12 \pm 0,1^m$	$57,5 \pm 0,3^i$	$21,5 \pm 0,1^i$
FC 9,5	$29,9 \pm 0,1^f$	$7,9 \pm 0,13^f$	$6,9 \pm 0,1^h$	$49,0 \pm 0,4^{fg}$	$10,5 \pm 0,1^g$
P+F 4,5	$45,8 \pm 0,1^i$	$21,4 \pm 0,2^i$	$5,5 \pm 0,1^e$	$75,5 \pm 0,1^j$	$22,1 \pm 0,2^k$
P+F 7,0	$28,4 \pm 0,1^c$	$9,5 \pm 0,1^g$	$10,1 \pm 0,1^l$	$43,1 \pm 0,3^h$	$13,9 \pm 0,1^e$
P+F 9,5	$25,2 \pm 0,2^b$	$1,0 \pm 0,1^a$	$2,4 \pm 0,1^a$	$23,3 \pm 1,9^a$	$2,6 \pm 0,1^a$

FC+F 4,5	63,1 ± 0,4^j	24,8 ± 0,1^k	2,8 ± 0,1^b	83,6 ± 0,4^k	25,0 ± 0,1^m
FC+F 7,0	27,5 ± 0,1 ^d	6,3 ± 0,2 ^e	8,7 ± 0,1 ^j	36,0 ± 0,5 ^g	10,7 ± 0,1 ^d
FC+F 9,5	23,8 ± 0,1 ^a	4,7 ± 0,4 ^c	6,4 ± 0,1 ^g	36,1 ± 2,1 ^d	7,9 ± 0,3 ^d

X ± SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En general, los valores más altos de L^* , b^* , h y C^* ; se correspondieron con los extractos FC 4.5 y FC+F 4.5; mientras que los más bajos con los extractos P+F 9.5 y CHB 9.5. Esto se relaciona con el hecho de que las muestras FC 4.5 y FC+F 4.5 tienden a ser amarillas claras. Por el contrario para el caso de P+F 9.5 y CHB 9.5 el color de las muestras tiende a ser un rojizo-amarronado oscuro. Cabe aclarar que en este caso el valor de C^* es bajo, lo que indica que si bien las muestras poseen un color en la gama de los marrones el mismo es muy difuso.

En las **Figuras IV.22 y IV.23** se representan los valores de h a partir de los parámetros a^* y b^* , de los extractos obtenidos a pH 4.5 y 9.5 respectivamente.

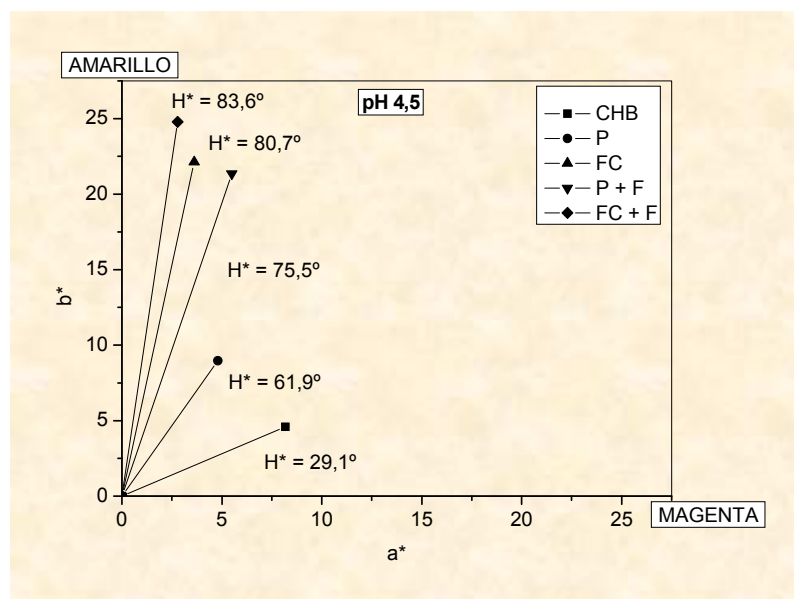


Figura IV.22 – Representación de h a partir de los parámetros a^* y b^* , de los extractos obtenidos a pH 4.5 a partir del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y sus hidrolizados: Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F), empleando un sistema de coordenadas cilíndricas.

Se puede ver de forma gráfica que a pH ácido las muestras en general tienden al amarillo, ya que los vectores se aproximan al eje b^* , siendo h cercano a 90° . Sin embargo cuando el pH aumenta (9.5), los valores de h en general son menores a 45° . Por lo tanto las muestras en general poseen un color rojizo-amarronado el cual esta asociado, entre otros

factores, con la presencia de metahemoglobina en las muestras. Dicha molécula se genera como consecuencia de la oxidación de la oxihemoglobina debido a una exposición prolongada al medio ambiente (Berwal & Novakofski, 1999).

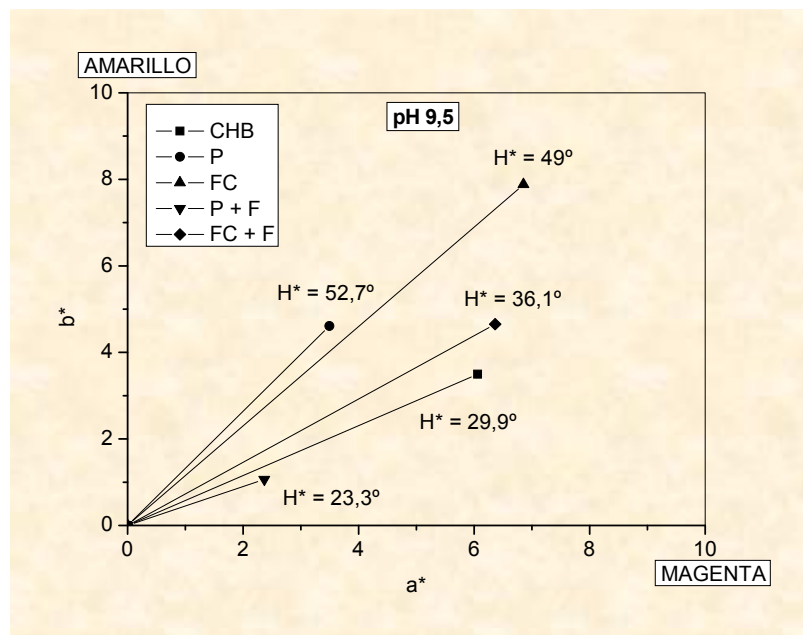


Figura IV.23 – Representación de h a partir de los parámetros a^* y b^* , de los extractos obtenidos a pH 9.5 a partir del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y sus hidrolizados: Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F), empleando un sistema de coordenadas cilíndricas.

En base a estos resultados se puede decir que los diferentes parámetros de color, determinados a partir de los distintos extractos, varían según el pH de extracción. En general, a pHs alcalinos se obtienen muestras más oscuras y amarronadas, mientras que a pH ácido las muestras adquieren un color amarillento.

Esta relación *color* – *pH* podría asociarse con el contenido de Fe presente en cada extracto. Como se mencionó anteriormente en el punto **IV.1.c.3.b)**, la variación del contenido de Fe de los diferentes extractos está ligada principalmente al pH de extracción (4.5, 7.0 o 9.5). Cuanto mayor es el pH de extracción más alto es el contenido de Fe (ppm) extraído (**Figura IV.17**). Ya que a que a pHs superiores a 8.0 los polímeros del grupo hemo son solubles (Lebrun et al, 1998). Sin embargo, conforme el pH baja la solubilidad de este grupo prostético disminuye ya que se torna muy dependiente de las asociaciones hemo – péptidos. Por lo tanto, a pHs alcalinos hay una alta proporción de hierro hemínico presente en la muestra lo que conduce a bajos valores de L^* , b^* y h, presentando colores amarronados. Mientras que en general a pHs ácidos, los valores de L^* , b^* y h son altos

porque los niveles de hierro hemínico soluble son muy bajos y la muestra es más amarillenta. Esto se ve reflejado en la **Figura IV.24** donde se muestra que la relación entre los parámetros L^* y b^* con el contenido de hierro (ppm) presente en cada extracto es lineal, siendo los valores de regresión 0.9813 y 0.9773, para L^* y b^* respectivamente.

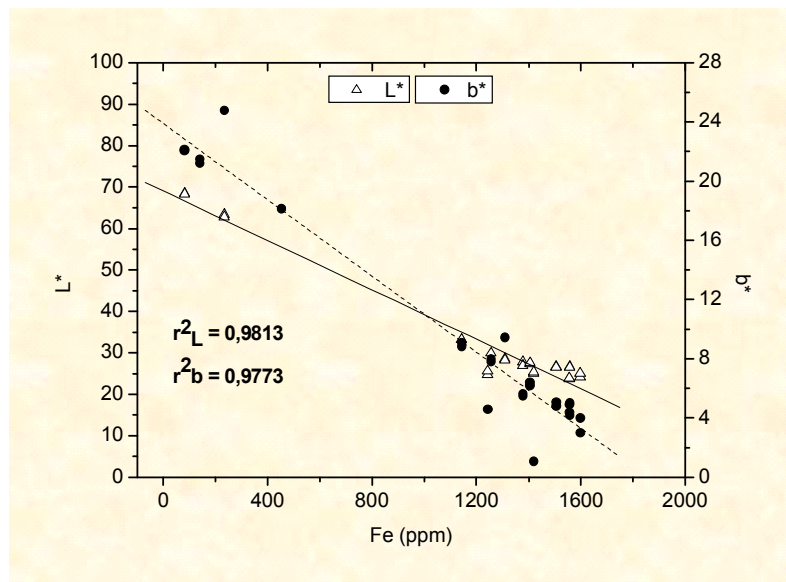


Figura IV.24 – Relación entre los parámetros L^* y b^* con el contenido de hierro total (ppm) de los extractos a distintos pHs (4.5, 7.0 y 9.5) obtenidos a partir del concentrado de hemoglobina bovina y sus hidrolizados (P, P+F, FC y FC+F).

A medida que aumenta el contenido de hierro en los extractos disminuye el parámetro L^* , lo que indica que las muestras tienden a ser más oscuras. También se puede ver que a menor concentración de Fe, mayor es el parámetro b^* , es decir las muestras tienden a ser más amarillas. Esto se condice con lo reportado por Martínez Graciá. (2000), para alimentos fortificados con concentrados de hierro hemínico porcino. En dicho trabajo se observó que la adición de hierro hemínico porcino disminuía los valores de b^* , h y C^* , respecto del control sin fortificar.

Además se debe tener en cuenta que el estado de oxidación del Fe también está relacionado con el pH del medio (Gallais, 1950). Consecuentemente, los cambios en el pH, modifican el estado de oxidación del Fe y el color del extracto y por lo tanto inducen cambios en el valor L^* y b^* .

e) Mecanismos de hidrólisis:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se presenta el siguiente esquema para explicar el comportamiento de las muestras (**Figura IV.25**).

Los hidrolizados de P estarían formados por componentes típicos del mecanismo de acción de la enzima tipo cremallera (*zipper*), en donde las moléculas de proteína nativa son rápidamente convertidas en el producto intermediario, el cual es lentamente degradado a productos finales. En las condiciones de pH y temperatura utilizadas en la hidrólisis con la enzima P, la estructura proteica del sustrato se desestabilizaría y dejaría más enlaces peptídicos expuestos, dando lugar a varios productos intermedios, por lo que la mezcla de reacción está compuesta por productos intermedios y finales. Estas especies de tamaño intermedio interaccionarían fuertemente con el grupo hemo evitando su polimerización y favoreciendo su solubilización en medio acuoso, sobre todo a pH ácido.

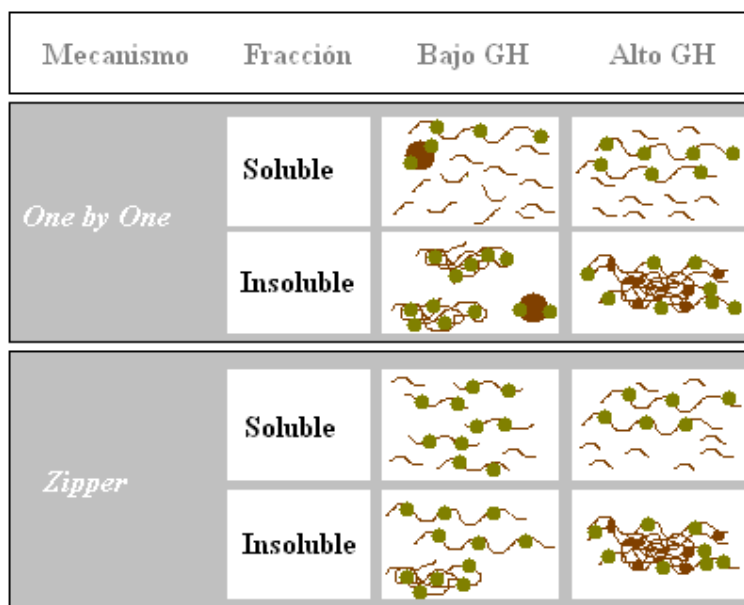


Figura IV.25 – Esquema de la composición de la mezcla de reacción de hidrolizados obtenidos por mecanismos puros de hidrólisis. ●: proteína nativa, ●: grupo hemo, ~: proteína desnaturizada, ~: péptidos de diferente longitud, ~: proteínas irreversiblemente desnaturizadas. ~: residuo insoluble (Adler-Nissen, 1976).

