

Trabajo de tesis doctoral

EVALUACIÓN DE HARINA DE ARVEJAS Y PRODUCTOS DERIVADOS COMO INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES

Lic. M. Agustina Cipollone
Dir: Valeria A. Tironi
2024



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de tesis doctoral

Tesista: Lic. M. Agustina Cipollone

Directora: Dra. Valeria A. Tironi

Año: 2024



El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CIDCA, CCT La Plata-CONICET, CICPBA, UNLP, La Plata, Argentina) bajo la dirección de la Dra. Valeria Anahí Tironi. Su realización fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo de tesis doctoral se publicaron los siguientes artículos en:

Congresos:

Cipollone M.A., Tironi V. (2024) “Desarrollo de una bebida vegetal a base de harina de arveja fermentada como potencial alimento antioxidante.” IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2024), Córdoba.

Cipollone M.A., Tironi V. (2023) “Extracción de polifenoles de harina de arvejas (*Pisum sativum*): análisis de diferentes metodologías.” XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. IX Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. VII Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. V Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias. Buenos Aires.

Cipollone M.A., Abraham, A., Tironi V. (2023) “Efecto de la fermentación autóctona de harina de arvejas (*Pisum sativum*) en la proteólisis y actividad antioxidante de péptidos.” XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. IX Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. VII Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. V Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias. Buenos Aires.

Cipollone M. A. y Tironi, V. (2020) “Obtención de harina de arvejas (*Pisum sativum*) fermentada como potencial ingrediente antioxidante.” 3° Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIIAL 2020), Montevideo.

Cipollone M. A., Tironi Valeria A. (2019) “Preparation of potential antioxidant ingredients by fermentation of pea flour by the autochthonous microbiota”. XII CIBIA Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos 2019. *Libro de actas, resúmenes*. Faro, Portugal.

Cipollone M. A., Tironi Valeria A. (2018) “Evaluación de potenciales ingredientes funcionales antioxidantes obtenidos a partir de arvejas”. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC) 2018. *Libro de actas, resúmenes*. Córdoba, Argentina.

Revistas científicas nacionales:

María A. Cipollone, Valeria A. Tironi (2020). Efecto de la fermentación y la digestión gastrointestinal simulada en la generación de péptidos antioxidantes a partir de harina de arveja amarilla (*Pisum sativum*). Revista FANUS (Foro de la alimentación, la nutrición y la salud). Vol. 2 / Número 2. ISSN 2683-9520

Revistas científicas internacionales:

María A. Cipollone, Analía G. Abraham, Ariel Fontana, Valeria A. Tironi (2024). Autochthonous fermentation as a mean to improve the bioaccessibility and antioxidant activity of proteins and phenolic compounds of yellow pea flour. *Foods*, 13(5), 659; <https://doi.org/10.3390/foods13050659>

María A. Cipollone, Ariel Fontana, Susan F. García Fillerías, Valeria A. Tironi (2024). Characterization, bioaccessibility and antioxidant activities of phenolic compounds recovered from yellow pea (*Pisum sativum*) flour and protein isolate. *Plant Foods for Human Nutrition*. 79, 401–409 <https://doi.org/10.1007/s11130-024-01172-z>

María A. Cipollone, Valeria A. Tironi (2020). Yellow pea flour and protein isolate as sources of antioxidant peptides after simulated gastrointestinal digestion. *Legume Science*, <https://doi.org/10.1002/leg3.59>

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la formación académica que ha sido fundamental para mi desarrollo profesional y personal.

Al CONICET por la beca otorgada que hizo posible la realización de este trabajo.

A Valeria quien me acompañó, educó y apoyó en todo el trabajo, siempre es un placer trabajar con ella.

A las autoridades y todo el personal del CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos) por abrirme las puertas y permitirme trabajar con libertad.

A mi familia, nada hubiese sido posible sin ellos, el apoyo constante me impulsó a nunca bajar los brazos.

Al Kun, Feli y Balta, solo ellos pueden saber lo que fue todo este proceso, siempre bancándome aún cuando los tiempos para pasar en familia quedaban cortos.

A mis amiguis del CIDCA, a todas, las quiero, siempre sostén, siempre red. Gracias por la contención en momentos que hizo falta.

A mis amigas de la vida, las del cole, las del grupo de mamis, las de Entre Ríos, las de ADIP siempre al pie del cañón para lo que necesitara.

A los integrantes de LIDiPA, por su disposición y solidaridad para guiarme en mi formación personal y profesional.

A Charlie y Luchi, los mejores compañeros que alguien podría haber querido conocer.

A Mari y los chicos de la cátedra.

A todos los que de alguna u otra manera me acompañaron, contuvieron, enseñaron y permitieron que este trabajo se llevara adelante.

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	15
ÍNDICE DE ESQUEMAS	21
ÍNDICE DE TABLAS.....	23
ÍNDICE DE IMÁGENES	26

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS	28
I.1 Las legumbres y las arvejas en particular	29
i.1.1. Características generales	29
i.1.2. Legumbres en Argentina.	32
i.1.3. Arvejas.	34
I.2 Evaluación de ingredientes y alimentos funcionales	38
I.3 Estrés oxidativo y su prevención	42
i.3.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).....	42
i.3.2. Daño oxidativo a biomoléculas.....	46
i.3.3. Defensa antioxidante	47
i.3.4. Estrés oxidativo	50
i.3.5. Antioxidantes dietarios	53
i.3.6. Actividad antioxidante de proteínas/péptidos	56
i.3.7. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos.....	60
i.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante.....	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....	66

BIBLIOGRAFÍA	68
--------------------	----

Capítulo I.

HARINA Y AISLADO PROTEICO DE ARVEJAS AMARILLAS (*PISUM SATIVUM*)

I.1. INTRODUCCION	79
I.2. OBJETIVOS	85
I.2.1. Objetivos generales	86
I.2.2. Objetivos específicos	86
I.3. MATERIALES Y METODOS	87
I.3.1. Preparación y caracterización de ingredientes: harina y aislado proteico	88
I.3.1.1. Preparación de la harina	88
I.3.1.2. Preparación del aislado proteico	88
I.3.1.3. Composición centesimal	88
I.3.1.4. Determinación del factor antitriptico	90
I.3.2. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS).....	91
I.3.2.1. Método estandarizado de digestión estática <i>in vitro</i>	91
I.3.2.2. Determinación del grado de hidrólisis proteica	94
I.3.3. Estudio de la fracción proteica	95
I.3.3.1. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	95
I.3.3.2. Obtención de fracciones solubles en PBS	95
I.3.3.3. Determinación de la concentración de proteína soluble.....	96
I.3.3.4. Cromatografía líquida de rápida de proteínas (FPLC) de filtración en gel	96
I.3.4. Estudio de la fracción polifenólica	97
I.3.4.1. Extracción de los polifenols	97
I.3.4.2. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT).....	97

I.3.4.3. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	98
I.3.5. Actividad antioxidante	99
I.3.5.1. Tratamiento de las muestras	99
I.3.5.2. Ensayos <i>in vitro</i> acelulares	99
I.3.5.3. Ensayos celulares	103
I.3.5.3.1. Cultivo de células Caco-2 TC7	103
I.3.5.3.2. Citotoxicidad de las muestras. Determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH).....	105
I.3.5.3.3. Inducción de la oxidación celular y determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo.....	106
I.3.6. Simulación de la absorción intestinal.....	108
I.3.6.1. Obtención monocapas de células Caco-2 TC7 en insertos	108
I.3.6.2. Determinación de la actividad transportadora.....	110
I.3.6.3. Análisis por RP-HPLC	110
I.3.7. Análisis estadístico	110
I.4. RESULTADOS.....	111
I.4.1. Caracterización fisicoquímica de la harina (H) y aislado proteico (A) de arvejas	112
I.4.1.1. Factor antitriptico	112
I.4.1.2. Composición centesimal	115
I.4.1.3. Composición polipeptídica y solubilidad proteica	117
I.4.1. Compuestos fenólicos.....	120
I.4.1.4.1. Obtención de extractos de CF: influencia del tipo de solvente y metodología de extracción utilizada.....	120
I.4.1.4.2. Comparación de CF en extractos obtenidos por EAU de H y A	125
I.4.2. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS) de H y A. Compuestos bioaccesibles.....	128
I.4.2.1. Grado de proteólisis, composición peptídica/polipeptídica y solubilidad proteica	129
I.4.2.2. Análisis de fracciones acuosas bioaccesibles.....	137

I.4.2.3. Fracciones solubles en etanol/agua: CF.....	141
I.4.3. Estudio de la actividad antioxidante	148
I.4.3.1. Actividad antioxidante por métodos químicas (no celulares).....	148
I.4.3.2. Actividad antioxidante en cultivos celulares.....	160
I.4.4. Simulación de la absorción intestinal	170

I.5. CONCLUSIONES	189
--------------------------------	------------

I.6. BIBLIOGRAFÍA	197
--------------------------------	------------

Capítulo II.

HARINA FERMENTADA

II.1. INTRODUCCION	212
---------------------------------	------------

II.2. OBJETIVOS	217
------------------------------	------------

II.2.1. Objetivos generales	218
-----------------------------------	-----

II.2.2. Objetivos específicos	218
-------------------------------------	-----

II.3. MATERIALES Y METODOS	219
---	------------

II.3.1. Preparación de las harinas fermentadas	220
--	-----

II.3.1.1. Ensayos preliminares. Fermentación en tubo	220
--	-----

II.3.1.2. Fermentación en bio-reactor	220
---	-----

II.3.2. Análisis microbiológico	221
---------------------------------------	-----

II.3.3. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS).....	224
---	-----

II.3.4. Caracterización molecular y funcional de las muestras	224
---	-----

II.3.4.1. Composición centesimal	225
--	-----

II.3.4.2. Determinación del grado de hidrólisis proteica	225
--	-----

II.3.4.3. Electroforesis	225
--------------------------------	-----

II.3.4.4. Obtención de las fracciones solubles y determinación de la concentración de proteína soluble.....	225
II.3.4.5. Cromatografía líquida de alta presión (FPLC) de filtración en gel.....	225
II.3.4.6. Extracción de polifenoles.....	226
II.3.4.7. Determinación de polifenoles totales.....	226
II.3.4.8. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	226
II.3.4.9. Actividad antioxidante.....	226
II.3.5. Simulación de la absorción intestinal.....	226
II.3.6. Análisis estadístico.....	226
II.4. RESULTADOS.....	228
II.4.1. Ensayos preliminares para la evaluación de condiciones de fermentación natural.....	229
II.4.1.1. Condiciones de concentración.....	229
II.4.1.2. Condiciones de incubación.....	230
II.4.2. Fermentación natural de H en bio-reactor.....	234
II.4.2.1. pH y recuento microbiológico.....	234
II.4.2.2. Composición centesimal.....	238
II.4.2.3. Efecto de la fermentación sobre la fracción proteica, su bioaccesibilidad y actividad antioxidante.....	239
II.4.2.3.1. Actividad antioxidante por ensayos químicos (no celulares).....	245
II.4.2.3.2. Actividad antioxidante en cultivos celulares.....	251
II.4.2.4. Efecto de la fermentación sobre los CF, su bioaccesibilidad y actividad antioxidante.....	253
II.4.2.4.1. Actividad antioxidante química (no celular).....	256
II.4.2.4.2. Actividad antioxidante en cultivos celulares.....	260
II.4.3. Simulación de la absorción intestinal.....	262
II.5. CONCLUSIONES.....	270
II.6. BIBLIOGRAFÍA.....	276

Capítulo III.

BEBIDAS A BASE DE HARINA Y HARINA FERMENTADA DE ARVEJAS

III.1. INTRODUCCION	283
III.2. OBJETIVOS	289
III.2.1. Objetivos generales	290
III.2.2. Objetivos específicos	290
III.3. MATERIALES Y METODOS	291
III.3.1. Preparación de bebida vegetal a base de proteínas de harina de arvejas amarillas (B).....	292
III.3.2. Preparación de bebida vegetal a base de harina de arvejas fermentada (BF).....	293
III.3.3. Estabilidad física de las bebidas – Quick Scan.....	294
III.3.4 Evaluación del comportamiento de flujo y determinación de la viscosidad.	295
III.3.5. Análisis microbiológico de las bebidas.....	295
III.3.6. Simulación de la digestión gastrointestinal (DGIS).....	295
III.3.6.1. Grado de proteólisis.....	296
III.3.7. Composición centesimal de las bebidas y sus digeridos	296
III.3.8. Caracterización de la fracción proteica	296
III.3.8.1. Electroforesis	296
III.3.8.2. Obtención de fracciones solubles y determinación de la concentración de proteína soluble.....	296
III.3.8.3. Cromatografía líquida de alta presión (FPLC) de filtración en gel.....	297
III.3.9. Compuestos fenólicos	297
III.3.9.1. Determinación de polifenoles totales (CFT).....	297
III.3.9.2. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	297

III.3.10. Actividad antioxidante	297
III.3.10.1. Ensayos <i>in vitro</i> acelulares.....	297
III.3.10.2. Ensayos <i>in vitro</i> celulares.....	297
III.3.10.2.1. Citotoxicidad de las muestras. Determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH).....	297
III.3.10.2.2. Inducción de la oxidación celular y determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	297
III.3.11. Análisis estadístico	297
III.4. RESULTADOS.....	299
PARTE A - Bebida a base de harina de arvejas (B).	
III.4.A.1 Composición centesimal.....	302
III.4.A.2 Viscosidad.....	303
III.4.A.3 Estabilidad física.....	306
III.4.A.4 Estabilidad microbiológica.....	313
III.4.A.5 Caracterización de la fracción proteica. Efecto de la DGIS	315
III.4.A.6 Actividad antioxidante de la fracción peptídica.....	321
III.4.A.6.1. Actividad <i>in vitro</i> acelular.....	321
III.4.A.6.2. Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales.	323
III.4.A.7 Caracterización de la fracción fenólica.....	325
III.4.A.8 Actividad antioxidante de la fracción fenólica.....	329
III.4.A.8.1. Actividad <i>in vitro</i> acelular.....	329
III.4.A.8.2. Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales.	331
PARTE B - Bebida a base de harina de arvejas fermentada (BF).	
III.4.B.1 Ensayos de optimización de la preparación de BF. Viscosidad y estabilidad.....	333
III.4.B.2 Análisis microbiológico.....	339
III.4.B.3 Viscosidad.....	342
III.4.B.4 Composición centesimal.....	345

III.4.B.5 Composición polipeptídica, solubilidad. Efecto de la DGIS.....	346
III.4.B.6 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> acelular de la fracción peptídica... ..	349
III.4.B.7 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales de la fracción acuosa.....	351
III.4.B.8 Caracterización de la fracción fenólica... ..	352
III.4.B.9 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> acelular de la fracción fenólica... ..	355
III.4.B.10 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales... ..	355
III.5. CONCLUSIONES	357
III.6. BIBLIOGRAFÍA.....	366
CONCLUSIONES GENERALES Y PESPECTIVAS FUTURAS	371

Figura I.1. Actividad de tripsina en presencia de H, Ht y A

Figura I.2. Electroforesis SDS-PAGE de H y A; P: patrón de bajo peso molecular

Figura I.3. Comparación de cromatogramas FPLC de A y H usando columna Superdex 75. La concentración de proteínas fue normalizada a 1 mg/ml

Figura I.4. Electroforesis SDS-PAGE A. H; A; HD1; AD1; B. H; A; HD2; AD2 (P) patrón de bajo peso molecular.

Figura I.5. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de H, HD1 y HD2. Se indican los marcadores de MM en la parte de arriba.

Figura I.6. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de A, AD1 y AD2. Se indican los marcadores de MM en la parte de arriba.

Figura I.7. Comparación de cromatogramas FPLC de filtración en gel (Superdex 30) de los digeridos de harina y aislado obtenidos por: A. protocolo 1 de DGS: HD1 y AD1; B. protocolo 2 de DGS: HD2 y AD2. Los cromatogramas se normalizaron a 1 mg proteína/ml.

Figura I.8. Comparación de cromatogramas FPLC (Superdex 30) de los solubles resuspendidos (s), directos (sd) y bioaccesibles (sb). A. HDs y HDsd las masas de proteína fueron normalizadas a 1 mg/ml; B. HDsd y HDsb;

Figura I.9. Comparación de cromatogramas FPLC (Superdex 30) de los solubles resuspendidos (s), directos (sd) y bioaccesibles (sb). A. ADs y ADsd (masa de proteína normalizada a 1 mg/ml); B. ADsd y ADsb.

Figura I.10. Comparación de cromatogramas FPLC (Superdex 30) de los solubles directos y bioaccesibles de BR. Los cromatogramas fueron normalizados a una concentración de 1 mg proteína/ml.

Figura I.11. Distribución de los distintos tipos de CF identificados en los extractos etanólicos de H, A, HD y AD.

Figura I.12. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de extractos obtenidos con etanol 60 % (EAU), evaporados y solubilizados en PBS. A. He, HDe y BR; B. Ae, ADe y BR. Se indican los marcadores de PM (kDa) en la parte superior de las figuras.

Figura I.13. Efecto del tratamiento con colestiramina sobre los extractos etanólicos A. BRe antes y después del tratamiento. B. HDe y ADe antes y después del tratamiento.

Figura I.14. Cromatografía de filtración en gel FPLC (Superdex 30) de extractos etanólicos resolubilizados en PBS. A. HDe y su fracción bioaccesible (HDesb); B. ADe y su fracción

bioaccesible (ADesb); C. BRE y su fracción bioaccesible BResb. Los marcadores de peso molecular (kDa) se indican en la parte superior de las figuras.

Figura I.15. A. Cultivo de células Caco-2 TC7 tratadas con BRsb; B. Monocapa de células Caco2-TC7.

Figura I.16. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con las fracciones bioaccesibles BRsb, HDsb y ADsb.

Figura I.17. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con diluciones 1/5 de las fracciones bioaccesibles BResb, HDsb y ADesb.

Figura I.18. Perfiles RP-HPLC correspondientes a la fase móvil (Fase A) y el buffer utilizado en el ensayo (PBS)

Figura I.19. Perfiles RP-HPLC de BRsd (1,8 mg proteína/ml) y BRsb (0,4 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

Figura I.20. Perfiles RP-HPLC de HDsd (28 mg proteína/ml) y HDsb (20 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

Figura I.21. Perfiles RP-HPLC de ADsd (21 mg proteína) y ADsb (8,3 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

Figura I.22. Perfiles RP-HPLC de HDsb (20 mg proteína/ml), ADsb (8,3 mg proteína/ml) y BRsb (0,4 mg proteína/ml)

Figura I.23. Espectros de absorción de los picos 3, 4 y 5 de las muestras HDsb, ADsb y BRsb.

Figura I.24. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HDsb (20 mg proteína/ml), Cámara apical (HD AP) y cámara basolateral (HD BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm.

Figura I.25. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HDsb (20 mg proteína/ml), Cámara apical (HD AP) y cámara basolateral (HD BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm.

Figura I.26. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de ADsb (8,3 mg proteína/ml), Cámara apical (AD AP) y cámara basolateral (AD BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm.

Figura I.27. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de ADsb (8,3 mg proteína/ml), Cámara apical (AD AP) y cámara basolateral (AD BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm.

Figura II.1. Electroforesis de las muestras fermentadas y su control A. SDS-PAGE, (P) Patrón de bajo peso molecular; B. Tricina SDS-PAGE, (P) Patrón de muy bajo peso molecular

Figura II.2. Cromatografía FPLC de filtración en gel de las muestras fermentadas y su control. A. Superdex 75; B. Superdex 30

Figura II.3. Electroforesis SDS-PAGE de las harinas, harinas fermentadas y sus digeridos, (P) patrón de bajo peso molecular

Figura II.4. FPLC de filtración en gel, columna Superdex 30. A. Dispersiones de harinas (H1 y H2) y harinas fermentadas (HF1 y HF2); B. Digeridos gastrointestinales (H1D, H2D, HF1D, HF2D).

Figura II.5. Fracciones separadas por FPLC de filtración en gel. A. Concentración polipeptídica/peptídica. B. % inhibición de ROO[·] (ensayo ORAC). Los valores se expresan como promedio ± SD.

Figura II.6. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de HF2Dsd y HF2Dsb. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Figura II.7. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas, basal); células pretratadas con las fracciones bioaccesibles BRsb, HDsb y HF2Dsb.

Figura II.8. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de extractos obtenidos con etanol 60 % (EAU), evaporados y solubilizados en PBS. Se indican los marcadores de PM (kDa) en la parte superior de las figuras.

Figura II.9. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con diluciones 1/5 de las fracciones bioaccesibles BResb, HDsb y HF2Desb.

Figura II.10. Cromatografía de filtración en gel FPLC (Superdex 30) de extractos etanólicos resolubilizados en PBS. A. HDe y su fracción bioaccesible (HDesb); B. HFDe y su fracción bioaccesible (HFDesb); C. BRe y su fracción bioaccesible BResb. Los marcadores de PM (kDa) se indican en la parte superior de las figuras.

Figura II.11. Perfiles RP-HPLC correspondientes a la fase móvil (Fase A) y el buffer utilizado en el ensayo (PBS)

Figura II.12. Perfiles RP-HPLC de HF2Dsd (29 mg proteína/ml) y HF2Dsb (19 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

Figura II.13. Espectros de absorción de los picos 3, 4 y 5 de las muestras HDsb, HF2Dsb y BRsb.

Figura II.14. Perfiles RP-HPLC (210 nm) de HDsb (20 mg proteína/ml), HF2Dsb (19 mg proteína/ml) y BRsb (0,4 mg proteína/ml).

Figura II.15. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HF2Dsb (19 mg proteína/ml), Cámara apical (HF2D AP) y cámara basolateral (HF2D BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm

Figura II.16. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HF2Dsb (19 mg proteína/ml), Cámara apical (HF2D AP) y cámara basolateral (HF2D BL) luego de 3 h de incubación. A. Cromatograma realizado a 220 nm; B. Cromatograma realizado a 257 nm; C. Cromatograma realizado a 278 nm.

Figura II.17. Resumen de los resultados.

Figura III.1. Beneficios para la salud de las bebidas a base de vegetales. (Mishra et al., 2023)

Figura III.2. Esquema simplificado del sistema óptico y de adquisición de datos del analizador óptico vertical

Figura III.3. Esquema simplificado la celda de medida y las zonas de análisis.

Figura III.4. Comportamiento de **B** pasteurizada y sin pasteurizar. Las muestras se homogeneizaron manualmente antes de la medida. **B** Evolución de la viscosidad de **B** pasteurizada y sin pasteurizar

Figura III.5. Análisis de viscosidad de **B** en función del tiempo de almacenamiento. Las muestras fueron homogeneizadas manualmente antes de cada medida.

Figura III.6 % BS en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm) de **B**. Cinética (medida cada 10 min, en parte inferior (10-15 mm) del tubo) realizada el día de la preparación a la bebida sin pasteurizar (**B** s/p) y pasteurizada (**B** p).

Figura III.7. BS % en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de **B**. Cinética (cada 1 min durante 40 min y a los 91 min) realizada a las 24 h de la preparación, posterior a una homogeneización manual..

Figura III.8. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de **B**. Cinética (cada 1 min) realizada luego de 4 días de almacenamiento a 4 °C.

Figura III.9. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de la bebida **B** pasteurizada. Cinética (medida cada 1 min) realizada luego de 7 días de la

preparación de la bebida. A. Medida realizada sobre una muestra abierta; B. Medida realizada sobre una muestra cerrada.

Figura III.10. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de B. Cinética (medida cada 1 min): A. luego de 14 días de almacenamiento a 4 °C (cerrado); B. luego de 21 días de almacenamiento a 4 °C (cerrado).

Figura III.11. % BS en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de B. Cinética (medida cada 1 min) realizada luego de 60 días de almacenamiento a 4 °C en recipiente cerrado

Figura III.12. % BS en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Valores iniciales comparados en el tiempo.

Figura III.13. Electroforesis SDS-PAGE (A) harina H y aislado A, (B) B y BD. (P) patrón de bajo peso molecular.

Figura III.14. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de B, H y A (normalizados 1 mg/ml). Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Figura III.15. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de Bs y BDs. Se indican los marcadores de PM en la parte superior

Figura III.16. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de BDsd y BDsb. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Figura III.17. % BS en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm) de la bebida BF1. A. Cinética (medida cada 1 min durante 30 min) realizada el día de la preparación a la bebida sin pasteurizar. B. Cinética (medida cada 1 min durante 30 min) realizada el día de la preparación a la bebida pasteurizada.

Figura III.18. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de la bebida BF2. Cinética medida cada 1 min durante 40 min.

Figura III.19. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de la bebida BF3. Cinética medida cada 1 min durante 40 min.

Figura III.20. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de BF. Cinética realizada a los 7 días de preparada la bebida (medida cada 1 min durante 40 min)

Figura III.21. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de BF. Cinética realizada a los 21 días de almacenamiento a 4°C (medida cada 1 min durante 40 min)

Figura III.22. Comportamiento reológico de BF pasteurizada y sin pasteurizar

Figura III.23. Análisis de viscosidad de BF en función del tiempo de almacenamiento. Las muestras fueron homogeneizadas manualmente antes de la medida.

Figura III.24. Electroforesis SDS-PAGE (A) harina fermentada HF (B) de las muestras BF y BFD. (P) patrón de bajo peso molecular.

Figura III.25. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de BFs y HF. Se indican los marcadores de PM en la parte superior

Figura III.26. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de BFs y BFDs. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Figura III.27. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de BFDsd y BFDsb. Se indican los marcadores de PM en la parte superior

Figura III.28. Resultados.

Esquema i.1. Evaluación de propiedades biológicas de matrices alimentarias, adaptación de Alongi y Anese, (2021).

Esquema i.2. Diagrama esquemático de formación de ROS y RNS.

Esquema i.3. Formación de ROS en la cadena respiratoria

Esquema i.4. Reacción de Fenton / Haber-Weiss

Esquema i.5. Mecanismos de acción de enzimas que actúan como “antioxidantes” en los organismos aerobios.

Esquema i.6. Rutas de señalización intracelular involucradas con la respuesta frente a ROS/RNS. ARE: antioxidant responsive element; AOE: enzimas antioxidantes. Tomado de Kurutas (2016).

Esquema i.7. Teoría tradicional de defensa antioxidante celular. Adaptado de Kurutas (2016)

Esquema i.8. Actividad antioxidante mediada por la inducción de genes. Adaptado de Finley et al. (2011)

Esquema i.9. Mecanismos de acción antioxidante de péptidos reportados en la literatura. Adaptado de Aguilar-Toalá y Liceaga (2020).

Esquema i.10. Clasificación de polifenoles

Esquema I.1. Aplicaciones alimentarias de la arveja y sus productos (Wu et al., 2023).

Esquema I.2. Preparación de aislado proteico A

Esquema I.3. Determinación del factor antitriptico

Esquema I.4. Proceso de digestión gastrointestinal simulada realizada en tubo falcon

Esquema I.5. Determinación del grado de hidrólisis por el método de TNBS

Esquema I.6. Vía de oxidación de fluoresceína propuesta en presencia de AAPH (Ou et al., 2001).

Esquema I.7. Reacción entre el persulfato de potasio, el ABTS y los antioxidantes (AOH) (adaptado de Oliveira et al., 2014).

Esquema I.8. Reacción que fundamenta el método para la determinación de LDH.

Esquema I.9. Formación del compuesto fluorescente DCF a partir de la oxidación de DCFH-DA.

Esquema I.10. Esquema de un inserto con formación de monocapa celular.

Esquema II.1. Productos derivados de la fermentación de semillas comestibles (Gan et al., 2017)

Esquema II. 2. Diluciones seriadas de las harinas fermentadas y sus controles

Esquema II. 3. Protocolo para la tinción de Gram

Esquema II. 4. Reacción mediada por la enzima catalasa

Esquema III.1. Preparación de bebida vegetal a base de arvejas. GG: goma gelano, GX: goma xantano.

Esquema III.2. Preparación de bebida vegetal a base de harina de arvejas fermentada. GG: goma gelano, GX: goma xantano

Esquema III.3. Preparación de BF1

Esquema III.4 Preparación de BF2

Esquema III.5. Preparación de BF3

Tabla i.1. Comparación del contenido nutricional de diferentes harinas vegetales (g/100g)

Tabla I.1. Composición centesimal en base seca (bs) de H y A

Tabla I.2. Solubilidad proteica de H y A en buffer PBS (pH = 7,4)

Tabla I.3. Efecto del protocolo de extracción en el CFT y la actividad antioxidante de los extractos

Tabla I.4. Perfil de CF de los extractos obtenidos por distintas metodologías

Tabla I.5. CFT y actividad antioxidante de los extractos de H y A

Tabla I.6. Perfil de CF ($\mu\text{g} / \text{g}$ bs) de los extractos de H y A

Tabla I.7. Contenido de proteína y GH (método de TNBS) de digeridos gastrointestinales obtenidos por ambos protocolos.

Tabla I.8. Concentraciones de proteína soluble (método de Lowry) y solubilidad proteica de H, A y sus digeridos gastrointestinales

Tabla I.9. Concentraciones de proteína de los solubles de HD, AD y BR

Tabla I.10. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos

Tabla I.11. Composición de CF de extractos etanólicos.

Tabla I.12. Actividad antioxidante acelular de las fracciones solubles acuosas.

Tabla I.13. Concentración de polipéptidos/péptidos y actividad ORAC de fracciones separadas por FPLC a partir de Hs y HDs.

Tabla I.14. Concentración de polipéptidos/péptidos y actividad ORAC de fracciones separadas por FPLC a partir de As y ADs.

Tabla I.15. CFT (Folin-Ciocalteu) y actividad antioxidante (ORAC y ABTS) de los extractos etanólicos (EAU).

Tabla I.16. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (HDsb, ADsb y BRsb).

Tabla I.17. Concentración proteína soluble, actividad antioxidante (ORAC), % inhibición de ROS intracelulares y citotoxicidad celular (LDH) de las fracciones separadas por FPLC de las muestras solubles en buffer PBS de HD y AD

Tabla I.18. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (HDesb, ADesb y BResb).

- Tabla II.1.** Evaluación del descenso de pH para mezclas (no agitadas) con distinta relación H/agua: A. incubación a 37 °C; B. incubación a 30 °C.
- Tabla II.2.** Evolución del pH durante la fermentación de una dispersión 36,4 % H a las temperaturas ensayadas, con agitación rotacional.
- Tabla II.3.** Parámetros relacionados con las proteínas en las muestras fermentadas
- Tabla II.4.** Actividad antioxidante medida por el método de ORAC
- Tabla II.5.** Valores de pH y recuentos microbianos de las muestras fermentadas y sin fermentar
- Tabla II.6.** Composición centesimal de las dispersiones y harinas fermentadas liofilizadas g/100 g en b.s)
- Tabla II.7.** Proteína soluble (método de Lowry), solubilidad y GH de las dispersiones de harina, harinas fermentadas y sus digeridos gastrointestinales.
- Tabla II.8.** Actividad ORAC y HORAC de las fracciones solubles en PBS de las dispersiones de harina antes y después de la fermentación y los correspondientes digeridos gastrointestinales.
- Tabla II.9.** Concentración de proteína y actividad antioxidante de las fracciones solubles en PBS (s), solubles directos (sd) y bioaccesibles (sb) de HF2D en comparación con HD.
- Tabla II.10.** Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (HDsb, HF2Dsb y BRsb).
- Tabla II.11.** Concentración proteína soluble, actividad antioxidante (ORAC), % inhibición de ROS intracelulares y citotoxicidad celular (LDH) de las fracciones separadas por FPLC de las muestras solubles en buffer PBS de HD y HF2D.
- Tabla II.12.** Contenido fenólico total (CFT) y actividad antioxidante de extractos (EAU, etanol al 60 %) de HF2 y HF2D en comparación con H y HD.
- Tabla II.13.** Perfil de CF. Efecto de la fermentación y DGIS
- Tabla II.14.** Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (HDesb, HF2Desb y BResb).
- Tabla III.1.** Composición centesimal de B liofilizada (base seca) y B fluida en base seca (b.s.) y base húmeda (b.h.).
- Tabla III.2.** Viscosidad de B sin pasteurizar y pasteurizada
- Tabla III.3.** Viscosidad aparente (500 s⁻¹) de B pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento
- Tabla III.4.** Valores de pH y recuentos microbianos de la bebida pasteurizada

Tabla III.5. Proteína soluble (método de Lowry), solubilidad y GH de B y BD

Tabla III.6. Concentración de proteína soluble (método de Lowry)

Tabla III.7. Actividad ORAC y ABTS de las fracciones solubles en PBS de B y BD.

Tabla III.8. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (BDsb y BRsb) en diferentes concentraciones.

Tabla III.9. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos

Tabla III.10. Composición de CF de extractos etanólicos

Tabla III.11. Actividad ORAC y ABTS de las fracciones etanólicas de B y BD.

Tabla III.12 Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (BDesb y BResb) en diferentes concentraciones.

Tabla III.13. Recuentos microbianos (log ufc/g) de la dispersión de harina y la bebida fermentada sin pasteurizar

Tabla III.14. Recuentos microbianos (log ufc/g) de la bebida fermentada pasteurizada y almacenada a 4 °C.

Tabla III.15. Viscosidad de BF sin pasteurizar y pasteurizada

Tabla III.16. Viscosidad de BF pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento

Tabla III.17. Composición centesimal de BF liofilizada y BF fluida en base seca (b.s.) y base húmeda (b.h.).

Tabla III.18. Viscosidad de BF pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento

Tabla III.19. Actividad antioxidante acelar de las fracciones solubles acuosas.

Tabla III.20. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (BFDsb y BRsb) en diferentes concentraciones.

Tabla III.21. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos

Tabla III.22. Perfil de CF de BFD en comparación con BF.

Tabla III.23. Actividad ORAC de las fracciones etanólicas de BF y BFD.

Tabla III.24. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (BFDsb y BRsb) en diferentes concentraciones

Imagen i.1. Regiones de cultivo de algunas de las especies de leguminosas que se siembran en Argentina. Fuente: Clera.com.ar

Imagen i.2. A. *Pisum sativum*, flor blanca; B. *Pisum sativum*, flor rosada; C. *Pisum sativum*, vainas

Imagen i.3. Estructura del homohexámero de la globulina 11S (Adachi y col., 2003). (a) Se muestran los seis polipéptidos que la conforman (ácidos: L α 1, L α 2 y L α 3, y básicos: L β 1, L β 2 y β 3) (b) Molécula rotada 90°. <http://www.pnas.org/content/100/12/7395/F1.expansion.html>

Imagen i.4. Estructura del trímero de la globulina 7S (Fukuda y col., 2008). (a) Se muestran los monómeros en rosa, celeste y verde. (b) Molécula rotada 90°. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2eaa/analysis>

Imagen I.1. Bio-reactor utilizado para el proceso de DGIS.

Imagen I.2. Voltímetro Millicell[®]-ERS

Imagen I.3. A. Harina; B. Aislado proteico de arveja amarilla var. Yams

Imagen II.1. Bio-reactor utilizado en la fermentación natural de H

Imagen II.2. Placa de cultivo con medio MRS

Imagen II.3. Placa de cultivo con medio PCA

Imagen III.1. Bebida a base de harina fermentada; A. Sin tratamiento térmico; B. Pasteurizada 63 °C, 30 min; C. Esterilizada 121°C, 15 min

Imagen III.2. 1. Bebidas (B) A. sin pasteurizar; B. pasteurizada; 2. Bebida pasteurizada refrigerada 4°C luego de 24h C. sistema inicial; D. luego de la homogeneización manual.

Imagen III.3. B pasteurizada. A. Conservada a 4 °C durante 7 días, abierta luego del tratamiento térmico; B. Conservada a 4 °C luego de 7 días, cerrada; C. Conservada a 4 °C, luego de 14 días, cerrada; D. Conservada a 4 °C luego de 21 días, cerrada; E. Conservada a 4 °C luego de 60 días.

Imagen III.4. Bebida a base de harina fermentada (BF1) sin pasteurizar y pasteurizada A. Recién preparada; B. Luego de 10 min; C. Luego de 100 min

Imagen III.5. 1. Bebidas a base de harina fermentada neutralizada (BF2) A. sin pasteurizar; B. pasteurizada; 2. Bebida pasteurizada C. sistema inicial; D. luego de 60 min.

Imagen III.6. 1. Bebidas a base de harina fermentada neutralizada antes del agregado de las gomas (BF3) A. sin pasteurizar; B. pasteurizada; 2. Bebida pasteurizada C. sistema inicial; D. luego de 60 min.

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

i.1. LAS LEGUMBRES Y LAS ARVEJAS EN PARTICULAR

i.1.1 Características generales

Las legumbres son las semillas de las plantas que pertenecen a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, el tercer grupo de plantas más numeroso del planeta, de distribución global y cuyo origen se presume fue hace alrededor de 90 millones de años. Producen entre uno y doce granos de tamaño, forma y colores variables dentro de una vaina, los que se utilizan para alimento y forraje. Para ser consideradas “legumbres secas” deben tener menos de 13 % de humedad y bajo tenor graso (lo cual las distingue de las oleaginosas). Entre sus características más notables, las leguminosas tienen capacidad de fijación biológica del nitrógeno, una cualidad que tiene gran relevancia en el enriquecimiento productivo de los suelos. Cuando estas plantas se siembran, los microorganismos del suelo *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se activan, estimulando la fertilidad telúrica. La bacteria *Rhizobium* infecta los pelos radicales de las raíces de las plantas leguminosas y crea nódulos en ellos que pasan a funcionar como diminutas fábricas subterráneas de nitrógeno. Dentro de los nódulos, la bacteria *Rhizobium* integra a la tierra este elemento químico tan abundante en la atmósfera, favoreciendo así el crecimiento vegetal. En relación simbiótica, las legumbres brindan un hogar a las bacterias dentro del nódulo y un suministro de energía constante. Por medio de este vínculo, las legumbres pueden añadir entre 30 y 40 kg de nitrógeno por cada hectárea de terreno. Algunas variedades de legumbres, además, son capaces de liberar fósforo en el suelo. Esta cualidad implica nula o mínima utilización de fertilizantes, cuestión relevante desde el punto de vista alimentario, económico y medioambiental. La emisión de gases de efecto invernadero durante su producción es muy baja comparada con otras fuentes de proteína, por lo que su huella de carbono también es muy baja (Legumbres, semillas nutritivas para un desarrollo sostenible (FAO (2016). www.fao.org/pulses-2016).

Las legumbres se consumen en todo el planeta, empleándose como harinas, en guisos, purés, guarniciones, aperitivos o postres. Se trata de productos que han acompañado al ser humano en su desarrollo agropecuario desde la prehistoria y se encuentran entre las primeras plantas domesticadas del mundo. La familia *Fabaceae* suma más de 20.000 especies y supera los 700 géneros, de los cuales solo una parte es considerada dentro del grupo alimentario de

las legumbres, como son los géneros *Pisum*, *Cicer*, *Cajanus*, *Faba*, *Lens* o *Phaseolus*. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) propuso al año 2016 como el Año Internacional de las Legumbres Secas (<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>) con el fin de potenciar estos cultivos por su rol en materia de seguridad alimentaria y nutricional y en la adaptación al cambio climático, la preservación de los suelos y la salud humana. Además, desde el año 2017 se estableció el 11 de febrero como el Día Internacional de las Leguminosas.

Desde el punto de vista nutricional, las legumbres poseen un alto contenido de proteínas, aminoácidos esenciales, fibra, vitaminas y minerales. Abundan en minerales como el hierro, el potasio, el magnesio y el zinc. También poseen alto contenido en vitaminas del grupo B, incluyendo ácido fólico, tiamina y niacina. Contienen el doble de cantidad de proteína que los cereales de grano entero (trigo, avena y cebada) y el triple que el arroz (Legumbres, semillas nutritivas para un desarrollo sostenible, www.fao.org/pulses-2016). Las proteínas son macronutrientes esenciales para la nutrición humana y la calidad nutricional de las mismas varía sustancialmente dependiendo de su biodisponibilidad, digestibilidad, perfil de aminoácidos, pureza, factores antinutricionales y efectos de procesamiento (Sá et al., 2020). Aunque el consumo de legumbres puede satisfacer la mayoría de requerimientos de aminoácidos esenciales, así como también se caracterizan por alto contenido de lisina, varios estudios informaron que las legumbres son una fuente limitada de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptofano (Sá et al., 2020). En función de esto son un excelente complemento de los cereales. Los parámetros de calidad de las proteínas de leguminosas son algo inferiores si se comparan con las de origen animal, debido a su menor digestibilidad, a su mencionada deficiencia en aminoácidos azufrados y a la presencia de factores antinutritivos (Belitz y Grosh, 1997). Las digestibilidades proteicas *in vitro* del garbanzo, poroto mungo y arveja varían entre 65,3-79,4 %, 67,2-72,2 % y 60,4-74,4 %, respectivamente (Chitra et al., 1995). A modo de comparación, Han et al. (2007) informaron una digestibilidad proteica de alrededor de 72 % para la soja, mientras que la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de trigo fue de 86,7 % (Abdel-Aal y Hucl (2002)). Márquez y Lajolo (1990) mostraron que la globulina aislada de *Phaseolus vulgaris* (porotos) presentó alto valor de digestibilidad (89,5 %) pero bajo valor de NPR (retención neta de proteínas) (1,51). Las fracciones de albúmina y glutelina mostraron digestibilidades de 79,1 y 73,2 %, y NPR de 3,18 y 2,91, respectivamente, siendo estos últimos valores 30 % más bajos que los de caseína. El enriquecimiento de porotos enteros

con la fracción de albúmina aislada (rica en aminoácidos azufrados) no mejoró la NPR, sugiriendo que puede haber algunas regiones en estas proteínas con restricciones conformacionales a la hidrólisis.

Las legumbres contienen también abundantes carbohidratos complejos y fibra, lo que propicia una liberación lenta y gradual de energía, genera sensaciones de saciedad, y contribuye a estabilizar los niveles de glucemia, convirtiéndolas en una opción ideal para personas que padecen diabetes (Legumbres, semillas nutritivas para un desarrollo sostenible, www.fao.org/pulses-2016). Han demostrado además tener otros beneficios en la salud relacionados con la modulación de la función intestinal, la disminución del colesterol, efectos antioxidantes, y su consumo regular ha sido asociado con un efecto de prevención de enfermedades crónicas tales como cáncer de colon y la *diabetes mellitus* tipo 2. Los mismos han sido atribuidos a componentes tales como fibra soluble e insoluble, almidón de baja digestibilidad, oligosacáridos prebióticos y componentes polifenólicos (Vaz Patto et al., 2015). También las proteínas y péptidos de legumbres han demostrado ejercer actividades biológicas. Hidrolizados proteicos de diferentes legumbres presentaron actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I sugiriendo un potencial efecto hipotensor (Barbana y Boye, 2011; Boye et al., 2010; Vermeirssen et al., 2005). Harinas, concentrados e hidrolizados proteicos mostraron capacidad de unir sales biliares en el tracto gastrointestinal constituyendo un posible mecanismo para la reducción del colesterol plasmático (Barbana et al., 2011).

Las propiedades funcionales se definen como las propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Kinsella, 1982). Las propiedades de mayor interés en el procesamiento de alimentos incluyen solubilidad, unión al agua, unión a grasas, emulsificación, formación de espuma, gelificación, espesamiento y *flavor*. Se ha informado que las proteínas de arveja forman geles inducidos por calor con vicilina purificada, pero no con legumina (Bora et al., 1994). Aislados proteicos de arvejas, garbanzos y lentejas mostraron similares propiedades: alta solubilidad en agua, alta estabilidad térmica y buenas propiedades emulsificantes (Ladjal-Ettoumi et al., 2015). Se obtuvieron buenas propiedades funcionales para concentrados proteicos de estas mismas legumbres producidos mediante dos métodos, precipitación isoeléctrica y ultrafiltración, y, como es esperable, las propiedades (solubilidad, capacidad de retención de agua, emulsificación, espumado y gelificación) fueron dependientes

del tipo de legumbre y del proceso de obtención (Boye et al., 2010). Las propiedades tecnofuncionales dependen principalmente de la proteína (composición aminoacídica, conformación de las macromoléculas), del proceso de obtención de los productos y de los tratamientos, físicos, químicos y/o enzimáticos, que se realicen durante la obtención, previa o posteriormente.

Según el tipo de legumbre y el genotipo, estos granos presentan diferentes contenidos y tipos de compuestos fenólicos que pueden estar libres, esterificados o unidos a otros componentes; por ejemplo, la composición de los compuestos fenólicos cambia con el color de la cubierta de la semilla de la leguminosa (Vaz Patto et al., 2015). Como indican Liu et al. (2020), las legumbres son buenas fuentes de ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas y taninos. Se ha informado que el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante, mientras que los glucósidos de flavonol, antocianinas y taninos, que existen principalmente en la cubierta de la semilla de las legumbres, están presentes en concentraciones altas o bajas dependiendo del tipo y genotipo de las legumbres. Por ejemplo, la composición de los compuestos fenólicos varía según el color de la cubierta de la semilla de las leguminosas (Vaz-Patto et al., 2015).

i.1.2. Legumbres en Argentina

En Argentina, el complejo legumbres secas se compone de arvejas, garbanzos, lentejas y porotos secos y se caracteriza por presentar un elevado perfil exportador (en expansión y en crecimiento), aunque con marcadas diferencias según la especie en cuestión. Por otro lado, el país posee condiciones agroecológicas favorables para los cultivos y el sector presenta una evolución positiva, alcanzando récords sucesivos de producción en el último quinquenio. En los últimos años, la demanda mundial de legumbres ha aumentado y se prevé que en el futuro continúe esta tendencia. El consumo promedio de legumbres en el mundo es de aproximadamente 8 kg *per cápita* (OCDE FAO, 2020) mientras que el de Argentina es marginal respecto a ese alcanzando apenas 800 g por habitante por año (CLERA, 2020), siendo las lentejas las que acumulan el 60 % de ese valor.

Estos cultivos comenzaron a tomar relevancia en nuestro país a mediados del siglo pasado como alternativa productiva, al mismo tiempo que algunas de ellas se utilizaron para rotación de otros cultivos, ya que las leguminosas son en general de ciclo corto y poseen características agronómicas distintivas. A pesar del bajo porcentaje que significan en la canasta total de

cultivos (1,87 % frente a 54,55 % de los cereales y 43,59 % de las oleaginosas), las legumbres presentan una dinámica propia y muestran una tendencia positiva. Así, del 1,42 % que representaban en la campaña 2016/17 pasaron a representar el 1,81 % en ciclo 2020/21 (+26 % de variación en la participación). A pesar de las bondades nutricionales que poseen, la demanda interna continúa siendo muy baja para estas especies por lo que el complejo presenta un marcado perfil exportador.

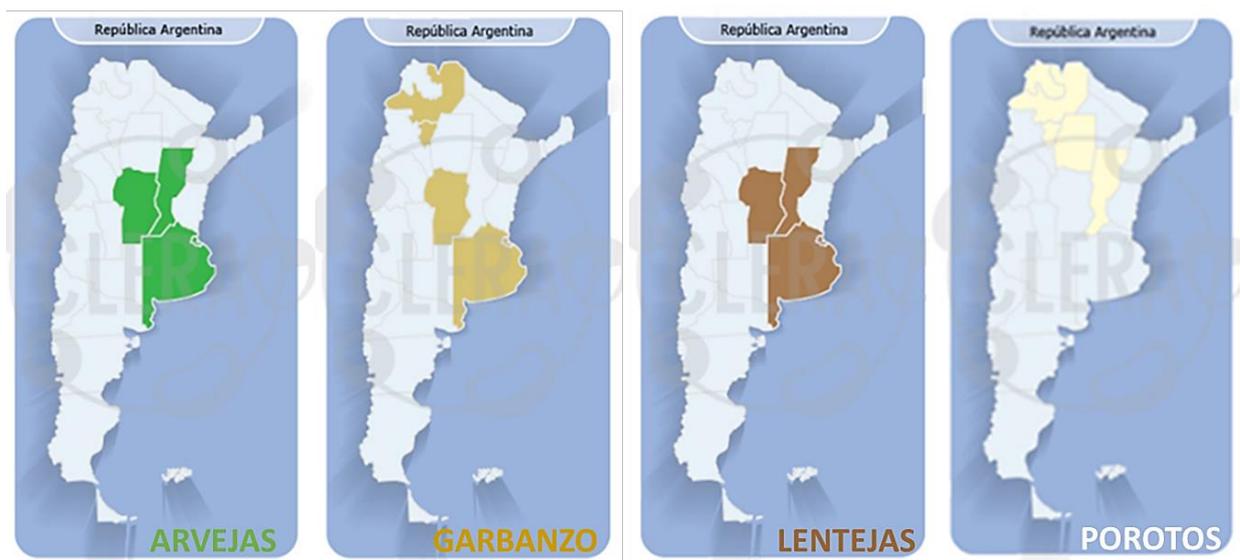


Imagen i.1. Regiones de cultivo de algunas de las especies de leguminosas que se siembran en Argentina. Fuente: *Clera.com.ar*

En nuestro país, la estructura de la cadena productiva de legumbres abarca los eslabones primarios dedicados a las actividades de siembra y cosecha. Aunque de forma escasa, existen núcleos dedicados a la mejora genética, evaluación de tecnología agronómica y de sanidad de cultivos de legumbres. En lo que respecta a los eslabones industriales, se destaca la industria de selección que clasifica en función a estándares vinculados a la calidad, peso, color y otros atributos propios de los granos dependiendo del tipo de legumbre. Cabe mencionar que el nivel tecnológico de este eslabón se limita al uso de seleccionadoras electrónicas, mientras que el resto de las tareas son predominantemente manuales. Por otro lado, la industria de conservas agrega valor al producto a través del envasado en frascos y latas y en la elaboración de escabeche y pastas para la preparación de comidas. En este caso los granos pueden ser frescos o secos. Finalmente, la industria molinera transforma los granos secos en harinas, con un potencial de crecimiento en la elaboración de las mismas (https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/SSPE_Cadenasde_valor_Legumbres.pdf).

i.1.3. Arvejas

La arveja (*Pisum sativum*) es una planta trepadora, de tallos angulosos, de la que coexisten variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado, posibilitando con esta característica el desarrollo de tres tipos de variedades fijadas: las enanas, las de medio enrame y las de enrame. Las hojas tienen pares de folíolos y terminan en zarcillos, que poseen la propiedad de aferrarse a los tutores. Las flores se agrupan en inflorescencias, como flores solitarias o racimos con 2 o 3 flores en el ápice del pedúnculo; tienen cáliz campanulado, pueden ser de color blanco (**Imagen i.2.A**) o rosado (**Imagen i.2.B**). Las vainas tienen entre 5 a 10 cm de largo y suelen poseer de 4 a 10 semillas, que según las variedades son de forma y color variable (**Imagen i.2.C**). Éstas pueden clasificarse de acuerdo a la foliosidad, al color del grano, a la textura o en función del destino comercial del producto. Existen variedades del tipo semiáfila, cuya característica principal es la de poseer zarcillos muy desarrollados que le dan una estructura de porte más erecto que las foliosas, las cuales son más decumbentes. Hay arvejas de grano verde y amarillo, liso y rugoso, destinadas al consumo en fresco, como grano seco remojado, o para forraje.



Imagen i.2. A. *Pisum sativum*, flor blanca; B. *Pisum sativum*, flor rosada; C. *Pisum sativum*, vainas

La arveja contiene entre 20 a 26 % p/p de proteínas, 1 a 3 % p/p de lípidos, 46 a 50 % p/p de hidratos de carbono, 14 a 18 % p/p de fibra, 7 a 9 % p/p de humedad, aportando aproximadamente 317 kcal/100 g de grano (Zulet y Martínez, 2001).

La proteína de arveja se clasifica comúnmente en cuatro categorías: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, de las cuales las globulinas son la principal fracción de proteínas de almacenamiento y representan entre el 55 y 65 % de la proteína total (Wu et al., 2023). Las

albúminas son solubles en agua y comprenden proteínas enzimáticas, inhibidores de proteasa, inhibidores de amilasa y lectinas y tienen pesos moleculares (PM) que varían entre 5 y 80 kDa. Se han identificado dos proteínas principales de albúmina en las arvejas: la principal contiene dos polipéptidos con masa molecular de 25 kDa, mientras que la otra albúmina minoritaria es una proteína de masa molecular baja que contiene polipéptidos de aproximadamente 6 kDa (Rao et al., 1989).

Las globulinas se componen principalmente de legumina (11S) y vicilina (7S). La legumina es un oligómero hexamérico de 330-410 kDa constituido por seis polipéptidos de aproximadamente 60 kDa, con un segmento básico L β (19-22 kDa) y uno ácido L α (38-40 kDa) asociados a través de un puente disulfuro (**Imagen i.3**). El oligómero de legumina presenta heterogeneidad en cuanto a su peso molecular y al punto isoeléctrico de sus subunidades (Gatehouse et al., 1980; O'Kane et al., 2004). La fracción de vicilina contiene varios polipéptidos, y es formada a partir de un precursor de aproximadamente 50 kDa considerado como una subunidad que se ensambla *in vivo* en un oligómero trimérico (Gatehouse et al., 1982; O'Kane et al., 2004) (**Imagen i.4**). La vicilina tiene varios sitios segmentables (sitios de procesamiento $\alpha:\beta$ y $\beta:\gamma$). La proteólisis produce polipéptidos más pequeños tales como: 33 kDa ($\alpha\beta$), 30 kDa ($\beta\gamma$), 19 kDa (α), 13,5 kDa (β) y 12,5-16 kDa (γ). La convicilina es un polipéptido de 70 kDa asociado en trímeros. Tiene un perfil de aminoácidos muy parecido al de vicilina en su extremo C, pero también una extensión N-terminal altamente cargada (Croy et al., 1980). Se ha informado heterogeneidad en la composición proteica de diferentes variedades de arvejas, con una relación legumina/vicilina entre 0,2 y 1,5, así como en la composición polipeptídica de las proteínas individuales de una única variedad (O'Kane et al., 2004).

Otras proteínas minoritarias que se encuentran en las arvejas incluyen a las prolaminas y a las glutelinas (Wu et al., 2023). Las prolaminas son solubles en alcohol y se caracterizan por una alta proporción de prolina y glutamina. Las glutelinas, por otro lado, son solubles en detergentes ácidos o alcalinos diluidos, y en presencia de agentes caotrópicos o reductores (Osborne, 1924). Las glutelinas tienen un mayor contenido de metionina y cistina que las globulinas y, por lo tanto, también son de interés nutricional. En consecuencia, algunos investigadores han sugerido que el cultivo de legumbres con mayor contenido de glutelina podría ayudar a mejorar la calidad de sus proteínas (Singh y Jambunathan, 1982). Fiel et al.

(2002) informaron que para las arvejas, el riego frecuente podría aumentar el contenido de albúminas, prolaminas y glutelinas, pero podría disminuir el contenido de globulina.

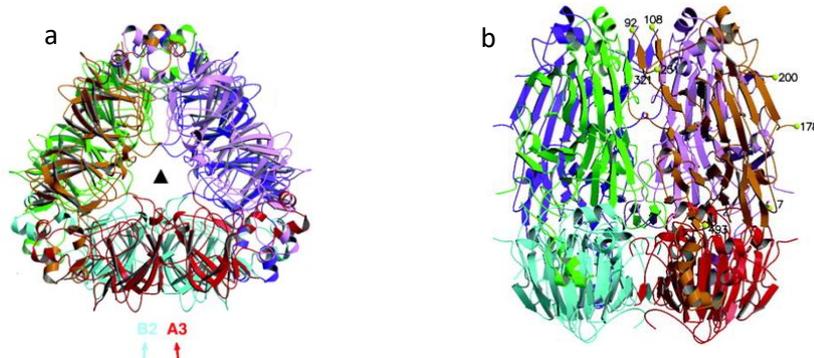


Imagen i.3. Estructura del homohexámero de la globulina 11S (Adachi et al., 2003). (a) Se muestran los seis polipéptidos que la conforman (ácidos: $L\alpha_1$, $L\alpha_2$ y $L\alpha_3$, y básicos: $L\beta_1$, $L\beta_2$ y $L\beta_3$). (b) Molécula rotada 90°. <http://www.pnas.org/content/100/12/7395/F1.expansion.html>



Imagen i.4. Estructura del trímero de la globulina 7S (Fukuda et al., 2008). (a) Se muestran los monómeros en rosa, celeste y verde. (b) Molécula rotada 90°. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2eaa/analysis>

Si bien las semillas de arvejas son una fuente importante de nutrientes, también contienen factores antinutricionales, entre ellos α -galactósidos, inhibidores de tripsina y fitatos, y sus concentraciones difieren ampliamente entre diferentes variedades. La eliminación de componentes indeseables es esencial para mejorar la calidad nutricional de las legumbres y de manera efectiva utilizar todo su potencial como alimento humano. Existen técnicas de procesamiento simples y económicas que constituyen métodos efectivos para lograr cambios deseables en la composición de las semillas; entre ellas se encuentran el remojo, la cocción y la germinación (Vidal-Valverde et al., 1992).

Las arvejas son libres de gluten, no constituyen alérgenos comunes y no están genéticamente modificadas, por lo que son un excelente ingrediente que ayudan a fortificar los productos incrementando su valor nutrimental. Tienen gran potencial de

aprovechamiento, ya que además de utilizar las semillas enteras se puede obtener a partir de éstas otros ingredientes como harinas y fraccionados (almidón, fibra, concentrados y aislados de proteína). Entre los principales beneficios de utilizar harina de arveja en los productos alimentarios pueden mencionarse su aporte de proteína (más de 20 %) y de fibra como puede observarse en la **Tabla i.1** donde se compara con otras harinas vegetales.

Tabla i.1. Comparación del contenido nutricional de diferentes harinas vegetales (g/100g)

Fuente	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Fibra
Harina de trigo	10	1	76	3
Harina de soja entera	38	22	30	8
Harina de arveja	24	1	46	17
Harina de arroz	5,8	1,4	80,1	2,4
Harina de maíz blanco	8,5	3,7	76,6	6,4

Fuente: USDA National Nutrient DataBa

Además, se ha demostrado que una dieta rica en arvejas secas es efectiva en la disminución de la incidencia de cáncer de colon, diabetes tipo 2, colesterol-LDL y enfermedad cardíaca (Roy et al., 2010). Como para otras legumbres, los efectos benéficos en la salud han sido relacionados con micronutrientes, fitoquímicos, y péptidos bioactivos. Para estos últimos, se han descrito actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), actividad antioxidante, actividad antitumoral (López-Barrios et al., 2014). Ding et al. (2020) aislaron y purificaron péptidos antioxidantes a partir de hidrolizados de proteínas de arveja obtenidos con alcalasa. Los péptidos se identificaron mediante nano-LC-ESI-MS/MS y su actividad biológica se evaluó *in silico* (Peptide Ranker). Los resultados mostraron que una fracción purificada a partir del hidrolizado con peso molecular < 1 kDa tenía una buena actividad antioxidante con una elevada tasa de eliminación de radicales DPPH· e hidroxilo (OH·).

Por otra parte, según lo informado por Zhao et al. (2021), el contenido total de polifenoles de las semillas de arvejas está fuertemente correlacionado con actividades antioxidantes que podrían tener posibles efectos beneficiosos para la salud humana.

En Argentina el cultivo de arveja se está consolidando debido a la creciente demanda para la exportación y porque es considerada cada vez más como una alternativa viable para incluir en la rotación, tanto por su rentabilidad como por los beneficios como antecesor de los cultivos de verano. Tiempo atrás, las mayores exportaciones eran a Brasil seguido por Senegal. A partir del año 2020, se empezaron a concretar nuevas exportaciones de arveja con China como nuevo destino, representando en el año 2022 un 13,95%. Por otro lado, en el año 2021 Venezuela comenzó a tener relevancia, superando a Brasil como destino de exportación al año siguiente (2022) (Informe de legumbres, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023 <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe-legumbres-enero-2023.pdf>).

Además, existe actualmente producción y exportación de **harina** de arvejas en nuestro país; esta se presenta como una excelente opción para el agregado de valor para generar nuevos ingredientes nutritivos, aptos para celíacos, con potenciales efectos beneficiosos para la salud.

i.2. EVALUACIÓN DE INGREDIENTES Y ALIMENTOS FUNCIONALES

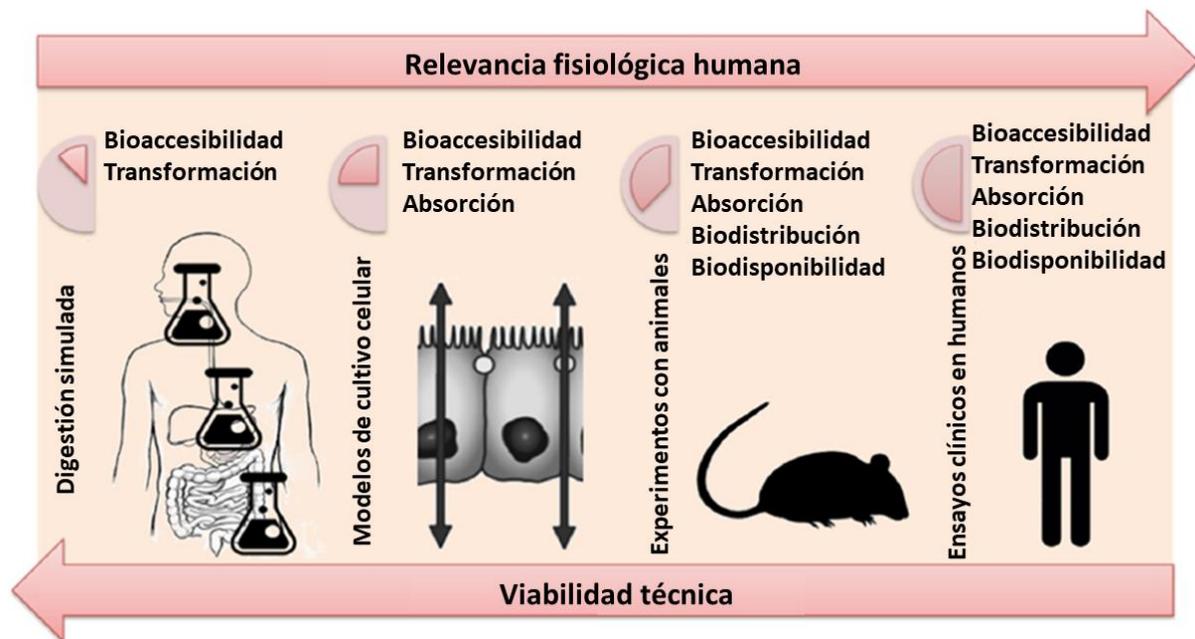
El concepto de alimentos funcionales apareció hace ya muchos años, en 1984 cuando el gobierno japonés definió una nueva categoría de productos “Alimentos para Usos Específicos de Salud” (FOSHU), como “alimentos que contienen un ingrediente con funciones para la salud y aprobado oficialmente para afirmar sus efectos fisiológicos en el cuerpo humano” y elaboró un marco legislativo específico. Luego le siguió Estados Unidos que, en los años 90, cuando desarrolló la primera declaración de propiedades saludables, pero sin proporcionar una definición formal de alimento funcional, y finalmente los países europeos adquirieron el concepto de alimento funcional más de 10 años después (año 2006) cuando la Unión Europea introdujo una regulación sobre declaraciones nutricionales y saludables (Alongi y Anese, 2021). La Acción Concertada “Functional Food Science in Europe” (FUFOSE), desarrolló una definición práctica de alimento funcional como aquel que *“ha demostrado satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa una o más funciones blanco en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que es relevante para un mejor estado de salud y bienestar y/o una reducción del riesgo de enfermedad”*. En el contexto de esta definición práctica, una “función objetivo” es una actividad biológica que se desarrolla en el cuerpo y que es un objetivo de intervención con vistas al mantenimiento o la mejora de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad (Howlet, 2008). En 2018, se presentó una propuesta

de definición consensuada describiendo a los alimentos funcionales como *“alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos; que, en cantidades definidas, efectivas y no tóxicas, brindan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado utilizando biomarcadores específicos para la prevención, el manejo o el tratamiento de una enfermedad crónica o sus síntomas”* (Functional Food Center, Gur et al., 2018). Posteriormente, en 2022, Temple cuestionó las definiciones comunes que hablan de que contienen *“sustancias que pueden ser benéficas para la salud más allá de la nutrición básica”* dadas por instituciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) o la Clínica Mayo. Este autor postula varios inconvenientes con estas definiciones tales como que son demasiado amplias porque incluyen a gran parte de los alimentos comunes y generan confusión en lo que significa *“más allá de nutrición básica”* y que compuestos son o no nutrientes básicos. En función de ello, propone la siguiente definición: *“los alimentos funcionales son alimentos nuevos (novel foods) que se han formulado de manera que contengan sustancias o microorganismos vivos que puedan tener un valor beneficioso para la salud o prevenir enfermedades, y en una concentración que sea segura y lo suficientemente alta para lograr el beneficio deseado. Los ingredientes añadidos pueden incluir nutrientes, fibra dietética, fitoquímicos, otras sustancias o probióticos”*. Una característica clave de estos alimentos es que sean novedosos (Temple, 2022).

Salvo en Japón, estos alimentos no se encuentran definidos como una categoría en ninguna legislación internacional. Países como Brasil, el Reino Unido, los Estados Unidos y Australia permiten que, en su rótulo, se incluyan ciertas declaraciones de propiedades saludables. Estas leyendas deben estar científicamente demostradas y autorizadas previamente por la autoridad sanitaria. En la actualidad, es materia controvertida la inclusión de dichas inscripciones. En nuestro país existen en el mercado alimentos funcionales, pero los criterios para autorizar las declaraciones no son uniformes. A fin de remediar esta situación, el INAL-ANMAT designó una comisión, que está realizando un relevamiento de la legislación internacional, para sancionar una norma que permita unificar los criterios (ANMAT). (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/est_agr_estudio-panoramico-alimentos-funcionales_0.pdf).

La evaluación de los efectos biológicos de los alimentos es un punto clave y muy complejo. Se requiere comprender los factores que gobiernan la liberación de compuestos bioactivos de

los alimentos, el grado de absorción y su destino en el organismo, considerando todos los pasos a lo largo del viaje desde el matriz alimenticia al tejido u órgano objetivo. La evidencia se puede recopilar aplicando el mismo enfoque que se usa para los medicamentos ingeridos por vía oral, como análisis mecánicos *in vitro*, incluidos modelos de cultivo celular y digestión simulada, seguidos de estudios *in vivo*, incluidos experimentos con animales y ensayos clínicos en humanos (Esquema i.1).



Esquema i.1. Evaluación de propiedades biológicas de matrices alimentarias, adaptación de Alongi y Anese, (2021).

La biodisponibilidad y bioaccesibilidad son aspectos importantes en el estudio de compuestos potencialmente bioactivos. Los ensayos de simulación de la digestión *in vitro* permiten evaluar la bioaccesibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos. El término biodisponibilidad hace referencia a la fracción del componente ingerido disponible en el sitio de acción para su utilización en funciones fisiológicas normales, y se determina mediante ensayos *in vivo*. La biodisponibilidad es el resultado de tres pasos principales: digestibilidad y solubilidad del elemento en el tracto gastrointestinal; absorción del elemento por las células intestinales y transporte a la circulación; e incorporación de la entidad funcional a la circulación o destino. Además, la biodisponibilidad incluye dos términos adicionales: bioaccesibilidad y bioactividad. La bioaccesibilidad se ha definido como la fracción de un compuesto que es liberado de su matriz alimentaria dentro del tracto gastrointestinal y por lo tanto se convierte

en disponible para absorción intestinal. Incluye la secuencia de eventos que tienen lugar durante la digestión de los alimentos para su transformación en material potencialmente bioaccesible, pero muchas veces se excluye la absorción/asimilación a través del tejido epitelial y del metabolismo presistémico. Sin embargo, existe una definición más rigurosa y menos usada de la bioaccesibilidad que incluye las transformaciones digestivas de los alimentos en moléculas que pueden ser absorbidas, y también la asimilación o absorción por las células intestinales y el metabolismo presistémico (tanto intestinal como hepático). La bioaccesibilidad puede ser evaluada mediante metodologías *in vitro*, *ex vivo*, *in situ* y también *in vivo*, aunque lo más habitual es la evaluación a partir de procedimientos *in vitro* (Carbonell-Capella et al., 2014; Motilva et al., 2015). La bioactividad, a su vez, incluye eventos relacionados con la forma en que el nutriente o el compuesto bioactivo se transporta y alcanza el tejido objetivo, cómo interactúa con las biomoléculas, el metabolismo o biotransformación que puede experimentar, y la generación de biomarcadores y las respuestas fisiológicas inducidas. Aunque los términos biodisponibilidad y la bioaccesibilidad en algunos casos se utilizan indistintamente, debe remarcar que la biodisponibilidad incluye bioactividad (Alegría et al., 2015).

En resumen, en la investigación relacionada con alimentos funcionales es esencial estudiar la biodisponibilidad de los componentes alimentarios potencialmente bioactivos. Muchas veces la información que se obtiene de ensayos *in vitro* de componentes bioactivos puede no resultar valiosa si no se conoce que ocurre *in vivo* con la absorción, distribución, metabolismo y excreción de estos compuestos y las moléculas derivadas. Por ejemplo, los péptidos bioactivos pueden causar efectos sistémicos y, para ello, deben absorberse desde la luz intestinal, o actuar directamente sobre el tracto intestinal o mediante receptores y señales celulares para mediar su acción (Rutherford-Markwick y Moughan, 2005).

En este contexto, la digestión simulada *in vitro* es una estrategia conveniente para evaluar preliminarmente la bioaccesibilidad y los cambios en la funcionalidad de los polifenoles, ya que es más segura, más rápida, más económica y sin restricciones éticas en comparación con los enfoques *in vivo* (Ferreyra et al., 2021; Ketnawa et al., 2022).

Se han establecido una gran variedad de modelos basados en células y animales para el estudio de la absorción intestinal. El modelo de células Caco-2 es probablemente la línea celular más utilizada con este propósito. Como se mencionó anteriormente, estas células derivan de un adenocarcinoma de colon humano y son capaces de crecer para formar una monocapa

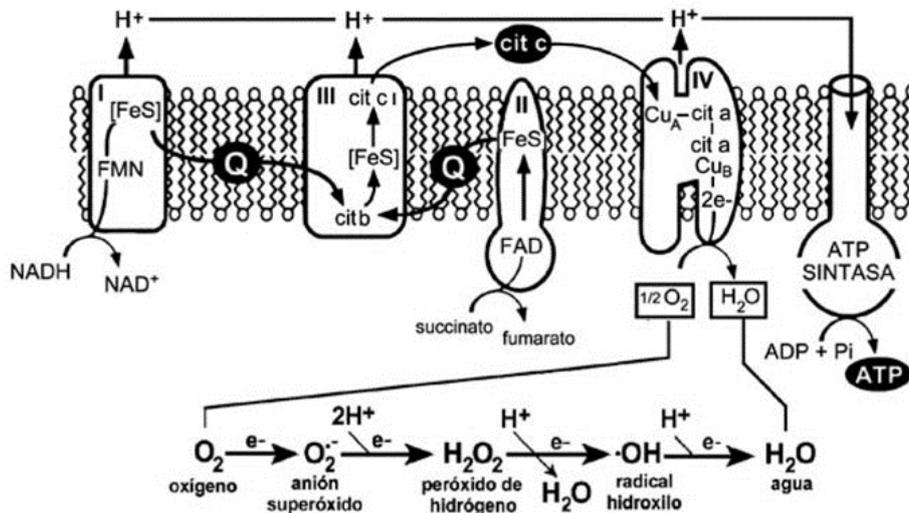
polarizada mostrando características morfológicas y funcionales similares a las de los enterocitos (Alqahtani et al., 2013). Un ejemplo de esto es la presencia, durante su cultivo, de microvellosidades y distintas enzimas como hidrolasas, enzimas del citocromo P450, y enzimas de fase II como la glutatión S-transferasa (GST). Numerosos estudios también han demostrado que expresan muchos sistemas de transporte activo que se encuentran en los enterocitos, incluidos los sistemas de transporte mediados por portadores de glucosa, péptidos, aminoácidos, vitaminas y ácidos biliares, además de la proteína de transporte de colesterol, Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). Las células Caco-2 también expresan varios transportadores de eflujo tal como la glicoproteína-P humana (P-gp). Debido a esta expresión endógena de diferentes proteínas de transporte, el modelo de células Caco-2 es una línea celular utilizada comúnmente para los mecanismos de transporte de distintos compuestos. Todas estas características hacen que haya una alta expectativa en cuanto a la correlación de la permeabilidad in vitro estudiada en monocapas de Caco-2 con lo que ocurre in vivo (Yamashita et al., 1997). Estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente cuando son sembradas sobre membranas semipermeables, en las cuales forman una monocapa continua polarizada con un sistema de borde en cepillo bien definido en la superficie apical. Para estudios de transporte, las células Caco-2 deben cultivarse alrededor de 21 días para formar uniones estrechas y expresar una gran cantidad de transportadores de flujo de salida (De Angelis y Turco, 2011). Dado que la población de la línea celular Caco-2 es bastante heterogénea y altamente dependiente de las condiciones de cultivo, lo que puede llevar a propiedades de transporte y permeabilidad variables, se han aislado una gran variedad de clones; entre ellos, el clon TC7 que se obtuvo de un pasaje tardío de la línea Caco-2 parental. Solo se han observado pequeñas diferencias entre la línea celular parental y el clon TC7 en términos de transporte paracelular y difusión pasiva. Un estudio en el que se compararon cuatro líneas celulares Caco-2 concluyó que el clon TC7 consiste en una población más homogénea, provocando menores variaciones entre los resultados de absorción y presentando un mejor desarrollo de las uniones entre células (Turco et al., 2011).

i.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y SU PREVENCIÓN

i.3.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)

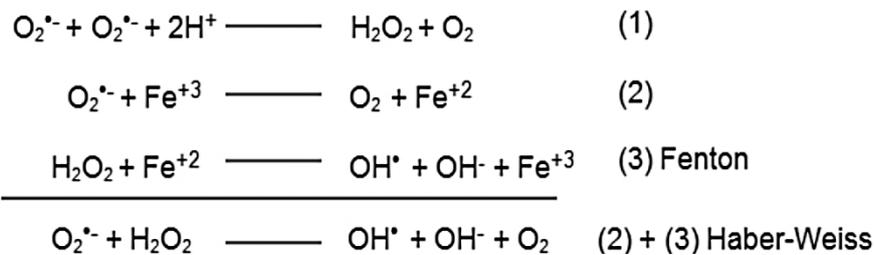
Esquema i.2. Diagrama esquemático de formación de ROS y RNS.

1. La *cadena respiratoria*, que es la principal fuente de energía de las células aeróbicas para producir ATP; las mitocondrias y los sistemas de transporte de electrones son el sitio de mayor oxidación celular (**Esquema i.3**) (Huerta Jimenez et al., 2005).



Esquema i.3. Formación de ROS en la cadena respiratoria

El ión superóxido (O₂^{•-}) es el principal precursor de la mayoría de las ROS en los sistemas biológicos. Se produce principalmente en las mitocondrias, causado por la fuga de electrones de la cadena respiratoria, cuando solo se agrega un electrón a la molécula de O₂ (Santo et al., 2016). Se considera la ROS primaria y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarias. Una de las reacciones más importantes del O₂^{•-} es la reacción de dismutación donde actúa a la vez como reductor y oxidante. La dismutación depende de la acción catalítica de la superóxido dismutasa (SOD), produciendo H₂O₂ y O₂ en medio ácido (reacción (1), **Esquema i.4**).



Esquema i.4. Reacción de Fenton / Haber-Weiss

El $O_2^{\bullet-}$ formado en la cadena de transporte de electrones se convierte en H_2O_2 por la acción de la SOD continuamente en todos los tejidos, y una vez producido difunde fácilmente a través de la membrana plasmática. Es una importante ROS biológica, cuyo exceso puede causar daño a las células y tejidos. Tanto el $O_2^{\bullet-}$ como el H_2O_2 participan en la generación del radical OH^{\bullet} a través de la reacción de Haber–Weiss. La formación de este radical a partir del H_2O_2 puede ser catalizada por la presencia de iones de metales de transición de acuerdo con la reacción de Fenton (**Esquema i.4**) (Kanti Das et al., 2014, Haber y Weiss, 1934, Fenton, 1894)). Los OH^{\bullet} pueden iniciar el proceso de peroxidación lipídica a través de la abstracción de un H de los ácidos grasos insaturados, generando radicales peroxilos (LOO^{\bullet}). No hay evidencia del papel de $O_2^{\bullet-}$ en la peroxidación lipídica; sin embargo, este puede reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} , lo que a su vez puede acelerar la generación de OH^{\bullet} a partir de H_2O_2 (reacción de Haber Weiss).

Otro radical interesante es el óxido nítrico (NO), el cual se forma a partir de arginina y es un relajante del músculo liso produciendo una baja en la presión sanguínea. También es producido por macrófagos y contribuye a la defensa inmunológica. En exceso se vuelve tóxico ya que puede reaccionar directamente con biomoléculas o combinarse con $O_2^{\bullet-}$ para formar el anión $ONOO^-$. Este puede inducir la peroxidación lipídica y nitrar residuos de tirosina (Kohen y Nyska, 2002).

2. El consumo de O_2 incrementado por la acción bactericida en las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos o macrófagos) es una fuente importante de radicales $O_2^{\bullet-}$ superóxido extracelulares (Huerta Jiménez et al., 2005).

3. La autooxidación de compuestos de carbono reducido como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos.

4. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como son la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa y lipoxigenasa (Fridrovich, 1976). El H_2O_2 también se produce por acción de la xantina oxidasa, la aminoácido oxidasa y la NADPH oxidasa y en los peroxisomas por consumo de O_2 en las reacciones metabólicas (Birben et al., 2012)

- *Fuentes exógenas*

1. Ambientales: humo de tabaco, ozono, radiaciones, etc.
2. Farmacológicas: Xenobióticos, drogas, etc.

3. Nutricionales: Contaminantes, aditivos, oxidación de lípidos, etc.

i.3.2. Daño oxidativo a biomoléculas.

La generación continua de ROS puede producir un daño oxidativo acumulativo de componentes, el cual será dependiente de la localización donde se producen los ROS. Por ejemplo, el radical OH^\bullet es altamente reactivo y con una vida media muy corta por lo que su daño estará limitado a moléculas cercanas al lugar de generación. Por otra parte, otras especies tales como el H_2O_2 pueden permanecer mayores tiempos y alcanzar localizaciones alejadas del lugar de generación, pudiendo incluso atravesar membranas celulares (Diplok et al., 1998).

Las ROS producen diversas acciones sobre el organismo, siempre de importancia biológica y que pueden ser el origen del daño celular. Entre las principales pueden mencionarse:

- *Daño a lípidos.* La oxidación de los lípidos de membrana provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las mismas (la plasmática y de las organelas celulares) (Birben et al., 2012). Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y las lipoproteínas son particularmente susceptibles al ataque del radical OH^\bullet , del oxígeno singlete y del hidropéroxilo, iniciando un proceso de lipoperoxidación autocatalítico. Este proceso genera hidroperóxidos que pueden alterar la membrana, o transformarse en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos (malondialdehído, entre otros), los cuales pueden difundir lejos del lugar donde se originaron, ocasionando daños a otras macromoléculas (Kohen y Nyska, 2002).

- *Daño a proteínas.* Las especies OH^\bullet , RO^\bullet y ONOO^- son las que causan mayor daño, aunque las proteínas conteniendo grupos SH pueden sufrir oxidación por medio de H_2O_2 . Dentro de las modificaciones ocasionadas por las ROS pueden mencionarse peroxidación, daño a residuos aminoacídicos específicos, cambios en la estructura terciaria, degradación y fragmentación. Los productos de oxidación de las proteínas más usuales son aldehídos, cetocompuestos y carbonilos, siendo uno de los principales marcadores de este daño la 3-nitrotirosina. Los productos de proteínas con daños oxidativos pueden contener grupos muy reactivos que pueden contribuir al daño de la membrana y muchas funciones celulares. Como consecuencia de estas modificaciones puede ocurrir pérdida de actividad enzimática, funciones metabólicas alteradas, problemas para el establecimiento de potenciales de membrana y cambios en los tipos y niveles de proteínas celulares (Kohen y Nyska, 2002; Lobo et al., 2010).

- *Daño al ADN.* Pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas,

conversión de bases, aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas (una o dos hebras). El radical más activo es el OH^{\bullet} , el cual puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas generando diversos productos de oxidación, siendo uno de los más importantes la 8-hidroxiguanina. La mayoría de estas modificaciones del ADN son muy relevantes para la carcinogénesis, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes, ya sea por la pérdida de expresión o por la síntesis de una proteína alterada (Kohen y Nyska, 2002, Birben et al., 2012).

- *Daño a glúcidos*: alteración de las funciones celulares asociadas a la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores (Kohen y Nyska, 2002).

De acuerdo con lo mencionado, las ROS pueden causar efectos destructivos y letales sobre los sistemas celulares (Philanto, 2006). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que el organismo también utiliza a los radicales libres como mecanismo de defensa para la destrucción de bacterias y patógenos invasores.

i.3.3. Defensa antioxidante.

Todos los sistemas biológicos en ambientes oxigenados han desarrollado mecanismos de defensa contra las especies reactivas, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. A nivel fisiológico existe el sistema microvascular cuya función es mantener los niveles tisulares de O_2 dentro de presiones parciales relativamente bajas. A nivel bioquímico la defensa puede ser de carácter enzimático o no enzimático, así como sistemas reparadores de moléculas.

- *Sistema no enzimático.*

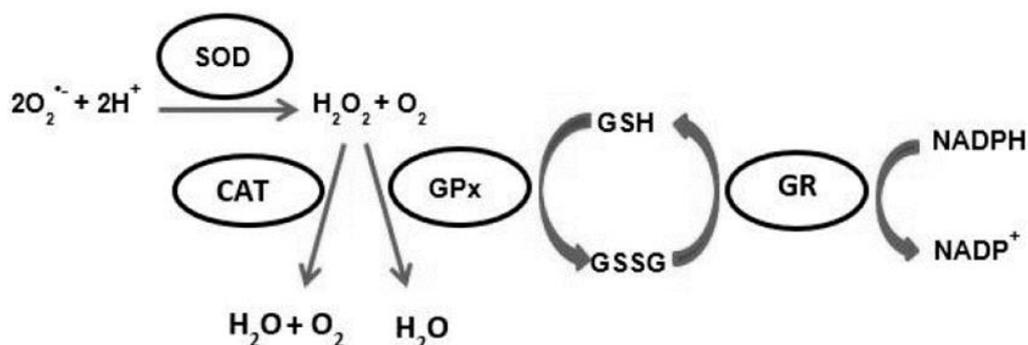
Las células utilizan una serie de compuestos de baja masa molecular que actúan como primera línea de defensa como "scavengers" (captadores) directos de las ROS y RNS por diversos mecanismos (Birben et al., 2012; Lobo et al., 2010). Algunas son sintetizadas por el propio organismo (glutati6n, 6cido 6rico). El glutati6n reducido (GSH) es un trip6ptido (Glu-Cys-Gly) que es un agente intracelular multifuncional. Es abundante en citosol, n6cleo y mitocondrias, y es el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares. La capacidad antioxidante de los compuestos de tiol se debe al 6tomo de azufre, que puede adaptarse f6cilmente a la p6rdida de un solo electr6n, el GSH se oxida a glutati6n oxidado (GSSG) que se acumula dentro de las c6lulas, la proporci6n de GSH/GSSG es una buena medida

del estrés oxidativo de un organismo. Las funciones protectoras del glutatión contra el estrés oxidativo/nitrosativo son varias: puede actuar como un cofactor para varias enzimas desintoxicantes, participar en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, eliminar directamente ROS, y regenerar las vitaminas C y E de nuevo a sus formas activas (Kurutas, 2016).

Otras sustancias son de aporte externo (α -tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno), compuestos fenólicos, péptidos, entre otros). En esta tesis nos centraremos en la evaluación de péptidos y compuestos fenólicos.

- *Sistema enzimático.*

Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD) dependiente del zinc, cobre y manganeso, catalasa (CAT) dependiente del hierro, glutatión peroxidasa (GPx) dependiente de selenio y DT-diaforasa (Muñiz et al., 2000). Junto con otras enzimas desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis en las células a través de las reacciones que se muestran en el **Esquema i.5**.



Esquema i.5. Mecanismos de acción de enzimas que actúan como “antioxidantes” en los organismos aerobios.

Como ya se ha mencionado, el papel de la SOD es catalizar la descomposición de los radicales superóxido y convertirlos en H_2O_2 a través de una reacción de dismutación. La catalasa (H_2O_2 oxido-reductasa) contiene cuatro grupos hemo (hierro) que permiten que la enzima reaccione con el H_2O_2 . El sistema de glutatión incluye a las glutatión peroxidasas (GPx), la glutatión S-transferasa (GST) y la glutatión reductasa (GR). El rol de las GPx (son varias isoformas) es la reducción de H_2O_2 , hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos orgánicos. Una de las isoformas (GPx2) presenta una alta expresión en el tracto gastrointestinal, es probable que ejerza allí funciones antioxidantes o antitumorales, en asociación con GPx1 y con

el (Nrf2) (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Lei et al., 2016), cuyo papel se describirá más adelante. Las glutatión-S-transferasas (GST) representan un grupo importante de enzimas desintoxicantes, que forman una familia de proteínas multifuncionales involucradas en la desintoxicación celular de compuestos citotóxicos y genotóxicos y en la protección de los tejidos contra el daño oxidativo. La glutatión reductasa (GR) cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Esta enzima permite que la célula mantenga niveles adecuados de GSH celular (Birben et al., 2012).

Junto con estas enzimas detoxificantes de ROS/RNS existen enzimas reductoras que también juegan un papel importante en la homeostasis redox (tioredoxina reductasas, glutaredoxinas) (Kurutas, 2016).

La inducción de las enzimas antioxidantes refleja una respuesta específica al estrés oxidativo. Sin embargo, durante las últimas dos décadas, los desarrollos de modelos de ratones con sobreexpresión y eliminación de genes de enzimas antioxidantes han permitido no solo verificar las funciones metabólicas "esperadas" de promoción de la salud de estas enzimas, sino también revelar a menudo funciones "paradójicas" ignoradas de las enzimas antioxidantes que desencadenan trastornos metabólicos. De hecho, ha quedado claro que muchas enzimas antioxidantes son más que simples secuestrantes protectores de ROS/RNS. Regulan muchas vías de señalización redox y también pueden exhibir funciones pro-oxidantes o funciones independientes de sus actividades redox (Lei et al., 2016).