Para FC el hidrolizado estaría formado por componentes presentes cuando el mecanismo de hidrólisis es uno a uno (*one by one*) no siendo posible identificar cantidades apreciables de productos intermedios, ya que las moléculas se hidrolizan una por una para dar productos. En este caso la mezcla de reacción estará constituida por proteínas nativas y por productos finales de pequeño tamaño. La presencia de la exopeptidasa en la mezcla enzimática aumenta la proporción de aminoácidos liberados en relación a la otra enzima. Por lo tanto se tendría fundamentalmente proteínas nativas o grandes polipéptidos y aminoácidos o péptidos muy pequeños. Por lo que se podría pensar que el grupo hemo es sólo solubilizado por las proteínas nativas o los péptidos muy grandes, y no por las

especies de bajo PM, ya que estas últimas interaccionan débilmente con el hierro hemínico. De esta manera la polimerización del grupo prostético se daría en forma más rápida durante la hidrólisis, sobre todo si es a pH ácido (FC), y como consecuencia de ello el grupo hemo perdería solubilidad.

Esta composición de los hidrolizados puede esperarse para bajos GH, cuando el sustrato no está extensivamente hidrolizado. En el caso de las hidrólisis secuenciales, la adición de la exopeptidasa contribuye a una mayor proteólisis, cortando los aminoácidos desde los extremos, por lo que se obtienen hidrolizados cuyos productos finales son de bajo PM. Dichas especies interaccionan débilmente con el anillo porfirínico por lo que se favorece la polimerización, fundamentalmente a pH ácido. Lo que trae como consecuencia la precipitación del hierro hemínico. Cabe aclarar que la solubilización del grupo hemo, bajo estas circunstancias, depende fundamentalmente de presencia de péptidos de elevado PM o de cadenas proteicas intactas presentes en el medio.

IV.1.d Conclusiones parciales:

- El CHB contiene un importante agregado de proteínas del plasma.
- El agregado de una exopeptidasa en forma secuencial permitió aumentar el GH en relación al uso de sólo una enzima.
- Las electroforesis permitieron evidenciar que la hidrólisis de la hemoglobina no es total, ya que se observa la banda característica a las 6 horas de hidrólisis.
- Con los termogramas (DSC) se vio que las proteínas se encuentran desnaturalizadas ya sea como consecuencia de la hidrólisis enzimática y/o la inactivación térmica de las enzimas post-proceso.
- El CHB presentó menor solubilidad a pH 7.0 que a los otros pH evaluados (4.5 y 9.5), lo que está relacionado con el punto isoeléctrico de dicha proteína.
- Para los hidrolizados, el aumento de solubilidad respecto del CHB dependió del pH evaluado, pero a pH 7.0 la solubilidad fue significativamente mayor respecto del sustrato. A pH 4.5 se observó una disminución significativa en la solubilidad de todos los hidrolizados respecto del CHB, lo que puede deberse, por un lado a la precipitación de los péptidos presentes en los hidrolizados del CHB debido a un cambio en el punto isoeléctrico en relación a la proteína nativa, y por otro lado, al tratamiento térmico adicional sufrido por los hidrolizados cuando las enzimas son

inactivadas. A pH 9.5, la solubilidad del hidrolizado de P fue significativamente mayor respecto a los demás hidrolizados y del CHB, lo que estaría relacionado con la naturaleza de los péptidos producidos.

- Las fracciones de los hidrolizados de P y FC tuvieron péptidos de tamaños promedios mayores a los obtenidos para los sistemas secuenciales, por lo que el agregado de la enzima F favoreció la disminución del PCL. Además, tanto para el CHB como para sus hidrolizados no hubo variación significativa del PCL respecto del pH evaluado, para una misma muestra. Esto indicaría que los péptidos producidos son igualmente sensibles al pH.
- El CHB presentó los mayores porcentajes de Fe extraído a todos los pHs. A medida que el pH de extracción aumentó, la proporción de hierro extraído se incrementó significativamente, siendo los extractos de pH 9.5 los que mayor porcentaje de hierro extraído presentaron. Conforme el pH de extracción disminuyó la proporción de hierro extraído fue descendiendo, obteniéndose los menores valores a pH 4.5. Esta variación en el porcentaje de hierro extraído estaría relacionada con la solubilidad del grupo hemo, la cual no sólo dependería del pH de extracción sino que también de la naturaleza de las fracciones peptídicas generadas durante el proceso enzimático, cuya solubilidad también es un factor muy importante.
- La hidrólisis implicó una pérdida de la capacidad de extraer Fe a distintos pHs, sobre todo en medio ácido, siendo la excepción el extracto obtenido a pH 4.5 con la enzima P, el cual permitió concentrar el hierro respecto del CHB y los demás hidrolizados. Esto indica que dicho extracto posee péptidos capaces de mantener soluble al hierro hemínico a pH 4.5.
- El color de los diferentes extractos estuvo comprendido entre el rojo ($a^* > 0$) y el amarillo ($b^* > 0$), en sus distintas tonalidades (L^* : 24 – 70). Los diferentes parámetros de color (L^* , a^* , b^* , h y C^*), variaron según el pH de extracción. A pHs alcalinos (9.5) se obtuvieron muestras más oscuras y amarronadas, mientras que a pH ácidos las muestras adquirieron un color amarillento. Esta variación *color – pH* estuvo ligada al contenido de Fe presente en cada extracto. Por lo tanto cuanto mayor fue el pH de extracción más alta fue la solubilidad del Fe hemínico y por lo tanto más bajos fueron los valores de L^* , b^* y h (muestras más oscuras). Mientras que en

general a pHs ácidos los valores de L^* , b^* y h fueron elevados ya que la solubilidad del hierro hemínico fue muy baja (muestras amarillentas).

- Las enzimas actuarían por distintos mecanismos enzimáticos, lo que se refleja en la composición de los hidrolizados de menor grado de hidrólisis.

Capítulo 2. Evaluación de propiedades bioactivas de hidrolizados de CHB.

IV.2.a Evaluación de actividad antioxidante (AO):

En una primera etapa se determinó la AO sobre el CHB y sus hidrolizados. En ambos casos se evaluó la cinética de reacción y se obtuvieron los parámetros correspondientes (Inhibición máxima y Velocidad inicial). Además se calculó la Capacidad Antioxidante Trolox Equivalente (TEAC) para los seis minutos de reacción. Asimismo se estudió el efecto de la concentración de proteínas sobre la AO, obteniéndose el valor de IC_{50} . Posteriormente el CHB y sus hidrolizados fueron fraccionados por pH y ultrafiltración. A las fracciones obtenidas se le determinó la AO y se calculó la Capacidad Antioxidante Trolox Equivalente (TEAC) para los seis minutos de reacción.

IV.2.a.1 Cinética de la actividad antioxidante del CHB y sus hidrolizados:

En la **Figura IV.26** se muestra la cinética de inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$ para las distintas muestras. A medida que transcurre el tiempo de reacción, la AO de los hidrolizados y del sustrato aumenta, alcanzándose valores significativamente superiores para los hidrolizados respecto del CHB.

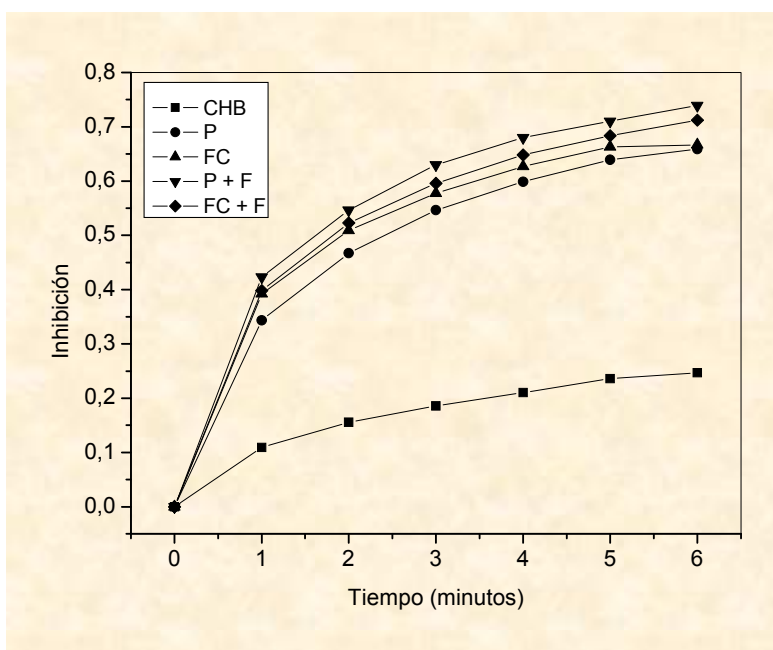


Figura IV.26 – Curvas de inhibición del radical cation $ABTS^{\cdot+}$ a distintos tiempos, del CHB y sus hidrolizados (P, P+F, FC y FC+F).

El aumento de la AO con el tiempo de reacción es el comportamiento típico observado para el bloqueo de este radical con distintos antioxidantes y también fue observado por Chang et al. (2007), para hidrolizados de hemoglobina porcina. En dicho trabajo, el

sustrato fue hidrolizado con un sistema secuencial (Alcalasa + Flavourzyme), alcanzándose un GH de 13.14% al cabo de las 6 horas de reacción.

Por otro lado, se puede ver en la **Tabla IV.6** que la hidrólisis incrementó la Capacidad Trolox equivalente (TEAC) casi tres veces respecto de la muestra sin hidrolizar (CHB). Este mismo incremento en la AO fue observado por Dávalos et al. (2004), pero para hidrolizados de proteínas de clara de huevo obtenidos con pepsina durante 3 horas de reacción. Esto sugiere que la proteólisis enzimática es una buena alternativa para aumentar la AO, independientemente del tipo de sustrato. Durante este proceso, la estructura del sustrato se hidroliza y se liberan péptidos más activos (Peña-Ramos & Xiong, 2002), lo que se manifestaría como una mayor TEAC.

Tabla IV.6 – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) obtenida a los 6 minutos de reacción y valores de Grado de hidrólisis (GH) alcanzados para cada hidrolizado.

Muestra	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g de proteína}$)	GH (%)
CHB	143,19 \pm 4,42 ^a	-----
P	399,27 \pm 6,63 ^b	8,33 \pm 1,02 ^a
FC	402,94 \pm 6,78 ^b	8,43 \pm 0,69 ^a
P+F	420,64 \pm 9,18 ^c	19,84 \pm 0,21 ^c
FC+F	425,09 \pm 7,59 ^c	16,67 \pm 0,11 ^b

X \pm SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los mayores valores de TEAC fueron observados para las muestras más hidrolizadas, es decir P+F y FC+F, no siendo significativamente diferentes entre sí. Esto puede deberse a que el empleo de mezclas de proteasas contribuye a aumentar el GH y permite generar una mayor proporción de especies de bajo PM. Estas últimas tienen mayor accesibilidad al sistema de ensayo oxidante-antioxidante, lo que se manifiesta como una mayor TEAC (Moosman & Behl 2002). Este aumento de AO con el GH también fue observado por Peng et al. (2009), para hidrolizados de proteínas de suero de leche obtenidos con Alcalasa (E/S: 2%), durante 8 horas de reacción. En dicho trabajo se obtuvo una relación casi lineal entre GH y la AO (FRAP) hasta las tres horas de proteólisis. Sin embargo, para este sustrato en particular (CHB), no hubo una relación directa entre la TEAC y el GH, ya que el hidrolizado P+F presentó el mayor GH (**Tabla IV.6**), pero sin embargo la TEAC no fue significativamente diferente respecto del hidrolizado FC+F, cuyo GH fue

significativamente inferior. Esto puede deberse a que la actividad antioxidante de los hidrolizados está influenciada por la secuencia aminoacídica de los péptidos, que depende de la especificidad de cada proteasa (Ren et al, 2008). Es decir, el GH puede afectar notablemente las propiedades antioxidantes de los péptidos obtenidos pero no es el único factor influyente (Xie et al, 2008).

A partir de las curvas de inhibición del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ vs. tiempo (**Figura IV.26**), se obtuvieron los parámetros: Inhibición máxima (I_{max}) y velocidad inicial (V_0) para cada muestra (**Tabla IV.7**).

Para el caso de la I_{max} , los valores se correspondieron con los resultados de TEAC obtenidos a los seis minutos de reacción (**Tabla IV.6**). No se observaron diferencias significativas entre los hidrolizados P y FC, ni entre los obtenidos secuencialmente (P+F y FC+F), siendo el menor valor obtenido, el correspondiente al CHB. Es decir, la tendencia en el tiempo para las diferentes muestras seguiría siendo la misma que para los 6 minutos de reacción (Chen et al, 1998). Como se mencionó anteriormente, esto estaría asociado a una mayor generación de especies proteicas de bajo tamaño molecular (Quian et al, 2008).

Tabla IV.7 – Inhibición máxima (I_{max}) y Velocidad Inicial (V_0) calculadas a partir de las curvas de inhibición del radical catión $ABTS^{\cdot+}$ vs. Tiempo.