- *Sistemas reparadores.*

Se subdividen en dos grandes grupos, los directos y los indirectos. El sistema reparador directo se relaciona con la reducción de los grupos disulfuro (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa. La reparación indirecta involucra dos pasos distintos: primero, la molécula dañada (o la parte dañada de una molécula) debe reconocerse y extirparse, eliminarse o degradarse. A continuación, se debe sintetizar un reemplazo de toda la molécula dañada, o de la porción extirpada de la molécula dañada. Las proteasas del complejo multienzimático proteosomal presente en citoplasma y núcleo celulares reconocen las proteínas oxidadas y las degradan por completo a aminoácidos; luego se sintetizan moléculas de proteína de reemplazo completamente nuevas *de novo*. Lípidos de membrana que han sido oxidados son atacados por diversas enzimas tales como fosfolipasas que hidrolizan los ácidos grasos oxidados generando

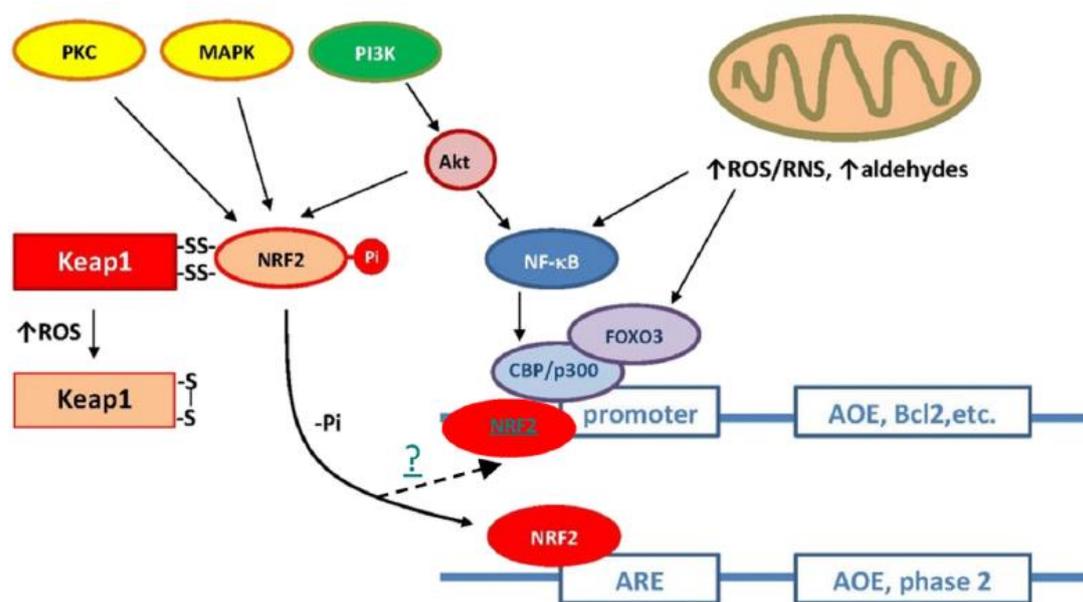
lisofosfolípidos que luego son reacylados, GPx específicas y GST que actúan sobre los hidroperóxidos de ácidos grasos. En el caso de la oxidación del ADN, dada la variedad de productos que pueden formarse, existe una diversidad de enzimas para reparar las bases oxidadas que incluyen GPx y GST específicas, ADN metilasas, glicosilasas, endo y exonucleasas que producen una sistemática excisión y excreción de bases modificadas (Davies, 2000).

i.3.4. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es una expresión que se refiere al establecimiento de un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) y las defensas antioxidantes presentes en mayor o menor medida en todos los tejidos. Se lo define como “una alteración en el balance prooxidante-antioxidante en favor del primero, llevando a un daño potencial” conocido como “daño oxidativo” (Sies, 1991). Dicho desbalance puede deberse a un efecto de depleción de antioxidantes endógenos, a una incorporación dietaria insuficiente de antioxidantes y/o a una producción aumentada de especies reactivas como consecuencia de ciertas circunstancias anormales como inflamación, isquemia, la presencia de iones catalíticos, etc. Un aumento en el nivel de ROS/RNS en el organismo puede generar los daños antes descritos en la estructura del ADN, proteínas y lípidos, y también la activación de varios factores de transcripción inducidos por el estrés y la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Birben et al., 2012), como se describe a continuación.

Cuando se produce estrés oxidativo, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes y restablecer el equilibrio redox mediante la activación o el silenciamiento de genes que codifican enzimas defensivas, factores de transcripción y proteínas estructurales. Moléculas de bajo peso molecular, como ROS/RNS, pueden penetrar la membrana plasmática y modular directamente la actividad del dominio catalítico de los receptores transmembrana o las enzimas transductoras de señales citoplasmáticas, lo que conduce a una activación anormal de los factores de transcripción. Por el inicio de la expresión génica y la consecuente síntesis de proteínas estructurales y funcionales de respuesta, ROS/RNS permiten la adaptación y supervivencia de la célula o, dependiendo de la intensidad y duración de la señal, activan los procesos responsables del daño o muerte celular. El efecto de ROS/RNS en el proceso de señalización celular se promueve a través de una serie de mecanismos simultáneos y, más comúnmente, mediante la activación de una extensa red de varias vías de transducción de

señales intracelulares interactivas (**Esquema i.6**). Se activan sensores de H_2O_2 y vías que convergen en la regulación de diversos factores de transcripción que inducen la expresión de numerosos genes, incluidos los necesarios para la desintoxicación de moléculas oxidantes y para la reparación y el mantenimiento de la homeostasis celular, controlando múltiples funciones celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. La regulación de los factores de transcripción mediada por H_2O_2 puede tener lugar a diferentes niveles: síntesis/degradación, tráfico citoplasmático-nuclear, unión al ADN y transactivación (Kurutas, 2016).



Esquema i.6. Rutas de señalización intracelular involucradas con la respuesta frente a ROS/RNS. ARE: antioxidant responsive element; AOE: enzimas antioxidantes. Tomado de Kurutas (2016).

Uno de los factores de transcripción muy estudiado y muy importante en la activación de las defensas frente al aumento de ROS/RNS es el Nrf2. En condiciones “normales” de alto potencial reductor intracelular, Nrf2 se encuentra estabilizado a través de la unión a Keap1, una proteína que contiene múltiples cisteínas que censan el estímulo oxidativo. Bajo estrés oxidativo/nitrosativo, los grupos tiol en Keap-1 se oxidan (enlaces cruzados S-S) causando la disociación de Nrf2. En la activación de este factor también pueden intervenir protein-quinasas. (fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa C (PKC) que lo fosforilan dando como resultado la liberación de Nrf2 de Keap1. Luego se produce la translocación al núcleo donde interactúa con la proteína MAF formando un heterodímero que se une al ARE (antioxidant

responsive element), un elemento regulatorio en regiones promotoras de diversos genes que codifican las enzimas de detoxificación de fase II y las enzimas antioxidantes (**Esquema i.6**, Finley et al., 2011; Kurutas, 2016).

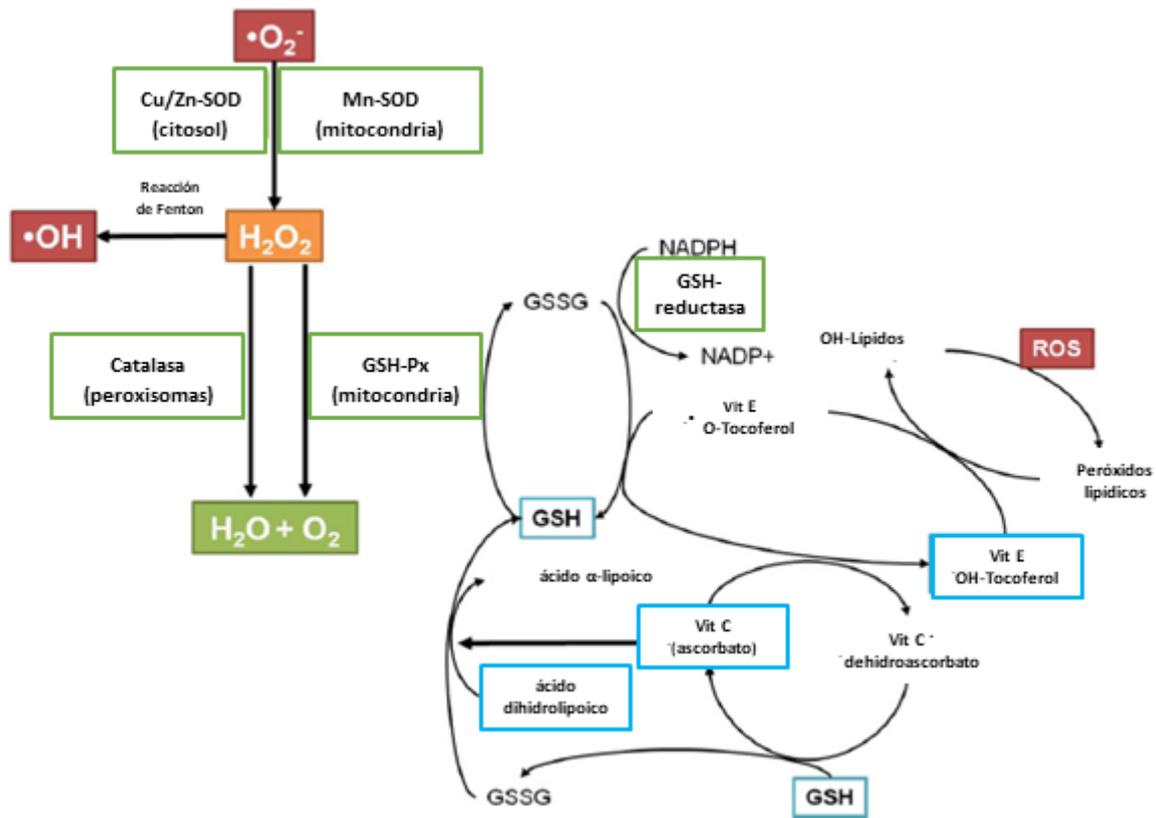
Otro factor de transcripción cuya activación es estimulada por el estado pro-oxidativo de las células es NF- κ B, especialmente por una mayor presencia de H₂O₂. La cascada de señalización parece deberse a la activación de la vía MAP quinasa (**Esquema i.6**). Los mecanismos que regulan y controlan el nivel de GSH en la célula participan indirectamente en la regulación de la expresión de genes con un sitio de unión a NF- κ B en el promotor. Además, controla la expresión de numerosos genes inducibles y específicos de tejido y participa en la regulación de las respuestas celulares proinflamatorias e inmunitarias, la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Kurutas, 2016). El factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) también es activado por ROS .y une a elementos de respuesta que regulan varios procesos celulares, incluida la proliferación celular, la apoptosis, la supervivencia y la diferenciación (**Esquema i.6**). Aunque varias otras vías pueden ser reguladas por ROS/RNS, las respuestas primarias contra diferentes intensidades de estrés oxidativo/nitrosativo están moduladas principalmente por la cooperación de tres vías: NF- κ B, AP1 y MAP quinasa. Sin embargo, con el aumento del estrés oxidativo/nitrosativo, la vía Nrf2/Keap1 también es necesaria para inducir las defensas antioxidantes y minimizar el daño (Kurutas, 2016).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo estaría implicado en los procesos de envejecimiento celular y la aceleración de los mismos (Shahidi, 1997). También constituye la base etiológica de muchas enfermedades no transmisibles (Wei y Lee, 2002). Ejemplos de esto son: enfermedades degenerativas del sistema nervioso tales como el Parkinson y el Alzheimer; oxidación del colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), conduciendo a la formación de ateromas; carcinogénesis, por mutaciones por adición a dobles enlaces de las bases pirimidínicas y abstracción de hidrógeno de las moléculas de azúcar resultando en escisión del ADN (Simic, 1988); diabetes, cataratas, entre otras. Muchos de los procesos, así como los cambios generados a nivel celular se pueden utilizar como biomarcadores de estrés oxidativo y de las enfermedades en cuestión (Huang y Nan, 2019).

i.3.5. Antioxidantes dietarios

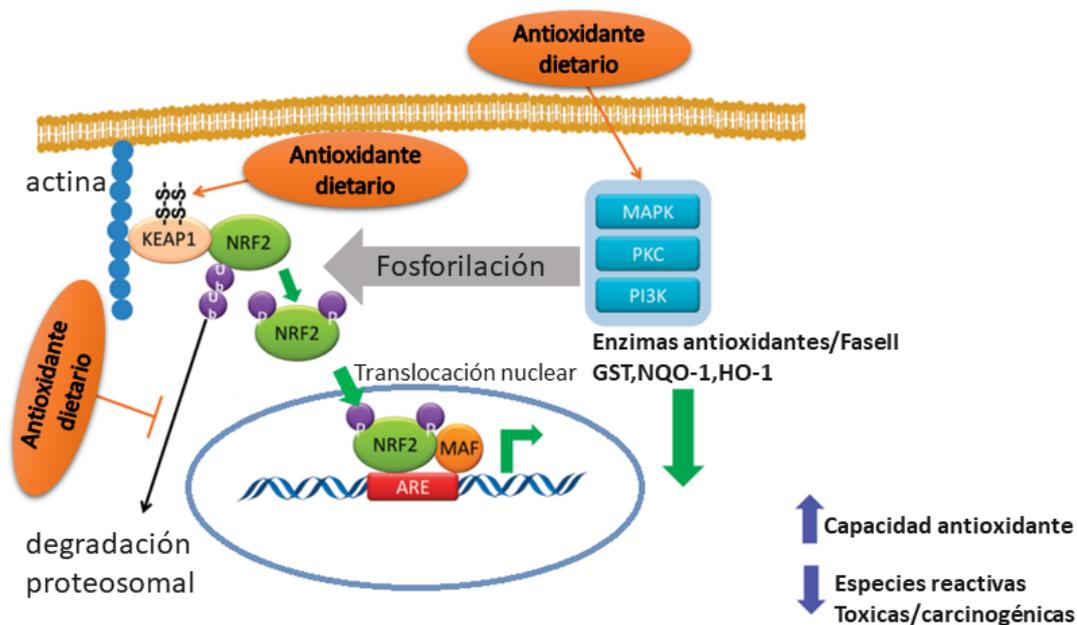
Dadas las implicancias de los procesos oxidativos, es importante su inhibición tanto a nivel de los alimentos como del organismo humano. Desde el punto de vista práctico, los antioxidantes a ser incorporados en alimentos deben poseer las siguientes características: ser inocuos, activos a concentraciones bajas y estables durante todos los procesos ordinarios de la tecnología alimentaria (Belitz et al., 1997). A lo largo de los años se han incorporado diversos antioxidantes sintéticos en el procesamiento de alimentos. Entre los más empleados están el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) que son poderosos antioxidantes primarios utilizados por décadas en los alimentos, sin embargo, hay en la actualidad estudios que demuestran su toxicidad (Ibañez et al., 2000). La acción antioxidante del BHT es similar a la de la vitamina E: dona eficientemente un átomo de hidrogeno a un radical peroxi o alcoxi, interfiriendo con la propagación de la peroxidación lipídica (López, 1996). También se puede citar la terbutilhidroquinona (TBHQ) y 2,4,5-trihidroxi-butirofenona (THBP). Con el incremento del interés por la seguridad de los aditivos alimentarios, todos estos antioxidantes han sido estudiados y se ha demostrado que poseen actividad carcinogénica (Lindberg-Madsen y Bertelsen, 1995). Por tal motivo la demanda de antioxidantes se ha orientado hacia el empleo de productos naturales. Dentro de los antioxidantes naturales se incluyen diversos grupos de compuestos tales como los fenoles y polifenoles, quelantes, vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), vitamina C, carotenoides (vitamina A), etc. Los polifenoles son el grupo más grande de componentes antioxidantes y están presentes en frutas y hortalizas, semillas leguminosas, granos, tés, hierbas, especias y vinos (Horubala, 1999; Borowska, 2003). También se ha demostrado actividad antioxidante de proteínas o hidrolizados proteicos.

Como se ha descrito, el organismo cuenta con sustancias de origen endógeno (no enzimáticas y enzimáticas) y otras de origen dietario para defenderse contra el estrés oxidativo a través de lo que constituye la teoría antioxidante tradicional (Finley et al., 2011) que se resume en el **Esquema i.7**.



Esquema i.7. Teoría tradicional de defensa antioxidante celular. Adaptado de Kurutas (2016)

Sin embargo, esta visión se ha modificado en los últimos tiempos, especialmente pensando en los antioxidantes procedentes de la dieta. Se ha observado mediante estudios epidemiológicos que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, que los contienen en bajas concentraciones, tiene efectos protectores. Pero, por otro lado, los estudios de intervención administrando antioxidantes puros en altas dosis, no muestran efectos biológicos benéficos e incluso pueden presentar mayores riesgos frente a ciertas patologías. En función de esto se sugirió que la teoría antioxidante tradicional presentaba limitaciones, y se han reconocido otras formas de acción antioxidante como la inducción en la expresión de genes y la activación de vías de señalización celular entre otras. Surge también de las observaciones realizadas que es necesario un cierto nivel de ROS para estimular algunos de los procesos que determinan beneficios para la salud y la remoción completa de estas especies tendría efectos opuestos a los buscados (Finley et al., 2011).



Esquema i.8. Actividad antioxidante mediada por la inducción de genes. Adaptado de Finley et al. (2011)

Como se describió anteriormente, existe una respuesta adaptativa y de defensas inducibles que se expresan en respuesta al estrés oxidativo y está dada por alteraciones en la expresión génica (transcripción y traducción) a través de genes up o down-regulados, temprana y/o posteriormente, involucrados en la defensa antioxidante (activación/inactivación enzimática) y en la eliminación de daños/reparación de enzimas. En este sentido, se ha demostrado que varias sustancias de la dieta producen la inducción de varios genes contenidos en el ARE (el cuál como se describió anteriormente regula la síntesis de enzimas antioxidantes y detoxificantes) a través de varios mecanismos diferentes (**Esquema i.8**). Se ha reportado que ciertos compuestos con capacidad de modificación de los -SH alteran los residuos de cisteína en Keap1 y activan las vías de las kinasas. El estado redox también modifica la importación/exportación nuclear de Nrf2. Cuando las células se exponen a compuestos antioxidantes que generan estrés oxidativo, se impide la ubiquitinación de Nrf2 sensible a redox, aumenta la translocación de Nrf2 y las tasas de importación/exportación de Nrf2 hacia/desde el núcleo se altera, lo que lleva a un aumento de Nrf2 libre, lo que resulta en una transcripción mejorada (Finley et al., 2011).

La variación genética en los sistemas de defensas antioxidantes endógenos puede afectar el estrés oxidativo y el desarrollo subsecuente de enfermedades. Además, la dieta modifica la relación entre variación genética de enzimas antioxidantes endógenas y biomarcadores de estrés oxidativo y riesgo de enfermedades relacionadas. Por otro lado, la variación genética en

la absorción, metabolismo, distribución o eliminación de los antioxidantes exógenos puede influir sobre el grado de exposición de los antioxidantes a las células diana. Por lo tanto, *in vivo*, la situación y los procesos son muy complejos. Esto hace que la capacidad antioxidante de una sustancia debe ser validada en modelos celulares e *in vivo* y estará dada por la capacidad de las sustancias de modular el estado redox celular a través del bloqueo del aumento de los niveles basales/estacionario de biomarcadores en modelos celulares/animales sometidos a estrés oxidativo (Finley et al, 2011).

i.3.6. Actividad antioxidante de proteínas/péptidos.

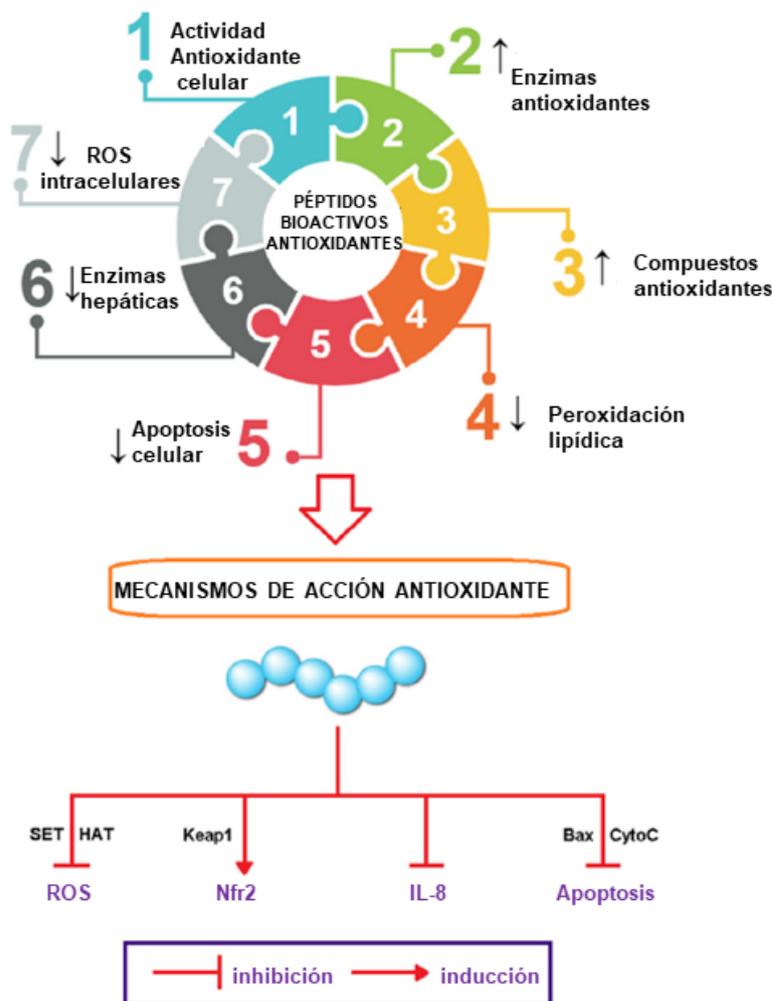
Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. Las mismas pueden además contener secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño que se encuentran encriptadas y que al liberarse constituyen “péptidos bioactivos”. Dichos péptidos pueden ser liberados por hidrólisis, ya sea por hidrólisis enzimática *in vitro* durante el procesamiento de los alimentos; como producto de la actividad de ciertos microorganismos, por ejemplo, durante las fermentaciones; o como resultado de la hidrólisis gastrointestinal que sufren al ser digeridos por el organismo de los individuos (Orsini Delgado et al., 2011). Existen evidencias que demuestran que algunos péptidos son capaces de atravesar el epitelio intestinal y afectar los principales sistemas: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune. Se han podido aislar, identificar y secuenciar péptidos con actividad antimicrobiana, antitrombótica, antihipertensiva, hipocolesterolemica, antioxidante, inmuno y citoreguladora, entre otros (Vioque et al., 2006). Algunos aminoácidos son conocidos como efectivos antioxidantes primarios (Sakanaka et al., 2004). Varios aminoácidos, como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano son generalmente aceptados como antioxidantes a pesar de sus efectos pro-oxidativos en algunos casos (Peña Ramos et al., 2004).

Los principales mecanismos de acción antioxidante directa propuestos para los péptidos se relacionan con la transferencia directa de H (HAT) del grupo OH unido al anillo aromático de un residuo de tirosina; la cisteína y la histidina pueden actuar a través de un mecanismo de transferencia de un electrón (SET) y también a través de la pérdida de un protón asistida por el solvente (SALP), mecanismo dependiente del pH y propiedades ácido base, seguida de transferencia de electrón. En todos los casos se forman especies de radicales más estables.

Además, péptidos que contienen histidina pueden actuar a través de la quelación de metales, y residuos de cisteína y metionina en la reducción de hidroperóxidos resultantes de la oxidación lipídica (Esfandi et al., 2019). También se ha mostrado que la histidina presenta una fuerte actividad secuestrante de radicales libres, debido a su habilidad de donar protones del grupo imidazol (Chen et al., 1998; Mendis et al., 2005; Wang et al., 2006). En muchos casos se ha observado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (prolina y leucina) en el extremo N-terminal potenciaría la actividad antioxidante de los péptidos. Chen et al. (1998) postularon que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos podría mejorar la accesibilidad de péptidos antioxidantes en ciertos sitios celulares como las cadenas poliinsaturadas de ácidos grasos de las membranas biológicas. Además, es de esperar que un péptido con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presente una mayor potencia antioxidante debido a la mayor interacción con los ácidos grasos (Mendis et al., 2005). Se han desarrollado modelos teóricos que surgen como una herramienta muy útil para el análisis de las relaciones estructura/actividad de los péptidos. Uno de los modelos matemáticos más utilizado es el modelo cuantitativo QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) (Li y Li, 2013). Dicho modelo proporciona relaciones matemáticas que permiten expresar la relación entre la estructura y la actividad de los péptidos a partir de datos encontrados en estudios previos en la literatura, y puede ser utilizado para estimar o predecir la actividad biológica de un determinado compuesto en relación con su estructura química. Este modelo asume principalmente que la actividad biológica está relacionada con propiedades estructurales como son los atributos electrónicos, la hidrofobicidad y la estericidad (Hansch y Leo, 1995; King et al., 1993). Cuando los aminoácidos se encuentran unidos formando péptidos, no solamente es importante la presencia de estos aminoácidos que tienen propiedades antioxidantes, sino que el posicionamiento de los mismos en la secuencia juega un rol fundamental. Por ejemplo, hay estudios que han demostrado que el posicionamiento del grupo imidazol de la histidina y su entorno en un péptido influyen mucho su actividad. Son particularmente importantes los aminoácidos que se encuentran en los extremos C y N-terminales. La conformación, la masa molecular y la hidrofobicidad de los péptidos también tendrán efecto en el mecanismo y la potencia que tengan como antioxidantes. Los péptidos de baja masa molecular son los que generalmente presentan las mayores actividades antioxidantes, generalmente se habla de péptidos menores a 3 kDa pero más frecuentemente se encuentra actividad en aquellos

menores a 1 kDa, lo cual se atribuye a que los péptidos más grandes podrían producir repulsiones estéricas, aunque hay excepciones de péptidos grandes con actividad. También generalmente se considera que una mayor hidrofobicidad contribuye a aumentar la actividad antioxidante debido a interacciones entre los residuos hidrofóbicos o con moléculas *target* hidrofóbicas tanto en solución como a nivel celular (Nwachukwu y Aluko, 2019; Zou et al., 2016).

Gran parte de los estudios sobre las propiedades antioxidantes de los péptidos bioactivos se han realizado mediante ensayos químicos *in vitro*, mientras que hay una proporción mucho menor de estudios hechos en cultivos celulares y aún menor en ensayos *in vivo*. Los estudios celulares *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los péptidos bioactivos antioxidantes poseen actividad antioxidante celular, disminuyen los biomarcadores de estrés oxidativo (p. ej., peroxidación lipídica, niveles intracelulares de ROS, apoptosis), aumentan las actividades de diversas enzimas antioxidantes y modulan los niveles de moléculas antioxidantes. Al igual que en otros tipos de antioxidantes, los péptidos pueden activar las respuestas antioxidantes a través de la inducción del factor de transcripción factor eritroide nuclear 2 (Nrf2) (**Esquema i.9**). Estas propiedades bioactivas celulares *in vitro* y los efectos sobre la salud *in vivo* sugieren que los péptidos antioxidantes podrían usarse como componentes de alimentos funcionales y contribuir a la promoción de la salud al mejorar funciones fisiológicas específicas (Aguilar-Toalá y Liceaga, 2021).



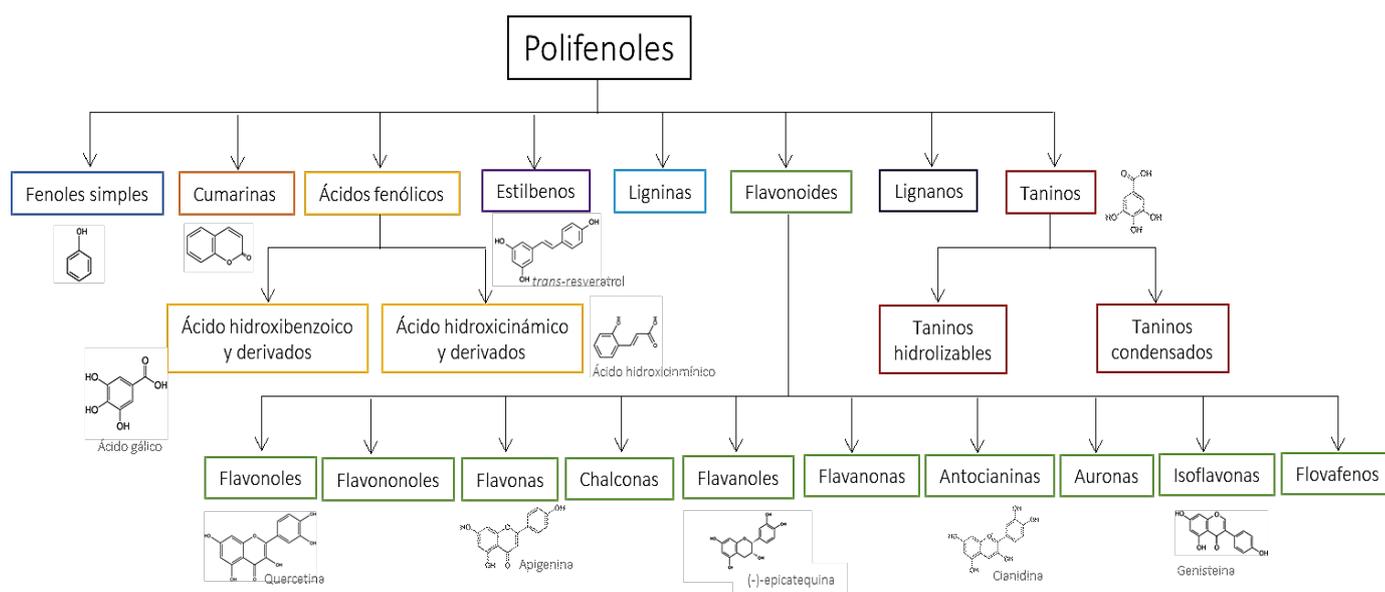
Esquema i.9. Mecanismos de acción antioxidante de péptidos reportados en la literatura. Adaptado de Aguilar-Toalá y Liceaga (2020).

En diversos trabajos se han obtenido y aislado péptidos bioactivos a partir de leguminosas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos responsables de la actividad antioxidante; de los resultados de dichas investigaciones se puede destacar que tanto la composición de aminoácidos como la secuencia de los péptidos son críticas para su actividad antioxidante. Por ejemplo, Zhang et al. (2011) reportaron la purificación de un péptido con actividad antioxidante obtenido a partir del hidrolizado de proteína de garbanzo digerido con alcalasa; el péptido se obtuvo por separación del hidrolizado. Este péptido presentó actividad de captación de radicales libres DPPH, hidroxilo y superóxido, además de actividad quelante de hierro y cobre. Por otro lado, se evidenció que la capacidad antioxidante de los péptidos de soja, dependía de su estructura y se afectaba por los procedimientos de hidrólisis. Al comparar la actividad antioxidante de 28 péptidos relacionados estructuralmente con Leu-Leu-Pro-His-His se

encontró que la secuencia Pro-His-His era el sitio más activo, lo cual hizo pensar que los péptidos que contienen histidina pueden actuar como quelantes de iones metálicos, captadores de radicales e inactivadores de ROS contribuyendo a su actividad (Wang y Gonzalez de Mejía, 2005). Asimismo, los péptidos derivados de proteína de soja pueden presentar actividad antioxidante más alta que la proteína de la cual provienen, por ejemplo, después de hidrolizar la β -conglucina y la glicina, su actividad de captación de radicales libres se incrementó de 3 a 5 veces (De Mejía y De Lumen, 2006). Zhao & Liu (2023) aislaron y purificaron péptidos antioxidantes a partir de hidrolizados de proteína de arveja. Identificaron tres péptidos: YLVN (Tyr-Leu-Val-Asn), EEHLCFR (Glu-Glu-His-Leu-Cys-Phe-Arg) y TFY (Thr-Phe-Tyr), los cuales exhibieron una fuerte actividad antioxidante *in vitro*. EEHLCFR mostró una mayor actividad secuestradora de DPPH \cdot mientras que YLVN mostró una mayor actividad secuestradora de ABTS \cdot . En otro estudio, Cosson et al. (2022) identificaron otros péptidos antioxidantes presentes en arvejas. Once péptidos tenían secuencias homólogas a las de péptidos antioxidantes conocidos (base de datos BIOPEP) previamente identificados: ADGF; ADVFNPR; ELLI; FVPH; HLHP; KFPE; LPILR; SAEHGSLH; SGAF; YLKT; y YVGD, y provenían de diferentes proteínas: proteínas de almacenamiento; enzimas tales como la lipoxigenasa-3, y proteínas metabólicas como las transportadoras.

i.3.7. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos.

Los polifenoles son compuestos resultantes del metabolismo secundario de las plantas, con más de 8000 estructuras conocidas actualmente. La estructura general comprende al menos un anillo de benceno, con un mínimo de un grupo hidroxilo unido a él. Pueden clasificarse en diferentes grupos según diferencias estructurales, como el número de anillos de fenol en la molécula o los grupos de sustitución de los anillos de fenol. Aunque se han realizado varias clasificaciones, la más aceptada divide a los polifenoles en dos familias principales: flavonoides y no flavonoides.



Esquema i.10. Clasificación de los polifenoles

Entre los no flavonoides dietéticos más comunes se encuentran los ácidos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico y sus derivados conjugados y los estilbenos. Los miembros de la familia de los flavonoides tienen un núcleo flavánico típico C6-C3-C6, y son los principales polifenoles que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y, por lo tanto, son abundantes en la dieta humana. De acuerdo con el estado de oxidación del anillo de pirano central, los flavonoides pueden subdividirse en flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas), antocianinas, isoflavonoides y chalconas. Otro miembro del grupo de los flavonoides, los isoflavonoides, contienen anillo B unido a la posición C3 del anillo C (Zhao et al., 2015). Las principales subclases de flavonoides dietéticos son flavonas, antocianinas, flavonoles, (iso)-flavanonas y flavan-3-oles. Entre los polifenoles, los taninos representan un grupo especial que tiene la capacidad de interactuar y precipitar proteínas. Los taninos se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados. Sus componentes básicos se basan en ésteres de monosacáridos derivados del ácido gálico o unidades de flavan-3-oles, respectivamente. Estos compuestos pueden alcanzar pesos moleculares muy altos y estructuras complejas (Pérez-Gregorio et al., 2020).

Los compuestos fenólicos pueden encontrarse como moléculas libres (agliconas), conjugados usualmente con azúcares (glicósidos) o unidos a polímeros como proteínas mediante enlaces covalentes o no covalentes (Vacek et al., 2010).

Deben tener en cuenta varios aspectos cuando se pretende evaluar la funcionalidad biológica de las matrices/ingredientes alimentarios que contienen esos compuestos fenólicos: baja estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (por ejemplo, exposición a la temperatura, el oxígeno y la luz); modificaciones durante la digestión (por pH y enzimas); interacciones con otros componentes de los alimentos (Albuquerque et al., 2021). La biodisponibilidad de los polifenoles depende en gran medida de sus estructuras. Sólo una parte de los compuestos ingeridos es biodisponible luego de la administración oral debido a diversos factores como: tiempo de residencia insuficiente en condiciones gástricas; baja solubilidad y/o permeabilidad en el intestino (Di Lorenzo et al., 2021; Pérez Gregorio et al., 2020). Algunos de los polifenoles necesitan someterse a hidrólisis y ser metabolizados a través del ambiente del estómago/intestino y/o por la microbiota del tracto digestivo antes de su absorción. El proceso de digestión puede cambiar la estructura de los compuestos fenólicos y, en consecuencia, la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal (Lucas-González et al., 2018).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que una mayor ingesta de polifenoles se asocia con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos neurodegenerativos. Los efectos beneficiosos de los polifenoles se atribuyen principalmente a su capacidad para contrarrestar las condiciones de estrés oxidativo que acompañan a estas patologías. Se ha demostrado que varios polifenoles tienen claras propiedades antioxidantes *in vitro*, ya que pueden actuar como cortando la reacción radicalaria en cadena o neutralizando radicales libres dependiendo de sus estructuras químicas, lo que también influye en su poder antioxidante. Se ha establecido una jerarquía para los diferentes compuestos polifenólicos dentro de cada clase sobre la base de su capacidad para proteger los lípidos, las proteínas o el ADN contra el daño oxidativo. Si bien muchas de sus acciones biológicas se han atribuido a esas propiedades antioxidantes, la evidencia acumulada indica que los polifenoles exhiben varias propiedades adicionales en sistemas biológicos complejos tales como: inhibición de diferentes enzimas (telomerasa, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, xantina oxidasa, metaloproteinasas, enzima convertidora de angiotensina, proteína quinasa); interacción con vías de transducción de señales; interacción con receptores celulares. Los polifenoles también pueden interactuar con vías dependientes de caspasas; interferir con la regulación dependiente de ciclina del ciclo celular; inducir enzimas desintoxicantes; potenciar la producción de factores vasodilatadores como el óxido nítrico; afectar la función plaquetaria. Varios estudios indicaron que los

polifenoles de la dieta pueden estimular la transcripción de los sistemas de defensa antioxidantes y de desintoxicación a través de los elementos ARE. Una hipótesis es que los polifenoles influyen en las vías que regulan la activación de ARE, modificando la capacidad de Keap1 para secuestrar Nrf2 (**Esquema i.8**). Esta hipótesis está respaldada por la evidencia de que los polifenoles pueden reaccionar con grupos sulfhidrilos activos, estrechamente relacionados con la inducción enzimática y el aumento de GSH, modulando así varias proteínas sensoras, Keap1 entre otras. También debe tenerse en cuenta que los antioxidantes fenólicos pueden influir en la expresión de genes dependientes de ARE a través de la activación de proteínas MAPK, probablemente involucradas en la estabilización de Nrf2 a través de su fosforilación (**Esquema i.8**). La diferente eficiencia mostrada por las estructuras de los polifenoles indica claramente una fuerte relación estructura-actividad que puede estar relacionada con la capacidad antioxidante de cada compuesto o con la diferente capacidad para actuar como ligandos de receptores desconocidos hasta el momento (Masella, et al., 2005; Lv et al., 2021).

i.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante

Existen tres niveles generales de ensayos para la evaluación de la actividad antioxidante: ensayos químicos (acelulares) *in vitro*: ABTS, ORAC, HORAC, neutralización de peroxinitritos o superóxido, entre otros); ensayos utilizando cultivos celulares y ensayos *in vivo* en modelo animal/humano. Con base en la ventaja de su bajo costo y su operación simple y rápida, el ensayo químico es el más utilizado. Sin embargo, los resultados obtenidos en este tipo de ensayos son considerados un primer paso en la caracterización de una sustancia potencialmente antioxidante y pueden ser, además, cuestionables para predecir la capacidad antioxidante *in vivo* ya que el ensayo químico se realiza bajo condiciones no fisiológicas y no se considera la absorción y el metabolismo del compuesto antioxidante (Frankel y Meyer, 2000). En el caso de modelos animal/humano, a pesar del verdadero reflejo de la capacidad antioxidante *in vivo*, la desventaja de un largo tiempo de operación y un gran costo, así como cuestiones éticas, hace que este ensayo sea inadecuado para la evaluación de antioxidantes en la etapa inicial de la investigación antioxidante. Por lo tanto, el ensayo basado en células como método de prueba intermedio resulta necesario e imprescindible. En este sentido, existe una gran variedad de cultivos celulares capaces de ser utilizados como modelos en el estudio de los

antioxidantes. En la actualidad, se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

La utilización de cultivos celulares para la evaluación del estrés oxidativo y la capacidad de distintos compuestos de actuar como antioxidantes está ampliamente desarrollada. Dado que para ensayos relacionados con el estrés oxidativo se busca que el modelo celular sea lo suficientemente robusto como para generar una respuesta al proceso y que solo haya efectos citotóxicos cuando los tratamientos sean muy intensos, es más ventajosa la utilización de líneas celulares en lugar de un cultivo (Goya et al., 2009). En particular, resulta de interés la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2). Esta línea fue establecida a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y Trempe, 1975). La particularidad de estas células es que son capaces de diferenciarse espontáneamente en enterocitos mientras se cultivan a largo plazo. Son indiferenciadas durante toda la fase de crecimiento exponencial, y su diferenciación sólo ocurre tras alcanzar la confluencia celular, durante su fase estacionaria, exhibiendo las mismas funciones biológicas y estructura de microvellosidades que el intestino humano. Dado que la población de la línea celular Caco-2 ha demostrado ser heterogénea y altamente dependiente de las condiciones de cultivo se ha logrado aislar varios clones de esta con el objetivo de reducir la heterogeneidad. Un ejemplo de esto es el clon TC7 obtenido a partir de un pasaje tardío de la línea parental Caco-2 y que se caracteriza por una mejor capacidad metabólica y de transporte (Caro et al., 1995). Las características de esta línea celular han permitido, desde hace varios años, su utilización en la investigación científica en distintas áreas como nutrición, toxicología y farmacología evaluando el transporte y la absorción intestinal de una gran cantidad de compuestos exógenos y endógenos. Sin embargo, esta línea celular se utiliza también en otras áreas de investigación, como por ejemplo el estudio del estrés oxidativo. Estas células sirven como un modelo efectivo debido a que poseen un sistema de defensa antioxidante muy amplio que permite la evaluación de varios biomarcadores del estrés oxidativo. Un ejemplo de esto es el factor de transcripción NRF2, un regulador clave en la respuesta al estrés oxidativo y que se expresa en colon, hígado y otros tejidos (Gonzalez-Donquiles et al., 2017). La línea celular Caco-2 y varios de sus clones se han utilizado en ensayos relacionados con el estrés oxidativo intracelular y la actividad antioxidante de una gran variedad de compuestos (Liu y Finley, 2005; Taha et al., 2010).

Una de las ventajas principales de la utilización de cultivos celulares es que permite el estudio de diversos tipos de células, estímulos oxidativos y muestras e inclusive permite desarrollar modelos para evaluar el efecto de antioxidantes en el marco de enfermedades o patologías específicas. En cuanto a los antioxidantes, estos se pueden agregar al medio de cultivo celular simultáneamente con el factor estresante o preincubarse con las células. Es muy importante considerar el efecto de la incorporación del antioxidante en las células y las variables relacionadas para una evaluación sólida del efecto del mismo. Los cultivos celulares pueden sufrir un estado de estrés oxidativo por una mayor generación de ROS o por un daño en las defensas antioxidantes; por esto, los efectos de compuestos antioxidantes contra el estrés oxidativo en estos modelos se pueden medir de distintas formas y a partir de varios biomarcadores como por ejemplo: supresión de la formación de ROS, oxidación de biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN), efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y prooxidantes, así como sobre la expresión de genes relacionados, efecto sobre antioxidantes celulares no enzimáticos y muerte celular (Niki, 2010; López-Alarcón y Denicola, 2013). El estudio de los efectos de los antioxidantes a nivel celular implica el uso de diferentes estímulos oxidativos o factores estresantes, lo que a su vez generan diferentes mecanismos de estrés oxidativo. El H_2O_2 es uno de los más utilizados a la hora de inducir el estrés oxidativo en varios modelos celulares, particularmente en cultivos Caco-2. Como se mencionó anteriormente, la reacción biológicamente significativa de H_2O_2 es su conversión espontánea, catalizada por Fe^{2+} (reacción de Fenton) a radicales $OH\bullet$ altamente reactivos. Como los alimentos que ingerimos frecuentemente contienen sales de hierro, y los agentes reductores en el jugo gástrico reducen el hierro a Fe^{2+} para facilitar su absorción, el tracto gastrointestinal es un objetivo importante para el daño generado por los radicales $HO\bullet$. Altas concentraciones de H_2O_2 puede causar daño a la membrana celular, daño al ADN y finalmente necrosis (Wijeratne y Cuppett, 2006). Dado que las células del colon son susceptibles a la actividad oxidativa del H_2O_2 , el modelo de células Caco-2 con H_2O_2 como inductor es un sistema ideal para realizar estudios relacionados con el estrés oxidativo y con la identificación de antioxidantes que pueden eliminarlo o reducirlo. La respuesta de estas células varía ampliamente según la concentración de inductor utilizada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

Teniendo en cuenta que:

- la semilla de arveja es fuente de una diversidad de componentes potencialmente antioxidantes (péptidos y compuesto fenólicos entre ellos) que pueden ejercer su funcionalidad a través de distintos mecanismos y sus efectos benéficos sobre la salud podrían potenciarse por la presencia simultánea de todos ellos;
- estos compuestos presentes en el ingrediente (harina) o en ingredientes o matrices alimentarias derivadas con distinto grado de complejidad deberán atravesar el sistema digestivo donde podrán ser liberados y/o modificados; posteriormente podrán ejercer una acción intestinal local o ser absorbidos en su forma original o modificados, y alcanzar el órgano blanco para ejercer su función biológica. En función de ello, dos aspectos fundamentales a analizar son la bioaccesibilidad, incluyendo estudios de digestión gastrointestinal y la absorción intestinal.
- la forma en que los componentes de los alimentos interactúan entre sí afecta los procesos fisiológicos, como la digestión y el metabolismo, que en última instancia afectan sus bioactividades. Esto es particularmente importante para estas clases de compuestos. La bioaccesibilidad y bioactividad de dichos componentes dependerá de la composición y el procesamiento de la matriz en la que se encuentran;
- la fermentación natural de las harinas constituye una herramienta muy interesante para la liberación de componentes potencialmente bioactivos tales como péptidos y compuestos fenólicos;
- las bebidas vegetales son alimentos en fuerte expansión en el mercado;

este trabajo de tesis plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

Los compuestos bioactivos (especialmente péptidos y compuestos fenólicos) presentes en ingredientes de arveja amarilla (aislado proteico, harina, harina fermentada) y en productos bebibles derivados presentarán diferencias cuali y cuantitativas debido a los procesos aplicados para su obtención a la matriz que los contiene. Una vez ingeridos, dichos compuestos tienen

posibilidad de acceder a la luz intestinal, ser digeridos y absorbidos en su forma original o ser modificados, y de ejercer actividad moduladora del estrés oxidativo tanto a nivel intestinal como a nivel sistémico. Los ensayos de simulación del proceso de digestión gastrointestinal in vitro estáticos y los métodos de simulación de la absorción, así como ensayos in vitro químicos y celulares serán adecuados para aportar información sobre la potencial bioactividad de los compuestos bioactivos en estudio, como paso previo para, en algún momento llegar a la realización de ensayos en animales y clínicos bien diseñados que permitan la confirmación de posibles declaraciones de propiedades saludables.