Muestra	I_{max} (%)	V_0 (min^{-1})
CHB	26,072 ± 0,747 ^a	0,1164 ± 0,003 ^a
P	65,815 ± 1,064 ^b	0,4258 ± 0,007 ^b
FC	65,732 ± 1,077 ^b	0,5332 ± 0,009 ^c
P + F	68,301 ± 1,452 ^c	0,6144 ± 0,013 ^d
FC + F	69,547 ± 1,211 ^c	0,5187 ± 0,009 ^c

X ± SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Para el caso de la velocidad inicial, el mayor valor correspondió al hidrolizado P+F, indicando que las especies proteicas presentes en esta muestra reaccionan más rápidamente con el radical catión $ABTS^{\cdot+}$ que las de los demás hidrolizados o del sustrato. El menor valor de V_0 se obtuvo para CHB. Por otro lado, los valores de V_0 de FC y FC+F no difirieron significativamente entre sí, por lo que las especies presentes en estos dos últimos hidrolizados actuarían con la misma rapidez frente al radical catión $ABTS^{\cdot+}$. Estas diferencias en las V_0 obtenidas para las distintas muestras podrían deberse a los diferentes productos con secuencias aminoacídicas particulares, que pueden o no reaccionar más rápidamente frente al radical catión $ABTS^{\cdot+}$ (Moure et al, 2006).

IV.2.a.2 Influencia de la concentración proteica sobre la actividad antioxidante:

Como se puede observar en la **Figura IV.27**, a medida que se incrementa la concentración proteica, la actividad antioxidante tanto del sustrato como de los hidrolizados aumenta. Esta relación *concentración proteica* – *AO* también ha sido observada para hidrolizados de otras fuentes proteicas. Wang et al. (2007), reportó para hidrolizados de gluten de trigo obtenidos con papaína durante 6 horas, un incremento de la actividad anti-DPPH con la concentración proteica, en un rango de 0 – 2.4mg/ml de proteínas. Sakanaka y Tachibana (2006), hallaron la misma tendencia, pero para hidrolizados de proteínas de yema de huevo obtenidos con un sistema secuencial (Orientase + Protease). En dicho trabajo, la actividad anti-DPPH aumento con la concentración de proteínas en el rango de 0.6 – 10mg/ml. Xie et al. (2008), encontraron para hidrolizados de proteínas de hoja de alfalfa, obtenidos con Alcalasa durante 4 horas, el mismo comportamiento: la AO (anti-DPPH) se incrementó en un rango de concentración de proteínas de 0 – 2mg/ml.

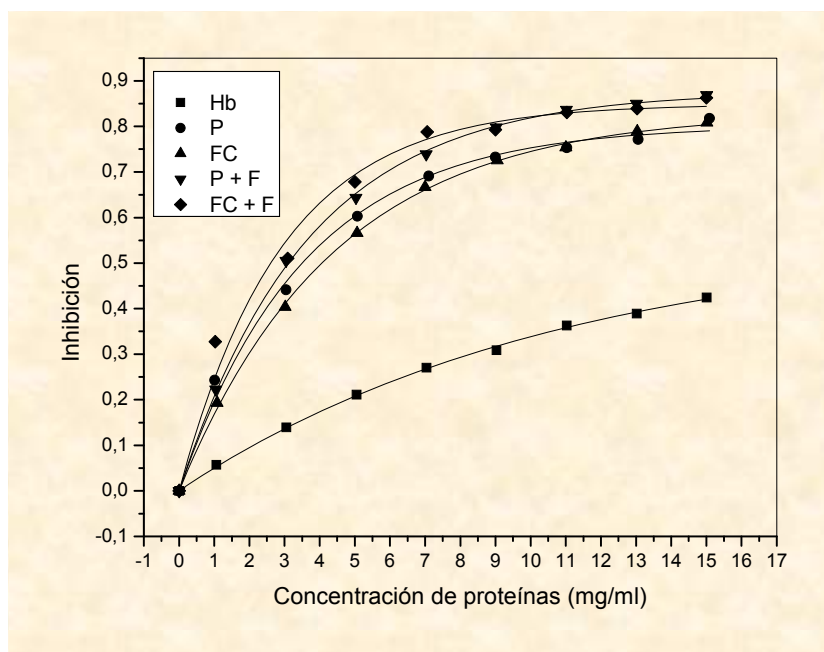


Figura IV.27 – Inhibición del radical cation $ABTS^+$ medida a los 6 minutos de reacción en función de la concentración [1-15 mg/ml de proteínas] del CHB y sus hidrolizados (P, P+F, FC y FC+F).

Los hidrolizados de CHB presentaron un comportamiento del tipo asintótico a medida que aumentó la concentración proteica. Más allá de 11mg/ml de proteínas, la actividad antioxidante permaneció prácticamente en el mismo valor. Esta invariabilidad en la AO,

más allá de una determinada concentración proteica, también ha sido observada para otros hidrolizados proteicos. Yang et al. (2008), observaron que un incremento en la concentración proteica de hidrolizados de gelatina, más allá de los 20mg/ml de proteínas, no se traducían en aumento de la actividad antioxidante. En dicho trabajo los hidrolizados se obtuvieron con diferentes proteasas (Papaína, Pancreatina, Tripsina y Bromelina) y la AO fue evaluada con el método del radical DPPH. Al igual que para los hidrolizados del CHB, la tendencia asintótica de la AO estuvo comprendida entre 75-85% de inhibición.

A partir de las curvas de la **Figura IV.27** se obtuvo el parámetro de IC₅₀ (**Tabla IV.8**). El hidrolizado de mayor AO fue FC+F, siendo el valor de IC₅₀ similar al reportado por Ren et al. (2008), para una fracción básica del hidrolizado de músculo de *Ctenopharyngodon idellus* y utilizando como método antioxidante la actividad anti-Radical hidroxilo (2,11 ± 0,10mg/ml de proteínas). Por otro lado, el hidrolizado que mostró menor AO fue el obtenido con la enzima FC, siendo el valor de IC₅₀ semejante (4,84 ± 0,11mg/ml de proteínas) al de la fracción neutra/ácida aislada por Ren et al. (2008), a partir del mismo hidrolizado mencionado anteriormente (músculo de *Ctenopharyngodon idellus*). No obstante, en diversos trabajos se han obtenido hidrolizados cuya potencia antioxidante respecto a la de los hidrolizados del CHB, es mayor (menor IC₅₀). Por ejemplo, Sakanaka y Tachibana (2006), hallaron un valor aproximado de IC₅₀ de 1.25mg/ml de proteínas. Sin embargo, hay que destacar que el método utilizado para evaluar la AO no fue el mismo, lo que puede influir notablemente en los resultados (Thaipong et al, 2006).

Tabla IV.8 – Concentración de proteínas que inhibe el 50% del radical ABTS⁺· (IC₅₀).

Muestra	IC ₅₀ (mg/ml de proteínas)
CHB	24,65 ± 0,35 ^e
P	3,53 ± 0,07 ^c
FC	4,06 ± 0,05 ^d
P + F	3,11 ± 0,04 ^b
FC + F	2,52 ± 0,07 ^a

X ± SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas (p<0.05).

A partir de la **Tabla IV.8** se puede apreciar que el valor de IC₅₀ obtenido para el CHB es casi diez veces superior al obtenido con el sistema FC+F, lo que indica la baja capacidad AO que posee el sustrato frente al radical catión ABTS⁺·. Entonces, el empleo secuencial de proteasas es una buena estrategia para incrementar y optimizar la potencia antioxidante

de una determinada proteína, lo que se condice con lo reportado por Li et al. (2007), para hidrolizados de colágeno porcino.

IV.2.a.3 Relación entre el tamaño molecular de las especies proteicas y la actividad antioxidante:

Como se puede observar en la **Figura IV.28** existe una buena correlación entre los valores de TEAC obtenidos para cada muestra y sus respectivos tamaños promedio de la cadena polipeptídica o PCL. Para los hidrolizado, se puede ver que a medida que el PCL aumente la TEAC disminuye lo que indica que las especies más activas o responsables de una mayor actividad antioxidante son las de bajo PM.

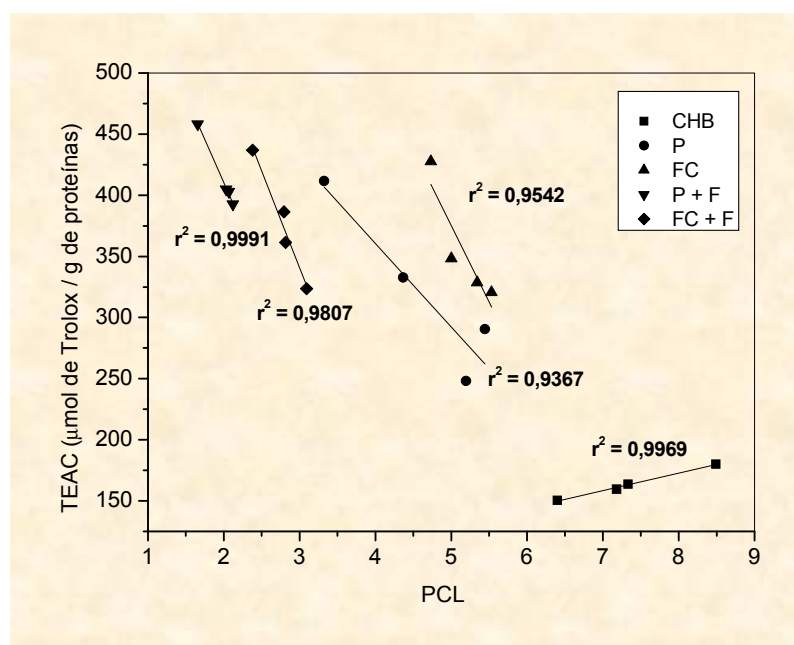


Figura IV.28. Relación entre la Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de los extractos a diferentes pH (4.5, 7.0 y 9.5) del CHB ($y = 14,273x + 58,52$) y sus hidrolizados (P: $y = 633,38 - 68,22x$; P+F: $y = 690,35 - 139,93x$; FC: $y = 1000,22 - 125,01x$; y FC+F: $y = 815,49 - 158,32x$) y el tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL).

Este resultado concuerda con lo reportado por Chang et al. (2007), para hidrolizados de hemoglobina porcina, en donde se concluyó que la elevada actividad anti-DPPH de los hidrolizados enzimáticos podía estar asociada con elevadas concentraciones de especies proteicas de bajo PM. Este mismo comportamiento fue observado para hidrolizados de proteínas de suero de leche, en donde la actividad antioxidante fue dependiente del tamaño molecular (Peng et al, 2009). Para los hidrolizados, la mayor TEAC se obtuvo para especies pequeñas cuyo valor de PCL es aproximadamente 1.5. Para el caso del hidrolizado FC+F, el valor de PCL es de 2.3 a 3.0 (≈ 2.7 en promedio), lo que se condice

con lo reportado por Sakanaka et al. (2004), para hidrolizados de proteínas de yema de huevo. En dicho trabajo la mayor actividad estuvo ligada a hidrolizados obtenidos secuencialmente cuyo valor de PCL fue de 2.6.

Cabe aclarar que el valor de PCL, como su nombre lo indica, es un promedio y no representa exactamente el tamaño real de las fracciones peptídicas.

Por otra parte, las pendientes de las rectas para las distintas muestras son diferentes, lo que demostraría la importancia de la naturaleza de los péptidos, más allá de su tamaño.

Para definir rangos de PM de péptidos con actividad antioxidante, se fraccionaron los hidrolizados y el CHB por ultrafiltración, empleando para ello una membrana cuyo cut-off fue de 5kDa.

En la **Figura IV.29** se muestran los valores de TEAC de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración para el CHB y sus hidrolizados. Exceptuando el caso del hidrolizado P, la fracción con mayor TEAC fue la de PM < 5kDa (*Permeado*), lo que confirma lo mencionado anteriormente acerca de que las fracciones con bajo PM son las que tienen mayor actividad antioxidante.

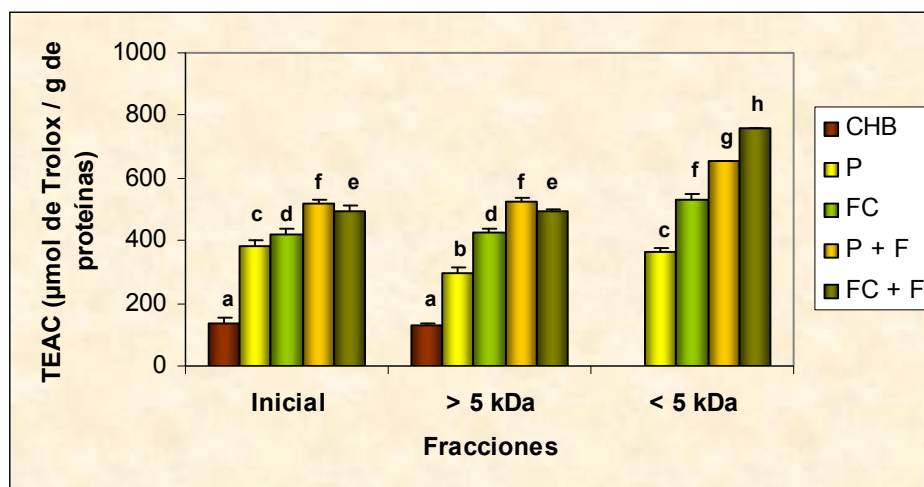


Figura IV.29 – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de las diferentes fracciones del CHB y sus hidrolizados, obtenidas por ultrafiltración empleando una membrana de 5kDa y evaluada con el método de decoloración del radical catión $ABTS^{+}$, para un tiempo de 6 minutos.