En función de esta hipótesis, el **objetivo general** de este trabajo de tesis es ***evaluar a la harina, aislado proteico y harina fermentada de arveja como ingredientes funcionales antioxidantes que serán utilizados en la preparación de dos productos bebibles con la potencialidad de ser alimentos fuente de compuestos con acción preventiva del estrés oxidativo.***

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. (2002). Amino Acid Composition and In Vitro Protein Digestibility of Selected Ancient Wheats and their End Products. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 737–747.
- Aguilar-Toalá, J. E., Liceaga, A. M. (2021). Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: beyond chemical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2193–2204. doi.org/10.1111/ijfs.14855.
- Albuquerque, B., Heleno, S., Oliveira, M. B., Barros, L., & Ferreira, I. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12, 14-29.
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G., Cilla, A. (2015). Static digestion models: general introduction. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models* (pp. 3–12). Cham: Springer International Publishing. doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_1.
- Alqahtani, S., Mohamed, L. A., & Kaddoumi, A. (2013). Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9(10), 1241–1254.
- Alongi, M., Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81, 104466. doi.org/10.1016/j.jff.2021.104466.
- Barbana, C., Boucher, A. C., Boye J. I. (2011) In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Research International* 44, 174–180.
- Barbana, C., Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry* 127, 94–101.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Bora, P. S., Brekke, C. J., Powders, J. R. (1994). Heat induced gelation of pea (*Pisum sativum*) mixed globulins, vicilin and legumin. *Journal of Food Science*, 59, 594–596.

- Boye, J. I., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414–431
- Belitz, H. D., Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. pp 1087.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. doi.org/10.1111/1541-4337.12049.
- Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., Zweibaum, A., Fabre, G. (1995). Characterization of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 116(2), 147–158
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F. Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49–53
- Chitra, U., Vimala, V., Singh, U., Geervani, P. (1995). Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47, 163–172.
- Cosson, A., Correia, L. O., Descamps, N., Saint-Eve, A., & Souchon, I. (2022). Identification and characterization of the main peptides in pea protein isolates using ultra high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and bioinformatics tools. *Food Chemistry*, 367, 130747.
- Croy, R. R., Gatehouse, J. A., Tyler, M., Boulter, D. (1980). The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemical Journal*, 191, 509–516.
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289. doi.org/10.1080/15216540051081010.
- De Angelis, I., & Turco, L. (2011). Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Current Protocols in Toxicology*, (SUPPL.47), 1–15.
- De Mejía, E., De Lumen, B.O. (2006). Soybean bioactive peptides a new horizon in preventing chronic diseases. *Sexuality, Reproduction & Menopause*, 4(2), 91-95.

- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13, 273. doi.org/10.3390/nu13010273.
- Ding, J., Liang, R., Yang, Y., Sun, N., & Lin, S. (2020). Optimization of pea protein hydrolysate preparation and purification of antioxidant peptides based on an in silico analytical approach. *LWT-Food Science and Technology*, 123, 109126.
- Diplock, A. T., Charleux, J., Crozier-Willi, G., Kok, F., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stah, W., Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80 (1): S77-S112.
- El Fiel, H. E. A., El Tinay, A. H., & Elsheikh, E. A. (2002). Effect of nutritional status of faba bean (*Vicia faba* L.) on protein solubility profiles. *Food Chemistry*, 76(2), 219-223.
- Esfandi, R., Walters, M. E., Tsopmo, A. (2019). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*, 5(4), e01538. doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01538.
- Ferreira, S., Bottini, R., Fontana, A. (2021). Tandem absorbance and fluorescence detection following liquid chromatography for the profiling of multiclass phenolic compounds in different winemaking products. *Food Chemistry* 338, 128030.
- Finley, J. W., Kong, A.-N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., & Lei, X. G. (2011). Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 6837–6846. doi.org/10.1021/jf2013875.
- Fogh, J., & Trempe, G. (1975). *New Human Tumor Cell Lines*. Fogh J. (eds) *Human tumor cells in vitro*. Springer, Boston, MA. Oxford University Press.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, 1941, 1925–1941.
- Fridovich, I. (1976). *Free radicals in Biology*. Academic Press, New York, 1: 1976.
- García Fillería, S. F. (2019) Evaluación de aislado proteico de amaranto como fuente de péptidos antioxidantes: estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis doctoral.
- Gatehouse, J. A., Lycett, W., Croy, R. R. D., Boulter, D. (1982). The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L). *Biochemical Journal*, 207: 629–632.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Boulter, D. (1980). Isoelectric focusing properties and carbohydrate content of pea (*Pisum sativum*) legumin. *Biochemistry Journal*, 185: 497–503

- Gonzalez-Donquiles, C., Alonso-Molero, J., Fernández-Villa, T., Vilorio-Marqués, L., Molina, A. J., Martín, V. (2017). The NRF2 transcription factor plays a dual role in colorectal cancer: A systematic review. *Plos One*, 12(5), e0177549.
- Goya, L., Martín, M. Á., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L. (2009). A cell culture model for the assessment of the chemopreventive potential of dietary compounds. *Current Nutrition & Food Science*, 5, 56–64
- Gupta, R., Dhillon, S. (1993). Characterization of seed storage proteins of Lentil (*Lens culinaris* M.). *Annals of Biology*, 9: 71–78.
- Gur J., Mawuntu M., Martirosyan D. (2018). FFC's advancement of functional food definition. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(7), 385-397. doi.org/10.31989/ffhd.v8i7.531.
- Haber, F. Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society of London*, 147: 332-351.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, 9(1), 1-32.
- Han, I. H., Swanson, B. G., & Baik, B. K. (2007). Protein digestibility of selected legumes treated with ultrasound and high hydrostatic pressure during soaking. *Cereal Chemistry*, 84(5): 518–521.
- Hansch, C., Leo, A. (1995). Exploring QSAR: fundamentals and application in chemistry and biology. American Chemical Society, Washington DC.
- Horubała, A. (1999). Antioxidant capacity and their changes in fruit and vegetables processing. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 3: 30-31.
- Howlet, J. (2008). Functional foods. From science to health and claims. ILSI Europe Concise Monograph Series. www.researchgate.net/profile/Entedhar-Sarhat/post/Is-there-any-list-of-whole-natural-unprocessed-functional-foods/attachment/5ac60d5f4cde260d15d6f551/AS%3A612022702055429%401522928991081/download/Functional-Foods.pdf.
- Huang, Y. J., Nan, G. X. (2019). Oxidative stress-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 9–12.
- Huerta Jiménez, M., Ortega, Cerrilla, M. E., Cobos, Peralta, M., Herrera Haro, J. G., Díaz-Cruz, A., Guinzberg Perrusquia, R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Asociación Interciencia*. Caracas, Venezuela, 30 (12): 728- 734.

- Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Senoráns, F. J., Cavero s. Reglero G. (2000). Combined use of supercritical fluid extraction micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48(9), 4060-4065.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.
- Irshad, M., Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233–1239.
- Jakubczyk, A., & Baraniak, B. (2014). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after in vitro hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) globulins. *BioMed Research International*, 2014.
- Kanti Das, T., Wati, M. R., Fatima-Shad, K. (2014). Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. *Archives of Neuroscience*, 2(3). doi.org/10.5812/archneurosci.20078.
- Ketnawa, S., Reginio Jr, F. C., Thuengtung, S., Ogawa, Y. (2022). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity of plant-based foods by gastrointestinal digestion: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(17), 4684-4705.
- King, R., Hirst, J. & Sternberg, M. (1993). New approaches to QSAR: neural networks and machine learning. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1: 279–290.
- Kinsella, J. E. (1982). Relationship between structural and functional properties of food protein. En: P. F. Fox & J. J. Condon (Eds.), *Food proteins* (pp. 51–60). London: Applied Science Publishers.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicological Pathology* 30(6): 620–50.
- Koyoro, H., Powers J. R. (1987). Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chemistry* 64: 97–101.
- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutrition Journal*, 15(1), 1–22. doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5.

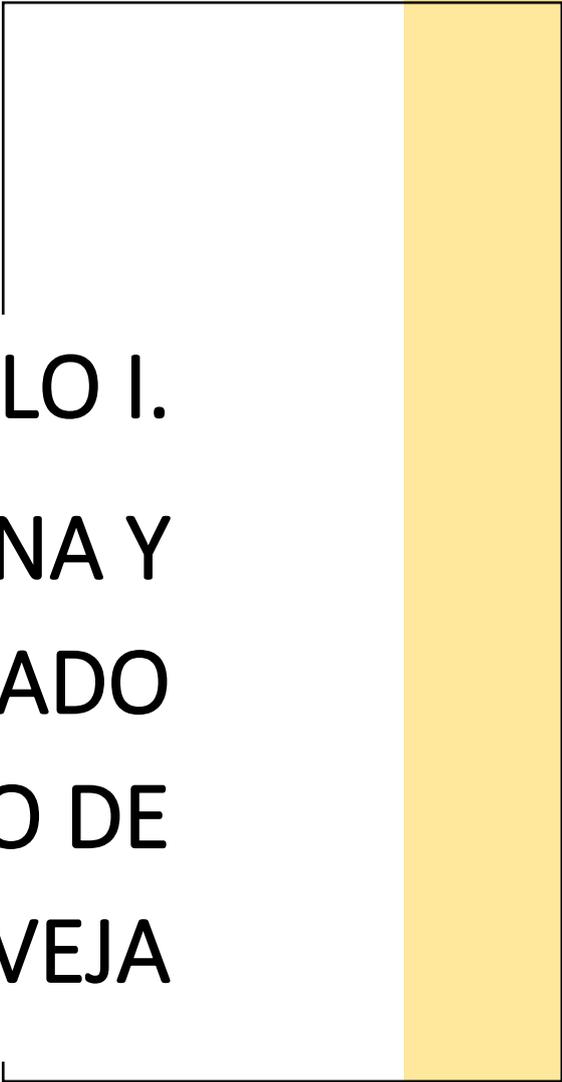
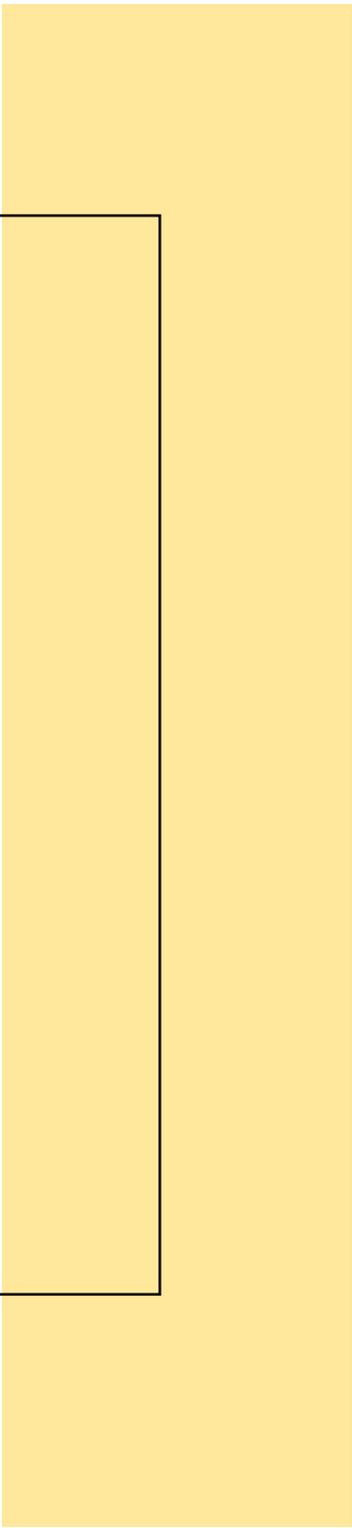
- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., Romero, A. (2015). Pea, chickpea and lentil protein isolates: Physicochemical characterization and emulsifying properties. *Food Biophysics*. doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6.
- Lei, X. G., Zhu, J. H., Cheng, W. H., Bao, Y., Ho, Y. S., Reddi, A. R., ... Arnér, E. S. J. (2016). Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307–364. doi.org/10.1152/physrev.00010.2014.
- Li, Y.W.; Li, B. (2013) Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology* 318, 29–43.
- Lindberg Madsen, H., Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 271-278
- Liu Y., Ragaei S., Marcone M. F., Abdel-Aal E. S. M. (2020). Composition of phenolic acids and antioxidant properties of selected pulses cooked with different heating conditions. *Foods* 9(7), 908. doi.org/10.3390/foods9070908.
- Liu, R. H., Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4311–4314.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- López, A. (1996). Modificación de la LDL humana por el ion cúprico: Efecto de algunos antioxidantes. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 2 (1):5-24.
- López-Alarcón, C., Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10.
- López-Barríos, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bioactive Peptides and Hydrolysates from Pulses and Their Potential Use as Functional Ingredients. *Journal of Food Science*, 79 (3): 273-283
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez Álvarez, J. A., Fernández-López, J. (2018). Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 256, 252–258.
- Lv, Q. Z., Long, J. T., Gong, Z. F., Nong, K. Y., Liang, X. M., Qin, T., Huang, W., Yang, L. (2021). Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of

- polyphenolic compounds. *Natural Product Communications*. 16. 1934578X2110277. doi:10.1177/1934578X211027745.
- Marín, L., Miguélez, E., Villar, C., Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 905215. doi.org/10.1155/2015/905215
- Marquez, U. M. L., Lajolo, F. M. (1990). Nutritional value of cooked beans *Phaseolus vulgaris* and their isolated major protein fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53: 235–242.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577–586. doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 581-587.
- Motilva, M.-J., Serra, A., Rubió, L. (2015). Nutrikinetic studies of food bioactive compounds: from in vitro to in vivo approaches. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(sup1), S41–S52. doi.org/10.3109/09637486.2015.1025721.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503–515.
- Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12761. doi.org/10.1111/jfbc.12761.
- O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J. S. (2004). Characterization of pea vicilin: 1. Denoting convicilin as the a-subunit of the *Pisum* vicilin family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3141–3148.
- Orsini Delgado, M. C., Tironi, V. A., Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology*, 44, 1752-1760.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins* (2° ed.). London: Longmans Green and Co

- Peña-Ramos, E., Xiong, Y., Arteaga, G. (2004). Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyses whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1908-1918.
- Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2020). Bioactive peptides and dietary polyphenols: Two sides of the same coin. *Molecules*, 25(15), 3443. doi.org/10.3390/molecules25153443.
- Philanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1313.
- Rao, R., Costa, A., Croy, R. R. D., Boulter, D., Gatehouse, J. A. (1989). Variation in polypeptides of the major albumin protein of pea (*Pisum sativum* L.): Inheritance and molecular analysis. *Molecular and General Genetics MGG*, 219: 277-281.
- Roy, F., Boye, J.I., Simpson, B.K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43: 432–442.
- Rutherford-Markwick, K. J., Moughan, P. J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955–966.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86(1), 99-103.
- Santo, A., Zhu, H., Li, Y. R. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*. doi.org/10.20455/ros.2016.847.
- Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants: An overview. En: *Natural Antioxidants*, cap. 1, ed. Shahidi F., AOCS Press, Illinois, USA.
- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Anti-oxidants*, Academic Press, London.
- Simic, M. (1988). Mechanisms of inhibitions of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 202, 366-386.
- Singh, U., Jambunathan, R. (1982). Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 31, 347–354.
- Swanson, B. G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 276–280.

- Taha, R., Seidman, E., Mailhot, G., Boudreau, F., Gendron, F. P., Beaulieu, J. F., Ménard, D., Delvin, E., Amre, D., Levy, E. (2010). Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 Cell Line. *PLoS ONE*, 5(7).
- Temple, N. J. (2022). A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers Nutrition*, 29(9), 957516. doi.org/10.3389/fnut.2022.957516.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E. Di, Testai, E., & Stamatii, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro*, 25(1), 13–20.
- Vacek, J., Ulrichová, J., Klejdus, B., & Simánek, V. (2010). Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples. *Analytical Methods*, 2, 604–613.
- Vaz Patta, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H-J., Martín-Cabrejas, M. A., Domoney, C. (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105–143
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2005). Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests. *Journal of the Science of Food & Agriculture* 85, 399–405
- Vidal-Valverde, C.; Frias, J.; Valverde, S. (1992). Effect of processing on the soluble carbohydrate content of lentils. *Journal of Food Proteins* 55, 301-304.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. (2006). Bioactive Peptides in Storage Plant Proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 99-102.
- Wang, W. Y., De Mejia, E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78.
- Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., Jiang, Y. M. (2006). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101(4), 1658-1663.
- Wei, Y. H., Lee H. C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 671-682.
- Wijeratne, S. S. K., & Cuppett, S. L. (2006). Hydrogen hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4476–4481.

- Yamashita, S., Tanaka, Y., Endoh, Y., Taki, Y., Sakane, T., Nadai, T., & Sezaki, H. (1997). Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer.pdf. *Pharmaceutical Research*, 14, 486–491.
- Yihong, Q., Yisheng, C., Zhang, G. (2009). Developing solid oral dosage forms. *Pharmaceutical theory and practice* (Elsevier I). USA
- Zhang, T., Li, Y., Miao, M., Jiang, B. (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 128, 28-33.
- Zhao, D., Liu, X. (2023). Purification, identification and evaluation of antioxidant peptides from pea protein hydrolysates. *Molecules*, 28(7), 2952.
- Zhao T, Su W, Qin Y, Wang L, Kang Y (2020). Phenotypic diversity of pea (*Pisum sativum* L) varieties and the polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of their seeds. *Ciência Rural* 50:e20190196. doi.org/10.1590/0103-8478cr20190196.
- Zhao, Y., Wu Y., Wang, M. (2015). Bioactive substances of plant origin. En: *Handbook of food chemistry*, ed. P. C. K. Cheung and B. M. Mehta, 967–1008. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W., Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 21(1), 1–14. doi.org/10.3390/molecules21010072.
- Zulet, M. A., Martínez, J. A. (2001). Dieta mediterránea: legumbres y colesterolemia. *Revista Chilena de Nutrición*, 28, 312-320.



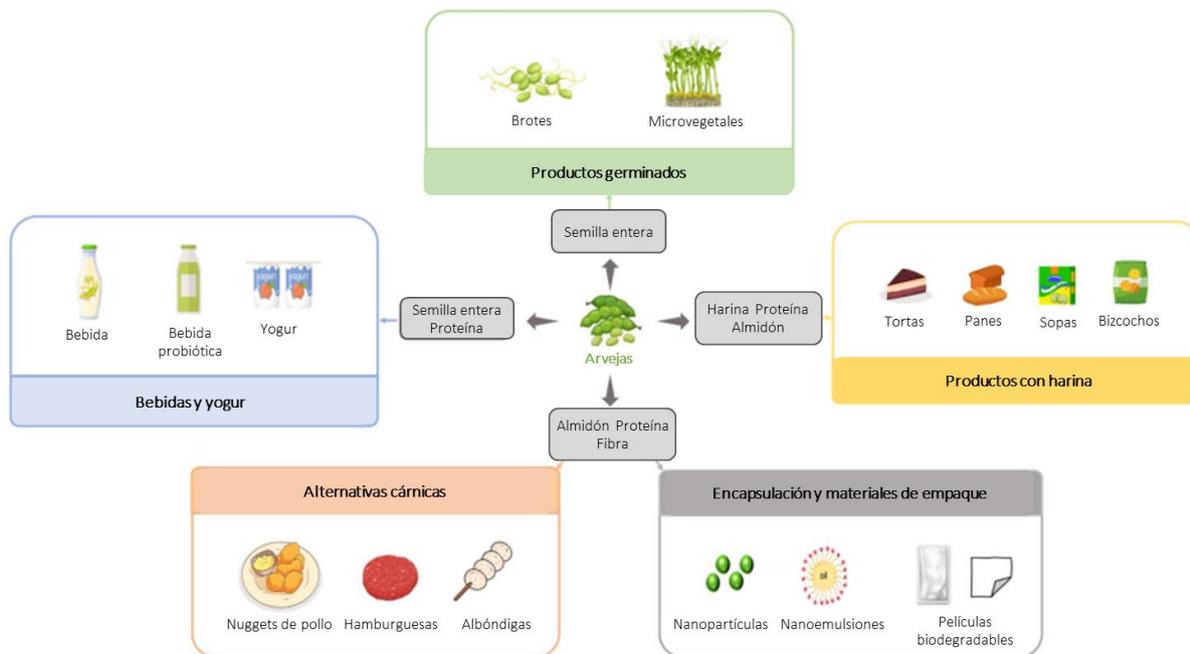
**CAPÍTULO I.
HARINA Y
AISLADO
PROTEICO DE
ARVEJA**

INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

Como se mencionó en la *Introducción general*, las arvejas tienen varios beneficios relevantes que alientan su incorporación en las dietas. Entre ellos puede mencionarse que son libres de gluten, no constituyen alérgenos comunes y no están genéticamente modificadas. Además, son excelente fuente de componentes que ayudan a fortificar los productos incrementando su valor nutricional. Son fuente de proteínas de alta calidad nutricional (entre 18 a 26 % p/p; Boye et al., 2010) principalmente albúminas y globulinas y en menor medida prolaminas y glutelinas. La arveja contiene altos niveles de lisina, un aminoácido cuyo contenido es bajo en los granos de cereales. Por esto, puede complementar las proteínas presentes en cereales y alimentos procesados producidos en base a granos de cereales. También aportan carbohidratos complejos y fibra dietaria (entre 14 y 17 %) (Vidal-Valverde et al., 2002; Martín-Cabrejas et al., 2003; Almeida et al., 2006); este contenido está significativamente afectado por factores genotípicos y ambientales (ubicación de cultivo y año de cosecha) (Stoughton-Ens et al., 2010).

La arveja tiene un gran potencial de aprovechamiento, ya que además de utilizar el grano entero se puede obtener a partir de éste otros ingredientes como harinas y fraccionados (almidón, fibra, concentrados y aislados proteicos). La harina de arveja no solo es relevante como una fuente proteica vegetal sino que también es valorada por sus particulares propiedades funcionales. El uso de proteínas vegetales como ingredientes funcionales en la industria alimenticia está creciendo y se ha dado especial atención al uso de esta semilla que forma parte de la dieta humana en todo el mundo (Oelke et al., 1991). Las arvejas se procesan para obtener diversos productos, como productos germinados, masas con harina de arvejas, bebidas, alternativas cárnicas y materiales de encapsulación y embalaje. En conjunto, la arveja puede constituir ingredientes funcionales para diversas aplicaciones en el sistema alimentario (**Esquema I.1**; Wu et al., 2023).



Esquema I.1. Aplicaciones alimentarias de la arveja y sus productos (Wu et al., 2023).

Para la extracción y concentración de proteínas vegetales, existen diferentes metodologías. Éstas pueden ser agrupados en dos categorías: secas y húmedas. Ambos tipos de procesos comienzan con la semilla entera. Cuando se requieren fracciones con altos contenidos proteicos se hace necesario usar un proceso húmedo, de los cuales el más común es la *precipitación isoeléctrica* con diversas opciones para la extracción de proteínas (alcalina, ácida, con sales). Otras posibilidades son: el empleo de membranas de ultrafiltración, utilizado a escala industrial por su capacidad de alcanzar altas concentraciones de solutos en grandes volúmenes con mínimo gasto de energía, y la extracción líquido-líquido utilizando micelas reversas formadas a partir de moléculas surfactantes en un solvente no polar rodeando un núcleo interno acuoso, el cual es capaz de extraer proteínas con poca desnaturalización dado que las mismas se solubilizan en el núcleo acuoso (Tom, 2008; Nishiki et al., 1993). Los procesos húmedos extractivos presentan algunas desventajas. Por un lado, utilizan sustancias químicas, grandes cantidades de agua y de energía, y generan grandes cantidades de efluentes conteniendo materia orgánica. Además, la conformación de las proteínas nativas se pierde en algún grado, lo que podría afectar sus propiedades funcionales, y las proteínas insolubles no son recuperadas, lo cual genera una pérdida de rendimiento y de funcionalidad (Pelgrom et al., 2013). Nawaz et al. (2022) indicaron que se observó una mayor solubilidad para los aislados de proteína de arveja cuando la extracción se logró mediante el método de precipitación isoeléctrica en comparación con los métodos de extracción con sales y ultrafiltración.

En el presente trabajo, luego del desgrasado de la harina, se preparó aislado proteico por solubilización alcalina y posterior precipitación isoeléctrica, dado que este es el método más comúnmente utilizado a escala de laboratorio. La técnica aprovecha la solubilidad de las proteínas de legumbres que es alta a pH alcalino y baja a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico (pH 4-5) (Boye et al., 2010). Perfiles de solubilidad de proteínas de leguminosas en función del pH muestran valores mínimos para pH entre 4 y 6, correspondiente a la región del punto isoeléctrico a la que las interacciones proteína-proteína desfavorecen la solubilidad en comparación con los otros niveles de pH estudiados. La solubilidad aumenta gradualmente por debajo de pH = 4 y por encima de pH = 6 para alcanzar el máximo a valores de pH alcalinos altos (pH \approx 9) y a valores bajos de pH ácido (pH \approx 2). En general, a valores de pH altos, la alta carga negativa neta en la proteína disocia los agregados de proteínas y la solubilidad puede aumentar, mientras que, a valores de pH bajos, la carga positiva neta contribuye a la solubilidad (Yin et al., 2011).

La arveja se presenta como una fuente de diversos componentes potencialmente bioactivos. Las dietas ricas en arvejas secas han demostrado tener beneficios en la salud relacionados con regulación de la glucemia, modulación de la función intestinal, disminución del colesterol y efectos antioxidantes, y su consumo regular ha sido asociado con la prevención de enfermedades crónicas tales como cáncer de colon y la *diabetes mellitus* tipo 2, lo que ha sido atribuido a componentes tales como fibra soluble e insoluble, almidón de baja digestibilidad, oligosacáridos prebióticos y componentes polifenólicos (Vaz Patto et al., 2015, Frattianni et al., 2014). También las proteínas y péptidos de legumbres han demostrado ejercer actividades biológicas tales como antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria, hipocolesterolemica (Shanthakumar et al., 2022). Por ejemplo, mediante el uso de diversas proteasas y condiciones de proteólisis, se ha descrito actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), actividad antioxidante, actividad antitumoral, entre otras, para péptidos liberados de proteínas de leguminosas (López-Barrios et al., 2014). En este sentido, se ha informado que la proteína de arveja no hidrolizada no mostró actividad inhibidora de la ACE, pero esta actividad se observó después de la digestión gastrointestinal *in vitro* (Barbana y Boye, 2010; Jakubczyk & Baraniak, 2014).

Existen algunos antecedentes de estudios de actividad antioxidante de péptidos de arvejas, en los que la hidrólisis enzimática y la simulación de la digestión gastrointestinal generan

hidrolizados de proteína de arvejas con actividades antioxidantes. Pownal et al. (2010) informaron sobre la capacidad antioxidante de un hidrolizado de proteínas de arvejas obtenido utilizando termolisina y observaron la presencia de péptidos con peso molecular (PM) < 3 kDa. En un estudio más reciente, Wang et al. (2022) utilizaron diferentes enzimas, incluidas alcalasa, quimotripsina, flavorzima, pancreatina, pepsina y tripsina, separaron fracciones de péptidos de PM < 1, 1–3, 3–5 y 5–10 kDa, y compararon su capacidad de eliminación de radicales libres. Encontraron que los hidrolizados obtenidos mediante el uso de alcalasa, flavorzima y pepsina tenían una mayor capacidad de eliminación de radicales que los demás, y que los péptidos con un PM más pequeño generalmente tenían una mayor potencia antioxidante. La actividad antioxidante del hidrolizado de proteína de arvejas producido con una proteasa alcalina se demostró mediante la neutralización de radicales OH[•]; la protección de una línea celular de músculo esquelético de ratón (C2C12) contra el daño oxidativo inducido por H₂O₂ y la evaluación *in silico* de la actividad de péptidos identificados en el hidrolizado (Wang et al., 2022).

Otros compuestos de interés que se encuentran presentes en la semilla de arvejas son los compuestos fenólicos (CF). La cantidad y calidad de los CF presentes en arvejas son influenciadas por factores genéticos, geográficos (composición del suelo, condiciones de crecimiento), grado de maduración y condiciones climáticas y ambientales (Vaz-Patto et al., 2015). Además, el procesamiento de alimentos puede inducir cambios significativos en la composición química y la cantidad de compuestos bioactivos de origen vegetal de maneras diversas; dependiendo del método aplicado, el procesamiento podría afectar los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante del producto final (Coelho et al., 2018). Estos factores junto con las condiciones analíticas de extracción y cuantificación hacen que se encuentren en la literatura una gran variedad de resultados. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos protegen el cuerpo humano del daño por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que está asociado con muchas enfermedades. Sin embargo, se deben tener en cuenta varios aspectos cuando se evalúa la funcionalidad biológica de las matrices/ingredientes alimentarios que contienen CF: su frecuentemente baja estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, las modificaciones durante la digestión (por pH y enzimas) y las interacciones con otros componentes de los alimentos. La biodisponibilidad de los CF depende en gran medida de sus estructuras y solo una parte de los CF ingeridos está

biodisponible después de la administración oral. Algunos CF necesitan someterse a hidrólisis y ser metabolizadas a través del ambiente del estómago/intestino y/o por la microbiota del tracto digestivo antes de su absorción. El proceso de digestión puede cambiar la estructura de los CF y, en consecuencia, su actividad antioxidante (Di Lorenzo et al., 2021).

Como ya ha sido mencionado, la bioaccesibilidad y bioactividad de los diversos componentes son afectadas por los procesos de digestión gastrointestinal, la complejidad de la matriz y procesos previos. En estudios preliminares al presente trabajo de tesis, fueron analizadas dos variedades de arvejas amarillas (yams y navarro) y se evaluó ese efecto tanto en las harinas como en los aislados proteicos para la obtención de péptidos con potencial actividad antioxidante. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias sustanciales entre las variedades en la composición molecular de las harinas y los aislados proteicos, antes y después de la digestión gastrointestinal simulada. El grado de proteólisis alcanzado durante la digestión gastrointestinal fue independiente de la variedad de arveja y del ingrediente de partida (harina o aislado proteico). La digestión gastrointestinal incrementó la capacidad de captación de radicales peroxilo (ensayo ORAC) en todos los casos y la capacidad de inhibir la formación de radicales hidroxilo en el caso de los aislados pero no de las harinas. Estos hechos podrían estar asociados con algunas diferencias en la composición molecular registrada entre los digeridos de harina y aislados proteicos. Las diferencias en los perfiles peptídicos podrían estar relacionadas con la presencia de otros componentes no proteicos y/o el estado inicial de las proteínas que podrían afectar el ataque proteolítico de las enzimas digestivas. Estos resultados posicionaron a las harinas y los aislados proteicos de ambas variedades de arvejas como ingredientes funcionales promisorios con propiedades antioxidantes (Cipollone, 2018).

OBJETIVOS

I.2.Objetivos

El objetivo general de este capítulo consistió en evaluar la potencialidad de harina y aislado proteico de arvejas amarillas como ingredientes antioxidantes.

A fin de lograr este objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos:

- I. Obtener harina y aislado proteico a partir de semillas de arvejas amarillas. Caracterizar fisicoquímicamente dichos ingredientes.
- II. Aplicar a los ingredientes un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Caracterizar los digeridos obtenidos. Evaluar la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos analizando los efectos del proceso de digestión gastrointestinal simulada y de absorción intestinal simulada.
- III. Evaluar la potencial actividad antioxidante *in vitro* y mediante ensayos celulares de los digeridos gastrointestinales y fracciones obtenidas a partir de ellos, haciendo foco en péptidos y compuestos fenólicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.3. Materiales y Métodos

I.3.1. Preparación y caracterización de ingredientes: harina y aislado proteico

I.3.1.1 Preparación de la harina (H)

Se usaron arvejas amarillas (*Pisum sativum*) de la variedad yams cultivadas en la provincia de Buenos Aires (Argentina). H fue obtenida por molienda de la semilla entera en un molino Udy de laboratorio usando una malla de 1 mm, y fue almacenada a 4 °C.

I.3.1.2 Preparación del aislado proteico (A)

Se desgrasó H mediante extracción con n-hexano: se preparó una suspensión de harina (10 % p/v) en el solvente y se la mantuvo en agitación *overnight*. Luego se filtró y se eliminaron restos del solvente por evaporación a temperatura ambiente.

Para obtener A (*Esquema I.1*), se preparó una suspensión (10 % p/v) de H desgrasada en agua MilliQ. Se llevó el pH a 9,5 con NaOH 1 N y se agitó durante 40 min a temperatura ambiente para lograr la extracción de las proteínas. Luego se realizó una precipitación isoeléctrica de las mismas llevando el pH = 4,5 con HCl 2 N. El pellet fue resuspendido en agua, neutralizado a pH = 7,0 y finalmente liofilizado (Makri et al., 2005; Qayyum et al., 2012; Cipollone, 2018).



Esquema I.2. Preparación de aislado proteico A

I.3.1.3 Composición centesimal

Se determinó la composición de H y A mediante los siguientes métodos:

- **Humedad:** secado a 105 °C hasta peso constante (AOAC, 1990).
- **Proteínas:** se utilizó el método de microKjeldahl (Allen, 1931) seguido del método colorimétrico de Berthelot modificado para determinar el contenido de nitrógeno en el

digerido (Tabbaco et al., 1979). Para ello, se tomaron muestras de manera tal que contuvieran aproximadamente 5 mg de proteínas, se colocaron en balones con 1 g de catalizador ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$ 10/1 p/p) y 5 ml de H_2SO_4 concentrado (98 % p/p), y se digirieron por calentamiento hasta que la mezcla adquirió un color verde translúcido. La solución resultante se llevó a un volumen final de 50 ml con agua destilada para luego realizar la reacción colorimétrica. El nitrógeno fue determinado directamente en el digerido por el desarrollo de una coloración azul verdosa debida a la formación de un complejo fenol-indofenol por reacción con soluciones de fenol alcalino, hipoclorito y nitroprusiato de sodio. Para la reacción colorimétrica se tomaron 250 μl de las muestras diluidas (80 μl de muestra, 170 μl de agua destilada) y se mezclaron con 750 μl de solución A+B (50:50) (A: Na_2HPO_4 0,2 M, NaOH 0,2 M y tartrato de sodio y potasio 10 % p/v; B: NaOH 2,5 M), 200 μl de solución N-S (Nitroprusiato-Salicilato: 20 % p/v salicilato de sodio, 0,03 % p/v nitroprusiato de sodio) y 100 μl de hipoclorito de sodio conteniendo 5 % de cloro activo. Se agitaron durante 20 min a temperatura ambiente y luego se tomaron 125 μl de dicha mezcla de reacción a los que se adicionaron 125 μl de agua destilada y se les midió la absorbancia a 660 nm. Para calcular el contenido de proteínas el factor utilizado fue $f = 5,6 \text{ g proteína/g de N}$ (Gueguen y Barbot, 1988).

- **Lípidos:** método de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente de extracción (AOAC, 1990).

- **Cenizas:** calcinación en mufla a 550 °C (AOAC, 1990).

- **Hidratos de carbono:** hidrólisis con HCl 1,3 M, 2 h a reflujo, filtración, neutralización y determinación de azúcares mediante el método colorimétrico de Antrona, utilizando glucosa como patrón (Southgate, 1976).

- **Fibra:** La determinación se realizó empleando el kit Megazyme (K-TDFR-100A/K-TDFR-200A 04/17) usando protocolos basados en los métodos AACC 32-05.01 y AOAC 985.29 (Prosky et al., 1985; Prosky et al., 1988). La fibra dietética total (FDT) se determinó en muestras duplicadas de material seco. Las muestras secas (1 g) se sometieron a digestión enzimática secuencial (Digestor Enzimático Velp GDE, Italia) mediante α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa termoestables. Se trataron a ~ 100 °C con α -amilasa termoestable para dar gelatinización, hidrólisis y despolimerización del almidón; se incubaron a 60 °C con proteasa (para solubilizar e hidrolizar proteínas) y amiloglucosidasa (para hidrolizar fragmentos de almidón a glucosa). Luego se trató con cuatro volúmenes de etanol para precipitar la fibra soluble. El residuo se

filtró (Extractor de fibra dietaria VELD CSF-6, Italia); se lavó con etanol al 78 %, etanol al 95 % y acetona; se secó; y se pesó. Un duplicado del residuo se analizó mediante la técnica de Kjeldahl para determinar proteína y el otro se calcinó a 525 °C para determinar las cenizas. La FDT es el peso del residuo filtrado y seco menos el peso de la proteína y la ceniza (*Ecuación 1.1*).

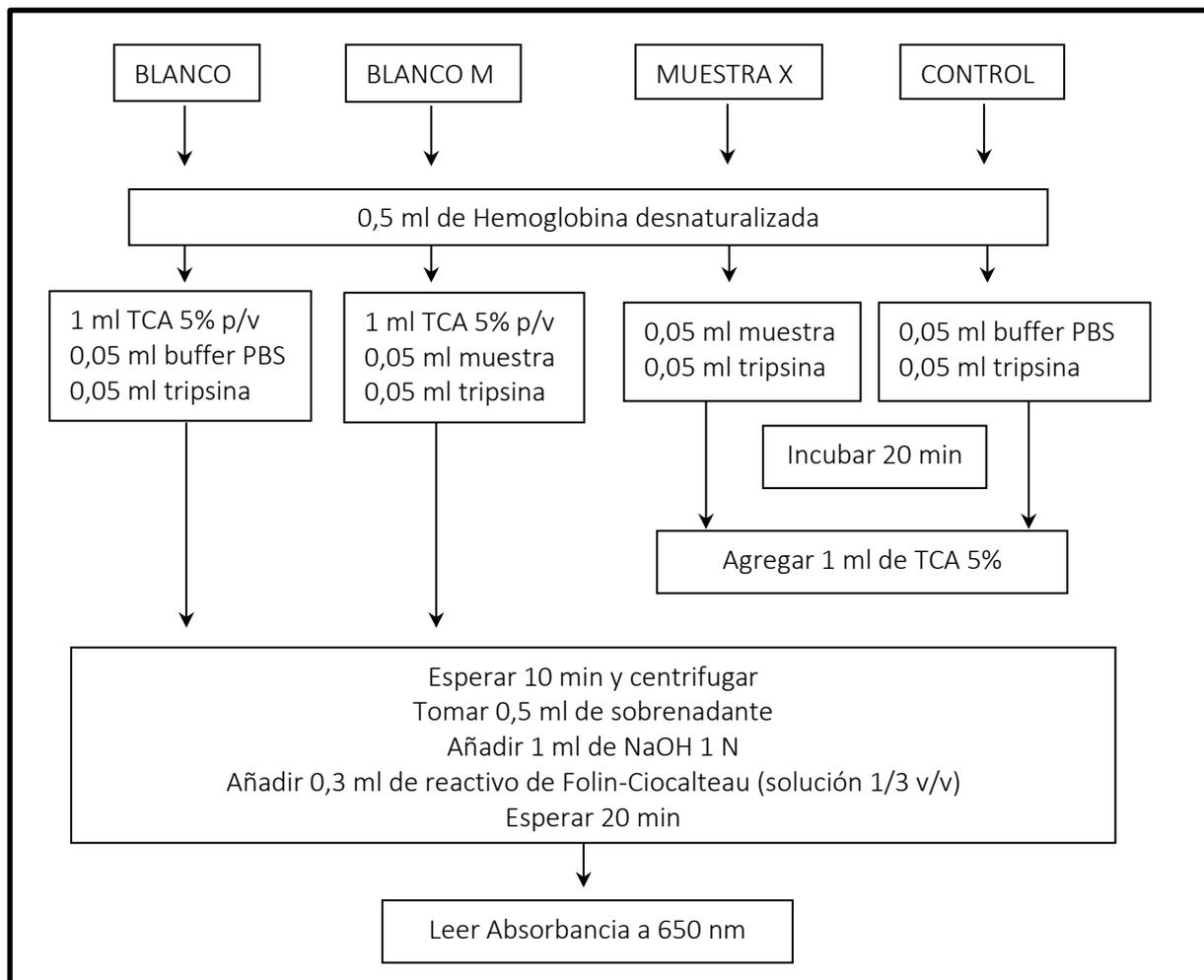
$$\mathbf{FDT} = \frac{(\mathbf{Rs} - \mathbf{Pr} - \mathbf{Cr}) \times 100}{\mathbf{M}} \quad (\mathbf{Ec. 1.1})$$

donde: FDT: fibra dietética total; M: g de muestra inicial; Rs: g residuo seco promedio; Pr: g proteína residual; Cr: g ceniza residual.

1.3.1.4 Determinación del factor antitriptico.

Tratamiento térmico de las semillas: Las semillas fueron puestas en remojo (relación 1:5 de semillas en agua) durante 5 h, luego se llevaron a hervor por 30 min, se colaron y finalmente, se dejaron en estufa a 54 °C overnight (Kattab y Artnfield, 2009). A partir de las semillas tratadas térmicamente se prepararon harinas como se indicó en el inciso 1.3.1.1.

Se evaluó la actividad antitriptica de las harinas (con y sin tratamiento térmico) y del aislado proteico mediante la determinación de aminoácidos aromáticos (método de Hull) presentes en la fracción soluble ácido tricloroacético (TCA-soluble) obtenida a partir de una mezcla de reacción conteniendo hemoglobina desnaturalizada como sustrato de la enzima tripsina. Para ello, se prepararon dispersiones (10 % p/v) de las muestras en buffer fosfato salino (PBS: KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH = 7,4), se mantuvieron a 4 °C *overnight* y se centrifugaron a 21380×g durante 25 min. Se recogió el sobrenadante. Luego se prosiguió como indica el ***Esquema 1.2*** para realizar el ensayo de actividad antitriptica (Manassero et al., 2016), utilizando una solución 0,2 mg/ml de tripsina porcina (1350 UE/ml, Sigma, St Louis, USA). A partir de las lecturas de absorbancia obtenidas, se calculó el % de actividad antitriptica (AA) de cada muestra considerando que el sistema control presentaba el 100 % de actividad de tripsina, y el % inhibición de la tripsina como 100 – AA.



Esquema 1.3. Determinación del factor antitriptico

1.3.2 Digestión gastrointestinal simulada (DGIS).

1.3.2.1. Método estandarizado de digestión estática *in vitro*

Este método de digestión simulada *in vitro* incluye las fases oral, gástrica e intestinal, tratando de imitar condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión, y las concentraciones de sal, entre otros factores.

Protocolo 1. En una primera instancia, las digestiones se realizaron en tubo aplicando el protocolo consenso de INFOGEST (Minekus et al., 2014) modificado (se modificaron las enzimas y sus actividades enzimáticas según protocolos anteriormente utilizados en nuestro laboratorio) (*Esquema 1.3*).

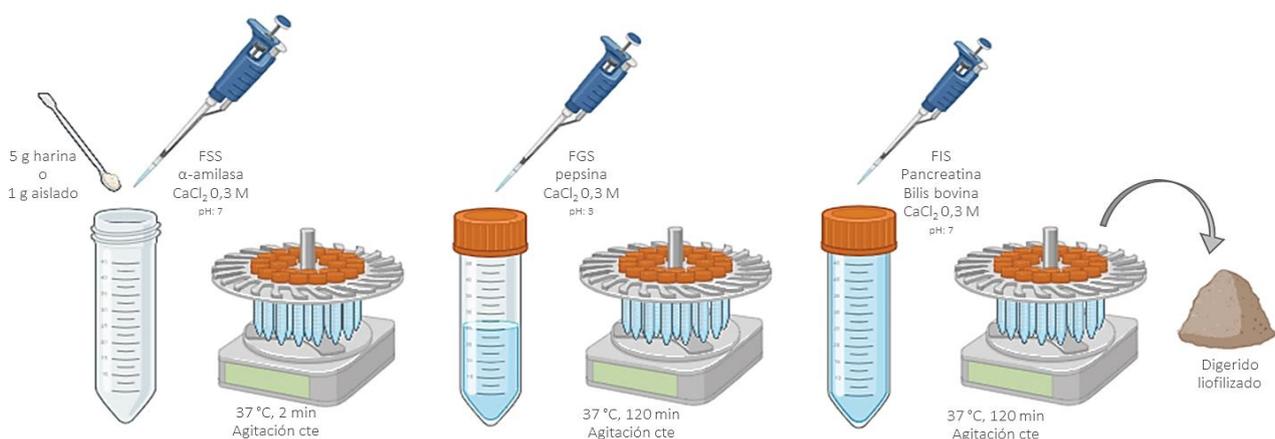
Fase Oral: 5 g de **H** o 1 g de **A** fueron mezcladas con fluido salival simulado (FSS, compuesto por KCl 0,5 M, KH₂PO₄ 0,5 M, NaHCO₃ 1 M, MgCl₂ 0,15 M, y NH₄HCO₃ 0,61 M; pH = 7), α-amilasa

(Sigma 100-70 (57,4 U/mg)), (26 mg/ml en FSS, CaCl_2 0,3 M) y se incubaron con agitación durante 2 min a 37 °C.

Fase Gástrica: se agregó fluido gástrico simulado (FGS, compuesto por KCl 0,5 M, KH_2PO_4 0,5 M, NaHCO_3 1 M, NaCl 2 M, MgCl_2 0,15 M, y NH_4HCO_3 0,61 M; pH = 3), pepsina (1:15000 5X NF standards MP Biomedicals inc. (≥ 400 U/mg)), (47,8 mg/ml en FGS) y CaCl_2 (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37 °C.

Fase Intestinal: se agregó fluido intestinal simulado (FIS, compuesto por KCl 0,5 M, KH_2PO_4 0,5 M, NaHCO_3 1 M, NaCl 2 M y MgCl_2 0,15 M; pH = 7), pancreatina (MP Biomedicals inc. (4X USP Grade)) (15,3 mg/ml en FIS), bilis (150 mg/ml Bilis Fluka B3883), CaCl_2 (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37 °C. Finalmente se inactivaron las enzimas calentando 10 min a 85 °C.

Las muestras digeridas (**HD₁** y **AD₁**) fueron liofilizadas.



Esquema I.4. Proceso de digestión gastrointestinal simulada realizada en tubo falcon

Protocolo 2. Digestión en reactor. A fin de mejorar el proceso de DGIS, se realizó el protocolo consensuado de Minekus et al. (2014) en un bioreactor termostatzado (camisa de vidrio conectada a un baño de agua LAUDA RMT6 que permitió la recirculación de agua termostatzada a 37 °C) y agitado (agitador vertical Dlab OS20-PRO20L, 90 rpm fases oral y gástrica, 100 rpm fase intestinal) (**Imagen I.1**). En este caso, las enzimas utilizadas (SIGMA Chemical, St. Louis, MO, USA) y sus actividades fueron las recomendadas por Minekus et al. (2014).

Fase Oral: las muestras (50 g de **H**, 10 g de **A**) fueron homogeneizadas con 35 ml de la solución de electrolitos “fluido salival simulado” (FSS, pH = 7), 5 ml de una solución de α -amilasa en FSS

(26 mg/ml), 250 μ l CaCl_2 0,3 M y 9,75 ml H_2O (todos los reactivos fueron preincubados a 37 °C). La mezcla fue agitada e incubada 2 min a 37 °C.

Fase Gástrica: la solución proveniente de la fase oral fue mezclada con 75 ml de solución electrolítica “fluído gástrico simulado” (FGS, pH = 3), 16 ml de solución de pepsina (25000 Anson U/ml en FGS) y 50 μ l CaCl_2 0,3 M, ajustando el valor de pH a 3 con HCl 2 N y completando con H_2O hasta los 100 ml de volumen agregado. La mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C.

Fase Intestinal: la solución gástrica (200 ml) fue mezclada con 110 ml de la solución de electrolitos denominada “fluído intestinal simulado” (FIS), 50 ml de solución de pancreatina (800 TAME U/ml en FIS), 25 ml de bilis bovina (150 mg/ml), y 400 μ l CaCl_2 0,3 M, ajustando el pH a 7 con NaOH 1 N y agregando H_2O hasta 200 ml finales de fase intestinal. La mezcla fue incubada 2 h a 37 °C. Finalmente, las actividades de las enzimas fueron inactivadas mediante una incubación a 85 °C por 10 min.

Las muestras digeridas (**HD₂** y **AD₂**) fueron liofilizadas.

Las soluciones de electrolitos FSS, FGS y FIS fueron preparadas y las actividades de pepsina y pancreatina fueron determinadas de acuerdo con Minekus et al. (2014).

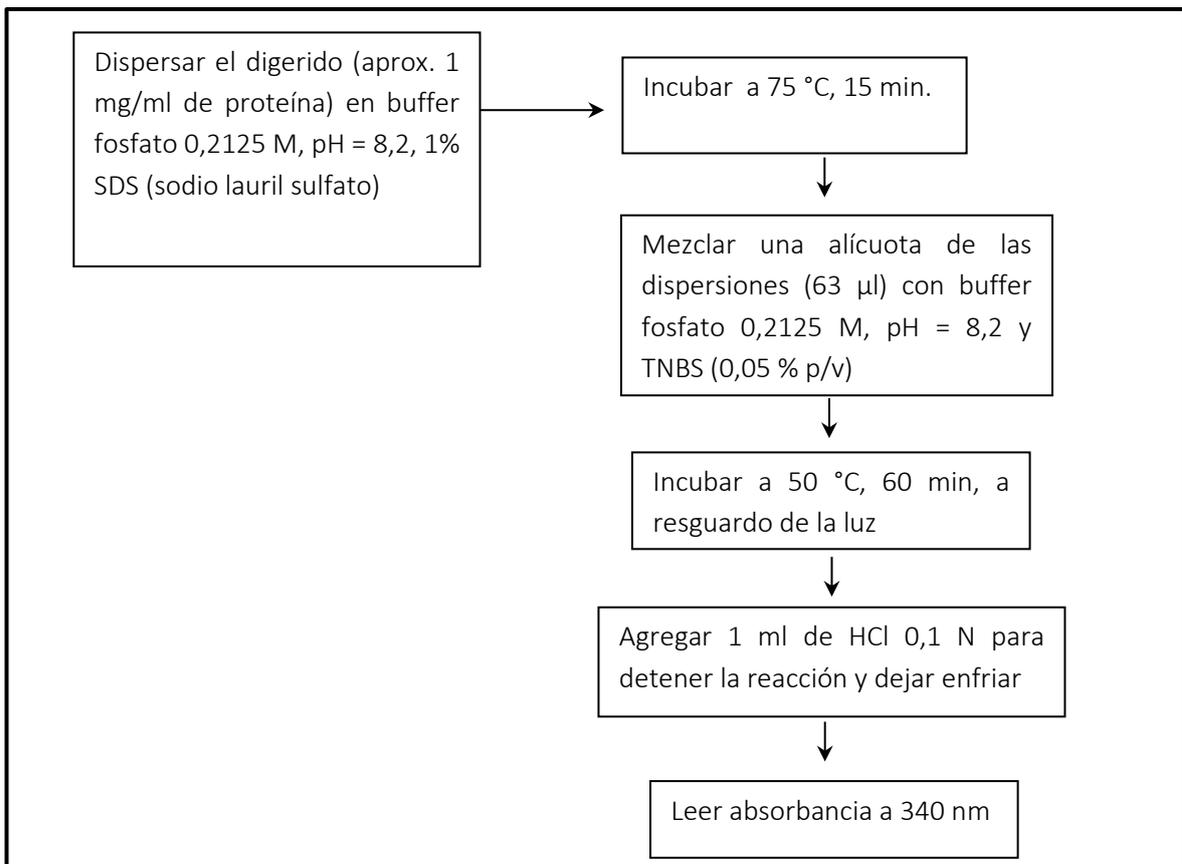


Imagen 1.1. Bio-reactor utilizado para el proceso de DGIS.

En ambos protocolos se realizaron blancos de muestra con todos los fluidos pero sin enzimas (**BM**), y un blanco de reactivos (**BR**, todos los reactivos, reemplazando la muestra por agua).

1.3.2.2 Determinación del grado de hidrólisis proteica

El grado de hidrólisis proteica de los digeridos gastrointestinales se determinó mediante el método del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Adler- Nissen, 1979) a través del cual se mide la concentración de grupos aminos libres. El protocolo se muestra en el **Esquema 1.4**.



Esquema 1.5. Determinación del grado de hidrólisis por el método de TNBS

Se construyó una curva de calibración con concentraciones entre 0,225 y 2,25 mM de L-leucina (ácido L-2-Amino-4-metilpentanoico, Sigma), a partir de una solución 45 mM en buffer fosfato 0,2125 M, 1 % SDS, pH = 8,2 y. Las diluciones para la curva se realizaron utilizando buffer fosfato 0,2125 M, pH 8,2 (el mismo que se usó para las muestras). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado. El grado de hidrólisis se determinó a partir de la *Ecuación 1.2*:

$$GH = \frac{([-NH_2]_h - [-NH_2]_0)}{([-NH_2]_{inf} - [-NH_2]_0)} \times 100 \quad (Ec. 1.2)$$

donde:

$[-NH_2]_h$: concentración de grupos amino libres en la muestra hidrolizada;

$[-NH_2]_o$: concentración de grupos amino libres en la muestra sin hidrolizar;

$[-NH_2]_{inf}$: concentración de grupos amino libres en la muestra hidrolizada completamente, cuyo valor fue obtenido a partir de la *Ecuación 1.3*.

$$[-NH_2]_{inf} = \frac{1}{Maa} \times (1 + fLys) \times C_{prot} \quad (Ec. 1.3)$$

donde:

C_{prot} : concentración de proteínas en la muestra;

Maa = 169,42 g/mol (promedio pesado de los pesos moleculares de los aminoácidos en las proteínas de arveja);

f_{Lys} = 1/17,8 (proporción de lisina en las proteínas de arveja).

Estos valores fueron calculados a partir de datos de composición aminoacídica de arvejas obtenidos de Boye et al. (2010).

1.3.3 Estudio de la fracción proteica

1.3.3.1 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Las muestras fueron dispersadas en buffer muestra 1X (Tris 0,0625 M, SDS 2 %, Glicerol 10 %v/v) de modo tal que contuvieran 3 mg/ml de proteína. Las electroforesis SDS-PAGE se realizaron en un equipo Mini-Protean II (BIO-RAD), utilizando geles de poliacrilamida de separación conteniendo 12 % de acrilamida y de apilamiento con 4 % de acrilamida. Se sembró un volumen tal que contuviera 30 µg de proteína. Paralelamente se sembraron 4 µl de patrones de bajo peso molecular (GE HealthCare): fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Las corridas fueron realizadas a corriente constante (30 mA por placa, voltaje máximo 200 V), a temperatura ambiente, hasta que el frente de corrida llegó al borde inferior del gel. Se realizó inicialmente una coloración de los geles con Coomassie Brilliant Blue durante 2 h y una decoloración con solución decolorante (etanol 30 %, ácido acético 10 %) aplicado sucesivas veces. Por último, se realizó una tinción con plata para aumentar la sensibilidad de la detección cuando las bandas eran poco visibles (Blum et al., 1987).

1.3.3.2 Obtención de fracciones solubles en PBS

Se prepararon dispersiones de **H**, **A** y sus respectivos digeridos (10 o 20 mg/ml) en buffer PBS. Se agitaron en Thermomixer Eppendorf (500 rpm, 1 h, 37 °C) y por último se centrifugaron a 10000×g durante 10 min a temperatura ambiente.

1.3.3.3 Determinación de la concentración de proteína soluble

La determinación de la concentración proteica en las fracciones solubles se realizó mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para ello, se realizaron las diluciones correspondientes de las fracciones solubles en buffer PBS. Las muestras se mezclaron con 1 ml de la solución A+B (A: Na₂CO₃ 2 % p/v - NaOH 0,1 N; y B: CuSO₄.5H₂O 1 % p/v, tartrato de Na y K 2 % p/v), se agitaron vigorosamente con un vórtex y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el cual se les agregó 100 µl de la solución de Folin (dilución 50 % v/v en agua destilada) (Folin Ciocalteu, Anedra), se agitaron enérgicamente y se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de placas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments). Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Sigma) (0 - 0,4 mg/ml).

1.3.3.4 Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de filtración en gel

Las fracciones solubles en buffer PBS (preparadas como se indicó en el inciso 1.3.3.2) fueron analizadas en un equipo ÄKTA purifier (GE Healthcare), utilizando dos columnas de exclusión molecular diferentes.

Columna Superdex 75 10/300 GL (límite de exclusión: 10² kDa; rango de separación 3-70 kDa) (GE Healthcare). Esta columna fue calibrada con azul dextrano (volumen de exclusión, V₀ = 7,3 ml), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (9,2 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa (19 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración: $\log MM = 1,96 - 2,30 K_{av}$, donde: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, V_e es el volumen de elución (ml) del pico de interés; y V_t es el volumen total de la columna (V_t = 24 ml). Las muestras se filtraron con filtros de nylon de 0,45 µm de poro. Se eluyeron 200 µl de cada muestra con un flujo de 0,4 ml/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados por absorbancia a 210 nm.

Columna Superdex 30 Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) (límite de exclusión = 10 kDa; rango de separación = 0,1-7 kDa para proteínas globulares). Esta columna fue calibrada con azul dextrano (volumen de exclusión V₀ = 7,60 ml), aprotinina (6500 Da), vitamina B12 (1355 Da) y ácido hipúrico (179,14 Da), obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración: $\log MM = 4,84 - 3,30 K_{av}$, siendo $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, donde, V_e: volumen de elución, V_t = 24 ml.

Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon de 0,45 μm de poro. Las condiciones de corrida fueron: flujo 0,5 ml/min, volumen de muestra = 200 μl . La detección fue realizada a 210 nm.

I.3.4 Estudio de la fracción polifenólica

I.3.4.1 Extracción de los polifenoles

A fin de evaluar la mejor condición para la extracción de compuestos fenólicos (CF), se llevaron a cabo diferentes ensayos sobre **H** en los cuales se mantuvo constante la relación sólido:solvente (50 mg **H**/ml). Las extracciones se realizaron utilizando tres metodologías:

Método 1: Extracción por agitación con diferentes solventes: etanol (EtOH)/agua 60/40, metanol (MeOH)/agua 60/40 y MeOH/agua 70/30), agitación constante (750 rpm) durante 3 h a 30 °C (Thermomixer Eppendorf). Los extractos se centrifugaron (Hermle, Labortechnik GmbH, Alemania) durante 5 min, 4430 \times g, temperatura ambiente, y se conservó el sobrenadante (Rodríguez y Tironi, 2020, con modificaciones)

Método 2: Extracción con EtOH:HCl 37 % 97/3 (para romper posibles interacciones entre CF y otros componentes) con agitación constante (agitador magnético) durante 24 h a temperatura ambiente (Czerwinski et al., 2004, con modificaciones). Los extractos se centrifugaron (Hermle, Labortechnik GmbH, Alemania) durante 10 min, 3500 \times g, 4 °C, y se conservó el sobrenadante

Método 3: Extracción asistida por ultrasonido (EAU) en un procesador ultrasónico VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, USA) utilizando diversas condiciones: 10, 15 y 20 min; 40, 60 y 80 % de amplitud. Estas extracciones se realizaron usando como solvente EtOH/agua 60/40 en baño de hielo para evitar aumentos excesivos de temperatura, que se mantuvo en todos los casos por debajo de 42 °C. Los extractos se centrifugaron (Hermle, Labortechnik GmbH, Alemania) durante 5 min, 4430 \times g, temperatura ambiente, y se conservó el sobrenadante.

Todos los extractos obtenidos se evaporaron completamente (30 °C, ciclos de 2 h, Concentrator plus/Vacufuge® plus) y finalmente se resuspendieron en buffer PBS pH = 7,4.

A partir de los resultados obtenidos aplicando las metodologías descriptas a continuación, el método de extracción seleccionado para ser aplicado en **H**, **HD**, **A** y **AD** fue el de EAU en las condiciones de 15 min y 40 % de amplitud. Los respectivos extractos resuspendidos en buffer PBS fueron denominados **H_e**, **HD_e**, **A_e** y **AD_e**.

I.3.4.2 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT).

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) para determinar el contenido de CFT en los extractos. Este ensayo se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm. Sobre 325 μ l de muestra se agregaron 50 μ l del reactivo de Folin 1 N, se mezcló por agitación y 3 min después, se agregaron 375 μ l de Na_2CO_3 20 % p/v. La mezcla se dejó reposar durante 1 h en oscuridad. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm, en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, USA). Paralelamente se realizó una curva patrón con ácido gálico (0-0,06 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g de muestra en base seca. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

1.3.4.3. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Para el estudio de los perfiles cualitativos y cuantitativos de los CF (extraídos por los métodos 1 y 3), al momento del análisis se solubilizaron los extractos secos en la fase móvil del método cromatográfico. La separación y determinación de CF se realizó mediante HPLC acoplada a detectores de fluorescencia y arreglo de diodos (HPLC-DAD-FLD) (sistema Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Alemania) y una columna Kinetex C18 de fase reversa (3,0 x 100 mm, 2,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Se utilizó el software Chromeleon 7.1 para controlar todos los parámetros del sistema y procesar los datos obtenidos. La lista de CF determinados, condiciones cromatográficas y de detección fueron las reportadas por Ferreyra et al. (2021), con pequeñas modificaciones. Las fases móviles fueron una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 % (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). El gradiente aplicado fue el siguiente: 0-1,7 min: 0 a 5 % B; 1,7-10 min: 5 a 30 % B; 10-13,5 min: 30 a 95 % B; 13,5-15 min: 95% B; 15-16 min, 95 a 5 % B; 16-19: 5% B. El flujo se fijó en 0,8 ml/min, la temperatura de la columna fue de 35 °C y el volumen de inyección fue de 10 μ l. La celda de flujo analítico para DAD se configuró para escanear de 200 nm a 400 nm; se utilizó una velocidad de recolección de datos de 5 Hz, un ancho de banda de 4 nm y un tiempo de respuesta de 1 s. Se utilizaron diferentes longitudes de onda (254, 280, 320 y 370 nm) según la absorbancia máxima de los analitos para DAD. Para FLD, se utilizó una longitud de onda de excitación de 290 nm y una respuesta de emisión monitoreada a 315, 360 y 400 nm,

dependiendo de los analitos objetivo. Se utilizó una velocidad de recopilación de datos de 10 Hz para FLD. Los tiempos de retención de los compuestos en las muestras se compararon con los de estándares auténticos para la identificación de CF. Las gráficas de calibración para los analitos estudiados mostraron rangos lineales entre 0,05 y 40 mg/l ($r^2 > 0,993$).

1.3.5. Actividad antioxidante

1.3.5.1. Tratamiento de las muestras: Se evaluaron fracciones solubles acuosas y etanólicas, y fracciones separadas por FPLC de filtración en gel, obtenidas a partir de los digeridos gastrointestinales y del blanco de reactivo (**BR**). Debido a la citotoxicidad de las sales biliares incluidas en el protocolo de DGIS, fue necesario reducir su contenido para los ensayos celulares. Las fracciones estudiadas fueron:

1) *solubles resuspendidos*: se resuspendió **HD** y **AD** liofilizado (20 mg/ml) en buffer PBS (pH = 7,4) (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1h, 500 rpm), y posteriormente se centrifugó (10000×g, 10 min) conservando el sobrenadante (**HD_s** y **AD_s**).

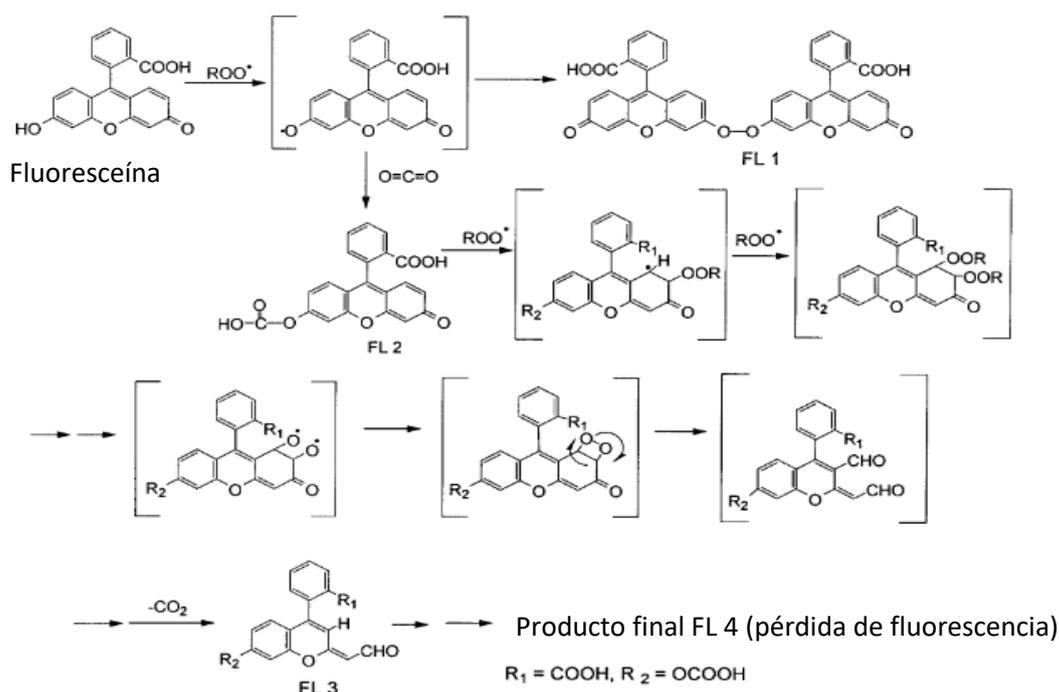
2) *solubles acuosos directos*: el liofilizado se reconstituyó en agua milliQ en la misma proporción en la que se encontraba en la digestión; se homogenizó (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g ,10 min) conservando el sobrenadante (**HD_{sd}**, **AD_{sd}**, y **BR_{sd}**).

3) *solubles etanólicos directos*: se denominó *solubles directos* a los extractos etanólicos (**HD_e** y **AD_e**) que fueron evaporados y posteriormente resuspendidos en buffer PBS en el mismo volumen original.

3) *solubles bioaccesibles*: para reducir el contenido de sales biliares de las fracciones solubles directas se agregó la resina colestiramina (C4650 SIGMA) en una relación 10 % p/v y se homogenizó (Thermomixer Eppendorf, 25 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g, 20 min) para remover la resina y las sales biliares adsorbidos conservando el sobrenadante que se filtró (0,22 µm) (Rodríguez y Tironi, 2023), obteniendo las fracciones **HD_{sb}**, **AD_{sb}**, y **BR_{sb}** para los extractos acuosos y **HD_{esb}**, **AD_{esb}**, y **BR_{esb}** para los extractos etanólicos. De acuerdo con trabajo previos este proceso permite imitar la reabsorción intestinal humana (Edwards y Slater, 2009; Vázquez-Sánchez et al., 2018) obteniéndose fracciones que fueron llamadas bioaccesibles por estos autores.

1.3.5.2 Ensayos in vitro acelulares

Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). A través del método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales libres al exponer la muestra a un generador de radicales peróxidos (2,2’ Azo bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro, AAPH) a 37 °C, utilizando la fluoresceína (3’,6’-dihidroxispirol[isobenzofuran-1(3H),9’[9H]-xanten]-3-ona) como sonda fluorescente. Se determina la degradación oxidativa de la fluoresceína, que al reaccionar con los radicales generados por el AAPH se descompone formando diversas estructuras con la consiguiente pérdida de fluorescencia (Ou et al., 2001; *Esquema 1.5*).



Esquema 1.6. Vía propuesta para la oxidación de fluoresceína en presencia de AAPH (Ou et al., 2001).

La pérdida de fluorescencia es, por lo tanto, un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con radicales peróxido. Aquellos compuestos con capacidad para secuestrar radicales peróxidos protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia. El efecto protector de los antioxidantes es medido al calcular el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia de la muestra comparada con el control negativo (CN) en el cual no hay antioxidantes presentes.

El procedimiento consistió en mezclar 150 μl de fluoresceína (53,3 nM) con 25 μl de la muestra correspondiente, buffer (control negativo CN), o distintas diluciones del Trolox (6,25 a 75 μM) utilizado como compuesto antioxidante de referencia. Por último, se agregaron 250 μl del AAPH (160 mM) y se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) en un

lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments) cada 1 min hasta los 45 min, incubando a 37 °C, con agitación continua. Al mismo tiempo, se realizó un blanco que no contenía AAPH. El área bajo la curva (AUC) se calculó como indica la *Ecuación 1.4*:

$$\text{AUC} = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{i-1}/f_0 + 0,5 f_i/f_0 \quad (\text{Ec. 1.4})$$

donde: f_i : fluorescencia en un tiempo determinado; f_0 : fluorescencia inicial.

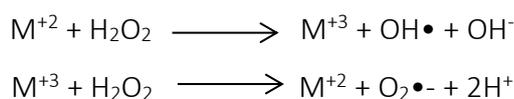
El porcentaje de secuestro de los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) se calculó según la *Ecuación 1.5*:

$$\% \text{ Secuestro de } \text{ROO}\bullet = [(AUC_M - AUC_{CN}) / (AUC_B - AUC_{CN})] \times 100 \quad (\text{Ec. 1.5})$$

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

Graficando este valor en función de la concentración (proteína, CF) se obtuvo el valor de la dosis que es capaz de lograr un 50 % de neutralización de los radicales (IC_{50}) (Orsini Delgado et al., 2015). Se realizó una curva dosis-respuesta usando Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como antioxidante patrón obteniéndose también el correspondiente valor de IC_{50} .

Método HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity). A través de la reacción de Fenton, es posible generar diversas especies radicalarias, entre ellas, el radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$). Esta reacción es reconocida como una de las reacciones más importantes en la explicación del daño oxidativo que ocurre en los sistema biológicos. La misma involucra varias especies oxidables capaces de reaccionar con diversos compuestos orgánicos, siendo el mecanismo más conocido el siguiente:



A través de este método es posible medir la capacidad de inhibir la formación y/o secuestrar radicales hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) al exponer la muestra a un sistema generador de radicales hidroxilo ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{M}^{+2}$), a través de la reacción de Fenton a 37 °C, utilizando la fluoresceína como sonda fluorescente. De la misma manera que ocurre en el método ORAC, lo que se determina en este ensayo es la degradación oxidativa de la fluoresceína, que se descompone al reaccionar con el radical hidroxilo generado formando diversas estructuras con la consiguiente pérdida de fluorescencia. El efecto protector de los antioxidantes es medido, al igual que en el método

ORAC, al calcular el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia de la muestra comparada con el control negativo (CN) en el cual no hay antioxidantes presentes.

El radical $\text{OH}\cdot$ fue generado *in situ* a través de la reacción de Fenton, utilizando Co^{+2} y H_2O_2 , y se utilizó fluoresceína como sonda fluorescente. Se preparó una solución de fluoresceína $0,0603 \mu\text{M}$ en buffer PBS ($\text{pH} = 7,4$); una solución de H_2O_2 $0,75 \text{ M}$ en agua MilliQ y la solución de Co^{+2} se obtuvo disolviendo 10 mg de ácido picolínico con 11 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua MilliQ. Las mezclas de reacción fueron preparadas añadiendo $190 \mu\text{l}$ de la solución de fluoresceína; $20 \mu\text{l}$ de muestra o buffer PBS (control negativo); $15 \mu\text{l}$ de H_2O_2 y $75 \mu\text{l}$ de solución de Co^{+2} . El blanco de reacción se preparó con fluoresceína y buffer. Se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm , λ_{em} : 535 nm) en un lector de microplacas (SYNERGY HT – SIAFRT, Biotek Instruments) cada 1 min hasta las 3 h , incubando a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación continua. El área bajo la curva (AUC) y el % de inhibición de los radicales $\text{OH}\cdot$ se calcularon como se indicó en las ecuaciones 3 y 4, respectivamente. Se obtuvieron los valores de IC_{50} de manera similar que para el método ORAC (Orsini Delgado et al., 2015).

Secuestro del catión radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$. El ensayo cuantifica la capacidad de los antioxidantes de neutralizar el radical libre $\text{ABTS}^{*\cdot}$ (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)). El $\text{ABTS}^{*\cdot}$ se genera a partir de la oxidación de ABTS con persulfato de potasio. El radical generado presenta uno de sus máximos de absorbancia a 734 nm y luego, por la presencia de antioxidantes, se reduce volviéndose incoloro (**Esquema 1.6**) (Oliveira et al., 2014; Re et al., 1999). Se ha reportado que las sustancias antioxidantes podrían neutralizar al $\text{ABTS}^{*\cdot}$ a través de un mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno (HAT), así como también a través de la transferencia de un electrón (ET) (Nenadis et al., 2003).

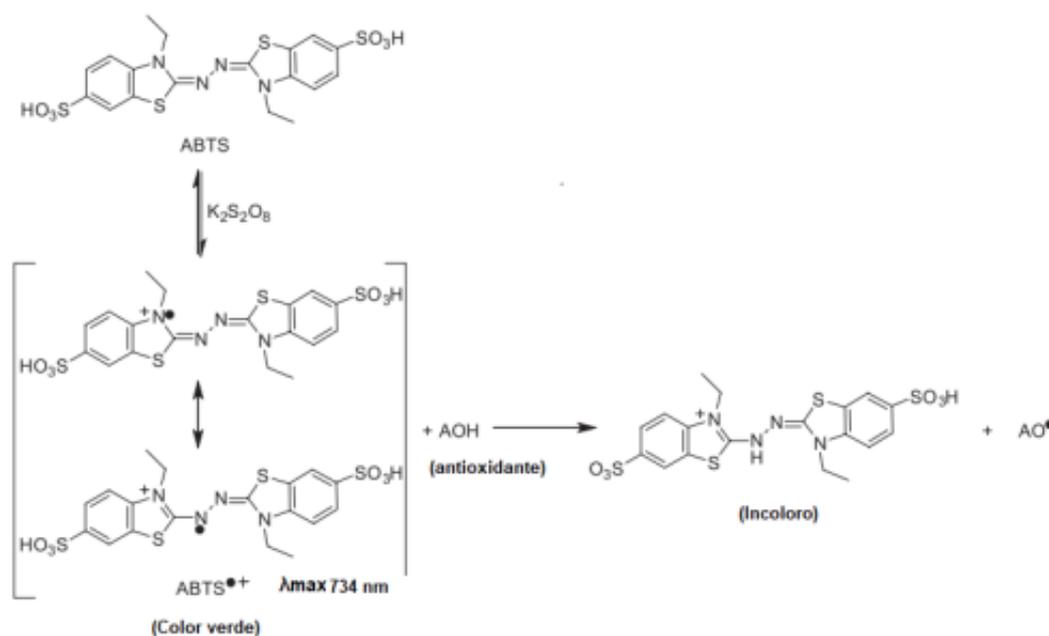
El método de decoloración del catión radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Tironi y Añón (2010), con algunas modificaciones. En primera instancia, se obtuvo el radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ por reacción de una solución 7 mM de ABTS (Fluka) con persulfato de potasio (Anedra) (concentración final: $2,45 \text{ mM}$) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante al menos 16 h . Previo al ensayo, la solución de $\text{ABTS}^{*\cdot}$ fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia a 734 nm de $0,70 \pm 0,02$ en una cubeta de 1 cm (espectrofotómetro Beckman DU 650). Se prepararon mezclas de $1000 \mu\text{l}$ de la solución diluida de $\text{ABTS}^{*\cdot}$ con $100 \mu\text{l}$ de los extractos fenólicos en placas de 48 pocillos y se midió la absorbancia a 734 nm a distintos tiempos ($0 - 15 \text{ min}$) en un lector de microplacas SYNERGY

HT–SIAFRT (Biotek Instruments, USA). Se empleó Trolox (0,05 – 0,20 mM) como compuesto de referencia. Con las medidas efectuadas para cada muestra y del blanco (solvente de extracción) se calculó el % de inhibición del radical a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición ABTS}^{\bullet+} = [(Abs_{B0} - Abs_{M15}) - (Abs_{B0} - Abs_{B15})] / Abs_{B0} \times 100 \quad (\text{Ec. 1.6})$$

donde: Abs_{B0} y Abs_{B15} se refieren a la absorbancia del blanco a los 0 y 15 min, respectivamente, y Abs_{M15} se refiere a la absorbancia de la muestra a los 15 min.

Cada medida fue realizada por duplicado.



Esquema 1.7. Reacción entre el persulfato de potasio, el ABTS y los antioxidantes (AOH) (adaptado de Oliveira et al., 2014).

I.3.5.3. Ensayos celulares

I.3.5.3.1 Cultivo de células Caco-2 TC7.

Medios y reactivos utilizados para los cultivos celulares:

- Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 15 % de suero fetal bovino (SFB): 1 sobre de DMEM (P3030-001, EMEVE Medios de laboratorio Microvel SRL) con 4,5 g/l de glucosa, 13 ml de Penicilina/Estreptomicina (15140-122 GIBCO PenStrep x 100 ml, 1000U/Pen + 1000 μ g/ml Strep), 2 g de $NaHCO_3$, 0,5 g de gentamicina, 13 ml de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids, GIBCO), 180 ml de SFB inactivado a 65 °C (Internegocios SA), 1000

ml de agua para irrigación quirúrgica, pH final = 7,4. El medio se esterilizó por filtración con membrana (filtro GP Millipore Express Plus membrane 0,22 μm) y se almacenó a 4 °C.

- Tripsina: 75 mg de tripsina (25200-056 GIBCO 0,25% Trypsin EDTA 1X) y 20 mg de EDTA en 100 ml de PBS. Se esterilizó por filtración con membrana (0,22 μm) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

- Azul tripán (T6146 SIGMA Trypan Blue powder, BioReagent, 0,4 % en PBS 2X).

Cultivo de las células Caco 2-TC7.

Los cultivos celulares se obtuvieron a partir de células que se encontraban congeladas en crioviales en nitrógeno líquido. Estas células fueron descongeladas, resuspendidas en DMEM, sembradas en una botella de plástico de cultivo celular e incubadas en estufa (37 °C, 5 % de CO₂) donde se mantuvieron cambiando el medio cada dos días. Cuando la monocapa llegó a confluencia (aproximadamente 7 días) el cultivo se amplificó tripsinando y sembrando las células en otra botella de 25 cm² o en una de 75 cm² según la cantidad de células obtenidas. Este procedimiento se repitió hasta obtener un recuento suficiente para las siembras en placa y para obtener botellas de reserva. Las células Caco2-TC7 empleadas correspondieron a los pasajes N° 48-55 del cultivo inicialmente adquirido en la ATCC.

Tripsinado: Para el proceso de amplificación del cultivo; una vez que la botella llegó a confluencia, se realizó una observación macro y microscópica para verificar que no existieran contaminación ni anomalías en el cultivo. Bajo flujo laminar, se descartó el medio con pipeta estéril, se lavó con PBS y se agregó tripsina sobre la pared opuesta a la monocapa (1 ml para botellas de 25 cm² y 2 ml para botellas de 75 cm²) y se incubó en estufa a 37 °C, hasta observar el desprendimiento de la mayor parte de la monocapa (5 min aproximadamente). Las células se resuspendieron agregando el volumen de DMEM correspondiente (5 ml para botellas de 25 cm² o 10 ml para botellas de 75 cm²) y se transfirió todo el contenido a un tubo cónico estéril. Se centrifugó (5 min, 1300xg, temperatura ambiente) y se descartó el sobrenadante; se resuspendieron las células en 5 o 10 ml de DMEM según correspondía, y se tomó una alícuota para realizar el recuento celular.

Recuento celular: Para realizar el recuento se mezclaron 50 μl de la suspensión celular con 50 μl de azul tripán y se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer. Se realizó el conteo en un microscopio invertido; donde se procedió a contar en diagonal dos cuadrantes opuestos (cada cuadrante tiene 16 cuadrados). El colorante azul tripán tiñe las células que no

están viables, por lo cual sólo se contaron aquellas no coloreadas. Una vez obtenido el número de células totales por ml se realizó la dilución correspondiente de acuerdo con la concentración de células deseada y se procedió a realizar la siembra en placa para los ensayos.

1.3.5.3.2. Citotoxicidad de las muestras. Determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH).

La LDH está presente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo al permeabilizarse la membrana de las células dañadas por un agente tóxico. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato a lactato (**Esquema 1.7**), utilizando NADH como cofactor. El rol que desempeña es esencial para la célula, ya que permite regenerar NAD⁺ y así continuar con el ciclo de la glucólisis, única fuente de ATP en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno.

Este ensayo se basa en la detección del incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo, la cual es proporcional al número de células lisadas o dañadas. La oxidación del NADH por parte de esta enzima implica una caída en la absorbancia a 340 nm.



Esquema 1.8. Reacción que fundamenta el método para la determinación de LDH.

Se utilizó la línea celular Caco-2 TC7 sembrada en placas de cultivo de 96 fosas (2,5 x 10⁴ células/pocillo). Luego de 48 h, se retiró el medio de cada pocillo, se agregó 100 µL de muestra y se incubó en estufa (37 °C, 5 % CO₂) por 3 h. Luego se trasvasó el sobrenadante a otra placa y se cuantificó la actividad de LDH mediante el kit comercial LDH-P UV unitest (Wiener Lab, Argentina). Las muestras se hicieron reaccionar con el sustrato reconstituido conteniendo piruvato y NADH siguiendo las especificaciones del fabricante. Se realizó la lectura de la caída de la absorbancia a λ = 340 nm en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU) utilizando una placa de 96 pocillos apta para la lectura en el UV (fondo plano, acrílicas, Costar®). La actividad enzimática (UI) se expresó como la variación de absorbancia/min (ΔA/min) calculando el promedio de la diferencia en las absorbancias/min, a los tiempos 0,5, 1,5, 2,5 y 3,5 min. Cada determinación se realizó por triplicado. La citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH (**Ecuación 1.7**):

$$\% \text{ LDH} = \text{LDH}_m / \text{LDH}_T \times 100$$

(Ec. 1.7)

donde:

LDH (U/l): $\Delta A/\text{min} \times f$

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

LDH_T: LDH (U/l) del Control (+) de muerte celular.

Controles:

(-): DMEM, Buffer muestra, PBS

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

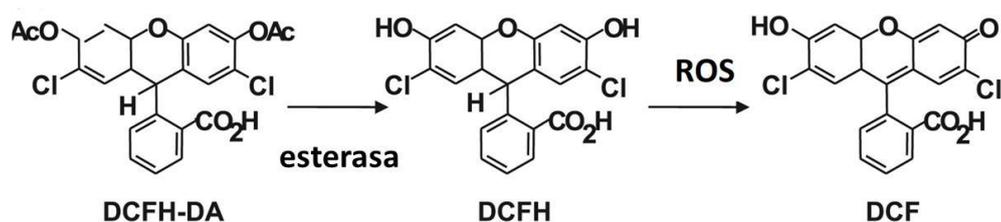
1.3.5.3.3. Inducción de la oxidación celular y determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo.

Dado que el objetivo fue evaluar la capacidad de los péptidos y compuestos fenólicos de arvejas de interactuar o ingresar a las células y ejercer un efecto antioxidante, en todos los ensayos realizados los cultivos se pre-incubaron con las muestras y luego se sometieron al proceso de inducción del estrés oxidativo previo retiro y lavado de la muestra en la solución extracelular. Se utilizó H₂O₂ como factor estresante, de acuerdo con un protocolo previamente optimizado en nuestro laboratorio. En este tipo de estudios el estímulo estresante debe aplicarse al cultivo celular de manera tal que genere un estrés en la célula, permitiendo que esta pueda generar una respuesta medible, pero sin producirle un daño letal, lo cual se logró con una concentración de H₂O₂ de 500 μM (García Fillería y Tironi, 2021).

Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Se evaluó la capacidad de las muestras para neutralizar ROS en las células Caco-2 TC7 sometidas a daño oxidativo inducido por H₂O₂ mediante el uso de la sonda 2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta sonda se aplica en estudios celulares debido a su capacidad de difundir a través de la membrana e ingresar a la célula, donde es hidrolizada a 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH) mediante esterasas intracelulares que rompen la unión con el acetato. La oxidación de DCFH por ROS origina la 2,7-diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 498 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$) (***Esquema 1.8***). Si bien durante mucho tiempo se consideraba que la ROS específica asociada a la oxidación de DCFH a DCF era el H₂O₂, se ha demostrado que esta oxidación puede llevarse a cabo por otras ROS como OH• y ROO• y también por RNS como NO• y ONOO-. Las peroxidasas celulares son fundamentales en la oxidación de DCFH a DCF por H₂O₂ (Gomes et al., 2005).

Este tipo de ensayos es lo que se denomina ensayo de actividad antioxidante celular (CAA) y tiene como objetivo evaluar la capacidad de los compuestos en estudio de reducir efectivamente el estado oxidativo intracelular. Es una herramienta importante para la evaluación del potencial del antioxidante para ejercer una respuesta a nivel celular (Wolfe y Liu, 2007).



Esquema 1.9. Formación del compuesto fluorescente DCF a partir de la oxidación de DCFH-DA.

Se realizó el siguiente protocolo:

1. Obtención de cultivos confluentes de células Caco-2 TC7: las células se sembraron en una placa de cultivo oscura de 96 pocillos en una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se incubó 48 h en estufa (37°C , 5 % CO_2). Se retiró el medio y se lavó con PBS.
2. Tratamiento con la sonda (T1): Se agregaron 100 μL de DCFH-DA 20 μM en PBS y se incubó 30 min en estufa (37°C , 5 % CO_2 , en oscuridad). Se retiró y se lavó con PBS.
3. Tratamiento con las muestras (T2): Se agregaron 100 μL de muestra y se incubó 1 h (37°C , 5 % CO_2). Se retiró y se lavó con PBS.
4. Inducción del estrés oxidativo (T3): Se agregaron 100 μL de H_2O_2 500 μM en PBS y se incubó 3 h leyendo la fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$) cada 10 min en un lector de placas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments, EE. UU).

Se prepararon tres sistemas control:

Control 1 (C1): Control de máximo estrés oxidativo. En T2 las células se incubaron con buffer PBS pH = 7,4 en lugar de muestra y luego se realizó la inducción del estrés oxidativo con H_2O_2 (T3).

Control 2 (C2): Control de oxidación basal. Estas células no fueron tratadas con muestras ni sometidas a estrés oxidativo; en T2 y en T3 se agregó buffer PBS pH = 7,4.