Este resultado se condice con lo reportado por Wang et al. (2007), para hidrolizados de gluten de trigo. En dicho trabajo también se utilizó una membrana de cut-off: 5kDa y se empleó el método de inhibición del radical DPPH. De esta manera queda de manifiesto que la elevada actividad antioxidante es dependiente de la distribución de tamaños moleculares (Peng et al, 2009; Qian et al, 2008). También se puede ver que tanto la muestra antes de ser

fraccionada y la fracción >5kDa presentan actividad antioxidante que no difieren significativamente entre sí (excepto para P), lo que concuerda con lo reportado por Wang et al. (2007).

En la **Figura IV.30** se observa la capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) y el valor de PCL de la fracción <5kDa del CHB y sus hidrolizados. Cabe mencionar que para el permeado del sustrato no fue posible detectar actividad antioxidante bajo la concentración proteica obtenida ($\approx 0,8\text{mg/ml}$ de proteínas). La mayor TEAC se obtuvo para el hidrolizado FC+F, siguiéndole en orden significativo la del hidrolizado P+F. Esto indica que cuanto mayor es la actividad *endo-exopeptidasa* mayor es la TEAC obtenida. Esto se debe básicamente a la acción conjunta de estas enzimas sobre el sustrato, ya que las exopeptidasas van hidrolizando los enlaces peptídicos no sustituidos próximos al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas lo hacen en regiones internas de las cadenas peptídicas (Guadix et al, 2000). De esta manera el proceso de hidrólisis se torna más efectivo permitiendo una degradación más completa de la proteína (Chang et al, 2007), lo que conduce a la generación de péptidos de diversos tamaños, siendo los principales componentes los de bajo PM (Li et al, 2007). Resulta preciso aclarar que la enzima FC posee una leve actividad exoproteasa además de la acción endopeptidasa.

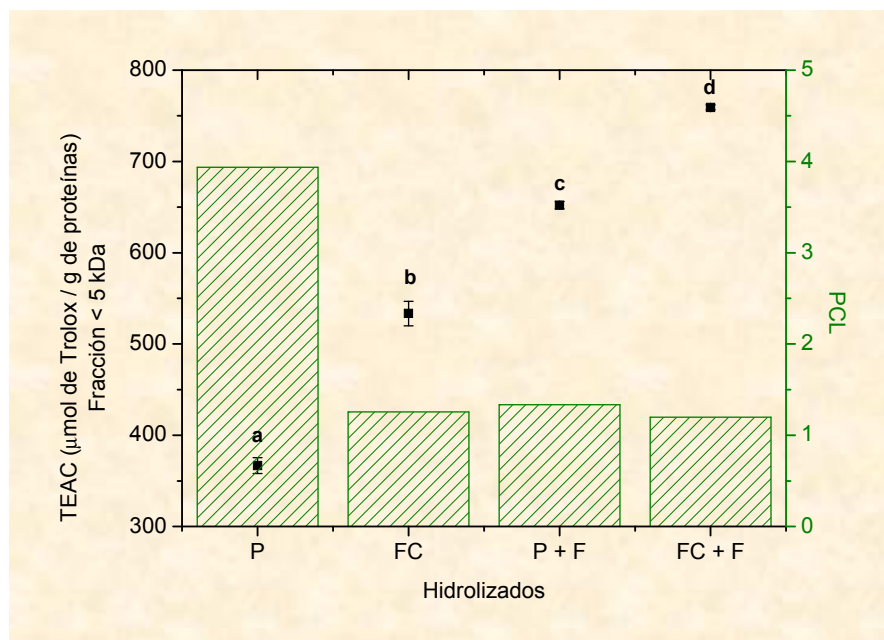


Figura IV.30 – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de la fracción <5kDa de los hidrolizados del CHB, obtenidas por ultrafiltración empleando una membrana de cut-off: 5kDa. Evaluada con el método de decoloración del radical catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$, para un tiempo de 6 minutos (ordenada izquierdo). PCL de la fracción <5kDa (ordenada derecha). Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, si bien la TEAC es mayor cuanto mayor es la acción endo-exopeptidasa, el valor de PCL es prácticamente el mismo para las tres fracciones (exceptuando P). Lo que indica, como ya se mencionó anteriormente, que no sólo influye sobre la actividad antioxidante el tamaño molecular de los productos, sino también la secuencia aminoacídica de los péptidos generados (Xie et al, 2008). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Yang et al. (2008), para hidrolizados de gelatina obtenida a partir de piel de *Rachycentron canadum* (Cobia).

Como se mencionó en la introducción, la actividad antioxidante de los péptidos ha sido atribuida a algunos aminoácidos presentes en la secuencia. Entre éstos se destacan los aminoácidos con grupos aromáticos, tales como Triptofano, Tirosina y Fenilalanina (Ren et al, 2008). Estos aminoácidos aromáticos han demostrado ser neutralizadores efectivos de los radicales libres (Rajapakse et al, 2005). Esto se puede explicar teniendo en cuenta la capacidad especial que poseen los grupos fenólicos y pirrólicos para actuar como donadores de grupos hidrógenos, siendo éste uno de los mecanismos de inhibición de la reacción en cadena de oxidación (Jung et al, 1995; Marcuse, 1960). Por tal motivo, se procedió a determinar espectrofotométricamente la proporción de estos aminoácidos en la fracción < 5kDa obtenida luego de la ultrafiltración, lo que se muestra en la **Figura IV.31**.

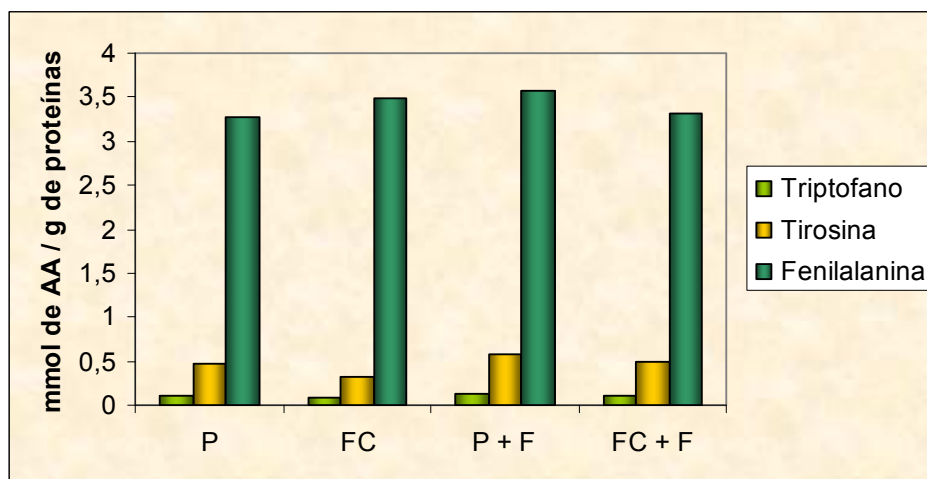


Figura IV.31 – Contenido de aminoácidos aromáticos presentes en la fracción <5kDa del CHB y sus hidrolizados determinada espectrofotométricamente (λ_{Trp} : 280nm; λ_{Tyr} : 274nm y λ_{Phe} : 257nm).

Para todos los hidrolizados, el aminoácido que se encuentra en mayor proporción es la Fenilalanina, siguiéndole en orden de magnitud la Tirosina y por último el Triptofano, lo que podría sugerir que este aminoácido contribuiría de manera significativa en la acción antioxidante de los hidrolizados (Pihlanto, 2006). Sin embargo, se debe tener en cuenta que

la capacidad antioxidante está asociada a una determinada secuencia aminoacídica, en la que intervienen otro tipo de aminoácidos tales como His, Cys, etc., más que a un aminoácido en particular (Sakanaka & Tachibana, 2006). Por esto, si bien el contenido de Fenilalanina es similar en todas las fracciones <5kDa, la TEAC correspondiente es significativamente diferente.

IV.2.b Evaluación de la disponibilidad del Fe y del Zn del CHB y sus hidrolizados:

IV.2.b.1 Dializabilidad de Fe (DFe(%)):

En la **Figura IV.32** se observa la DFe(%) del CHB y sus hidrolizados. La mayor DFe(%) se obtuvo con los sistemas de hidrólisis secuenciales, correspondiendo el mayor valor al hidrolizado P+F. Es posible que los péptidos generados en la hidrólisis gastrointestinal formen complejos que solubilicen el Fe y promuevan su diálisis y esto es más efectivo en muestras previamente hidrolizadas, lo que permitiría una liberación más eficaz del Fe. Este resultado concuerda con lo reportado por Vaghefi et al. (2002), para hidrolizados de hemoglobina bovina obtenidos con Pepsina y Subtilisin. En dicho trabajo el GH alcanzado con ambas enzimas fue de 15% (medido por TNBS), y la absorción potencial se midió en sistemas *in vitro* que utilizaron tejido duodenal y lumen de duodenos de ratas, determinándose el contenido de Fe por absorción atómica.

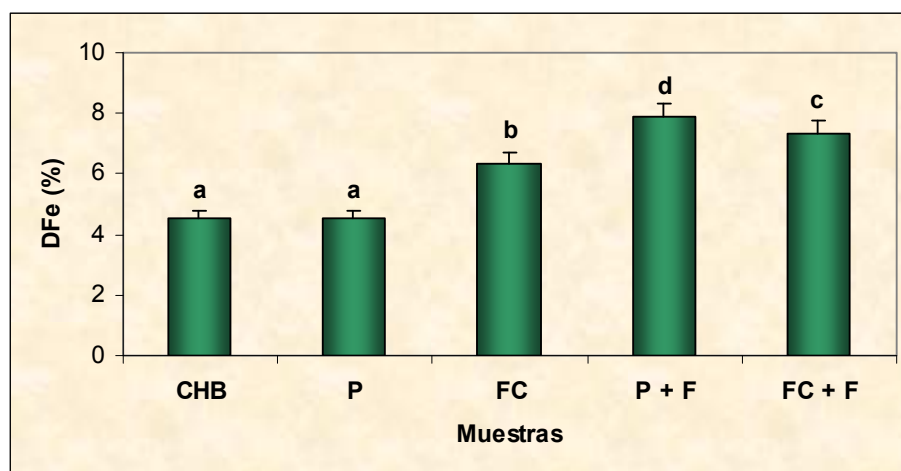


Figura IV.32 – Dializabilidad de hierro (DFe(%)) del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Las barras con diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

Si bien la muestra hidrolizada con P no presentó una DFe(%) diferente del CHB, el hidrolizado FC presentó un valor mayor de DFe(%). Esto podría estar asociado no sólo con la leve acción exopeptidasa que posee la enzima FC sino también con las diferentes

fracciones peptídicas generadas durante el proceso de hidrólisis, las cuales pueden resultar promotoras o no de la DFe(%).

Cabe agregar que fue posible establecer una correlación entre el GH de los hidrolizados y el valor de DFe(%) (**Figura IV.33**).

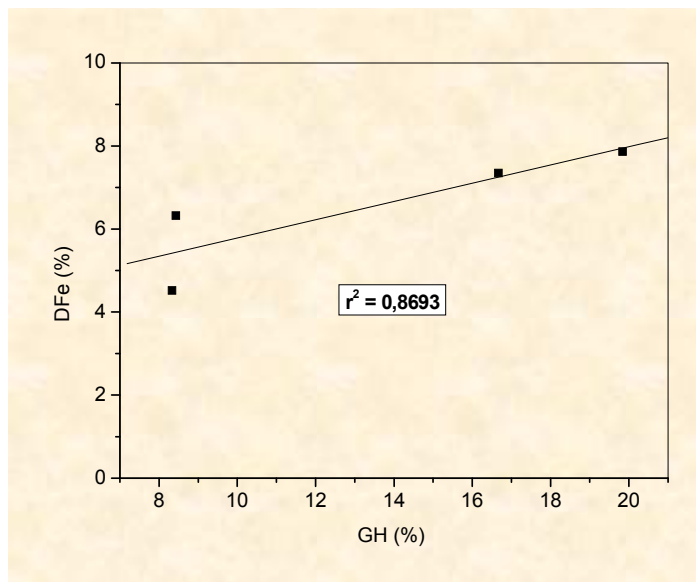


Figura IV.33 – Relación entre los valores de dializabilidad de hierro (DFe(%)) y el grado de hidrólisis (GH).

Con respecto al CHB se puede ver que el valor de disponibilidad de Fe hallado es bajo (4%) y significativamente menor al de los hidrolizados (exceptuando P). Estos bajos valores de disponibilidad potencial no se corresponden con aquellos altos valores de biodisponibilidad del hierro hemínico de comidas cárnicas. Al respecto, ha sido establecido que la adición de carne a una comida, incrementa la absorción de hierro (Hallberg, 1981a). Sin embargo, la absorción del hierro hemínico de una comida compuesta preparada con sangre, pero sin carne es menor de la mitad que si la carne está presente. Como ejemplo, la biodisponibilidad del hierro hemínico en comidas con carne es de aproximadamente 25%, mientras que en ausencia de carne es como máximo 10%, disminuyendo si se incrementa la dosis de prueba (Hallberg et al, 1979; Hallberg, 1981b). En presencia de proteínas de origen cárnico, los péptidos liberados durante la digestión de la carne podrían prevenir la polimerización del hemo y potenciar la absorción del hierro hemínico. Entre éstos se destacan los péptidos que poseen cisteína (Bouglé & Bouhallab, 2005).

Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la disponibilidad del Fe hemínico es baja cuando es evaluada fuera de su entorno natural que es la carne. Además

se observó, que en general, un aumento en el GH del CHB está asociado con un incremento de la disponibilidad potencial del hierro.

IV.2.b.2 Dializabilidad de Zn (DZn(%)):

En la **Figura IV.34** se muestran los valores de DZn(%) obtenidos para las distintas muestras. Los hidrolizados presentaron valores de DZn(%) superiores al del CHB, lo que evidencia que la proteólisis del CHB contribuye al incremento de la DZn(%). Sin embargo, no fue posible establecer una relación entre el GH y la DZn(%), ya que se obtuvo la mayor disponibilidad de Zn con el hidrolizado FC+F y la menor con el hidrolizado P+F.

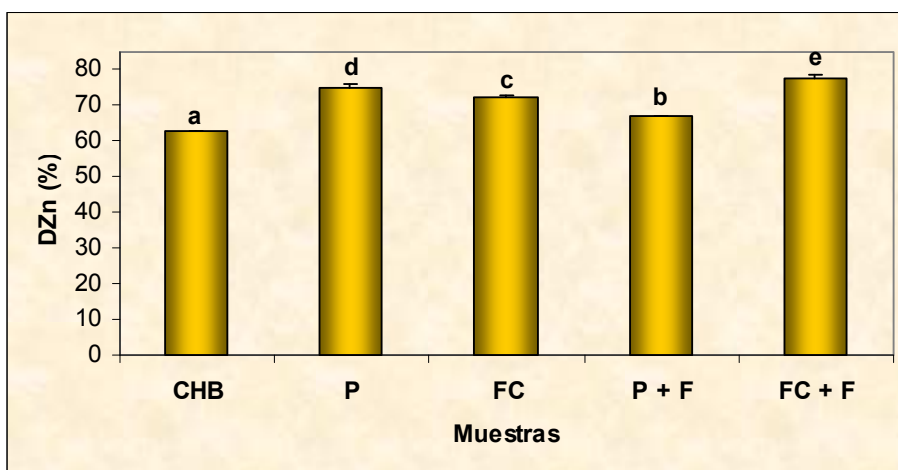


Figura IV.34 – Dializabilidad de zinc (DZn(%)) del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

Uno de los motivos por los cuales algunos hidrolizados promueven más la disponibilidad del Zn endógeno que otros, probablemente radica en la naturaleza aminoacídica de los péptidos generados, ya que se ha visto en forma *in vivo* que ciertos aminoácidos quelantes presentes en los péptidos mantienen solubles al Zn dejándolo más disponible para la absorción a nivel intestinal (Salgueiro et al, 2000). Entre estos aminoácidos se pueden destacar la Metionina, Cisteína e Histidina. Cabe aclarar que la hemoglobina posee un elevado contenido de Histidina (tres veces más que la caseína hidrolizada) (Aubes-Dufau et al, 1995). Por lo tanto, este aminoácido podría estar jugando un rol clave en la DZn(%) y la hidrólisis contribuiría a la exposición o liberación de fragmentos peptídicos con estos péptidos quelantes.

IV.2.b.3 Relación Fe – Zn:

En la **Figura IV.35**, se muestra en forma esquemática la DFe(%) y la DZn(%) obtenida para cada hidrolizado.

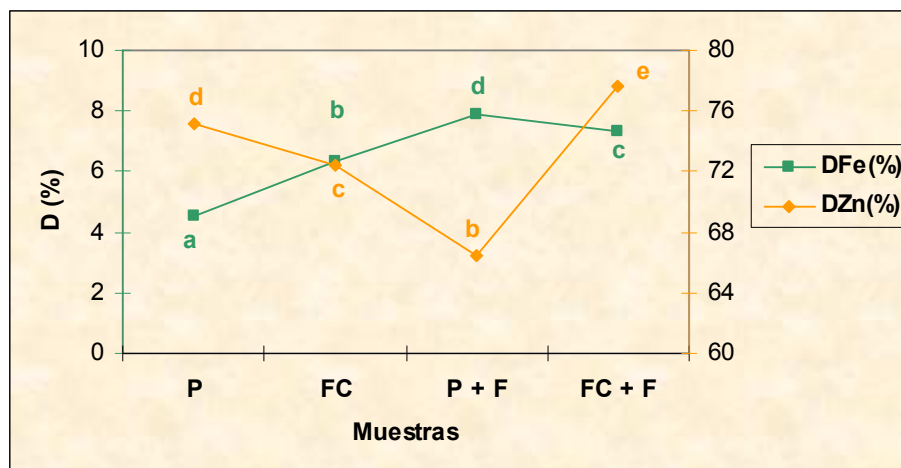


Figura IV.35 – Dializabilidad de hierro (DFe(%)) y zinc (DZn(%)) de los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

Para los hidrolizados obtenidos (excepto FC), se puede apreciar que la disponibilidad de ambos metales tiene una tendencia opuesta. Es decir, aquellos hidrolizados en los que se obtuvo una alta dializabilidad de Fe se obtiene una baja dializabilidad de Zn y viceversa. A modo de ejemplo se puede ver que para el hidrolizado de P se obtuvo el menor valor de DFe(%) y uno de los mayores valores de DZn(%), mientras que para el hidrolizado de P+F ocurrió lo contrario.

El hidrolizado obtenido con FC+F fue el que presentó el mayor valor de DZn(%) y uno de los valores más altos de DFe(%). Por lo tanto, dicho hidrolizado sería en principio el más conveniente para promover la disponibilidad de ambos minerales.

IV.2.c Conclusiones parciales:

- La Capacidad Trolox equivalente (TEAC) de los hidrolizados fue casi tres veces superior a la de la muestra sin hidrolizar (CHB). Los mayores valores de TEAC correspondieron a las muestras más hidrolizadas (P+F y FC+F). Esto sugiere que la proteólisis enzimática es una buena alternativa para aumentar la AO, y que cuanto mayor es la generación de especies proteicas de bajo PM más elevada es la TEAC obtenida.

- Para este sustrato en particular (CHB), no se obtuvo una relación directa entre la TEAC y el grado de hidrólisis (GH), lo que indica que si bien el GH puede afectar notablemente las propiedades antioxidantes de los péptidos obtenidos, éste no es el único factor influyente (secuencia aminoacídica de los péptidos, etc).
- Los valores de I_{\max} se correspondieron con los resultados de TEAC, obteniéndose los mayores valores para P+F y FC+F y el menor valor para CHB. Por lo tanto, y como se mencionó anteriormente, una mayor generación de especies proteicas de bajo tamaño molecular contribuye con el aumento de AO.
- Para el caso de la velocidad inicial (V_0), el mayor valor correspondió al hidrolizado P+F, indicando que los productos de hidrólisis presentes en esta muestra reaccionan más rápidamente con el radical catión $ABTS^{\cdot+}$ que los de los demás hidrolizados o del sustrato. El menor valor de V_0 se obtuvo para CHB. Por otro lado, los valores de V_0 de FC y FC+F no difirieron significativamente entre sí, por lo que las especies presentes en estos dos últimos hidrolizados actuarían con la misma rapidez frente al radical catión $ABTS^{\cdot+}$.
- A medida que se incrementó la concentración proteica la actividad antioxidante tanto del sustrato como de los hidrolizados aumentó, presentando un comportamiento del tipo asintótico. El hidrolizado de mayor AO (IC_{50} más baja) fue FC+F, y el que mostró menor AO (IC_{50} más alta) fue el obtenido con la enzima FC. El valor de IC_{50} obtenido para el CHB fue casi 10 veces superior al obtenido con el sistema FC+F, lo que demuestra la baja capacidad antioxidante que posee el sustrato frente al radical catión $ABTS^{\cdot+}$. Por lo tanto, el empleo secuencial de proteasas es una buena estrategia para incrementar y optimizar la potencia antioxidante de una determinada proteína.
- Se obtuvo una buena correlación entre los valores de TEAC y los tamaños promedio de la cadena polipeptídica (PCL), para cada muestra. Con los hidrolizados se pudo ver que a medida que el PCL aumentó la TEAC disminuyó. Por lo tanto las especies más activas o responsables de una mayor actividad antioxidante serían las de bajo PM. Lo que fue confirmado posteriormente en el fraccionamiento por PM.
- Exceptuando el hidrolizado P, la fracción con mayor TEAC fue la de $PM < 5kDa$ (*Permeado*). De esta manera quedó de manifiesto que la elevada actividad antioxidante fue dependiente de la distribución de los tamaños moleculares.
- Dentro de la fracción $PM < 5kDa$, la mayor TEAC se obtuvo con el hidrolizado FC+F, siguiéndole en orden significativo la del hidrolizado P+F. Por lo tanto cuanto mayor es la actividad *endo-exopeptidasa* mayor es la TEAC obtenida.

- Por otro lado si bien la TEAC es mayor cuanto mayor es la acción endo-exopeptidasa, el valor de PCL es prácticamente el mismo para las tres fracciones (exceptuando P). Lo que indica que no sólo influye sobre la actividad antioxidante el tamaño molecular de los productos sino también la secuencia aminoacídica de los péptidos generados.
- Para todos los hidrolizados, el aminoácido que se encontró en mayor proporción fue la Fenilalanina, lo que podría sugerir que este aminoácido contribuiría de manera significativa en la acción antioxidante de los hidrolizados
- En base a estos resultados se puede decir que posiblemente los hidrolizados de CHB, y particularmente las fracciones de bajo PM, contengan algunos sustratos donadores de electrones y/o grupos hidrógenos que puedan llegar a reaccionar con los radicales libres, convirtiéndolos en productos más estables y terminando la reacción en cadena de oxidación.
- La mayor dializabilidad de Fe (DFe(%)) se obtuvo con los sistemas de hidrólisis secuenciales, correspondiendo el mayor valor al hidrolizado P+F. Es probable que la pre-digestión contribuya a la liberación de péptidos que formen complejos que solubilicen el Fe y promuevan su diálisis o bien, las enzimas rompan estructuras que interaccionan con el metal y le impiden dializar.
- Si bien la muestra hidrolizada con P no presentó una DFe(%) diferente del CHB, el hidrolizado FC presentó un valor mayor de DFe(%). Esto podría estar asociado no sólo con la leve acción exopeptidasa que posee la enzima FC sino también con las diferentes fracciones peptídicas generadas durante el proceso de hidrólisis, las cuales pueden resultar promotoras o no de la DFe(%).
- Fue posible establecer una correlación entre el GH de los hidrolizados y el valor de DFe(%), observándose en general, que un aumento en el GH del CHB estuvo asociado con un incremento de la disponibilidad potencial del hierro
- Con respecto al CHB se pudo ver que el valor de disponibilidad de Fe hallado fue bajo (4%) y significativamente menor al de los hidrolizados (exceptuando P). Estos bajos valores de disponibilidad potencial no se correspondieron con aquellos altos valores de biodisponibilidad del hierro hemínico de comidas cárnicas. Lo que ponen de manifiesto que la disponibilidad del Fe hemínico es baja cuando es evaluada fuera de su entorno natural que es la carne.
- Los hidrolizados presentaron valores de dializabilidad de Zn (DZn(%)) superiores al del CHB, lo que evidencia que la proteólisis del CHB contribuyó con el incremento de

la DZn(%). Sin embargo, no fue posible establecer una relación entre el GH y la DZn(%)

- El hidrolizado obtenido con FC+F fue el que presentó el mayor valor de DZn(%) y uno de los valores más altos de DFe(%). Por lo tanto, dicho hidrolizado sería en principio el más conveniente para promover la disponibilidad de ambos minerales

Capítulo 3. Estudio de la incorporación de hidrolizados de CHB en alimentos extrudidos.

Los hidrolizados fueron incorporados a alimentos extrudidos y se evaluaron las propiedades físicas de los productos elaborados: expansión, volumen específico y resistencia a la compresión. Por un lado, se evaluó la capacidad antioxidante post- proceso de extrusión, de manera de estudiar tanto la influencia de la matriz en la que se incorporaron los hidrolizados, como el efecto de la extrusión, en vista de obtener un alimento funcional con propiedades antioxidantes. Por el otro, se estudió la disponibilidad de minerales, Fe y Zn del producto final con el objetivo de evaluar el uso de hidrolizados de CHB como fuente de hierro hemínico.

IV.3.a Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los expandidos de maíz elaborados con el agregado de de hidrolizados de CHB:

En la tabla **Tabla IV.9** se muestran los resultados de las propiedades fisicoquímicas obtenidos a partir los productos extrudidos.

Tabla IV.9 – Propiedades fisicoquímicas de los productos extrudidos.

Muestra	Expansión	Volumen Específico (cm ³ /g)	Compresión (Kg fuerza)
Maíz (M)	1,038 ± 0,013 ^a	6,65 ± 0,13 ^a	5,89 ± 0,24 ^a
M + CHB	1,04 ± 0,01 ^a	6,61 ± 0,19 ^a	5,96 ± 0,26 ^a
M + P	1,038 ± 0,011 ^a	6,40 ± 0,36 ^a	6,08 ± 0,22 ^a
M + FC	1,036 ± 0,01 ^a	6,35 ± 0,32 ^a	5,89 ± 0,25 ^a
M + P+F	1,034 ± 0,011 ^a	6,44 ± 0,27 ^a	5,97 ± 0,24 ^a
M + FC+F	1,036 ± 0,01 ^a	6,65 ± 0,20 ^a	6,05 ± 0,26 ^a

X ± SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas (p<0.05).

Como se puede ver la expansión, el grado de cocción (evaluado a través del Volumen Específico) y la resistencia a la compresión no fueron afectados por la adición del CHB o por la adición de sus hidrolizados, (p < 0.05). Esta invariabilidad entre las muestras respecto del control (M), puede deberse a que la adición tanto del CHB como de sus hidrolizados se realizó en una baja proporción (0.5% P/P).

IV.3.b Evaluación de la actividad antioxidante de los expandidos de maíz elaborados con el agregado de de hidrolizados de CHB:

En la **Figura IV.36** se observa la capacidad antioxidante expresada como TEAC de los expandidos elaborados con el agregado de CHB y sus hidrolizados.

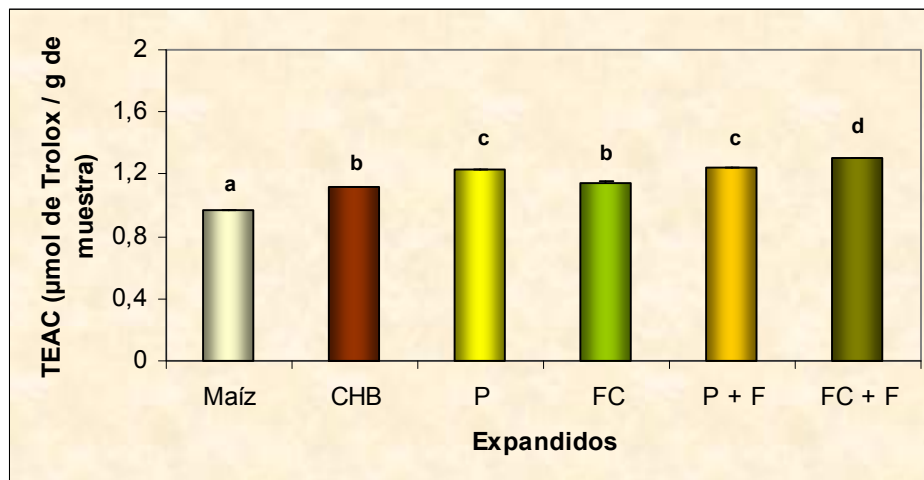


Figura IV.36 – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de los diferentes extrudidos de maíz con agregado de CHB y sus hidrolizados (P, P+F, FC y FC+F).

Si bien todos los hidrolizados presentaron mayor actividad antioxidante que el CHB (**Figura IV.26, Tabla IV.6**), una vez incorporados al alimento sólo tres de los cuatro extrudidos con agregado de hidrolizados presentó mayor actividad que el producto con CHB, correspondiendo la mayor actividad antioxidante al extrudido con agregado del hidrolizado FC+F. Además, en todos los casos la AO fue superior a la obtenida para el control (Maíz), lo que concuerda con lo reportado por Sakanaka y Tachibana (2006) para hidrolizados de proteínas de yema de huevo incorporados a homogenatos de carne vacuna y atún. En dicho trabajo todos los hidrolizados incorporados al sistema alimenticio modelo tuvieron mayor actividad que la muestra sin adición de hidrolizados o sustrato (control).

Por otro lado, la TEAC obtenida para el extrudido FC no fue significativamente diferente respecto del extrudido con agregado de CHB, lo que indica que si bien el proceso de extrusión no anuló la actividad antioxidante del hidrolizado, la afectó significativamente. Cabe aclarar que en el proceso de extrusión se alcanzan niveles de temperatura y presión muy elevados, los cuales puede contribuir a la pérdida de actividad antioxidante presente inicialmente en las fracciones proteicas, probablemente debidas a interacciones de los péptidos con la matriz alimenticia y a la degradación de algunos aminoácidos (Sorbetti-Guerri & Denis, 1998).

IV.3.c Estudio del efecto promotor de los hidrolizados de CHB en la disponibilidad de minerales

IV.3.c.1 Dializabilidad del Fe (DFe(%)):

Como se puede observar en la **Figura IV.37**, no fue posible detectar Fe en los dializados correspondientes a la muestra de maíz y a las muestras adicionadas de CHB o los hidrolizados P y FC, empleando espectroscopia de absorción atómica, para cuantificar Fe.

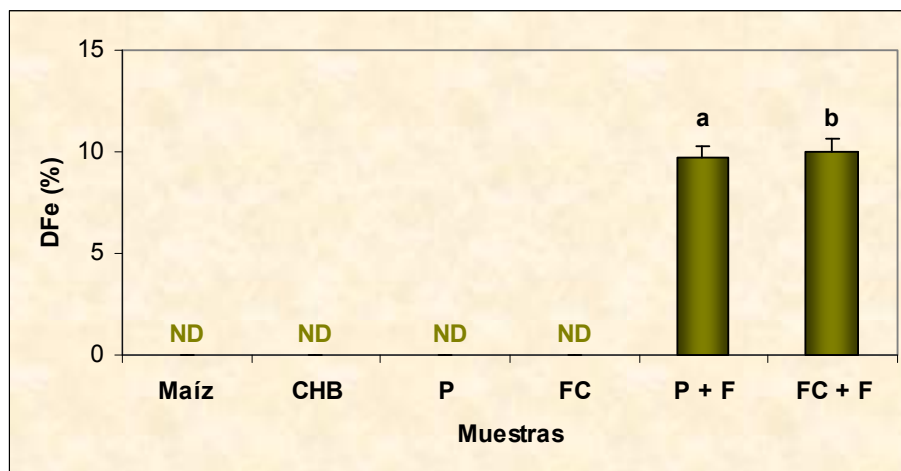


Figura IV.37 – Dializabilidad de hierro (DFe(%)) de los productos extrudidos: harina de maíz; maíz + 0.5% del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y maíz + 0.5% de los hidrolizados obtenidos con las enzimas Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$), ND: no detectado.

No obstante, resulta oportuno aclarar que se han reportado valores de DFe(%) superiores al 1% para productos a base de maíz comercial. Tal es el caso del estudio de Wolfgor et al. (1996), que midieron la disponibilidad del hierro en cereales para desayuno preparados con leche, utilizando el método de dializabilidad de Miller et al. (1981), modificado, obteniendo un valor de DFe(%) para copos maíz comercial de 4.8%. En otro estudio, Wolfgor et al. (2002), reportó una DFe(%) de copos de maíz sin la adición de leche de 2.9%. García-Casal et al. (2003), determinaron el porcentaje de hierro absorbido de copos de maíz en humanos adultos voluntarios, en los cuales se calculó la incorporación del hierro radiactivo a la sangre. La biodisponibilidad del hierro obtenida en este estudio fue de 2.96%. Bovell-Benjamin et al. (2000), también encontraron valores de biodisponibilidad de Fe del 1.4% en comidas a base de maíz tipo polenta (“porridge”) en ensayos en hombres adultos.

Si bien la información de disponibilidad de Fe encontrada en la literatura corresponde a alimentos a base de maíz, los procesos de elaboración del producto son diferentes al proceso de extrusión utilizado en la elaboración del expandido de maíz. Igualmente existen diferencias en la composición química de los alimentos evaluados en los distintos estudios (presencia de azúcar en los copos de maíz, leche, etc.) y no se informa si el maíz utilizado estaba descascarado/desgerminado o no.

También se observó que la adición de 0.5% de CHB a la harina de maíz comercial no se tradujo en un incremento de la DFe(%), no detectándose Fe en el dializado.

La baja DFe(%) de productos vegetales fortificados con hemoglobina (fuera de la matriz cárnica) ya ha sido reportada por algunos investigadores. Hurrell et al. (1988), observó que el agregado de hemoglobina a una comida de maíz (“porridge”), no incrementó la absorción de hierro en estudios en humanos sometidos al examen. Posibles interacciones entre el CHB y las proteínas de la matriz alimentaria (maíz), como la ausencia de proteínas cárnicas promotoras de la disponibilidad del Fe pueden explicar estos resultados. Weinborn et al. (2008), encontraron que la biodisponibilidad del hierro hemínico (evaluada en humanos), se ve afectada negativamente por algunas proteínas vegetales tales como los aislados de proteína de soja.

Como se puede observar en la **Figura IV.37** para el caso de los extrudidos fortificados con los hidrolizados P y FC tampoco se detectó Fe en los dializados, mientras que sólo para los expandidos fortificados con los hidrolizados P+F y FC+F se logró obtener valores de DFe(%) que fueron de aproximadamente 10%, correspondiendo el mayor valor al expandido de maíz con agregado del hidrolizado FC+F. Estas diferencias en la DFe(%) están ligada principalmente al tamaño y características de las fracciones peptídicas generadas y a las interacciones de estas con los diferentes componentes del producto. Los péptidos generados durante la proteólisis de las globinas mantienen soluble al hierro hemínico evitando su polimerización al pH neutro en el sitio de absorción (duodeno), lo que favorece su estado soluble y disponible para ser absorbido.

IV.3.c.2 Dializabilidad del Zn (DZn(%)):

Como se puede observar en la **Figura IV.38** los valores de DZn(%) obtenidos para el CHB y los distintos hidrolizados son significativamente superiores al del maíz. Sin embargo, sólo con el hidrolizado FC se logró obtener un valor superior de DZn(%) respecto del CHB, mientras que para las demás muestras no se hallaron diferencias significativas, a excepción de la muestra con FC+F, que presentó menor DZn(%)

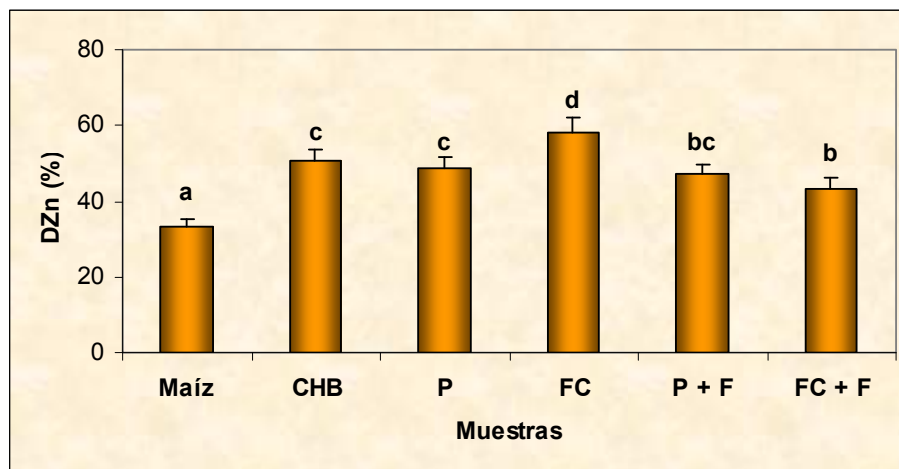
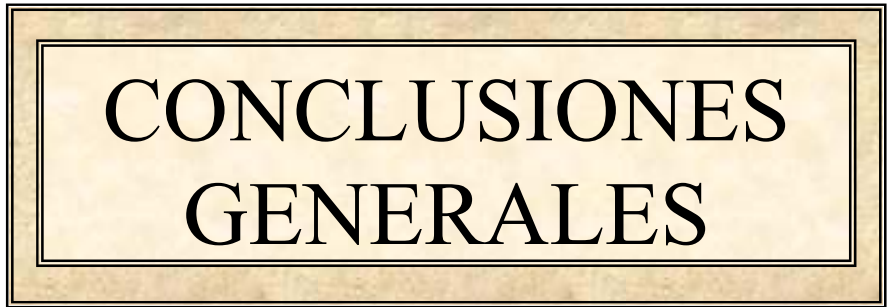
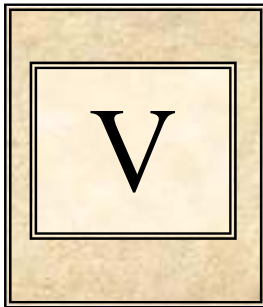


Figura IV.38 – Dializabilidad de zinc (DZn(%)) de los productos extrudidos: harina de maíz; maíz + 0.5% del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y maíz + 0.5% de los hidrolizados obtenidos con las enzimas Protex 6L (P), Fungal Protease Concentrate (FC), Protex 6L + Flavourzyme (P+F) y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$).

IV.3.d Conclusiones parciales:

- El agregado de CHB o sus hidrolizados no modificó las propiedades físicas de los expandidos respecto al control (Maíz), debido al bajo nivel de reemplazo usado.
- En todos los casos, el agregado de CHB o hidrolizados resultó en una mayor actividad antioxidante frente al control (Maíz).
- Si bien todos los hidrolizados presentaron mayor actividad antioxidante que el CHB, una vez incorporados al alimento sólo tres de los cuatro extrudidos con agregado de hidrolizados presentaron mayor actividad que el producto con CHB, correspondiendo la mayor actividad antioxidante al expandido con agregado del hidrolizado FC+F.
- La TEAC obtenida para el expandido FC no fue significativamente diferente respecto del expandido con agregado de CHB, lo que indica que si bien el proceso de extrusión no anuló la actividad antioxidante del hidrolizado, la afectó significativamente.
- La adición a la harina de maíz comercial de 0.5% de CHB no se tradujo en un incremento de la DFe(%), no detectándose Fe en el dializado al igual que para el control.
- En ausencia de las proteínas cárnicas promotoras de la disponibilidad, el Fe hemínico no presentó buena DFe(%).
- Sólo para los expandidos fortificados con los hidrolizados P+F y FC+F se logró obtener valores de DFe(%) que fueron de aproximadamente 10%, correspondiendo el mayor valor al expandido de maíz con agregado del hidrolizado FC+F.