Control 3 (C3): Control de fluorescencia intrínseca. En T1 y T2 se incubó con PBS y en T3 se incubó con el H_2O_2 .

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

$$\% \text{ inhibición ROS intracelulares} = (\Delta FC - \Delta FM) / \Delta FC \times 100$$

(Ec. 1.8)

donde:

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

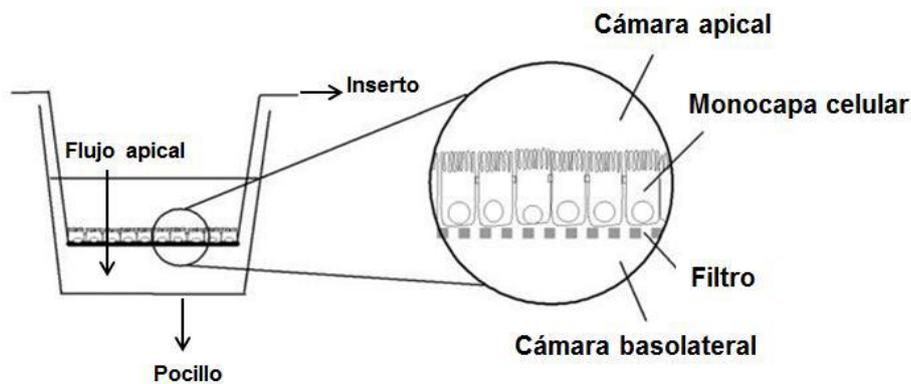
ΔFM : diferencia de fluorescencia ($F_{180\text{min}} - F_{0\text{min}}$) para M (muestra).

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

1.3.6. Simulación de la absorción intestinal

1.3.6.1. Obtención de monocapas de células Caco2-TC7 en insertos

Las metodologías de descongelación, tripsinado, recuento y cuantificación de las células, así como los medios, buffers y soluciones utilizadas fueron los mismos que se detallaron en el inciso 1.3.5.2.2. Para obtener monocapas celulares confluentes, las células Caco-2TC7 provenientes de cultivos confluentes obtenidos en botellas de 75 cm² se tripsinaron y luego se sembraron en una concentración de 10⁵ células/cm² en insertos de poliestireno con membrana filtrante de policarbonato (Millicell-PIHP01250, Millipore) de 0,4 μm de tamaño de poro, 12 mm de diámetro y 0,6 cm² de área efectiva. Se incubaron en estufa de cultivo (37 °C, 5 % CO₂).



Esquema 1.10. Esquema de un inserto con formación de monocapa celular.

En el **Esquema 1.9** se representa un inserto colocado sobre el pocillo de una placa; como se observa existen dos cámaras, la apical y la basolateral. En este caso, el estudio del flujo o transporte de los péptidos se realizó en la dirección apical-basolateral como se muestra en la figura. Además de la suspensión celular sembrada sobre la membrana, en la cámara basolateral se colocó medio de cultivo DMEM. El medio de cultivo de cada cámara se cambió cada 2 días,

momento en el cuál se midió la resistencia transepitelial como se describe a continuación (García Fillería y Tironi, 2021).

Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER)

La determinación de TEER (ohmios.cm^2 ($\Omega.\text{cm}^2$)) es una técnica simple que proporciona información sobre la integridad de las uniones epiteliales cerradas y la confluencia de monocapas celulares cultivadas en soportes semipermeables. Se utiliza como un indicador de la “estrechez” de la unión entre las células, y está correlacionado con el transporte paracelular. Para la medida de la TEER se utilizó un voltímetro Millicell®-ERS equipado con dos electrodos (Millipore, USA) (*Imagen 1.2*). Estos electrodos se colocan en el medio de cultivo, uno en compartimiento inferior (cámara basolateral) y otro en el superior (cámara apical), y la resistencia se determina directamente mediante un voltímetro.

Antes de su uso, los electrodos se esterilizaron sumergiéndolos en etanol 70 % v/v durante 20 min; y luego se estabilizaron al sumergirlos en medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente, durante 10 min. En primer término se realizó la lectura en los pocillos blanco, es decir, aquellos en los que no se habían sembrado células. Luego, se midió la resistencia en todos los insertos con células. Por último, se calculó la TEER para cada uno de los insertos a partir del área del inserto ($\pi \times \text{radio}^2$) de acuerdo a la ecuación 1.9.

$$\text{TEER } (\Omega.\text{cm}^2) = (\text{Resistencia total} - \text{Resistencia blanco})(\Omega) \times \text{Área } (\text{cm}^2) \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Se considera que la monocapa celular se encuentra correctamente formada cuando la TEER alcanza un valor constante (Artursson, 1990).



Imagen 1.2. Voltímetro Millicell®-ERS

1.3.6.2. Determinación de la actividad transportadora

La actividad transportadora de la monocapa celular fue determinada en dirección apical – basolateral. Una vez formada la monocapa (TEER constante), se retiró el medio de cada cámara, se adicionaron 0,5 ml de PBS en cada una y se incubó durante 20 min en estufa (37 °C, 5 % de CO₂), para estabilizar los insertos. Transcurrida dicha incubación, el PBS de ambas cámaras fue removido, se sembraron 400 µl de las muestras en la cámara apical, mientras que en la cámara basolateral, o receptora, se colocaron 400 µl de PBS, y se incubó durante 3 h (37 °C, 5 % de CO₂) (García Fillería y Tironi, 2021). Luego de transcurrido dicho tiempo, se tomaron las muestras de ambas cámaras y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por RP-HPLC.

1.3.6.3. Análisis por RP-HPLC.

Tanto las muestras de la cámara apical y basolateral luego de la incubación, como cada una de las muestras originales fueron analizadas por RP-HPLC. Para ello, se utilizó una columna analítica Shim-pack GIST C18, 5 µm 4,6 x 250 mm (Shimadzu) y un equipo Shimadzu Nexera 40 Series HPLC/UPLC equipado con: controlador de sistema (CBM-40), unidad desgasificadora (DGU 405), bomba (LC-40D XR), horno para columna (CTO-40) autosampler (SIL-40C XR) y un detector UV-Vis (190 nm – 800 nm) de matriz de fotodiodos (PDA) (SPD-M40) y con el software Shimadzu LabSolution (version 5.111). Para la corrida se utilizó una elución en gradiente utilizando dos solventes: el solvente A fue una mezcla de agua y acetonitrilo (98:2) con ácido trifluoroacético (TFA) (650 µL/L), mientras que el solvente B estuvo compuesto por una mezcla de agua y acetonitrilo (35:65) con TFA (650 µL/L). Las muestras (10 µL) fueron eluidas con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100% en 55 min) a 40 °C, con un flujo de 1,1 mL/min (García Fillería y Tironi, 2021)

1.3.7 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion con un nivel de confianza (α) de 95 %. Para la evaluación de diferencia de medias se utilizó el test de diferencias significativas (HSD) de Tukey.

RESULTADOS

I.4. Resultados

I.4.1 Caracterización fisicoquímica de la harina (H) y del aislado proteico (A) de arvejas amarillas

Se preparó **H** por molienda directa de las semillas de arvejas amarillas (*Pisum sativum*) de la variedad Yams obteniéndose polvos finos mediante la utilización de una malla de 1 mm en el molino Udy (**Imagen I.3.A**).

La preparación de **A** se realizó por solubilización alcalina y posterior precipitación isoeléctrica dado que este es el método más comúnmente utilizado a escala de laboratorio, aplicando un pH de 9,5 para la solubilización de las proteínas y un pH de 4,5 para la precipitación isoeléctrica según el protocolo previamente optimizado (Cipollone, 2018). El aislado proteico obtenido fue posteriormente liofilizado (**Imagen I.3.B**), obteniéndose un rendimiento cercano al 12,5 % p/p respecto a la harina.

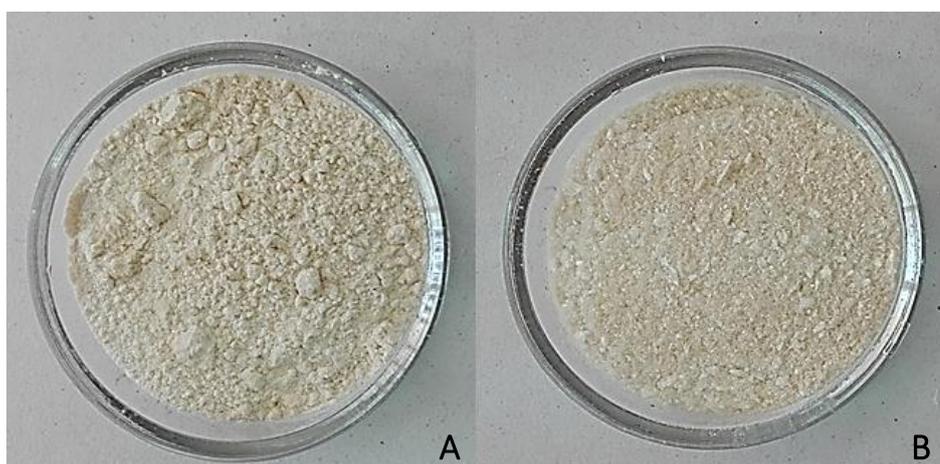


Imagen I.3. A. Harina; B. Aislado proteico de arveja amarilla var. Yams

I.4.1.1 Factor antitriptico.

Los inhibidores de tripsina y quimotripsina son sustancias de naturaleza proteica que impiden fuertemente la actividad de estas enzimas reduciendo la digestión y la absorción de la proteína de la dieta (Norton, 1991). Existen otros factores antinutricionales como α -galactósidos, saponinas y ácido fítico que se encuentran en mayor o menor medida en todas las semillas de las leguminosas y causan flatulencia e interfieren con la absorción y utilización nutricional de proteínas y minerales (Champ, 2002).

La eliminación de componentes indeseables es esencial para mejorar la calidad nutricional de las legumbres y aprovechar todo su potencial como alimento. Existen técnicas de

procesamiento simples y económicas que constituyen métodos efectivos para lograr cambios deseables en la composición de las semillas. Diferentes autores han informado que el remojo, el tratamiento térmico, la fermentación y el germinado mejoran la calidad de las legumbres debido a la eliminación de algunos factores antinutricionales. En muchos casos, el uso de un solo método no resulta suficiente para lograr la eliminación deseada de compuestos antinutricionales y se requiere una combinación de dos o más métodos (Vidal-Valverde et al., 1994). El remojo es uno de los procesos utilizados para eliminar factores antinutricionales solubles los cuales son separados con la solución de remojo que se descarta; pero pueden ocurrir algunas reacciones durante el remojo, afectando el contenido de algunos compuestos (Vidal-Valverde et al., 1992). El tratamiento térmico generalmente inactiva los factores sensibles al calor tales como los inhibidores de tripsina como resultado de la desnaturalización de estas proteínas (Vidal-Valverde et al., 1994). Las maneras más comunes de aplicación de calor son el tostado (calor seco) y el hervor (calor húmedo). El tostado es un método de procesamiento rápido que utiliza calor seco durante un período corto de tiempo. Gahlawat y Sehgal (1992) informaron que el tueste puede mejorar la digestibilidad, el color, el sabor, la vida útil y reducir los factores antinutricionales de los cereales y las legumbres. En cuanto a las aplicaciones de calor húmedo se pueden destacar dos formas de hacerlo: cocción a presión atmosférica o cocción a presión reducida. En este sentido, se informó que la digestibilidad proteica se mejoró en un 80 % cuando se hizo a presión reducida comparada con la cocción tradicional (Naveeda y Jamuna, 2006). Ur-Rehman y Salariya (2005) demostraron que por ebullición normal de diferentes legumbres comestibles se mejoró entre 86 y 93,3 % la digestibilidad de las proteínas en comparación con las legumbres crudas.

En este trabajo se evaluó la presencia de factor antitriptico antes y después de la aplicación de un tratamiento de remojo seguido de hervor. Se analizó la harina (**H**), la harina tratada térmicamente (**Ht**) y el aislado proteico (**A**) evaluando la inhibición que ejercen estas muestras sobre la acción de tripsina porcina. Se pudo observar una actividad del factor antitriptico baja en el caso de **H** (16 % de inhibición de la tripsina), inactivándose completamente luego del remojo y tratamiento térmico (**Ht**) (**Figura I.1**).

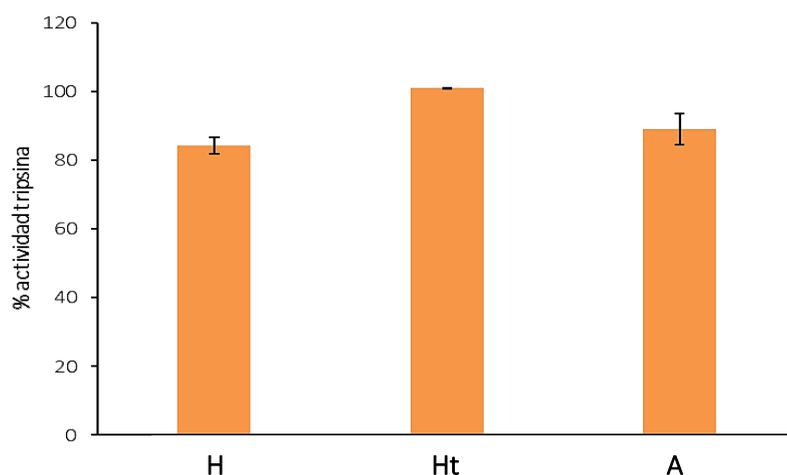


Figura I.1. Actividad de tripsina en presencia de H, Ht y A

Khatab y Arntfield (2009) analizaron la presencia de factores antinutricionales en diferentes legumbres luego de ser sometidas a diferentes tratamientos (remojo, hervor, tostado, cocción por microondas, autoclave, fermentación). Todos los tratamientos causaron una disminución significativa de taninos, ácido fítico, oligosacáridos y factor antitriptico. El hervor produjo la mayor reducción de taninos. Estos autores registraron actividad del factor antitriptico en arvejas canadienses y luego de realizar un tratamiento similar al ensayado en el presente trabajo, dicha actividad se redujo completamente. Análogamente, Vidal-Valverde et al. (1996) realizaron el mismo tratamiento a lentejas, y el resultado que obtuvieron fue una reducción de 100 % del factor antitriptico. En otro trabajo, Vidal-Valverde et al. (2002) analizaron 18 variedades de arvejas en las cuales se encontró un rango amplio de valores de factor antitriptico, lo cual fue atribuido a influencias de las condiciones climáticas y del suelo durante el cultivo. Por otra parte, en ese mismo trabajo, se comparó la presencia de factor antitriptico entre arvejas y soja, siendo en la última más de 10 veces mayor respecto a las arvejas.

En el caso de **A** la actividad registrada (11 %) fue aún menor que la de **H** (**Figura I.1**). Dado que las determinaciones se realizaron partiendo de masas de **H** y de **A** similares, la cantidad de proteína presente es mayor en el caso de **A**. Si se normaliza el % de inhibición de la tripsina por la masa de proteína presente se obtienen valores de $0,36 \pm 0,08$ %/mg proteína para **H** y $0,278 \pm 0,005$ %/mg proteína para **A**. Esta disminución en el valor sugiere que el factor antitriptico se perdería o inactivaría parcialmente durante la preparación de aislado. De igual manera, Olivera-Castillo et al. (2007) demostraron una reducción de varios factores antinutricionales tales como fitatos, taninos, inhibidores de α -amilasa, lectinas y también de los inhibidores de tripsina, al

preparar aislado proteico de judías (chauchas) a partir de un extracto alcalino y precipitando a pH = 4,33.

Cabe destacar que, con el método de ensayo utilizado, la presencia de inhibidores de tripsina en **H** fue muy baja. Además, cuando las semillas fueron sometidas a remojo y hervor, se dificultó la eliminación posterior de la humedad añadida en dichos procedimientos. En nuestro caso, luego de secar las semillas tratadas a 54 °C durante una noche y preparar luego las harinas, las mismas registraron un contenido de humedad entre 22 y 23 %, lo cual no es deseable y debería aplicarse un tratamiento de secado más drástico para reducir este valor. En el caso de **A** se registró una baja actividad del factor antitriptico. En función de estas observaciones, se decidió continuar el trabajo con productos obtenidos a partir de semillas a las que no se les aplicó el tratamiento térmico para eliminar el factor antitriptico.

1.4.1.2 Composición centesimal

Se realizó el análisis de la **composición de macrocomponentes** de **H** y **A** y se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla I.1**, expresados en base seca (b.s.). El contenido de humedad de **H** fue de $10,38 \pm 0,05$ % comparable con los obtenidos por Millar et al. (2019) quienes informaron valores de humedad de 10,60 % para arvejas verdes y 13,35 % para arvejas amarillas.

Tabla I.1. Composición centesimal en base seca (b.s.) de **H** y **A**

Muestra	Cenizas	Proteínas	Glúcidos	Lípidos	Fibra
H	3,0 ± 0,5	20,0 ± 0,5	58,2*	2,5 ± 0,2	16,3 ± 0,8
A	4,4 ± 0,2	85 ± 3	9,01 ± 0,05#	ND	8,9 ± 0,6

Los valores corresponden al promedio ± SD de al menos dos determinaciones. ND: no determinado

* Calculado por diferencia

Determinado por hidrólisis ácida seguida por el método de Antrona

El elevado contenido proteico en la mayoría de las especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre (Cubero y Moreno, 1983). Jiang et al. (2021) evaluaron 8 cultivares de arvejas amarillas e informaron valores de proteína (f = 6,25) entre 22 y 28 % en b.s. Boye et al. (2010) informaron un valor de 21 % de proteínas (24,6 % en b.s.) en arvejas amarillas de Canadá. Los datos obtenidos en este trabajo por el

ensayo de microKjeldahl mostraron un valor de 20 % (b.s) usando un $f = 5,6$ (si se usa $f = 6,25$ el valor es de 22,3 %) (**Tabla I.1**).

Los contenidos de cenizas (3 %) y lípidos (2,5 %) de **H** fueron bastante parecidos a los informados previamente para arvejas de origen canadiense (2,42 % de cenizas y 2,01 % de lípidos, Boye et al., 2010).

El contenido de fibra dietaria de **H** fue 16,3 % en b.s. La fibra dietaria consiste en el residuo vegetal no digerible, que incluye los polisacáridos no amiláceos, el almidón resistente y la lignina. La fibra alimentaria presenta una serie de propiedades fisicoquímicas que explican los efectos fisiológicos que se le atribuyen. La terminología que diferencia fibra soluble e insoluble permite una útil y sencilla categorización de la fibra alimentaria con diferentes propiedades fisiológicas. Tradicionalmente, se emplea el término fibras solubles porque muchas de ellas forman geles viscosos en el intestino delgado (pectinas y β -glucanos) y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa. Por otro lado, las fibras con una gran influencia en el funcionamiento del intestino grueso son las fibras insolubles (celulosa, parte de las hemicelulosas y lignina). Para arvejas se han informado previamente valores entre 14,1 y 26,7 % de fibra dietaria total de las cuales 10,1 a 15,2 % es fibra insoluble y entre 2,1 y 9,3 % es fibra soluble (Vidal-Valverde et al., 2002; Martín-Cabrejas et al., 2003; Almeida et al., 2006). Cuando se realizó la cuantificación de los hidratos de carbono por el método de hidrólisis ácida seguida del método de Antrona en **H**, los valores obtenidos siempre fueron demasiado altos, llevando a una suma total de componentes (incluyendo la fibra) superior al 100 %. Una posible explicación para estos resultados es que mediante este método (hidrólisis ácida extensa) se estén hidrolizando también componentes de la fibra y por lo tanto también se estén cuantificando. Es por esto que, el valor de hidratos de carbono total de **H** se obtuvo por diferencia, resultando ser un poco menor a los valores informados por Jing et al. (2021) quienes reportaron valores entre 66 y 73 % para hidratos de carbono también calculados de esta manera. Los polisacáridos del endosperma y del cotiledón de las arvejas incluyen, además de almidón, celulosa y hemicelulosas, por aproximadamente un 55 % de pectinas (Zink et al., 2024).

El contenido de proteína de las fracciones extraídas mediante solubilización alcalina y precipitación isoeléctrica es variable, probablemente debido a diferencias en las condiciones de procesamiento. Chakraborty et al. (1979) extrajeron proteínas de arvejas a $\text{pH} = 8,5$ (30 min,

40 °C) seguido de precipitación a pH = 4,5 y obtuvieron 90,1 % de proteína (b.s.). En otro estudio, la harina de arveja (var. Verde Holanda) se dispersó en agua (relación 1:5 p/v, pH = 9, 20 min, temperatura ambiente) seguido de centrifugación y precipitación de proteínas del sobrenadante (pH = 4, temperatura ambiente, 20 min), obteniendo un aislado con 84,9 % de proteína (b.s.) (Fernandez-Quintela et al., 1997). Shand et al. (2007) realizaron una extracción alcalina a pH: 8,5 con posterior precipitación a pH: 4,5 y obtuvieron 85 % (b.s.) de proteínas en aislado de arvejas. Boye et al. (2010) informaron 84,9 % (b.s.) por medio de una precipitación isoeléctrica (relación p/v 1 harina:5 agua, pH 9, 20 min, temperatura ambiente, seguido de centrifugación y precipitación de las proteínas en el sobrenadante a pH 4, temperatura ambiente, 20 min) y 83,9 % (b.s.) cuando realizaron ultrafiltración. En nuestro caso, se logró una concentración de proteínas de alrededor de 4 veces en **A** respecto a la presente en **H** (**Tabla I.1.**), con un valor de 85 % p/p (b.s.). La recuperación de proteínas (g proteína en **A**/100 g proteína en **H**) fue de 56 %. Este valor es muy similar al obtenido por Boye et al. (2010), quienes registraron un rendimiento de 55 % cuando utilizaron el método de precipitación isoeléctrica.

El contenido de cenizas de **A** fue mayor con respecto a **H** (**Tabla I.1**). Sosulski y McCurdy (1987) señalaron que los ácidos y las bases usados en el ajuste del pH durante la extracción de proteínas pueden contribuir a la formación de sales y dan como resultado valores elevados de contenido de cenizas en el aislado.

El procedimiento de preparación de **A** llevó a una eliminación de más del 85 % de los hidratos de carbono presentes en **H** (**Tabla I.1**). El contenido de hidratos de carbono remanentes determinado por hidrólisis ácida seguida del método de Antrona fue muy cercano al contenido de fibra dietaria (9 % p/p, **Tabla I.1**) por lo que se podría inferir que el mayor porcentaje de glúcidos que quedan luego del procedimiento es aportado por componentes de la fibra. Cui et al. (2020) informaron para aislados de arvejas con una concentración de proteína (f = 6,25) de 80 %, valores de carbohidratos entre 6,5 y 8,7 % en base húmeda y aislados proteicos de arveja comerciales (Nutralys F85G, 85 % de proteína) contienen un 10 % de fibra dietaria según el fabricante (Zink et al., 2024). Todos estos valores son comparables a los encontrados en este estudio y, aunque no se ha encontrado información al respecto, probablemente correspondan a componentes de la fibra que se encuentran interaccionando con las proteínas presentes en el aislado.

1.4.1.3. Composición polipeptídica y solubilidad proteica

Se analizó la composición polipeptídica de **H** y **A** mediante los perfiles electroforéticos SDS-PAGE (**Figura 1.2**).

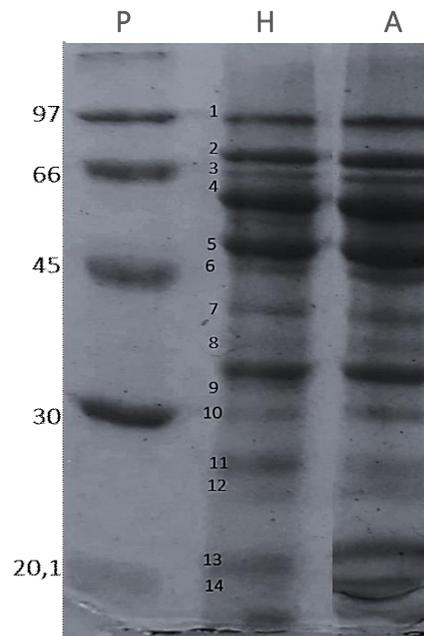


Figura 1.2. Electroforesis SDS-PAGE de **H** y **A**; P: patrón de bajo peso molecular

En todos los casos, se obtuvieron las masas moleculares correspondientes a cada banda a partir de las curvas de calibración ($\log PM$ vs r_f). El perfil polipeptídico de **H** mostró una gran variedad de péptidos entre 14 y 97 kDa. Fue posible detectar bandas que corresponderían a linoleato 9S-lipoxygenasa (banda 1, 93 kDa); alfa-dioxigenasa (banda 2, 77 kDa); convicilina, una importante proteína de reserva presente en arvejas (70 kDa, banda 3); subunidades de legumina (59 kDa, banda 4; 40 kDa, banda 7; bandas 12, 13 (25 y 20 kDa) podrían deberse a subunidades libres, ácidas y básicas respectivamente, de leguminas); subunidades de vicilina (53 kDa (banda 5) y 34 kDa (banda 9), la vicilina, una proteína oligomérica que consiste en tres subunidades polipeptídicas de entre 43 y 53 kDa, en la arveja es heterogénea por lo que dependiendo los genes que codifiquen se pueden producir diferentes polipéptidos; banda 6 (probablemente alfa-galactosidasa, 45 kDa); banda 11 (posiblemente correspondiente a subunidades/polipéptidos de albúmina-2, 28 kDa); y banda 14 (< 20 kDa) correspondería a albúminas. La identificación de estos polipéptidos se llevó a cabo de acuerdo a lo informado por Ma et al. (2017). Lu et al. (2000) mostraron que el perfil SDS-PAGE de la fracción albúmina de arvejas contenía esencialmente dos grupos de proteínas, una banda principal con PM alrededor de 30 kDa y varias bandas alrededor de 14 kDa y menores. Las glutelinas, en

condiciones no reductoras, presentan bandas que se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa (Gorinstein et al., 1991; Martínez y Añón, 1996).

A presentó un perfil similar al de **H**, solo con algunas diferencias de intensidad en las bandas correspondientes a PM < 30 kDa (disminución de la banda 11, aumento de las bandas 13 y 14) (**Figura I.2**). Esto sugiere que en **A** se logran recuperar la mayoría de las proteínas presentes en **H**.

Se estudió la solubilidad en buffer PBS (pH = 7,4) de las proteínas presentes en **H** y **A**. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla I.2**. Cabe aclarar que las determinaciones de la proteína soluble y de la proteína total fueron realizadas por dos metodologías diferentes (Lowry y microKjeldahl, respectivamente). Como puede observarse, las proteínas de **H** presentaron una solubilidad de 70 %. En las condiciones ensayadas, se espera que se solubilizan principalmente las albúminas y las globulinas. Por otra parte, **A** no presentó cambios significativos ($p > 0,05$) en el % de solubilidad proteica respecto de **H**. Ladjal-Ettoumi et al. (2015) informaron solubilidades proteicas de 65 % a pH = 7 y de 70 % a pH = 8 para aislados proteicos de arvejas de Algeria, en buena correlación con los presentes resultados.

Tabla I.2. Solubilidad proteica de **H** y **A** en buffer PBS (pH = 7,4)

Muestra	Solubilidad (g proteína/ 100 g muestra)	Solubilidad (g proteína/100 g proteína total)
H	12,0 ± 0,4	70 ± 3 ^a
A	50 ± 3	67 ± 5 ^a

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se analizó la composición molecular de las fracciones solubles en PBS por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 75 (límite de exclusión = 100 kDa). Se observó que **H** presentó 11 picos, algunos de los cuales se solapan, como puede observarse en la **Figura I.3**. El solapamiento entre los picos I y II constituye la mayor proporción del área total. El pico I apareció en la zona del volumen de exclusión con lo cual correspondería a pesos moleculares (PM) mayores a 100 kDa, es decir los oligómeros de globulinas intactos. El pico II puede deberse en parte a unidades constituyentes de las leguminas (globulinas 11S, tres dímeros constituidos por polipéptidos de 60 kDa que se mantienen unidos por enlaces no covalentes formados por subunidades ácidas y básicas asociadas por puentes disulfuro), como puede observarse el máximo de este pico corresponde a moléculas con PM de 60 kDa; y a las vicilinas (globulinas 7S, trímeros formados por unidades de aproximadamente 50 kDa

estabilizados por interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos y de hidrógeno). Por otro lado, también puede contener albúminas ya que se han descrito distintas moléculas de esta fracción proteica que pueden llegar a tener PM de hasta 80 kDa. También pudo apreciarse presencia relevante de moléculas con PM entre 25 y 43 kDa (pico III), 11 y 16 kDa (pico V), 4 y 7 kDa (pico VI + VII), y 2,7 a 4 kDa (pico VIII). Estos picos corresponderían fundamentalmente a albúminas y algunos péptidos menores.

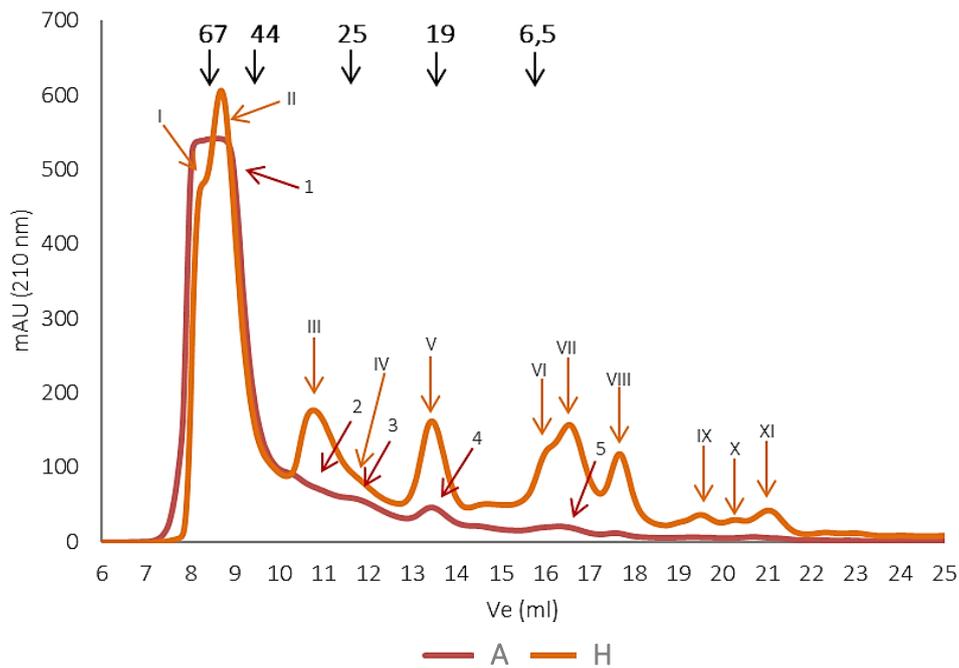


Figura 1.3. Comparación de cromatogramas FPLC de **A** y **H** usando columna Superdex 75. La concentración de proteínas fue normalizada a 1 mg/ml

A diferencia de **H**, el cromatograma de **A** presentó un pico 1 (que correspondería a la suma de los picos I y II de **H**) con mayor abundancia relativa y luego, 4 picos menores (**Figura 1.3**). La comparación entre los cromatogramas de **H** y **A** que fueron normalizados a una misma concentración proteica (**Figura 1.3**) muestra además una pérdida importante, aunque no total de moléculas menores a 43 kDa, fundamentalmente albúminas, durante la preparación de **A**.

1.4.1.4 Compuestos fenólicos (CF).

1.4.1.4.1. Obtención de extractos de CF: Influencia del tipo de solvente y metodología de extracción utilizada.

Con el objetivo de seleccionar la metodología de extracción de CF más adecuada, se aplicaron diferentes protocolos sobre **H** que incluyeron: extracción “convencional” (método 1), extracción ácida (método 2) y, extracción asistida por ultrasonido (EAU, método 3).

Los alcoholes como EtOH y MeOH son adecuados para solubilizar algunos componentes que no son solubles en agua. Lapornik et al. (2005) indicaron que el MeOH tiene características un poco mejores como solvente para extracción de compuestos fenólicos (CF) que el EtOH, aunque las diferencias no son grandes. Sin embargo, desde el punto de vista ambiental, de seguridad e industrial, es preferible utilizar EtOH debido a su baja toxicidad y a la compatibilidad que presenta con los sistemas alimentarios (Pohanka, 2016). Para comparar la aplicabilidad de ambos solventes específicamente en la extracción de CF de arvejas amarillas, se realizaron extracciones (50 mg/ml) usando 60 % y 70 % MeOH y 60 % EtOH (extracción por método 1: agitación durante 3 h, 30 °C, 750 rpm). Se seleccionó esta concentración de EtOH ya que fue utilizada previamente para la extracción de CF de otras leguminosas (Virost et al., 2010; Zhou et al., 2019), mientras que la selección del MeOH al 70 % se debió a su uso previo para extracción de CF en otro tipo de semillas (amaranto, Rodríguez y Tironi, 2020).

La determinación de CFT indicó una extracción significativamente mayor ($p < 0,05$) de sustancias reactivas a Folin-Ciocalteu cuando se utilizó EtOH al 60 % (**Tabla I.3**). Xiao et al. (2015) reportaron resultados similares comparando la extracción de CF de poroto mungo con 80 % EtOH y 80 % MeOH, obteniendo mayor contenido de CFT cuando la extracción se realizó con etanol. Además, se realizó una extracción ácida (EtOH/HCl 97:3, método 2) con el fin de romper posibles interacciones entre los CF y otros componentes de la matriz (Rodríguez y Tironi, 2020) ya que los CF pueden estar unidos a monosacáridos, polisacáridos, fibras o proteínas. Sin embargo, el contenido de CFT obtenido en esta condición no fue significativamente diferente ($p > 0,05$) a los obtenidos con EtOH/agua 60/40 (**Tabla I.3**).

Existe actualmente una creciente demanda de técnicas de extracción eficiente, sostenible y ecológica. La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un proceso rápido que puede reducir el consumo de solventes tóxicos y de energía. Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de esta tecnología para la extracción de CF de **H** y optimizar las mejores condiciones para este proceso, se utilizaron diferentes tiempos de extracción (10, 15 y 20 min) y amplitudes de ultrasonido (40, 60 y 80 %). Las mismas se ensayaron manteniendo constante la relación sólido/solvente (50 mg de **H**/ml de EtOH 60%). Los extractos obtenidos por EAU a menor

potencia (40 %) no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en su contenido de CFT respecto a las extracciones sin ultrasonido (**Tabla I.3**). Sin embargo, a amplitudes mayores (60 y 80 %), se obtuvieron contenidos de CFT significativamente mayores ($p < 0,05$) (entre 0,74 y 0,78 mg AGE/g H b.s.), sin influencia del tiempo de extracción. Como indicaron Luo et al. (2018), este fenómeno de mejora podría atribuirse a la cavitación y a los efectos térmicos de la onda de ultrasonido, que provoca la alteración de la pared celular y el aumento de la transferencia de masa de compuestos de la muestra al líquido.

Tabla I.3. Efecto del protocolo de extracción en el CFT y la actividad antioxidante de los extractos

Solvente	Metodología	Condición	CFT	ORAC	ABTS
			mg AGE/g H (b.s.)	IC ₅₀ (mg AGE/g H b.s.)	IC ₅₀ (mg AGE/g H b.s.)
EtOH/H ₂ O 60/40	Agitación	3 h, 30 °C	0,64 ± 0,01 ^{bc}	0,011 ± 0,001 ^a	0,20 ± 0,01 ^a
MeOH/H ₂ O 60/40	Agitación	3 h, 30 °C	0,48 ± 0,03 ^a	0,030 ± 0,004 ^d	0,46 ± 0,07 ^c
MeOH/H ₂ O 70/30	Agitación	3 h, 30 °C	0,44 ± 0,03 ^a	0,011 ± 0,002 ^a	0,32 ± 0,03 ^b
EtOH/HCl 97/3	Agitación	24 h, 20 °C	0,65 ± 0,02 ^{bc}	0,022 ± 0,003 ^{bcd}	nd
EtOH/H ₂ O 60/40	EAU	10' 40%	0,60 ± 0,03 ^b	0,026 ± 0,003 ^{bcd}	0,22 ± 0,02 ^{ab}
		10' 60%	0,740 ± 0,007 ^{de}	0,024 ± 0,002 ^{bcd}	0,22 ± 0,03 ^{ab}
		10' 80%	0,758 ± 0,005 ^{de}	0,022 ± 0,003 ^{bcd}	0,19 ± 0,03 ^a
		15' 40%	0,68 ± 0,02 ^{cd}	0,019 ± 0,001 ^{ab}	0,15 ± 0,01 ^a
		15' 60%	0,750 ± 0,001 ^{de}	0,026 ± 0,003 ^{bcd}	0,25 ± 0,01 ^{ab}
		15' 80%	0,77 ± 0,02 ^e	0,022 ± 0,002 ^{bcd}	0,21 ± 0,02 ^{ab}
		20' 40%	0,69 ± 0,03 ^{cd}	0,029 ± 0,003 ^{cd}	0,20 ± 0,03 ^a
		20' 60%	0,780 ± 0,001 ^e	0,019 ± 0,002 ^{abc}	0,25 ± 0,02 ^{ab}
		20' 80%	0,78 ± 0,01 ^e	0,020 ± 0,002 ^{abcd}	0,22 ± 0,02 ^{ab}

nd: no detectable

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los valores de CFT obtenidos para H estuvieron dentro del rango reportado por otros autores. Giusti et al. (2017) realizaron extracciones (0,25 mg/ml, 70 % EtOH, pH = 4, y posterior sonicación) de diferentes harinas vegetales reportando un valor de 0,72 mg AGE/g para arvejas verdes partidas. Wu et al. (2023) informaron que el CFT de las harinas de arvejas oscilaba entre 0,126 y 1,286 mg AGE/g, lo que se correlacionaba significativamente con el color y la forma de las cubiertas de las semillas. Comparados con esos resultados, los valores del presente trabajo se encuentran en el medio de este rango.

Para seleccionar la mejor condición, además del contenido de CFT, se realizaron dos pruebas para medir la actividad antioxidante (ORAC y secuestro del radical ABTS^{•+}) obteniendo

curvas dosis-respuesta y calculando los valores de concentración inhibidora del 50 % (IC_{50} , mg AGE/g H b.s.) (**Tabla I.3**). En extracciones convencionales con agitación, se observó una potencia ORAC significativamente ($p < 0,05$) mayor (valores de IC_{50} más bajos) del extracto con 60 % EtOH en comparación con 60 % MeOH y EtOH/HCl y similar a la obtenida con 70 % MeOH. Además, el extracto de EtOH al 60 % fue el que presentó mayor ($p < 0,05$) actividad ABTS⁺. Cuando se aplicó EAU, las muestras obtenidas a 15 min/40 % y 20 min/60 y 80 % presentaron la mayor potencia ORAC ($p < 0,05$), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto a los extractos obtenidos por el método convencional con agitación. Los resultados obtenidos por el método ABTS⁺ no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a la aplicación de EAU, presentando el extracto obtenido a 15 min/40 % una tendencia a un valor de IC_{50} menor. Aunque a mayor tiempo y potencia de ultrasonido probado hubo un aumento en el contenido de CFT, esta tendencia no se tradujo en un aumento en la capacidad antioxidante. Zhou et al. (2019) informaron que un aumento en el tiempo y la potencia en la EAU podría inducir la degradación de los antioxidantes presentes en los extractos. Los presentes resultados demostraron que la extracción convencional (método 1) y la condición EAU de 15 min/40 % de amplitud usando EtOH al 60 % como solvente produjeron extractos con contenido de CFT y actividad antioxidante similares.

Para evaluar el perfil de CF de los diferentes extractos, las muestras obtenidas aplicando EAU 15 min/40 % de amplitud y las de la extracción convencional fueron analizadas mediante HPLC-DAD-FLD.

Cuando se aplicó la extracción convencional por agitación, el uso de EtOH 60 % produjo la extracción más baja de casi todos los CF detectados con respecto al MeOH 60 y 70 % (**Tabla I.4**). Los mayores valores de CFT obtenidos para el extracto con 60 % EtOH (**Tabla I.3**) sugieren que este solvente solubilizaría una mayor cantidad de otras sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu. Sin embargo, al aplicar EAU con 60 % EtOH, muchos de los CF aumentaron su contenido respecto al método convencional, alcanzando valores similares a los registrados en las extracciones con MeOH (**Tabla I.4**).

Los CF se pueden clasificar en términos de sus grupos químicos constituyentes en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Lv et al., 2021). El perfil de CF de H mostró que la mayoría de los compuestos son flavonoides. Entre ellos, la (-)-epigallocatequina (un flavan-3-ol) es el CF mayoritario, y la procianidina B1 (dímero epicatequina-(4 β → 8)-catequina) también

está presente. El primero fue más abundante en los extractos de MeOH mientras que el segundo fue más abundante en el extracto de EAU con 60 % de EtOH (**Tabla I.4**). También se detectaron los flavonoles rutina (quercetina-3-O-rutinósido) y los menos abundantes quercetina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido; la flavanona naringenina (en baja concentración) sólo se encontró en el extracto obtenido por EAU. Respecto al grupo de los estilbenos, el contenido de polidatina (resveratrol-3- β -mono-D-glucósido) fue importante en **H**. Aunque la familia *Leguminosae* es una fuente importante de este tipo de compuestos, hasta donde sabemos, no se había informado previamente en las arvejas amarillas. Kalogeropoulos et al. (2010) informaron la presencia de *trans*-resveratrol en arvejas amarillas y verdes cocidas. Entre los ácidos fenólicos se detectaron los ácidos rosmarínico, cafeico (solo en extractos EAU y MeOH 60 %), *p*-cumárico, gálico, ferúlico y elágico. Además, se encontró OH-tirosol (**Tabla I.4**).

Algunos de los CF encontrados en **H** fueron reportados previamente por otros autores en diferentes partes de la semilla de arveja. Dueñas et al. (2004) identificaron los ácidos fenólicos *trans-p*-cumárico, *cis-p*-cumárico, *trans*-ferúlico y (-)-epigallocatequina en cotiledones de arvejas, y ácido gálico, (-)-epigallocatequina, (+)-catequina, ácido *trans-p*-cumárico y ácido *trans*-ferúlico en la cubierta de la semilla de arveja. Giusti et al. (2017) detectaron ácidos cafeico, *p*-cumárico y ferúlico en partes de arvejas verdes partidas. Borges-Martínez et al. (2021) informaron la presencia de ácido gálico y (+)-catequina en semillas de arvejas. Según Liu et al. (2020), un extracto de MeOH de la fracción fenólica libre de arvejas contenía ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, mientras que la fracción unida a proteínas contenía ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico. Como indicaron Pajak et al. (2014), las diferencias entre los contenidos de compuestos fenólicos reportados en varios estudios podrían resultar de múltiples factores, como la metodología (procedimiento de extracción, diferentes susceptibilidades a la degradación, protocolo analítico para la determinación), especies de plantas y condiciones de crecimiento y almacenamiento.

De acuerdo con estos resultados, la aplicación de EAU con 60 % EtOH permite aumentar la extractabilidad de los CF, produciendo extractos con composición de CF y actividad antioxidante similares a los obtenidos con la extracción convencional con MeOH. Como beneficio adicional, los EAU requieren mucho menos tiempo y utilizan un disolvente más

ecológico y menos tóxico. De esta manera, se seleccionó la EAU (condición: 15 min/40 % de amplitud) para continuar el estudio de los CF de **H**, **A** y sus digeridos gastrointestinales.