- Estas diferencias en la DFe(%) están relacionadas al tamaño y características de las fracciones peptídicas generadas y a las interacciones de estas con los diferentes componentes del producto.
- Los valores de DZn(%) obtenidos en los expandidos con agregado del CHB y de los distintos hidrolizados son significativamente superiores al del maíz. Pero sólo en las muestras con agregado del hidrolizado FC se logró obtener un valor significativamente superior de DZn(%) respecto a las muestras con CHB.



V - CONCLUSIONES GENERALES

- Con la metodología utilizada se pudieron obtener hidrolizados con mayor solubilidad que el sustrato en la región del punto isoeléctrico. Aunque a pH 4.5 se observó una disminución significativa en la solubilidad de todos los hidrolizados respecto del Concentrado de hemoglobina bovina, mientras que a pH 9.5, sólo la solubilidad del hidrolizado de Protex 6L fue significativamente mayor respecto de las demás muestras.
- El Concentrado de Hemoglobina Bovina presentó los mayores porcentajes de Fe extraído a todos los pHs. A medida que el pH de extracción disminuye, también lo hace la proporción de hierro extraído. Esta variación en el porcentaje de hierro extraído estaría relacionada con la solubilidad del grupo hemo, la cual no sólo dependería del pH de extracción sino que también de la naturaleza de las fracciones peptídicas generadas durante el proceso enzimático, cuya solubilidad también es un factor muy importante.
- A pH 4.5 el uso de la enzima Protex 6L, permitió concentrar el hierro respecto del Concentrado de Hemoglobina Bovina y los demás hidrolizados. Esto indica que dicho extracto posee péptidos capaces de mantener soluble al hierro hemínico a pH 4.5.
- El color de los diferentes extractos estuvo comprendido entre el rojo y el amarillo, en sus distintas tonalidades. Los diferentes parámetros de color (L^* , a^* , b^* , H^* y C^*), variaron según el pH de extracción. A pHs alcalinos (9.5) se obtuvieron muestras más oscuras y amarronadas, mientras que a pH ácidos las muestras adquirieron un color amarillento. Esta variación *color – pH* estuvo ligada al contenido de Fe presente en cada extracto.
- La Capacidad Trolox equivalente de los hidrolizados fue casi tres veces superior a la de la muestra sin hidrolizar. Los mayores valores de Capacidad Trolox equivalente correspondieron a las muestras obtenidas con la hidrólisis secuencial. Esto sugiere que la proteólisis enzimática es una buena alternativa para aumentar la actividad antioxidante, y que cuanto mayor es la generación de especies proteicas de bajo PM más elevada es la misma.
- A medida que se incrementó la concentración proteica la actividad antioxidante tanto del sustrato como de los hidrolizados aumentó, presentando un comportamiento del

tipo asintótico. El hidrolizado de mayor actividad antioxidante (IC_{50} más baja) fue Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme. Por lo tanto, el empleo secuencial de proteasas es una buena estrategia para incrementar y optimizar la potencia antioxidante de una determinada proteína.

- Se obtuvo una correlación inversa entre los valores de Capacidad Trolox equivalente y los tamaños promedio de la cadena polipeptídica (PCL), para cada muestra. Por lo tanto las especies más activas o responsables de una mayor actividad antioxidante serían las de bajo PM. Lo que fue confirmado posteriormente en el fraccionamiento por PM, en donde la fracción con mayor Capacidad Trolox equivalente fue la de $PM < 5kDa$ (*Permeado*). De esta manera quedó de manifiesto que la elevada actividad antioxidante fue dependiente de la distribución de los tamaños moleculares. Al respecto cabe destacar que el aminoácido que se encontró en mayor proporción fue la Fenilalanina, lo que podría sugerir que este aminoácido contribuiría de manera significativa en la acción antioxidante de los hidrolizados.
- Se obtuvo una correlación directa entre el grado de hidrólisis de los hidrolizados y el valor de dializabilidad de Fe, correspondiendo el mayor valor de dializabilidad al hidrolizado obtenido con las enzimas Protex 6L + Flavourzyme.
- Con respecto al Concentrado de Hemoglobina Bovina se pudo ver que el valor de dializabilidad de Fe hallado fue bajo (4%) y significativamente menor al de los hidrolizados (exceptuando Protex 6L). Estos bajos valores de disponibilidad potencial no se correspondieron con aquellos altos valores de biodisponibilidad del hierro hemínico de comidas cárnicas. Lo que ponen de manifiesto que la disponibilidad del Fe hemínico es baja cuando es evaluada fuera de su entorno natural que es la carne.
- Con respecto a la dializabilidad de Zn, se observó que la proteólisis produce un aumento de la misma. correspondiendo el mayor valor al hidrolizado obtenido con las enzimas Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme.
- El agregado del Concentrado de Hemoglobina Bovina o sus hidrolizados no modificó las propiedades físicas de los expandidos respecto al control (Maíz), pero sí incremento la actividad antioxidante. No obstante las diferencias de capacidad antioxidante evaluadas antes de la extrusión se atenúan luego del proceso, correspondiendo la mayor actividad al expandido con agregado del hidrolizado Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme.

- También, los expandidos fortificados con los hidrolizados Protex 6L + Flavourzyme y Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme mostraron los mayores valores de dializabilidad de Fe, correspondiendo el mayor valor al expandido de maíz con agregado del hidrolizado obtenido con las enzimas Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme. Estas diferencias en la dializabilidad de Fe están relacionadas al tamaño y características de las fracciones peptídicas generadas y a las interacciones de estas con los diferentes componentes del producto.
- Con respecto a la dializabilidad de Zn, también se observó que los valores correspondientes a los expandidos con agregado del Concentrado de Hemoglobina Bovina y de los distintos hidrolizados son significativamente superiores al del maíz.
- El hidrolizado que una vez incorporado a la matriz alimentaria exhibió la mayor actividad antioxidante y disponibilidad de hierro fue el obtenido con las enzimas Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme y si bien la dializabilidad de Zn no es la mas alta, su valor no es despreciable.



VI

BIBLIOGRAFÍA



VI - BIBLIOGRAFÍA

AACC – American Association of Cereal Chemist. (1994). Approved methods. St. Paul, Minnesota.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of 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. (1993). Proteases. In *Enzymes in food processing*; Ed. Nagodawithana, T., Reed, G. Academic Press: San Diego, 159-203.

Alencar, F. (1983). Estudos da recuperação das proteínas do plasma bovino por complexação com fosfatos e a sua utilização em produtos cárneos. Campinas, SP, Brasil. Thesis dissertation, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Alonso, A., Domínguez, C., Guillén, D., & Barroso, C. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3112-3115.

A.O.A.C. (1995). Official Methods of Analysis, (16th ed.), Horowitz, Washington DC, USA.

Ashwell, M. (2002). Concept of Functional Foods, ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press.

Aubes-Dufau, I.; Seris, J. & Combes, D. (1995). Production of Peptic Hemoglobin Hydrolysates: Bitterness Demonstration and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 1982-1995.

Autio, K., Kiesvaara, M., Mälkki, Y., & Kanko, S. (1984). Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method. *Journal of Food Science*, 49, 859-862.

Baran J. (1995). Química Bioinorgánica. Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.

- Barret, A., Rawlings, N., & Woesner, J. (1998). *The handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, London.
- Belitz & Grosch. (1997). *Química de los Alimentos*, 2da Ed. Aminoácidos, péptidos proteínas. Cap 1, pag 11-103 Ed. Acribia SA, Zaragoza España.
- Bernardi, D., Pilosof, A., & Bartholomai, G. (1991). Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(2), 102-105.
- Berwal, J., & Novakofski, R. (1999). Interactive lesson in meat Science. <http://labs.ansci.illinois.edu/meatscience/lessons/lesson1.html>.
- Black, M. (1998). Zinc deficiency and child development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 464-469.
- Bombara N., Pilosof, A., & Añón, M. (1994). Mathematical Model for Formation Rate and Collapse of Foams from Enzyme Modified Wheat Flours. *Journal of Food Science*, 59(3), 626-628.
- Bouglé, D., & Bouhallab, S. (2005). Chapter 3: Mineral-Binding proteins and peptides and Bioavailability of Trace Elements. *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Edited by Yoshinori Mine and Fereidoon Shahidi. Taylor & Francis group. CRC Press 2006.
- Bovell-Benjamin, A., Viteri, F., & Allen, L. (2000). Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *American Journal Clinical Nutrition*, 71, 1563-1569.
- Caldironi, H., & Ockerman, H. (1982a). Incorporation of Blood Proteins into Sausage. *Journal of Food Science*, 47(2), 405-408.
- Caldironi, H., & Ockerman, H. (1982b). Bone and Plasma Protein Extracts in Sausages. *Journal of Food Science*, 47(5), 1622-1625.
- Calvo, C., & Durán, L. (1997). Propiedades Físicas II- Ópticas y color. Pag. 261 a 288 en *Temas en Tecnología de Alimentos*. Editado por José Miguel Aguilera. Volumen 1. Instituto Politécnico Nacional ISBN 970-18-0934-3.
- Carpenter, C., & Mahoney, A. (1992). Contribution of heme and non heme iron to human nutrition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 31(4), 333-367.

- Caulfield, L., Zavaleta, N., Shanka, A., & Merialdi, M. (1998). Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 499-508.
- Chang, C., Wu, K., & Chiang, S. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer's disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 621-629.
- Cheftel J., Cuq J., & Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias. Ed Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Cole, E. (1969). Alternative Methods to the Kjeldahl Estimation of Protein Nitrogen. *Review of Pure and applied chemistry*, 19, 109-130.
- Crystal, R., & Ramon, J. (1992). GSHSystem. Glutación: eje de la defensa antioxidante. *Excerpta Médica*, Amsterdam. Holanda.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fadiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- Delaney, R. (1975). The nutritive value of porcine blood plasma concentrates prepared by ultrafiltration and spray drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(3), 303-310.
- Del Río de Reyes, M., Constantinides, S., Sgarbieri, V., & El Dash, A. (1980). Chicken blood plasma proteins: physicochemical, nutritional and functional properties. *Journal of Food Science*, 45, 17-20.
- Drago, S., & González, R. (2001). Foaming properties of enzymatically hydrolyzed wheat gluten. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 269-273.

- Drago, S., Binaghi, M., Valencia, M. (2005). Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas. *Journal of Food Science*, 70(2), 107-112.
- Duarte, R., Simões Carvalho, M., & Sgarbieri, V. (1999). Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 231-236.
- Duthie, G., Wahle, K., & James, W. (1989). Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutrition Research Reviews*, 2, 51- 62.
- Duthie, G. (1999). Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 1015-1024.
- Enzyme Nomenclature List of International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992.
- Ericsson, C. (1983). Heme-iron-enriched amino acid and process for the preparation of heme-iron-enriched amino acid. USA. Int. Patent 4,411,915.
- Faraji, H., Decker, E., & Aaron, D. (1991). Suppression of lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes and ground pork by spray-dried porcine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(7), 1288-1290.
- Fung, E., Ritchie, L., Woodhouse, L., Roehl, R., & King, J. (1997). Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 80-88.
- Gallais, F. (1950). Première triade horizontale du groupe VIII: Fer, Cobalt, Nickel, généralités sur les complexes. In *Chimie Minérale Théorique et Expérimentale (Chimie électronique)*; Masson et Cie: Paris, 708-808.
- García-Casal, N., Layrisse, M., Peña-Rosas, J., Ramirez, J., Leets, I., & Matus, P. (2003). Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. *Nutrition Research*, 23, 451-463.
- Gibson, G., & Robertfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotic. *Journal of Food Nutrition*, 125, 1401-1412.

Gnanasekharan, V., Shewfelt, R., & Chinnan, M. (1992). Detection of color changes in green vegetables. *Journal of Food Science*, 47, 149-154.

González, R., Torres, R., De Greef, D., Gordo, N., & Velocci, M. (1991). Influencia de las condiciones de extrusión en las características de la harina de maíz para elaborar sopas instantáneas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 87-96.

González, R., Torres, R., & De Greef, D. (1998). Comportamiento a la cocción de variedades de arroz y maíz utilizando el amilógrafo y dos diseños de extrusores. *Información Tecnológica*, 9(5), 35-44.

González, R., Torres, R., & Añón, M. (2000). Comparison of rice and corn cooking characteristics before and after extrusion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 50(9), 29-34.

González, R., Torres, R., & De Greef, D. (2002). Extrusión–cocción de cereales. *Boletín SBCTA, Campinas*, 36(2), 104-115.

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Gunstone, J. (1980). Using blood plasma. *National Provisioner*, 23, 20-28.

Gunther, R. (1979). Chemistry and Characteristics of Enzyme-Modified Whipping Proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 345-349

Hallberg, L., Bjorn-Rasmussen, E., Howard, L., & Rossander, L. (1979). Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 14, 769-769.