Tabla 1.4. Perfil de CF de los extractos obtenidos por distintas metodologías

Compuesto fenólico	EAU ¹		Agitación ²	
	EtOH 60 %	EtOH 60 %	MeOH 60 %	MeOH 70 %
OH-tirosol	1,7 ± 0,1 ^b	0,87 ± 0,09 ^a	1,7 ± 0,2 ^b	1,6 ± 0,1 ^b
Ácidos fenólicos				
Ácido Elágico	0,28 ± 0,02 ^b	0,17 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,02 ^b
Ácido Gálico	0,78 ± 0 ^a	0,78 ± 0 ^a	0,78 ± 0 ^a	0,78 ± 0 ^a
Ácido Cafeico	2,1 ± 0,5 ^a	nd	2 ± 1 ^a	nd
Ácido <i>p</i> -coumárico	1,53 ± 0,01 ^b	0,7 ± 0,1 ^a	1,74 ± 0,01 ^b	1,63 ± 0,06 ^b
Ácido Ferúlico	0,45 ± 0,09 ^{ab}	0,18 ± 0,04 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,6624 ± 0,0005 ^b
Ácido Rosmarínico	5,2 ± 0,4 ^b	2,1 ± 0,6 ^a	5,0 ± 0,3 ^b	4,58 ± 0,03 ^b
Total ácidos fenólicos	10 ± 1	3,9 ± 0,6	10,5 ± 0,3	7,9 ± 0,1
Estilbenos				
Polidatina	26,05 ± 0,04 ^b	9 ± 3 ^a	26,3 ± 0,5 ^b	25,7 ± 0,1 ^b
<i>trans</i> -resveratrol	2,6 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,2 ^a	2,99 ± 0,04 ^{bc}	3,30 ± 0,02 ^c
Total estilbenos	28,6 ± 0,1	11 ± 3	29,3 ± 0,5	29,0 ± 0,1
Flavonoides				
Procyanidina B1	13 ± 6 ^b	5 ± 2 ^{ab}	2,41 ± 0,09 ^a	2,83 ± 0,05 ^a
Rutina	5,2 ± 0,4 ^b	1,8 ± 0,4 ^a	5,2 ± 0,1 ^b	5,18 ± 0,04 ^b
Quercetin-3-glucósido	0,879 ± 0,006 ^b	0,3 ± 0,2 ^a	0,56 ± 0,03 ^{ab}	0,74 ± 0,01 ^b
Kaempferol-3-glucósido	2,3 ± 0,3 ^{ab}	1,7 ± 0,5 ^a	1,84 ± 0,09 ^a	3,3 ± 0,1 ^b
(+)-catequina	1,05 ± 0,04 ^b	0,76 ± 0,04 ^a	1,14 ± 0,04 ^b	1,08 ± 0,02 ^b
(-)-epigallocatequina	59,7 ± 0,2 ^b	35 ± 7 ^a	106 ± 6 ^c	91 ± 3 ^c
(-)-epicatequina	0,55 ± 0,02 ^b	0,37 ± 0,02 ^a	0,54 ± 0,03 ^b	0,54 ± 0,02 ^b
Naringenina	0,32 ± 0,02	nd	nd	nd
Hesperetina	0,71 ± 0,08 ^{ab}	1,1 ± 0,4 ^b	0,58 ± 0 ^{ab}	0,43 ± 0,02 ^a
Total flavonoides	84 ± 6	46 ± 7	119 ± 6	105 ± 3
Total	125 ± 6	62 ± 9	160 ± 6	144 ± 3

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

1.4.1.4.2. Comparación de CF en extractos obtenidos por EAU de **H** y **A**.

El contenido de CFT de los extractos de **A** obtenidos por EAU (15 min, 40 % de amplitud) fue de 0,98 mg AGE/g **A** b.s., significativamente mayor ($p < 0,05$) que el obtenido para **H** (Tabla

I.5). Similares resultados fueron reportados por Rodríguez y Tironi (2020) para aislado proteico de amaranto cuando realizaron la extracción con 70 % de metanol a 25 y 80 °C.

Se detectaron algunas diferencias en el perfil de CF de **A** respecto al de **H**. **A** presentó una mayor proporción de ácidos fenólicos y estilbenos, y una menor proporción de flavonoides que **H**, con similar contenido de CF identificados totales, calculados como la suma de los compuestos cuantificados por HPLC-DAD-FLD (**Tabla I.6**). Respecto a los CF individuales, el OH-tirosol y los flavonoides (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y procianidina B1 (flavanoles), rutina, quercetina-3-glucósido (flavonoles) y hesperetina (flavanona) presentaron un menor contenido en **A** con respecto a **H**. Durante la preparación de **A**, algunos CF originalmente presentes en **H** pueden perderse por solubilización, y algunos compuestos como las catequinas podrían degradarse debido a la condición de pH alcalino de la extracción de proteínas (Li et al., 2012) lo que estaría en correlación con la disminución de estos compuestos en **A**. Por otro lado, hubo un aumento de polidatina (el CF más abundante en **A**), *trans*-resveratrol, kaempferol-3-glucósido, ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido rosmarínico, y la aparición de daidzeína y genisteína (isoflavonas) en **A** (**Tabla I.6**). Los CF que se encontraban originalmente ligados podrían liberarse ya que el tratamiento alcalino podría romper las interacciones entre los CF y las proteínas o la fibra (Rodríguez y Tironi, 2020).

Tabla I.5. CFT y actividad antioxidante de los extractos de **H** y **A**

Muestra	CFT	ORAC	ABTS
	mg AGE/g b.s.	IC ₅₀ (mg AGE/g b.s.)	IC ₅₀ (mg AGE/g b.s.)
H	0,68 ± 0,02 ^a	0,023 ± 0,002 ^a	0,47 ± 0,03 ^a
A	0,98 ± 0,04 ^b	0,017 ± 0,002 ^a	0,6 ± 0,1 ^a

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Analizando la actividad antioxidante, el extracto obtenido a partir de **A** mostró similar ($p > 0,05$) actividad ORAC y ABTS que el correspondiente a **H** (**Tabla I.5**).

Tabla 1.6. Perfil de CF ($\mu\text{g} / \text{g bs}$) de los extractos de H y A

Compuesto	H	A
OH-Tirosol	1,7 \pm 0,1	1,28 \pm 0,06
Ácidos fenólicos		
Ácido elágico	0,28 \pm 0,02	0,21 \pm 0,06
Ácido gálico	0,78 \pm 0	0,84 \pm 0
Ácido siríngico	nd	nd
Ácido cafeico	2,1 \pm 0,5	6,0 \pm 0,5
Ácido <i>p</i> -coumárico	1,53 \pm 0,01	2,08 \pm 0,05
Ácido ferúlico	0,45 \pm 0,09	4,1 \pm 0,1
Ácido rosmarínico	5,2 \pm 0,4	9,26 \pm 0,06
Total ácidos fenólicos	10 \pm 1	22,5 \pm 0,1
Estilbenos		
Polidatina	26,05 \pm 0,04	41,9 \pm 0,5
<i>trans</i> -resveratrol	2,6 \pm 0,1	5,36 \pm 0,08
Total estilbenos	28,6 \pm 0,1	47,3 \pm 0,5
Flavonoides		
Procianidina B1	13 \pm 6	4,56 \pm 0,04
Rutina	5,2 \pm 0,4	nd
Quercetin-3-glucósido	0,879 \pm 0,006	0,42 \pm 0,01
Kaempferol-3-glucósido	2,3 \pm 0,3	6,21 \pm 0
Daidzeina	nd	0,337 \pm 0,002
Genisteina	nd	0,41 \pm 0,07
(+)-catequina	1,05 \pm 0,04	0,64 \pm 0,01
(-)-epigallocatequina	59,7 \pm 0,2	35,2 \pm 0,9
(-)-epicatequina	0,55 \pm 0,02	nd
(-)-galocatequina galato	nd	nd
Naringenina	0,32 \pm 0,02	nd
Hesperetina	0,71 \pm 0,08	0,53 \pm 0,01
Miricetina	nd	nd
Total flavonoides	84 \pm 6	49 \pm 1
Total	125 \pm 6	119 \pm 1

Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de dos determinaciones.

Zhao et al. (2014) analizaron la correlación entre CFT y la actividad antioxidante de 10 variedades de leguminosas e informaron que la actividad antioxidante difería significativamente entre los diferentes extractos de leguminosas pero en general se observó una correlación positiva significativa entre CFT y la actividad de eliminación de DPPH y el poder reductor total de los extractos. En nuestro caso, un aumento en el contenido de CFT y un cambio en el perfil de CF entre A y H no generó cambios significativos en el poder antioxidante.

I.4.2. Digestión gastrointestinal simulada (DGIS) de H y A. Compuestos bioaccesibles.

La evaluación de propiedades bioactivas de componentes alimentarios requiere poder simular la liberación de dichos componentes durante la digestión gastrointestinal, dado que, aunque los ensayos *in vivo* poseen una gran relevancia, los mismos deben ser limitados por razones éticas, así como por su complejidad técnica y la gran variabilidad inter-individual. En este sentido, se realizó una simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de los ingredientes previamente preparados. Para ello, se utilizó un sistema estático, el cual constituye una primera y simplificada aproximación al proceso que ocurre realmente *in vivo*.

Los sistemas estáticos de DGIS consisten en una sucesión de pasos en biorreactores que recrean el ambiente que los alimentos encontrarían al alcanzar cada compartimiento del tracto digestivo. Existen numerosos protocolos para estos estudios los cuales difieren fundamentalmente en el número y tipo de pasos involucrados en la digestión (boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso) y la composición de fluidos digestivos utilizados en cada paso (enzimas, sales, buffers, polímeros biológicos). Las enzimas y otras moléculas biológicas utilizadas en la mayoría de estos ensayos son la pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, peptidasa, α -amilasa, lipasa, sales biliares y mucina. Distintos factores como la concentración de las enzimas, la relación enzima/sustrato, la temperatura, el pH, la estabilidad, la presencia de inhibidores y los tiempos de incubación afectan la actividad enzimática (Hur et al., 2011). Los modelos estáticos son ampliamente utilizados como técnicas de screening, para determinar condiciones claves de hidrólisis. Sin embargo, no reflejan la complejidad del sistema gastrointestinal, tales como las condiciones bioquímicas transientes y el flujo del alimento a través de los distintos compartimientos. Con el fin de lograr una mayor aproximación al sistema real, se han desarrollado sistemas de digestión *in vitro* dinámicos, los cuales incluyen regulación del pH, del flujo dinámico del alimento y de la concentración de enzimas en cada compartimiento (Menard et al., 2014).

En el presente trabajo se evaluaron dos ensayos basados en el protocolo generado en el marco de la Acción INFOGEST de la Unión Europea, el cual cuenta con consenso internacional (Minekus et al., 2014). El método INFOGEST está basado en las condiciones fisiológicas e incluye una fase oral, una gástrica y una intestinal, cada una de ellas contiene soluciones de electrolitos completas cuya composición se detalla en el inciso I.3.2.1. Este es un método donde se tiene en cuenta la digestión de todos los macrocomponentes y puede ser aplicado a diversas

matrices. En la fase inicial de este trabajo se utilizó el *protocolo 1* (sección 1.3.2.1, Materiales y Métodos) en el que la DGIS se realizó en tubo, se utilizaron las enzimas y relaciones enzima/sustrato que habían sido previamente utilizadas en nuestro laboratorio en harinas y aislados proteicos de amaranto (Rodríguez et al., 2020) obteniéndose los digeridos **HD₁** y **AD₁**. Posteriormente, en el *protocolo 2*, la DGIS se realizó en un bio-reactor termostatzado con camisa de vidrio y agitación constante por medio de una paleta y utilizando las enzimas y actividades enzimáticas recomendadas por el protocolo de INFOGEST. Se obtuvieron **HD₂** y **AD₂**. En esta primera parte del Capítulo se compararán los resultados obtenidos por ambos protocolos.

1.4.2.1. Grado de proteólisis (GH), composición peptídica/polipeptídica y solubilidad proteica.

GH es uno de los indicadores más utilizados como un parámetro de monitoreo de la proteólisis (Adler-Nissen, 1979). Los resultados obtenidos para los digeridos gastrointestinales preparados a partir de **H** y **A** se presentan en la **Tabla I.7**. Como puede observarse, el valor para **HD₁** fue significativamente menor a los otros digeridos, mientras que entre **HD₂** y ambas digestiones de **A** los valores no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$), sugiriendo que, en esos casos, las proteínas estaban igualmente disponibles para el ataque de las proteasas. El menor valor obtenido para **HD₁** podría deberse a la agitación deficiente utilizada en ese protocolo, ya que la presencia de los otros componentes de la matriz (que podrían estar interaccionando con las proteínas o generando alguna barrera física para la acción de las proteasas) podría influir en la disponibilidad de las proteínas para las enzimas y, en consecuencia, en el GH %. El largo promedio de las cadenas peptídicas en los hidrolizados (MLP = Mean length of the peptide chains) puede ser estimado a través del grado de hidrólisis como $MLP = 100/GH \%$ (Adler–Nissen, 1979). En todas las muestras se obtuvieron valores de MLP de alrededor de 3 aminoácidos (**Tabla I.7**).

Rodríguez y Tironi (2020) aplicaron diferentes condiciones de DGIS (protocolo interno y protocolo de consenso de INFOGEST, similares a los aplicados en este trabajo) a harina y aislado proteico de amaranto y encontraron comportamientos algo diferentes a los recién descritos para arveja. Informaron que no encontraron diferencias significativas cuando estudiaron el aislado proteico de amaranto, pero si encontraron diferencias cuando ambos protocolos fueron aplicados a harina de amaranto, siendo menor el valor obtenido cuando la DGIS se

realizó con el protocolo de consenso internacional. Asimismo, ambos digeridos de la harina presentaron menores valores de GH que los digeridos de aislado proteico.

Tabla 1.7. Contenido de proteína y GH (método de TNBS) de digeridos gastrointestinales obtenidos por ambos protocolos.

Muestra	Proteína (% p/p)	GH (%)	MLP
HD ₁	16 ± 2	29 ± 2 ^a	3,4
HD ₂	19,1 ± 0,3	36 ± 3 ^b	2,8
AD ₁	45,6 ± 0,1	35 ± 2 ^b	2,9
AD ₂	39,2 ± 0,2	37 ± 1 ^b	2,7

El valor de GH se calculó tomando como valor inicial (0) los correspondientes a los blancos de muestra de **H** o **A**, según corresponda.

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se determinó el contenido de proteína en los digeridos gastrointestinales liofilizados a través del método de microKjeldahl, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 1.7**. La proteína presente en los digeridos proviene de la proteína de arveja de las muestras así como de las enzimas digestivas agregadas en una relación aproximada de 40/60 según estimaciones realizadas a partir de los contenidos de proteínas encontrados en los digeridos en el blanco de reactivos (**BR**). Además, la composición se ve afectada por el agregado de otros sólidos presentes en los fluidos de digestión. En este sentido, de acuerdo con la formulación de las distintas etapas del proceso de DGIS, fue posible estimar que aproximadamente el 75 % de los sólidos de los reactivos de digestión correspondían a sales biliares y electrolitos, mientras que el otro 25 % correspondería a las enzimas digestivas. En la **Tabla 1.7** puede observarse que el contenido proteico de los digeridos de **H** no se modificó de manera significativa ($p > 0,05$) respecto al de **H** (20 %, **Tabla 1.1**). Sin embargo, en el caso de **A** (85 %) se apreció una disminución significativa ($p < 0,05$) y marcada, donde esto puede ser explicado por el hecho de que para la preparación de los digeridos se partió de 5 g de harina y de 1 g de aislado a fin de tener cantidades similares de proteína a digerir, por lo que el efecto de dilución ejercido por todas las sales agregadas con los jugos gastrointestinales es mayor en el caso de aislados.

Se realizaron corridas electroforéticas a fin de analizar la composición molecular de los digeridos gastrointestinales. En el caso de los digeridos obtenidos por el protocolo 1, en los geles de SDS-PAGE fue necesario realizar una tinción con plata ya que con la tinción con Coomassie Blue no se detectaron bandas. De esta manera, pudo registrarse que las bandas

presentes en **H** y en **A** desaparecieron en una proporción muy alta (**Figura I.4.A**), quedando solo algunos remanentes de bandas correspondientes a PM < 60 kDa. Pudieron detectarse además bandas nuevas con PM > 97 kDa (19, y 20, **Figura I.4.A**) que podrían ser atribuidas a productos de hidrólisis de otros polipéptidos mayores que no ingresaban a los geles. La gran mayoría de los productos de digestión corresponderían a moléculas de bajo PM que escaparon de este gel.

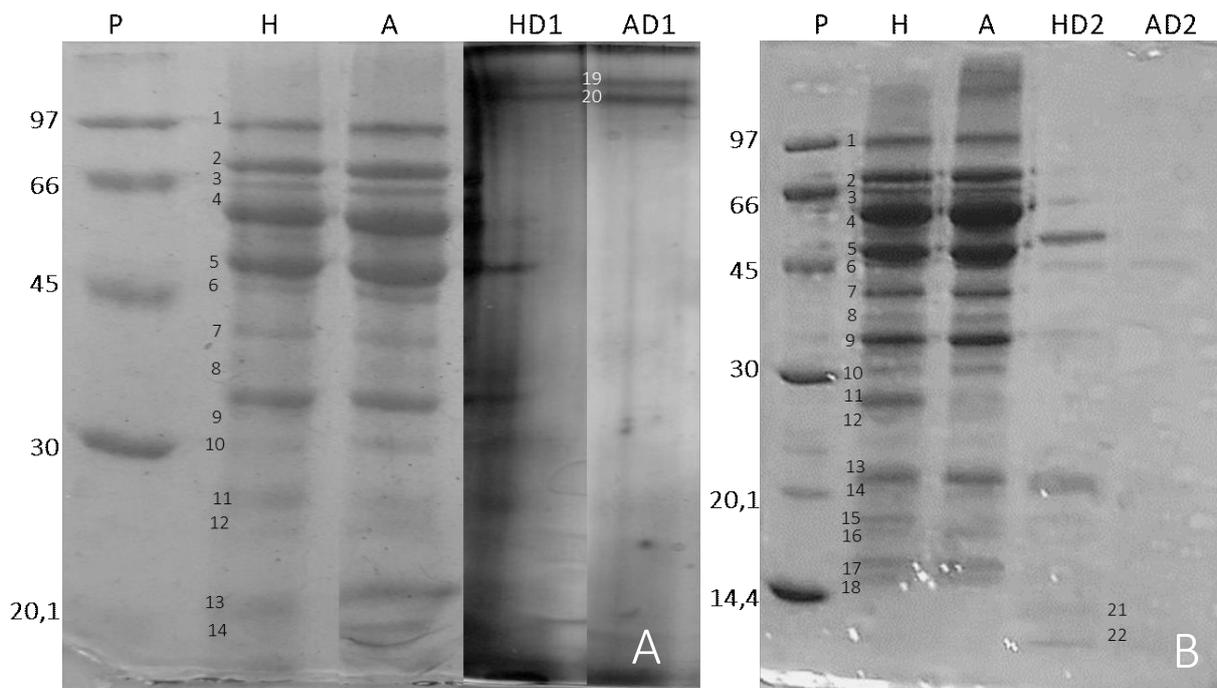


Figura I.4. Electroforesis SDS-PAGE **A.** H (33 µg); A (33 µg) tinción con coomassie blue; HD₁ (23 µg); AD₁ (34 µg) tinción con plata; **B.** H (33 µg); A (38 µg); HD₂ (28 µg); AD₂ (20 µg) tinción con Coomassie Blue (P) patrón de bajo PM. Entre paréntesis se muestra la cantidad de proteína sembrada

Cuando se analizaron los perfiles de los digeridos obtenidos por el protocolo 2 (**Figura I.4.B**), **HD₂** presentó desaparición de la mayoría de los polipéptidos, quedando remanentes de las bandas 4 (51 kDa), 5 (43 kDa) y 6 (de unos 35 kDa), 9, 13, 15 (leguminas y albúminas), evidenciando que algunos polipéptidos presentes en la harina de arveja resistieron la digestión gastrointestinal. Estos remanentes también aparecieron en **HD₁** con menor intensidad. También se evidenció en **HD₂** la aparición de moléculas con PM < 14,4 kDa (bandas 21 y 22), quedando con el frente de corrida en el caso de **HD₁** por la forma en la que corrió esta electroforesis. En los digeridos del aislado proteico, no se observaron bandas remanentes en **AD₁** y apenas unas bandas muy tenues (5 y 6) en **AD₂**, evidenciando una mayor acción de las enzimas que en el caso de **H**.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se analizó el perfil electroforético del **BR** realizado para el protocolo consenso (protocolo 2), siendo necesario aumentar en un 50 % la cantidad sembrada por calle para lograr detectar algunas bandas luego de la tinción con plata. Tanto en ausencia como en presencia de 2-ME se logró evidenciar una banda tenue a ~60 kDa y una correspondiente a PM > 97 kDa. También aparecieron algunas bandas muy tenues con PM < 20 kDa en los geles de tricina-SDS-PAGE (Rodríguez y Tironi, 2023). Estos datos indican que la gran mayoría de las bandas observadas corresponden a polipéptidos o productos de proteólisis de las proteínas de arveja.

Se evaluó la concentración de proteína soluble (por el método de Lowry). En la **Tabla I.8.** se presentan estos resultados junto con los correspondientes valores de solubilidad proteica % (respecto a la proteína total) de los digeridos en comparación con las muestras sin digerir. Puede observarse que en el caso de **HD₁**, **HD₂** y **AD₁** no se produjeron cambios significativos ($p > 0,05$) luego de la DGIS. Estos resultados sugieren que la hidrólisis se produjo fundamentalmente sobre moléculas proteicas que eran solubles en las muestras de partida. Sin embargo, **AD₂** presentó un valor significativamente ($p < 0,05$) mayor que **A** y también que el resto de los digeridos.

A fin de evaluar los tamaños de las moléculas solubles, se llevaron a cabo cromatografías de filtración en gel (FPLC) en columna Superdex 30 (rango de separación óptimo < 10 kDa). Se pudo observar que en los cromatogramas pertenecientes a **H** apareció un pico mayoritario (pico 1) con un volumen de elución (V_e) correspondiente al volumen de exclusión de la columna al que se solapa un segundo pico (pico 2) conteniendo ambos las moléculas de mayor PM (> 10 kDa). Apareció además un pico correspondiente a moléculas con PM > 6,5 kDa (pico 3) y otros 4 pequeños picos con PM entre 2 y 0,1 kDa (**Figura I.5**).

Tabla I.8. Concentraciones de proteína soluble y solubilidad proteica de **H**, **A** y sus digeridos gastrointestinales.

Muestra	PS (mg/ml)	Solubilidad (g PS/ 100g PT)
H	1,28 ± 0,04	70 ± 3 ^a
HD₁	1,23 ± 0,03	77 ± 10 ^{ab}
HD₂	2,7 ± 0,8	63 ± 10 ^a
A	5,3 ± 0,3	67 ± 5 ^a
AD₁	3,6 ± 0,3	79 ± 7 ^{ab}
AD₂	8,2 ± 0,9	93 ± 3 ^c

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones

PS: proteína soluble en PBS determinada por el método de Lowry a partir de dispersiones de 10 mg/ml para las muestras del protocolo 1 y de 20 mg/ml para las del protocolo

PT: proteína total determinada por microKjeldhal

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

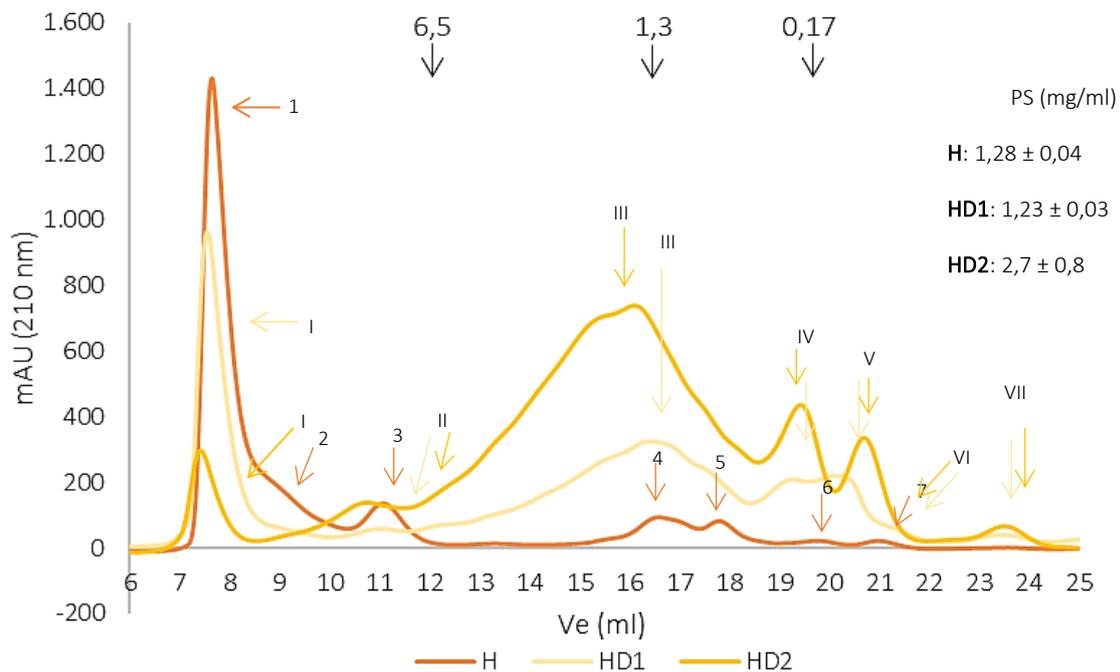


Figura I.5. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de H, HD₁ y HD₂. Se indican los marcadores de PM en la parte de arriba.

En el caso de **A** se observaron tres picos principales (picos 1, 2 y 3) correspondientes a PM > 6,5 kDa con la mayor proporción correspondiente a moléculas con PM > 10 kDa (pico 1+2), y un pico menor (pico 4) correspondiente a PM entre 0,5 y 1,6 kDa (**Figura I.6**). La comparación de este cromatograma frente al de **H** (**Figura I.5**) indica la pérdida de componentes solubles de bajo PM (fundamentalmente < 10 kDa) en **A**.

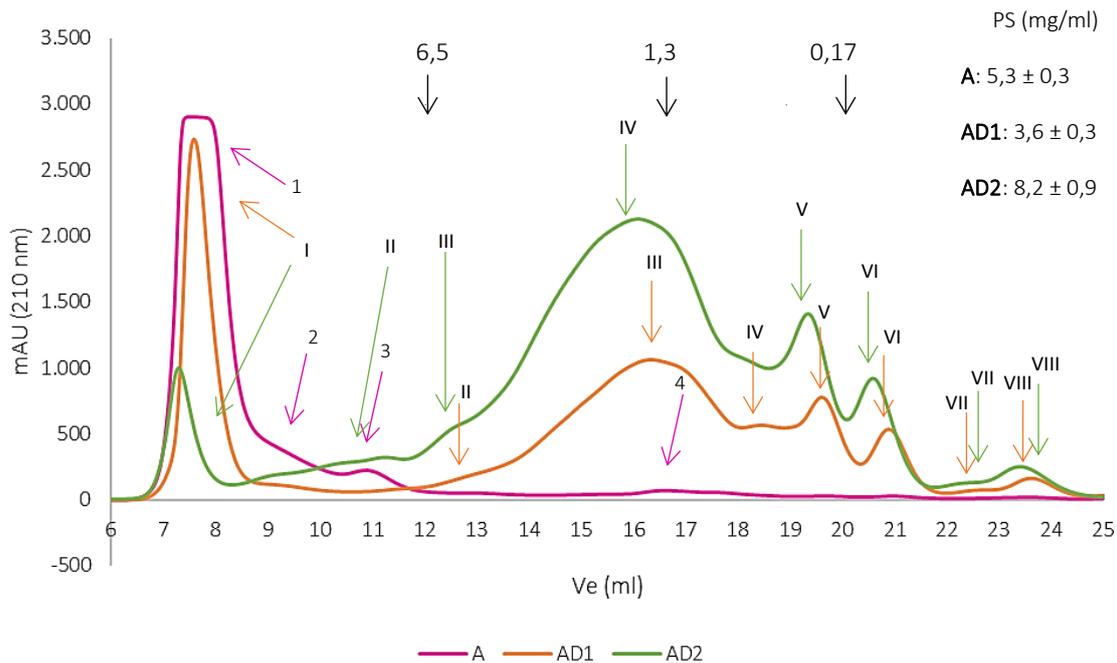


Figura I.6. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **A**, **AD₁** y **AD₂**. Se indican los marcadores de PM en la parte de arriba.

Luego de la DGIS de **H**, se observó el mismo comportamiento entre los digeridos obtenidos por ambos protocolos donde hubo una disminución de los picos 1, 2 y 3 (PM > 6,5 kDa) indicando que parte de esas moléculas fueron atacadas por las enzimas, siendo esta disminución más evidente en el digerido **HD₂**. Además, se observó la aparición del pico II+III involucrando un amplio rango de moléculas menores a 6,5 kDa, pero con un máximo alrededor de 1,3 kDa (correspondiente a péptidos de alrededor de 12 aminoácidos tomando como PM promedio de los aminoácidos el valor de 110 Da). Este pico resultó tener mayor área en el caso del digerido obtenido mediante el protocolo 1 (**HD₁**). También se encontraron dos picos solapados (picos IV y V) correspondientes a PM entre 0,1 y 0,5 kDa (correspondientes a aminoácidos libres hasta péptidos de 4 aminoácidos) en **HD₁** que resultaron con mayor resolución pero menor área en **HD₂**. Por último, se registraron otros dos picos menores (VI y VII) correspondientes a masas más pequeñas que podría corresponder a la liberación de algún otro tipo de componente (no proteico) durante la digestión gastrointestinal (**Figura I.5**). Como se indica en la figura, la concentración de proteína soluble de **HD₂** fue el doble que la de **HD₁**, eso se ve reflejado en los cromatogramas obtenidos para esas muestras.

En el caso de **A**, la DGIS produjo una disminución del área de los picos 1, 2 y 3, permaneciendo parte de esas moléculas en **AD₁** y prácticamente no encontrándose en **AD₂**. Además, en el digerido **AD₁** aparecieron diversos picos correspondientes a moléculas con PM menores a 7,1 kDa (picos III a VIII); una gran proporción correspondió a péptidos con masas alrededor de 1,3 kDa (pico III), siendo también relevantes las moléculas con PM entre 0,1 y 0,4 kDa (picos V y VI) que corresponderían a aminoácidos libres a péptidos de 2 a 4 aminoácidos. También en estos casos se observó presencia de moléculas con masas menores a las de un aminoácido libre (pico VIII). Este comportamiento de aumento de moléculas con PM < 6,5 kDa también se registró en el aislado digerido obtenido por el protocolo 2 (**AD₂**) (**Figura I.6**). Cabe remarcar en este caso, que la concentración de proteína soluble de **AD₂** fue más del doble que **AD₁** y esto se ve reflejado en el aumento de las áreas obtenidas para **AD₂** con respecto a las de **AD₁** siendo que los perfiles fueron muy similares.

Si, a fin de eliminar efectos de las distintas concentraciones de proteínas en las muestras, se comparan los cromatogramas normalizados (1 mg proteína/ml) correspondientes a los digeridos de **H** y de **A** realizados con el mismo protocolo de DGIS, puede observarse más claramente que existen algunas diferencias en la composición molecular de los mismos (**Figura I.7**). Por ambos métodos de DGIS, **AD** presentó una proporción algo mayor de moléculas con PM < 2 kDa con respecto a **HD**. Además, el proceso de DGIS realizado con el *protocolo 2*, produjo una mayor disminución de las moléculas mayores a 6,5 kDa (**Figura I.7.B**) indicando un mayor ataque enzimático sobre esas moléculas.

Hasta el momento se analizaron digeridos obtenidos mediante dos protocolos diferentes y pudieron describirse algunas diferencias en lo que respecta a la digestión proteica, debidas a cambios en los protocolos de digestión. Las diferencias entre ambos protocolos se centraron principalmente en el modo de agitación (en el *protocolo 1* los tubos cónicos se agitaron en agitador rotacional y en el *protocolo 2* la agitación se hizo directamente a la mezcla de digestión por medio de una paleta) y las actividades enzimáticas utilizadas. Como se discutió anteriormente, el GH proteico fue menor en el digerido de la harina realizado por el *protocolo 1*, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el digerido de la harina realizado por el *protocolo 2* y los digeridos del aislado por ambos métodos.

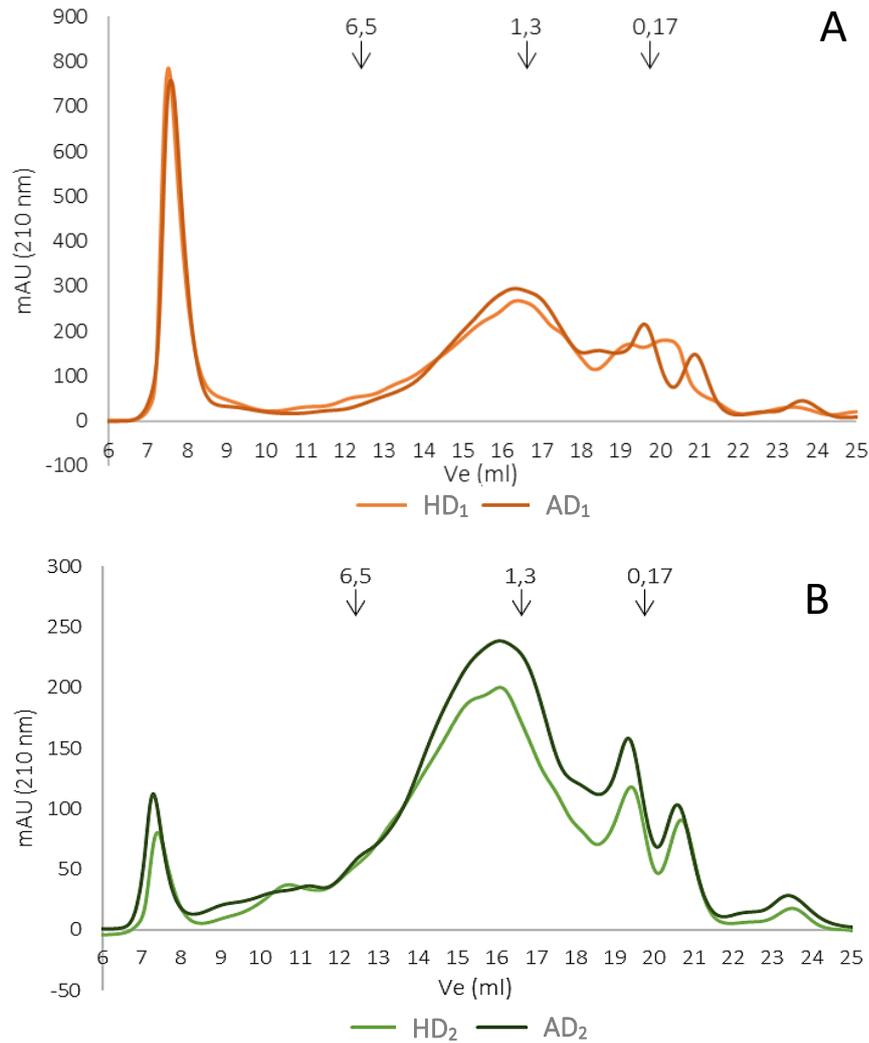


Figura 1.7. Comparación de cromatogramas FPLC de filtración en gel (Superdex 30) de los digeridos de harina y aislado obtenidos por: **A.** protocolo 1 de DGIS: **HD₁** y **AD₁**; **B.** protocolo 2 de DGIS: **HD₂** y **AD₂**. Los cromatogramas se normalizaron a 1 mg proteína/ml.

También se observó que la DGIS realizada con el *protocolo 1* produjo un menor ataque de las moléculas más grandes, lo que se tradujo en picos mayores correspondientes al volumen de exclusión en las cromatografías, así como en menores valores de solubilidad proteica. Esto podría deberse a la diferencia en la forma de agitación en cada método y a las actividades enzimáticas utilizadas ya que hubo un cambio de enzimas entre un protocolo y otro. Si bien se encontraron algunas diferencias en los digeridos, también se notó que el pico mayoritario correspondiente a moléculas alrededor de 1,3 kDa tuvo un máximo de absorbancia en torno a los 250-300 mAU para los digeridos por ambos protocolos lo que podría estar relacionado con

el GH que no tuvo diferencias significativas entre **HD₂**, **AD₁** y **AD₂** y que fue un poco menor para **HD₁**.

En lo que resta de esta tesis, se continuará trabajando con el *protocolo de digestión 2* que es el que respeta todas las condiciones del protocolo de consenso COST INFOGEST. Las muestras ya no serán identificadas con el número 1 o 2 a partir de este momento y serán llamadas **HD** y **AD**.

1.4.2.2. Análisis de fracciones acuosas bioaccesibles.

Se analizaron las fracciones solubles directas (**sd**) preparadas por centrifugación directa de los digeridos **HD** y **AD**. La **Tabla I.9** muestra la concentración de proteína en estas fracciones solubles en comparación con los solubles obtenidos por resuspensión de los digeridos liofilizados en PBS (20 mg/ml) analizados en la sección anterior (**s**). Como puede observarse, los reactivos de digestión a través de las distintas enzimas utilizadas, aportan una proporción minoritaria a la proteína soluble de los digeridos (**BR_{sd}**), que correspondió a un 6,7 % en el caso de **HD_{sd}** y a un 8,6 % en el caso de **AD_{sd}**.

Tabla I.9. Concentración de proteína (mg /ml) en las fracciones solubles de **HD**, **AD** y **BR**

Tipo de Muestra	HD	AD	BR
Soluble en PBS (s)	2,7 ± 0,8	8,2 ± 0,9	
Soluble directo (sd)	28 ± 4	21 ± 1	1,8 ± 0,5
Tratado con colestiramina (sb)	20 ± 2	8,3 ± 0,5	0,4 ± 0,1

Cuando se compararon los perfiles FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30, normalizados por su contenido de proteína) de **HD_s** y **HD_{sd}** se observó que el pico correspondiente a V_0 fue mucho más importante para **HD_{sd}** indicando una mayor presencia de moléculas de mayor PM en los solubles directos (o menor solubilización en PBS), mientras que los perfiles fueron semejantes para $PM < 6,5$ kDa (**Figura I.8.A**). En el caso de los solubles de **A** se observó un comportamiento diferente; todos los picos mostraron menor intensidad en el caso de **AD_{sd}** con respecto a **AD_s** (**Figura I.9.A**).

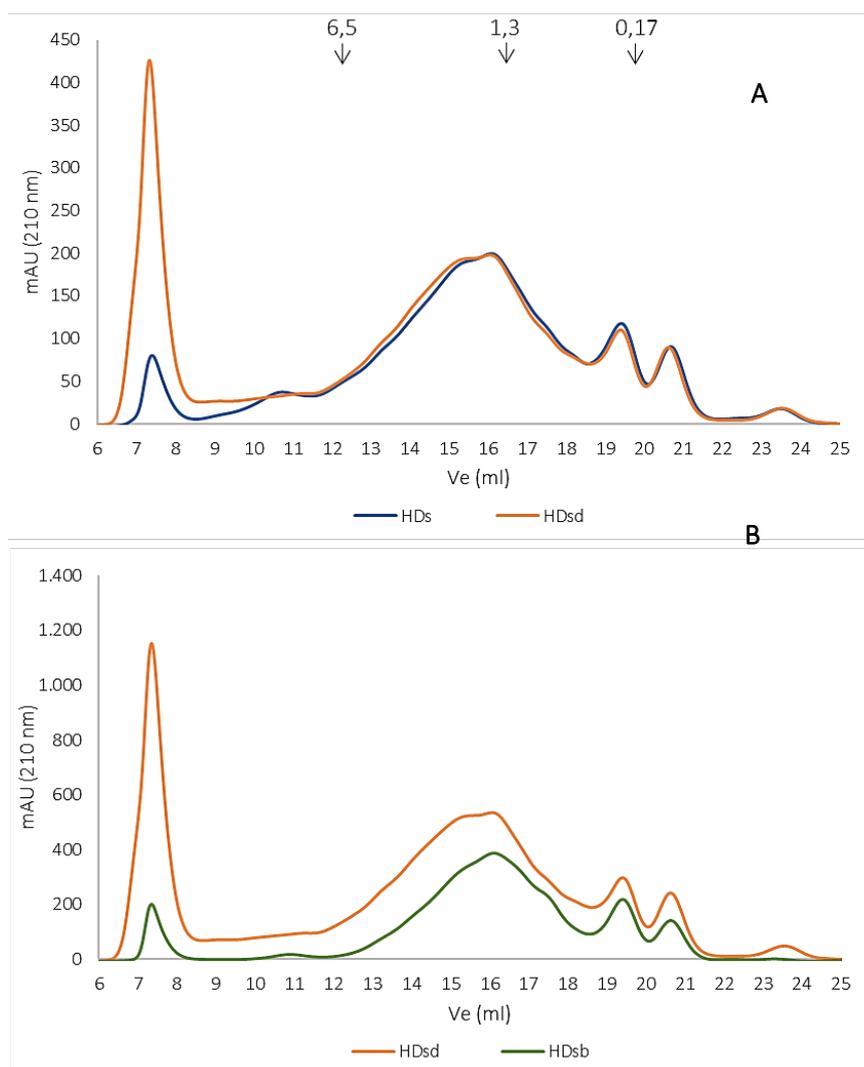


Figura 1.8. Comparación de cromatogramas FPLC (*Superdex 30*) de los solubles resuspendidos en PBS (s), directos (sd) y bioaccesibles (sb) de H. A. HD_s y HD_{sd}. La concentración de proteína se normalizó a 1 mg/ml. B. HD_{sd} y HD_{sb}.)

También se estudió el efecto del tratamiento con colestiramina sobre estos solubles directos a fin de analizar si la resina eliminaba también compuestos de naturaleza proteica. Se observó que la fracción bioaccesible de HD (HD_{sb}) presentó una disminución de todos los picos (esto en todo el rango de PM evaluado) con respecto a HD_{sd}, siendo más importante para las moléculas mayores a 6,5 kDa y aquellas de muy bajo PM (último pico) de las moléculas más pequeñas (Figura 1.8.B). Estos cambios en los perfiles cromatográficos pueden correlacionarse con los valores de proteína soluble obtenidos; en el caso de HD_{sb}, la pérdida de proteína soluble fue de alrededor de un 31 % (Tabla 1.9). De la misma manera, la fracción bioaccesible de AD (AD_{sb}) también presentó una disminución de todos los picos con respecto a AD_{sd},

desapareciendo casi completamente el pico correspondiente a V_0 (**Figura I.9.B**). Analizando el contenido de proteína soluble de estas muestras, se observó que la pérdida de dichas moléculas fue del orden del 61 % para AD_{sb} con respecto a AD_{sd} (**Tabla I.9**).