Hallberg, L. (1981a). Bioavailable nutrient density: a new concept applied in the interpretation of food iron absorption data. *American Journal Clinical Nutrition*, 34, 2242-2247.

Hallberg, L. (1981b). Bioavailability of dietary iron in man. *Annual Review of Nutrition*, 123-147.

Halliday, D. (1973). Blood a source of proteins. *Process Biochemistry*, 8, 15-17.

Halliday, D. (1975). Blood a source of proteins. *Process Biochemistry*, 10, 11-12.

- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55, 49-52.
- Hambidge, K., Krebs, N., & Miller, L. (1998). Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. *American Journal Clinical Nutrition*, 68, 410-413.
- Hambidge, M. (2000). Zinc and Health: Current Status and Future Directions Human Zinc Deficiency. *American Society for Nutritional Sciences*, 1344-1349.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, 42-49.
- Hoyle, N., & Merritt, J. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76-79.
- Howell, N., & Lawrie, R. (1986). Functional aspects of blood plasma proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 22(2), 145-151.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hunt, J. (2003). Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 633-639.
- Hurrell, R., Lynch, S., Trinidad, T., Sassenko, S., & Cook, J. (1988). Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *American Journal Clinical Nutrition*, 47, 102-107.
- Hurrell, R., Juillerat, M., Reddy, M., Lynch, S., Dassenko, A., & Cook, J. (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *American Journal Clinical Nutrition*, 56, 573-578.
- Hurrell, R. (1997). Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 55(6), 210-222.
- İbanog, L., Ainsworth, P., Ayse, Ö., & Plunkett, A. (2006). Physical and sensory evaluation of a nutritionally balanced gluten-free extruded snack. *Journal of Food Engineering*, 75(4), 469-472.

- In, M., Chae, H., & Oh, N. (2002). Process development for heme-enriched by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. *Bioresource technology*, 84, 63-68.
- Inanami, O., Shiga, A., Okada, K., Sato, R., Miyake, Y., & Kuwabara, M. (1999). Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, 60(4), 452-457.
- Institute of Food Technologists. (2005). Expert Report: Functional foods: opportunities and challenges.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992).
- Jacobsen, C., Léomis, J., Linderstrom – Lang, K., & Ottesen, M. (1957). The pH-stat and its use in biochemistry. *Methods of biochemical analysis*, 4, 171-210.
- Jung, M., Kim, S., & Kim, S. (1995). Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: Kinetics and amino acid effects. *Food Chemistry*, 53, 397-403.
- Kabirullah, M., & Wills, R. (1981). Functional properties of sunflower protein following partial hydrolysis with proteases. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 14, 232-236.
- Knights, R. (1985). Processing and evaluation of antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infant protein hydrolysates. Ed. Fina Lisshlpz, Cap. 8, pp. 105-115.
- Kokini, J., Lih Shih, L., & Chedid, L. (1992). Effect of starch structure on starch rheological properties. *Food Technology*, 46(6), 124-139.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101, 615-620.
- Kow, Y. (1999). Oxidative stress, DNA damage and human diseases. *Dojin News*, 90, 7-10.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227- 680.
- Lahl, W., & Braun, S. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*, 48, 68-71.
- Lay, L., & Kokini, J. (1991). Physicochemical and rheological of starch during extrusion (a review). *Biotechnology progress*, 7(3), 251-266.

- Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, P., & Guillochon, D. (1998). Solubility of Heme in Heme-Iron Enriched Bovine Hemoglobin Hydrolysates. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 46(12), 5017-5025.
- Lee, C., Love, J., & Johnson, L. (1993). Sensory and physical properties of cakes with bovine plasma products substituted for egg. *Cereal Chemistry*, 70, 18-21.
- Léonil, J., Mollé, D., Bohallab, S., & Henry, G. (1994). Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), 591-595.
- Leung, F. (1998). Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(6), 304-307.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., & Wu, Y. (2007) Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102, 1135-1143.
- Liu, X., Yonekura, M., Tsutsumi, M., & Sano, Y. (1996). Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 44(10), 2957-2961.
- Löffler, A. (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food technology*, 40(12), 63-70.
- López Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J., Castillo, C., & Benedito, J. (1997). Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Archivos de medicina veterinaria*, 29(2), 171-180.
- López de Romaña, D., Lönnerdal, B., & Kenneth, H. (2003). Absortion of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulphate or zinc oxide. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 190-194.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological chemistry*, 193-265.
- Maddipati, K., & Marnett, L. (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(36), 17398-17403.

- Mannheim, A., & Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69 (12), 1163-1169.
- Marcuse, R. (1960). Antioxidant effect of amino acids. *Nature*, 186, 886-887.
- Margalit, R., & Rosenberg, M. (1984). Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. *Biochemical Journal*, 219, 445-450.
- Margot, A., Flaschel, E., & Renken, A. (1994). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochemistry*, 29(4), 257-262.
- Marriott, B. (2000). Functional foods: an ecologic perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1728-1734.
- Martínez Graciá, C., López Martínez, G., Ros Berruezo, G., Vidal Guevara, M., & Abellán Ballesta, P. (2000). Use of Heme Iron Concentrate in the Fortification of Weaning Foods. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 2930-2936.
- Michnik, A., Drzazga, Z., Kluczevska, A., & Michalik, K. (2005). Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin. *Biophysical Chemistry*, 118, 93-101.
- Milardovic, S., Kereković, I., Derrico, R., & Rumenjak, V. (2007). A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS^{•+} and biamperometric detector containing interdigitated electrode. *Talanta*, 71, 213-220.
- Miller, D., Schricker, B., Rasmussen, R., & Van Campen, D. (1981). An *in Vitro* method for estimation of iron availability from meals. *American Journal Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256.
- Mitchell, J., & Areas, J. (1992). Structural changes in biopolymers during extrusion. En: Food Extrusion Science and Technology JL Kokini, CT Ho, MV Karwe (Eds). Marcel Dekker New York, 345-360.
- Moosmann, B., & Behl, C. (2002). Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: Structure-Activity Relationship. *Molecular Pharmacology*, 61(2), 260- 268.
- Molina Ortiz, S., & Añón, M. (2001). Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates: DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 66(2), 489-499.

- Moreira-Araújo, R., Araújo, M., & Arêas, J. (2008). Fortified food made by the extrusion of a mixture of chickpea, corn and bovine lung controls iron-deficiency anaemia in preschool children. *Food Chemistry*, *107*, 158-164.
- Moure, A., Domínguez, H. & Parajó, J. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, *41*, 447-456.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642-646.
- Njoku, V. (2007). Effect of temperature on the solubility of haemoglobin modified with acetyl-3,5-dibromosalicylic acid. *International Journal of Physical Sciences*, *6*(2), 140-143.
- Okada, Y., & Okada, M. (1998). Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 401-406.
- Olivera Carrión, M. (2007). Alimentos Funcionales en Argentina. *La Alimentación Latinoamericana*, *272*, 6-12.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, *49*, 4619-4926.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J., & Câmara, J. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, *105*, 204-214.
- Pañuela, O. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, *36*(3), 215-225.
- Paredes – López, O., Schevenin, L., Hernández – López, D., & Cárabez – Trejo, A. (1989). Amaranth starch-isolation and parcial characterization. *Starch/Stärke*, *41*, 205-207.
- Park, J., Rhee, K., Kim, B., & Rhee, K. (1993). Single-screw extrusion of defatted soy flour, corn starch and raw beef blends. *Journal of Food Science*, *58*, 9-19.

- Peng, X., Xiong, Y., & Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, *113*, 196-201.
- Peña-Ramos, E. & Xiong, Y. (2002). Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Journal of Food Science*, *67*(8), 2952-2956.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, *16*, 1306-1314.
- Poltronieri, F., Arêas, J., & Colli, C. (2000). Extrusion and iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry*, *70*, 175-180.
- Poutanen, K. (1997). Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends in Food Science and Technology*, *9*(8), 300-306.
- Prior, R., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, *51*, 3273-3279.
- Pukalskas, A., Van Beek, T., Venskutonis, R., Linssen, J., Van Veldhuizen, A., & De Groot, Æ. (2002). Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloe odorata*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2914-2919.
- Puski, G. (1975). Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chemistry*, *52*, 655-664.
- Qian, Z., Jung, W., Byun, H., & Kim, S. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*, *99*, 3365-3371.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W., Je, J., & Kim, S. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, *38*, 175-182.
- Ramón, J. (1993). Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. Ed. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A.), Madrid, España.
- Rawlings, N., & Barret, A. (1993). Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, *244*, 461-486.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Ananth, P., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., & Xue, S. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108, 727-736.
- Robertfroid, M. (2000). Defining functional foods, Chapter 1, in “Functional foods. Concept to product”. Edited by Glenn R. Gibson and Christine M. Williams, pp. 9-25. CRC Press, Washington DC.
- Robertfroid, M. (2002). Global view of functional foods: European Perspectives. *British Journal of Nutrition. Proceedings of an international Symposium 17-19 October 2001 in Paris, organized by ILSI Europe*, 88(2), 133-138.
- Rodríguez Silveira, M., Monereo Megías, S., & Molina Baena B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿Cerca o lejos?. *Revista Española de Salud Pública*, 3, 317-331.
- Rouault, T. (2005). Linking physiological functions of iron. *Nature Chemical Biology*, 4, 193-194.
- Sadettin, T., Sule Ustun, N., & Bogachan Altunkaynak, T. (2004). Effect of cooking methods on total and heme iron contents of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Food Chemistry*, 88(2), 169-172.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., & Juneja, L. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86, 99-103.
- Sakanaka, S., & Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95, 243-249.
- Salgueiro, M., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Ettlin, E., Weill, R., & Boccio, J. (2000). Bioavailability biodistribution, and toxicity of BioZn-AAS: a new zinc source. Comparative studies in rats. *Nutrition*, 16, 762-766.
- Senser, F., & Scherz, H. (1999). El pequeño “Souci-Fachmann-Kraut”. Tablas de composición de alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza. España.

- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295.
- Sorbetti-Guerri, F., & Denis, M. (1998). Code for collagen's stability deciphered. *Nature*, 392, 667-668.
- Sousa, Jr, Lopes, G., Tardioli, P., Giordano, R., Almeida, P., & Giordano, R. (2003). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147- 153.
- Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & Fitz Gerald, R. (2002). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13, 447-453.
- Supuran, C., & Scozzafava, A. (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12(2), 217-242.
- Suryaprakash, P., Kumar, R., & Prakash, V. (2000). Thermodynamic of interaction of caffeic acid and quinic acid with multisubunit proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(3), 219-228.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Teichgräber, P., Zache, U., & Knorr, D. (1983). Enzymes from germinating seeds. Potential applications in food processing. *Trends in Food Science Technology*, 5(4), 145-149.
- Toldrà, M., Elias, A., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2004). Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 88, 461-468.
- Uzel, C., & Conrad, M. (1998). Absorption of heme iron. *Seminars in Hematology*, 35, 27-34.
- Vaghefi, N., Nedjaoum, F., Guillochon, D., Bureau, F., Arhan, P., & Bougle, D. (2002). Influence of the extent of hemoglobin hydrolysis on the digestive absorption of heme iron. An in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4969-4973.

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites* 52(2), 127-131.

Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, M. (2006). Bioactive Peptides in Storage Plant Proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 99-102.

Viteri, E., Alvarez, E., Batres, R., Torun, B., Pineda, O., Mejia, L., & Sylvi, J. (1995). Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminetetraacetate (FeNaEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1153-1163.

Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F., Olivares, M., Llaguno, S., Letelier, A., Vega, V., & Stekel, A. (1993). Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(2), 190-194.

Wang, J., Zhao, M., Zhao, Q., & Jiang, Y. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101, 1658-1663.

Wayner, D., Burton, G., Ingold, K., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled lipid peroxidation. *FEBS Letters*, 187, 33-37.

Weinborn, V., Olivares, M., Arreondo, M., Hertrampf, E., & Pizarro, F. (2008). Effect of purified animal and vegetal proteins on Heme – iron bioavailability. 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals. Pucon – Chile, November 9th – 13th, 2008.

Wismer-Pedersen, J. (1979). Utilization of animal blood meat products. *Food Technology*, 33, 76-80.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949

Wolfgor, R., Rodríguez, V., Pellegrino, N., & Valencia, M. (1996). Evaluación de cereales fortificados como aportadores de Fe. *Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición*, 7(2), 33-37.

- Wolfgor, R., Drago, S., Rodríguez, V., Pellegrino, N., & Valencia, M. (2002). In vitro measurement of available iron in fortified foods. *Food Research International*, 35, 85-90.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111, 370-376.
- Yang, J., Ho, H., Chu, Y., & Chow, C. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110, 128-136
- Zhang, W., & Hosney, R. (1998). Factors affecting expansion of corn meal with poor and good expansion properties. *Cereal Chemistry*, 75(5), 639-643.
- Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F., & Pitot, J. (1997). Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers*, 43(2), 75-98.
- Zhao, Q., Pitot, J., Gautier, V., & Gottencheau, G. (1996). Isolation and characterization of bacterial growth – stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Appl. Microbiol. Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6), 778-784.
- Zimmermann, M., Winichagoon, P., Gowachirapant, S., Hess, S., Harrington, M., Chavasit, V., Lynch, R., & Hurrell, R. (2005). Comparison of the efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulfate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 1276-1282.