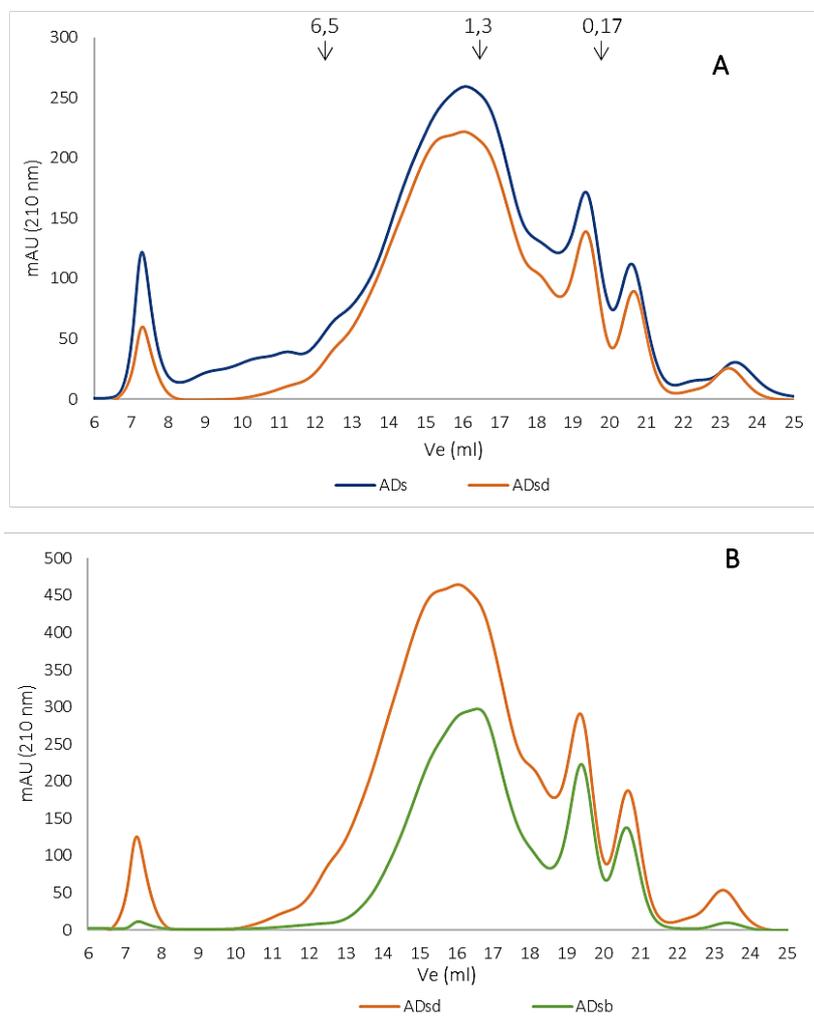


Figura I.9. Comparación de cromatogramas FPLC (*Superdex 30*) de los solubles resuspendidos en PBS (s), directos (sd) y bioaccesibles (sb). **A.** AD_s y AD_{sd} (masa de proteína normalizada a 1 mg/ml); **B.** AD_{sd} y AD_{sb} .

Analizando las cromatografías de la fracción BR_{sd} se observó que los reactivos de digestión aportan una pequeña proporción de compuestos con $PM > 10$ kDa y diversos componentes con PM entre 6,5 y 0,1 kDa dentro de los cuales se encontrarían las sales biliares. En el BR_{sb} se verificó una disminución de todos los picos presentes en BR_{sd} , incluyendo el rango de PM (entre 0,2 y 0,6 kDa, 18-20 ml en los cromatogramas) correspondiente a las sales biliares; además, desaparecieron los compuestos de mayor tamaño (V_0) y también los compuestos más

pequeños (< 0,1 kDa) (**Figura I.10**). Cabe aclarar que los ácidos biliares tienen diferentes capacidades de absorción de la luz UV, dependiendo de su estructura; los ácidos biliares conjugados con glicina o taurina presentan buena absorción en el UV-visible pero para los ácidos biliares no conjugados, la detección se encuentra limitada debido a su pobre absorbancia (Kakiyama et al., 2006). Por ello, no puede descartarse que algunos componentes presentes en los digeridos no hayan sido detectados en los cromatogramas (Rodríguez, 2022). Estos resultados muestran que una parte importante de los componentes eliminados por la colestiramina corresponden a reactivos de digestión (sales biliares, enzimas). Rodríguez y Tironi (2023) demostraron que el tratamiento con colestiramina de fracciones solubles en agua de digeridos de productos de amaranto resultó en una reducción importante de los ácidos biliares, pero también de compuestos de naturaleza proteica del amaranto y de las enzimas digestivas. En un estudio en paralelo realizado en nuestro laboratorio pudo determinarse que el contenido de bilis de las fracciones bioaccesibles de **HD** y **AD** (0,23 mM en ambos) disminuyó alrededor de 50 veces con respecto a los solubles directos (11-13 mM).

En estudios previos se ha demostrado que muchas proteínas alimentarias o sus hidrolizados/péptidos tienen un cierto grado de interacción con las sales biliares, que ha sido evaluada midiendo su capacidad de unión y precipitación de las sales biliares o analizando cómo se ve afectada la solubilización de moléculas hidrofóbicas como el colesterol en micelas de sales biliares. Estos fenómenos *in vitro* se correlacionan con los efectos observados *in vivo* que muestran en términos generales que la ingestión de muchas proteínas, especialmente de origen vegetal, reduce los marcadores lipídicos. Si bien esta interacción dependerá del tamaño y características fisicoquímicas de los péptidos, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel central en la afinidad y capacidad de unión, siendo mayor esta afinidad hacia los ácidos biliares hidrofóbicos. Diversos estudios *in vitro* muestran que péptidos de diferentes tamaños, incluyendo productos de la digestión gastrointestinal pueden secuestrar sales biliares, en ocasiones al mismo nivel que lo hace la colestiramina colestiramina (Bellesi y Pilosof, 2021). En función de esto, es probable que el tratamiento con colestiramina elimine proteínas/péptidos que se encuentran interaccionando con las sales biliares, como muestran los resultados descriptos anteriormente.

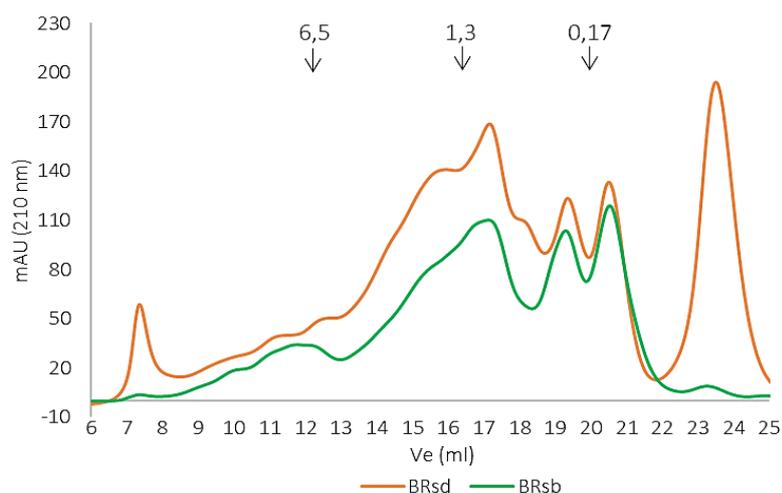


Figura 1.10. Comparación de cromatogramas FPLC (Superdex 30) de los solubles directos (sd) y bioaccesibles (sb) de **BR**. Los cromatogramas fueron normalizados a una concentración de 1 mg proteína/ml.

1.4.2.3. Fracciones solubles en etanol/agua: CF.

Después del proceso de DGIS (*protocolo 2*), **HD** y **AD** presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) y notable en el contenido de CFT de los extractos obtenidos con etanol 60 % y EAU (**e**) en comparación con las muestras no digeridas, siendo este valor significativamente mayor para **AD** (Tabla I.10). Esto indicó que la DGIS produjo una liberación significativa de compuestos solubles en EtOH 60 % y cuantificables por Folin-Ciocalteu.

Tabla I.10. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos¹

Muestra	CFT (mg AGE/g b.s.)
Sin digerir	H _e 0,68 ± 0,02 ^a
	A _e 0,98 ± 0,04 ^b
Después de DGIS	HD _e 5,04 ± 0,07 ^d
	AD _e 13,5 ± 0,1 ^f
Después de colestiramina (bioaccesible)	HD _{esb} 3,1 ± 0,1 ^c
	AD _{esb} 10,3 ± 0,1 ^d

¹ EAU: EtOH 60 %, 15 min, 40 % amplitud. En el caso de **HD** y **AD**, CFT se refirió a la masa original de **H** y **A** usadas en la DGIS. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En contraposición con los resultados de CFT por Folin, mediante HPLC-DAD-FLD se identificaron y cuantificaron en **HD_e** una cantidad de CF algo menor a la encontrada en **H_e** (Tabla I.10). Como puede observarse en esta tabla y en la **Figura I.11**, la disminución más importante

ocurrió en el grupo de los flavonoides. Muchos de los CF presentes en **H_e** no fueron detectados en **HD_e**, especialmente algunos compuestos flavonoides no mayoritarios (quercetina-3-glucósido, naringenina, hesperetina, (+)-catequina) y los más abundantes (procianidina B1) y (-)-epigallocatequina). Sin embargo, la (-)-epicatequina aumentó y apareció (-)-galocatequina galato en la muestra **HD_e** (**Tabla I.11**). Estos resultados sugieren procesos de hidrólisis, modificación e isomerización de catequinas durante la DGIS. Estudios previos realizados sobre las catequinas del té verde demostraron una pérdida de este tipo de compuestos tras la digestión *in vitro* que fueron atribuidos a la formación de radicales libres de semiquinona en el residuo de pirogalol del anillo B a pH casi neutro, presentando la epigallocatequina (mayoritaria en **H**) una alta tendencia a esta modificación (Oh et al., 2021). Además, se ha demostrado que las procianidinas son inestables al pH gástrico, y se ha observado degradación de las procianidinas y epimerización en el ambiente intestinal alcalino suave (Bouayed et al., 2012). Por otra parte, el flavonoide rutina no mostró cambios significativos después de la DGIS (**Tabla I.11**). El estilbeno polidatina presentó una reducción significativa ($p < 0,05$) pero pequeña junto con un aumento en el contenido de *trans*-resveratrol (**Tabla I.11**). Además, el OH-tirosol y el ácido ferúlico aumentaron mientras que los ácidos cafeico, *p*-cumárico y rosmarínico disminuyeron en **HD_e** con respecto a **H_e**. Estos resultados sugieren que la DGIS produjo varios efectos en los CF de **H**, incluidas modificaciones químicas, pero también la liberación de algunos compuestos. De esta manera, el perfil de CF en **HD** fue significativamente diferente al de **H**.

En cuanto a la DGIS de **A**, el contenido total de CF identificados por HPLC en **AD_e** fue superior al encontrado en **A_e** (**Tabla 1.10**), dado fundamentalmente por un aumento muy importante de los ácidos fenólicos, disminuyendo los otros tipos de CF (**Figura I.11**). De los 17 CF detectados en esta muestra, solo 4 se identificaron en **AD_e**: aumento de ácido elágico y (+)-catequina, disminución de ácido rosmarínico, y *trans*-resveratrol sin cambios. Además, en **AD_e** aparecieron (-)-galocatequina galato (como en **HD_e**), miricetina (un flavonol) y una cantidad notoria de ácido siríngico (un ácido hidroxibenzoico) (**Tabla I.11**). Estos resultados mostraron diferencias notables entre la composición de CF de **HD_e** y **AD_e**.

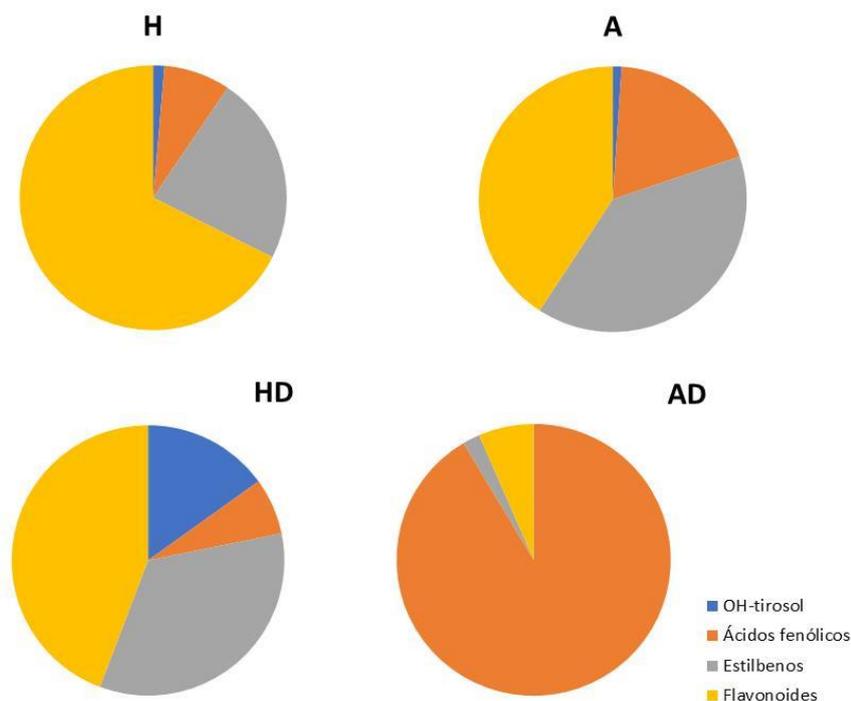


Figura I.11. Distribución de los distintos tipos de CF identificados en los extractos etanólicos de **H, A, HD y AD.**

Cao et al. (2021) estudiaron los efectos de DGIS sobre la bioactividad y la bioaccesibilidad de los extractos etanólicos de cáscara de maracuyá. Encontraron varios CF que mostraron una disminución significativa y tenían una baja estabilidad después de DGIS, entre los que se pueden mencionar: quercetina 3-glucósido (como en **HD y AD**), naringenina (como en **HD**), rutina (no modificada en nuestros digeridos) y polidatina (ligeramente disminuida en nuestros digeridos).

Ma et al. (2021) estudiaron los CF de la cáscara de arvejas rojas y amarillas después de la DGIS observando, de acuerdo con los presentes resultados, que el CFT, el contenido total de flavonoides y los CF individuales (estos últimos solo determinados en la cáscara de arvejas rojas) disminuyeron a lo largo de los pasos secuenciales de la digestión. Sancho et al. (2015) mostraron una reducción entre 52 y 75 % de los CF luego de someter dos variedades de poroto a DGIS y atribuyeron esta disminución a la inestabilidad de estos compuestos a valores de pH altos. De esta manera, diversos estudios reportaron distinta estabilidad de los CF durante la digestión salival, gástrica e intestinal de las legumbres. En general, la divergencia de los resultados podría explicarse posiblemente por las diferencias en las variedades de leguminosas estudiadas, los diferentes disolventes de extracción utilizados, sumados al efecto de la matriz

alimentaria y por las diferentes condiciones experimentales aplicadas (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

Tabla 1.11. Composición de CF de extractos etanólicos.

Compuesto	H _e	A _e	HD _e	AD _e
OH-Tirosol	1,7 ± 0,1 ^b	1,28 ± 0,06 ^a	13,6 ± 0,1 ^c	nd
Ácidos fenólicos				
Ácido elágico	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,06	0,22 ± 0,01 ^a	5,11 ± 0,03 ^b
Ácido gálico	0,78 ± 0 ^a	0,84 ± 0 ^b	nd	nd
Ácido siríngico	nd	nd	nd	220 ± 9
Ácido cafeico	2,1 ± 0,5 ^b	6,0 ± 0,5 ^c	0,7 ± 0,2 ^a	nd
Ácido <i>p</i> -coumárico	1,53 ± 0,01 ^b	2,08 ± 0,05 ^c	1,11 ± 0,05 ^a	nd
Ácido ferúlico	0,45 ± 0,09 ^a	4,1 ± 0,1 ^c	0,80 ± 0,05 ^b	nd
Ácido rosmarínico	5,2 ± 0,4 ^c	9,26 ± 0,06 ^d	3,30 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,02 ^a
Total ácido fenólicos	10 ± 1	22,5 ± 0,1	6,1 ± 0,2	225 ± 9
Estilbenos				
Polidatina	26,05 ± 0,04 ^b	41,9 ± 0,5 ^c	23,2 ± 0,3 ^a	nd
<i>trans</i> -resveratrol	2,6 ± 0,1 ^a	5,36 ± 0,08 ^b	7,5 ± 0,1 ^c	5 ± 1 ^b
Total estilbenos	28,6 ± 0,1	47,3 ± 0,5	30,7 ± 0,3	5 ± 1
Flavonoides				
Procianidina B1	13 ± 6 ^b	4,56 ± 0,04 ^a	nd	nd
Rutina	5,2 ± 0,4 ^a	nd	6,1 ± 0,2 ^a	nd
Quercetin-3-glucosido	0,879 ± 0,006 ^b	0,42 ± 0,01 ^a	nd	nd
Kaempferol-3-glucosido	2,3 ± 0,3 ^b	6,21 ± 0 ^c	0,8 ± 0,1 ^a	nd
Daidzeina	nd	0,337 ± 0,002	nd	nd
Genisteina	nd	0,41 ± 0,07	nd	nd
(+)-catequina	1,05 ± 0,04 ^b	0,64 ± 0,01 ^a	nd	1,45 ± 0,05 ^c
(-)-epigallocatequina	59,7 ± 0,2 ^b	35,2 ± 0,9 ^a	nd	nd
(-)-epicatequina	0,55 ± 0,02	nd	27 ± 5 ^a	nd
(-)-galocatequina gallato	nd	nd	6,3 ± 0,2 ^a	12,3 ± 0,7 ^b
Naringenina	0,32 ± 0,02	nd	nd	nd
Hesperetina	0,71 ± 0,08 ^b	0,53 ± 0,01 ^a	nd	nd
Miricetina	nd	nd	nd	2,46 ± 0,01
Total flavonoides	84 ± 6	49 ± 1	40 ± 5	16 ± 1
Total	125 ± 6	119 ± 1	90 ± 5	246 ± 10

Los contenidos se expresan como µg/g b.s. En el caso de **HD_e** y **AD_e**, los contenidos se refirieron a la masa original de **H** o **A** usada en la DGIS.

De acuerdo con los resultados presentados, luego de la DGIS se registró un aumento de más de 6 veces en el CFT (por Folin) de **HD_e** y de más de 12 veces en el caso de **AD_e** con respecto

a **H_e** y **A_e**, respectivamente (**Tabla I.9**). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, cuando las muestras fueron estudiadas por HPLC-DAD-FLD, se encontró una disminución de los CF identificados en el caso de **HD_e** y un aumento solo al doble en el caso de **AD_e** (**Tabla I.11**). Esta diferencia entre ambas determinaciones puede explicarse teniendo en cuenta que otros componentes presentes en los digeridos como polipéptidos, péptidos o aminoácidos libres se pueden extraer en EtOH/agua y pueden aumentar los valores de CFT medidos por Folin-Ciocalteu.

Para poder evaluar el tipo de compuestos presentes en los extractos etanólicos, más allá de los CF identificados, los extractos fueron analizados mediante cromatografía de filtración en gel.

Los cromatogramas de filtración en gel de los extractos etanólicos de las muestras no digeridas, **H_e** (**Figura I.12.A**) y **A_e** (**Figura I.12.B**), presentaron un pico correspondiente a moléculas > 6,5 kDa, con máximo en ~9 kDa, con mayor intensidad en **H_e**, el cual no se encontró en los digeridos gastrointestinales. El digerido **HD_e** mostró un pico correspondiente al volumen de elución levemente mayor en comparación con **H_e** mientras que para **AD_e** la situación fue al revés, el pico del volumen de elución fue un poco mayor para **A_e**. En ambos digeridos se evidenció la presencia de varios picos correspondientes a PM < 6,5 kDa. Tanto estas moléculas como las de PM > 10 kDa serían aportadas por los reactivos de digestión en una cierta proporción, como se evidencia en la **Figura I.12** al comparar con el extracto etanólico de BR. Sin embargo, también resulta evidente la solubilización en el medio etanólico de moléculas que podrían ser de naturaleza proteica, antes y después de la DGIS.

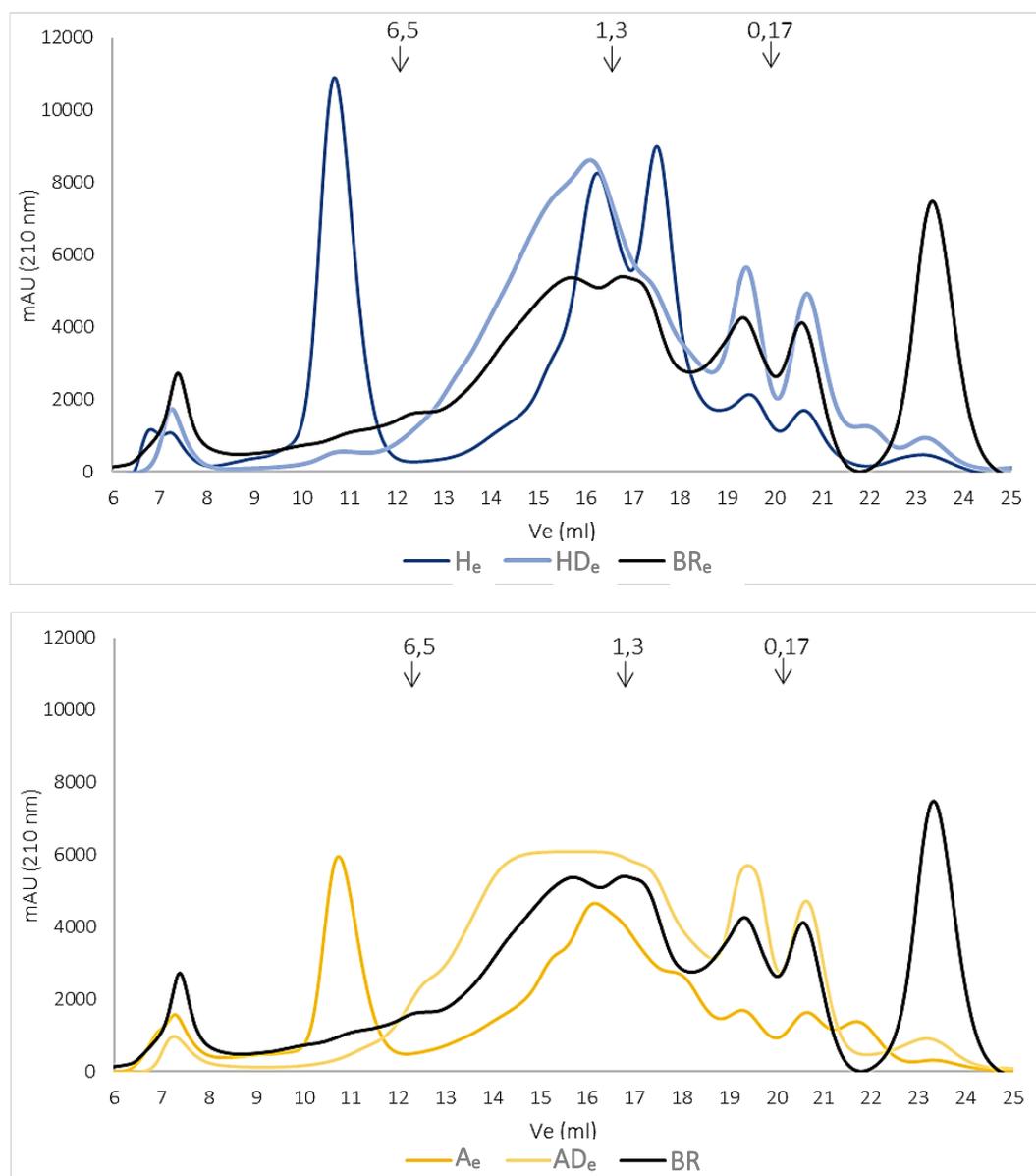


Figura I.12. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de extractos obtenidos con etanol 60 % (EAU), evaporados y solubilizados en PBS. **A.** H_e, HD_e y BR; **B.** A_e, AD_e y BR. Se indican los marcadores de MM (kDa) en la parte superior de las figuras.

Análisis de fracciones etanólicas bioaccesibles

En los extractos etanólicos (HD_e, AD_e y BR_e) también se evidenció la presencia de sales biliares tal como puede observarse en el color de los mismos en la **Figura I.13**. Por ello, al igual que las fracciones acuosas, estos extractos también fueron sometidos a un tratamiento con colestiramina a fin de reducir el contenido de sales biliares obteniéndose las denominadas fracciones bioaccesibles: HD_{esb}, AD_{esb}, y BR_{esb}.

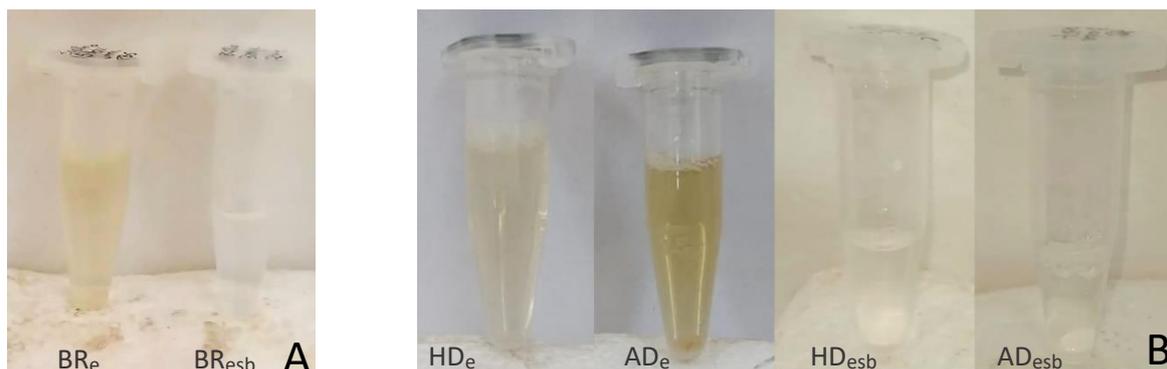
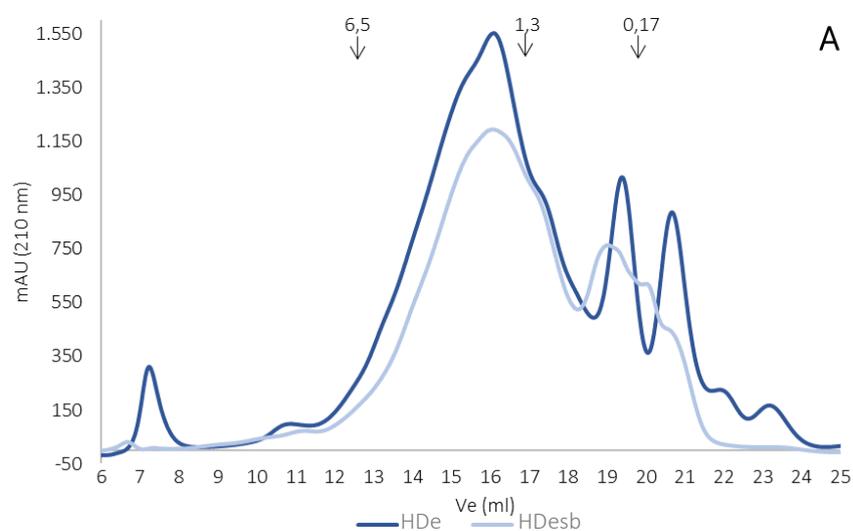


Figura I.13. Efecto del tratamiento con colestiramina sobre los extractos etanólicos. **A.** BR_e antes y después del tratamiento. **B.** HD_e y AD_e antes y después del tratamiento.

La comparación de los cromagramas FPLC de filtración en gel de HD_e y HD_{esb} mostró que después del tratamiento con colestiramina, los extractos etanólicos perdieron principalmente las moléculas con PM > 10 kDa y aquellas con PM < 0,17 kDa, mientras que hubo una pérdida parcial de moléculas con PM entre 0,17 y 6,5 kDa (**Figura I.14.A**), en las que se incluirían las sales biliares. Se observó un comportamiento similar para AD_{esb} con una mayor pérdida de estas moléculas (**Figura I.14.B**). No se puede descartar la pérdida de algunos CF después del tratamiento con colestiramina.

Finalmente, analizando los cromatogramas del BR_e se observó que el tratamiento con la resina también produjo una disminución de las moléculas mayores a 6,5 kDa y en particular, menores a 0,1 kDa (**Figura I.14.C**). Este comportamiento fue similar al informado previamente para la fracción acuosa soluble de BR (**Figura I.9**).



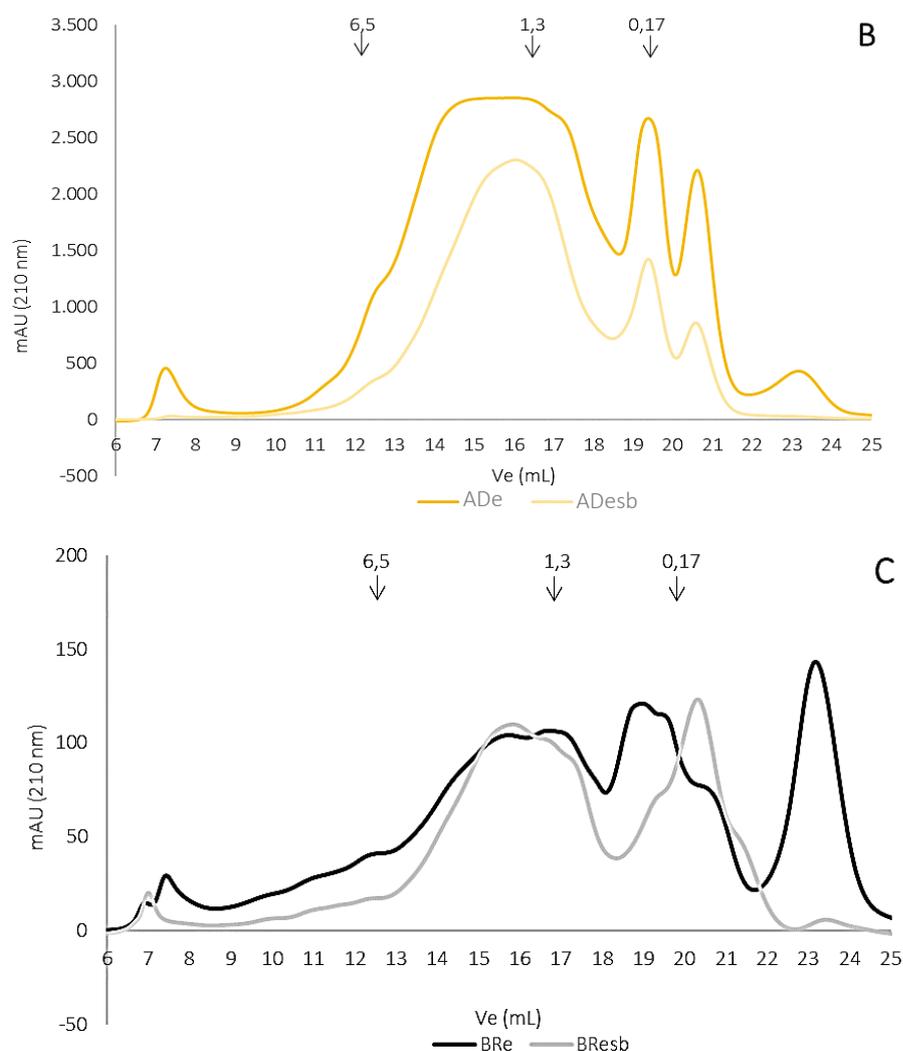


Figura 1.14. Cromatografía de filtración en gel FPLC (*Superdex 30*) de extractos etanólicos resolubilizados en PBS. **A.** HD_e y su fracción bioaccesible (HD_{esb}); **B.** AD_e y su fracción bioaccesible (AD_{esb}); **C.** BR_e y su fracción bioaccesible BR_{esb}. Los marcadores de PM (kDa) se indican en la parte superior de las figuras.

1.4.3. Estudio de la actividad antioxidante.

1.4.3.1. Actividad antioxidante por métodos químicos (no celulares)

Fracciones solubles acuosas.

Se llevó a cabo una primera aproximación a la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones solubles en buffer PBS de H, A (H_s y A_s) y de sus digeridos gastrointestinales (HD_s y AD_s), así como de los solubles directos (HD_{sd} y AD_{sd}) y bioaccesibles HD_{sb} y AD_{sb}, aplicando dos metodologías: método ORAC y método HORAC.

A través del método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales peroxilos (generados a partir de AAPH a 37 °C), determinándose experimentalmente la degradación oxidativa de la fluoresceína utilizada como sonda fluorescente. Por lo tanto, la pérdida de fluorescencia es un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con los radicales peroxilo. Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia (Ou et al., 2001). De la misma manera que ocurre en el ensayo ORAC, en el método de HORAC se determina la degradación oxidativa de la fluoresceína, que en este caso se descompone al reaccionar con los radicales hidroxilos generados *in situ* a partir de un metal divalente (Co^{+2}) y H_2O_2 , con la consiguiente pérdida de fluorescencia.

Para ambas metodologías, se ensayaron las fracciones solubles de cada muestra mencionadas anteriormente, en diferentes concentraciones a fin de obtener curvas dosis-respuesta. A partir de estas curvas (graficando % de inhibición de radicales en función de la concentración de proteína en la muestra), se obtuvieron los valores de IC_{50} (concentración que inhibe el 50 % de los radicales) para cada muestra (**Tabla I.12**).

Las fracciones solubles en el buffer PBS mostraron un descenso significativo ($p < 0,05$) de los valores de IC_{50} luego del proceso de DGIS. La potencia ORAC aumentó alrededor de 3 veces en el caso de **HD_s** y más de 4 veces en el caso de **AD_s**, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos digeridos (**Tabla 1.12**) indicando que se produjo la liberación de compuestos activos (péptidos y otros compuestos solubles en PBS). Las fracciones solubles directas **HD_{sd}** y **AD_{sd}** presentaron similares valores de IC_{50} que sus correspondientes fracciones solubles en PBS. Finalmente, luego del tratamiento con colestiramina, la potencia ORAC disminuyó significativamente ($p < 0,05$) respecto a las fracciones solubles completas para ambos digeridos pero el cambio fue mayor en el caso de **HD_{sb}** (**Tabla I.12**). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la fracción soluble acuosa del **BR**, aún en concentraciones mayores a las encontradas en las fracciones bioaccesibles de los digeridos, producen un muy bajo nivel de actividad ORAC (Rodríguez y Tironi, 2023). Por lo tanto, la actividad registrada en **HD_{sb}** y **AD_{sb}** está dada por los componentes derivados de la digestión de los ingredientes de arveja. En concordancia con los presentes resultados, Rodríguez y Tironi (2023) informaron que la potencia ORAC de la fracción bioaccesible de harina de amaranto fue menor que la de las fracciones solubles en buffer y soluble directa.

Tabla I.12. Actividad antioxidante acelular de las fracciones solubles acuosas.

Muestra	ORAC	HORAC
	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
H _s	0,24 ± 0,02 ^d	5 ± 1 ^{bc}
HD _s	0,078 ± 0,008 ^b	3,1 ± 0,7 ^{ab}
HD _{sd}	0,05 ± 0,01 ^{ab}	2,6 ± 0,2 ^a
HD _{sb}	0,28 ± 0,02 ^e	6,0 ± 0,9 ^c
A _s	0,31 ± 0,02 ^e	9 ± 2 ^d
AD _s	0,068 ± 0,001 ^{ab}	3,5 ± 0,9 ^{ab}
AD _{sd}	0,04 ± 0,01 ^a	6 ± 1 ^c
AD _{sb}	0,12 ± 0,01 ^c	4,6 ± 0,4 ^{abc}

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Luego de la DGIS, por el método de HORAC, **HD_s** no presentó diferencia significativa ($p > 0,05$) con la muestra sin digerir, mientras que **HD_{sd}** aumentó ($p < 0,05$) su potencia antioxidante con respecto a **H_s**. **HD_{sb}** mantuvo los niveles de actividad HORAC similares a los de la fracción sin digerir, disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) la potencia con respecto a **HD_s** y **HD_{sd}**, al igual que sucedió por el método de ORAC. Con respecto a las fracciones del aislado proteico, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la potencia HORAC en el caso de **AD_s** y **AD_{sd}** con respecto a **A_s**, mientras que, a diferencia de lo observado por el método ORAC, no hubo cambio luego del tratamiento con colestiramina (**AD_{sb}**) (**Tabla I.12**).

Comparando las fracciones bioaccesibles de ambos digeridos, **AD_{sb}** presentó mayor potencia por ORAC; el valor de IC₅₀ de **HD_{sb}** fue algo más que el doble con respecto al de **AD_{sb}**. Sin embargo, por el ensayo HORAC, no hubo diferencia significativa entre ambas fracciones bioaccesibles.

El ensayo ORAC es interesante desde un punto de vista de la potencial actividad biológica de los compuestos, debido a que los radicales peroxilo, que se evalúan a través de este método, se encuentran presentes en el organismo humano, ya que son formados por homólisis de los hidroperóxidos durante la oxidación de los ácidos grasos (Almeida et al., 2008). La literatura muestra numerosas publicaciones en las que se realizan estudios sobre péptidos de origen alimentario con actividad antioxidante, a través de las cuales se han podido establecer diversas conclusiones respecto a la relación entre la composición peptídica y la actividad (Sarmadi e Ismail, 2010). Se ha demostrado que la presencia de ciertos aminoácidos tales como la Hys, Cys, Pro, Met, Lys y los aminoácidos aromáticos, estaría relacionada con la actividad antioxidante a

través de diferentes mecanismos (Wang y De Mejia, 2005). En muchos casos se ha observado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (prolina y leucina) en el extremo N-terminal potenciaría la actividad antioxidante de los péptidos. Chen et al. (1998) postularon que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos podría mejorar la accesibilidad de péptidos antioxidantes en ciertos sitios celulares como las cadenas poliinsaturadas de ácidos grasos de las membranas biológicas. Saito et al. (2003) han realizado series de combinatorias de tripéptidos, demostrando que cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos influiría directamente sobre la actividad antioxidante de los mismos. También se ha postulado y evidenciado que los aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe y Trp) podrían actuar donando protones a los radicales libres o favoreciendo la quelación de metales que, en muchos casos, actúan como prooxidantes. Además, los grupos sulfhidrilo de Cys también podrían actuar secuestrando radicales libres. Hernández-Ledesma et al. (2005) evaluaron la actividad antioxidante por ORAC de cada aminoácido libre, demostrando que Trp, Tyr y Met presentaban las mayores actividades, seguidos de Cys, His y Phe, mientras que el resto de los aminoácidos no presentaron actividad ORAC. La elevada actividad que presentaron el Trp y la Tyr podría explicarse por su capacidad para donar un átomo de hidrógeno; mientras que la Met podría ser oxidada a sulfóxido de metionina y la Cys podría donar el átomo de hidrógeno del grupo sulfhidrilo. Luego de la evaluación de la actividad de diferentes péptidos, dichos autores concluyeron que la composición peptídica podría influir tanto de manera sinérgica como antagónica en comparación con la actividad antioxidante de los aminoácidos libres. En otro trabajo, se utilizaron diversos péptidos de la β -lactoglobulina, también a través del ensayo ORAC, encontrando una elevada actividad en aquellos péptidos que tenían residuos de Trp, Tyr y Met (Hernández-Ledesma et al., 2007). Adicionalmente, los mismos autores demostraron que la presencia de Tyr y Met en el extremo C-terminal, así como la presencia de Trp y Tyr en el extremo N-terminal aumentarían la capacidad antioxidante de los péptidos. En otros estudios ya se había demostrado que la presencia de Tyr en el extremo N-terminal sería uno de los factores determinantes en esta actividad en péptidos derivados de la ovoalbúmina (Dávalos et al., 2004). García Fillería et al. (2021) teniendo en cuenta que los mecanismos antioxidantes de los péptidos derivados de proteínas vegetales no se conocen completamente a nivel molecular y que la actividad antioxidante depende de la estructura de los péptidos, realizaron un análisis de los aminoácidos que promueven la actividad antioxidante en el cual revelaron que la

presencia de algún aminoácido aromático (Trp o Tyr) y al menos un aminoácido ácido (Glu o Asp) podría colaborar con la actividad antioxidante por los métodos de ORAC y HORAC.

Es importante remarcar que, aunque en los dos ensayos se utiliza la misma sonda fluorescente, las concentraciones que se evalúan son muy diferentes; el ensayo ORAC permite evaluar concentraciones mucho más bajas de las moléculas antioxidantes. En trabajos previos, Ou et al. (2002) demostraron que el ensayo HORAC reflejaría principalmente la capacidad de los antioxidantes de quelar metales, inhibiendo de esta manera la formación de radicales OH \cdot ; mientras que, como ya se mencionó anteriormente, el ensayo ORAC mide la capacidad de secuestro de radicales peroxilo por interrupción de la cadena radicalaria, fundamentalmente a través de un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno. Estas diferencias en la sensibilidad y en los mecanismos de acción de los compuestos activos entre ambos métodos utilizados en este trabajo podrían explicar diferencias de comportamientos luego de la DGIS entre ambos métodos.

Como se mostró anteriormente el digerido proveniente de **H** presentó algunas diferencias en la composición molecular respecto al digerido proveniente de **A**, principalmente relacionadas con la presencia de una proporción mayor de moléculas con PM < 1,4 kDa en **AD** y de moléculas > 6,5 kDa en **HD**. Esto indica la presencia de distintos péptidos, con distintas secuencias y distintos aminoácidos en posiciones claves para la actividad antioxidante que pueden ejercer distintos mecanismos de acción antioxidante y con distinta efectividad. Finalmente, no puede descartarse la presencia en estas fracciones solubles acuosas de componentes antioxidantes de naturaleza no proteica, cuyo contenido sea diferencial entre **H** y **A** tales como compuestos fenólicos.

Con el fin de analizar la contribución de distintas moléculas a la actividad antioxidante de estas muestras, se separaron fracciones de diferente PM mediante FPLC de filtración en gel de **Hs**, **As**, **HDs** y **ADs**, a las que se les determinó su concentración peptídica y su actividad eliminadora de ROO \cdot mediante el ensayo ORAC (**Tabla I.13** y **Tabla I.14**). En la muestra **Hs**, como era de esperar, las fracciones con mayor concentración de polipéptidos fueron aquellas con PM > 10 kDa (fracciones 1 a 9). Estas fracciones presentaron una actividad secuestrante de ROO \cdot en el rango de 40-60 % (**Tabla I.13**). Sin embargo, las fracciones que presentaron mayores actividades comprendidas entre 66 - 81 % fueron las fracciones entre la 23 y la 26 (PM entre 0,29 y 0,59 kDa), las cuales presentaron concentración baja o no detectable de péptidos. Según

los PM de estas fracciones, podría tratarse de péptidos de entre 3 y 5 aminoácidos, aunque no se puede descartar la presencia de otros componentes como compuestos fenólicos, los cuales presentarían actividad antioxidante. En cuanto a las fracciones de **HDs**, las que presentaron mayor concentración de péptidos fueron las correspondientes a PM entre 0,75 y 8 kDa (fracciones 12 a 21), mientras que las que presentaron las mayores actividades antioxidantes estuvieron comprendidas en un amplio rango de PM (0,11 a 4 kDa, fracciones 15 a 29) con valores entre 50 y 87 % de secuestro del radical $\text{ROO}\cdot$ (**Tabla I.13**). Cabe notar que la actividad de estas últimas fracciones se vió fuertemente incrementada luego de la DGIS respecto a **Hs** y corresponderían a productos de la proteólisis, desde aminoácidos y dipéptidos (con muy alta actividad, fracciones 27 a 29) hasta polipéptidos de aproximadamente 36 aminoácidos. Puede remarcarse también que hubo fracciones en las que la actividad ORAC de **HDs** disminuyó con respecto a la de **Hs**: las fracciones 1 a 8, todas correspondientes a PM > 10 kDa en las que la concentración polipeptídica disminuyó por ser moléculas proteolizadas, y las fracciones 23 a 26 correspondientes a PM entre 0,29 y 0,59 kDa. En estas últimas, la concentración peptídica aumentó con respecto a **Hs**. Teniendo en cuenta el PM de estas fracciones, una posible explicación a la disminución de la actividad podría estar relacionada con los cambios en los compuestos fenólicos (en este caso serían los que se solubilizaron en buffer PBS) debidos a la DGIS, tal como se describió en la *sección 1.4.2.2*.

En la muestra **As**, al igual que para **Hs**, las fracciones con mayor concentración de polipéptidos fueron las de PM > 10 kDa (fracciones 1 a 10). Las fracciones de 1 a 4 presentaron una elevada actividad secuestrante de $\text{ROO}\cdot$ (59 a 89 %); mientras que las fracciones 16 y de 23 a 26 (PM 2,5-3,1 y de 0,23 a 0,47 kDa), presentaron actividades comprendidas entre 55 y 72 % (**Tabla I.14**). Al igual que lo observado para **Hs**, dado los PM de estas fracciones, se trataría de péptidos de entre 3 y 5 aminoácidos, aunque, como se discutió anteriormente, no se puede descartar la presencia de otros componentes como compuestos fenólicos. Las fracciones de **ADs** con mayor concentración peptídica fueron las comprendidas entre 0,75 y 4 kDa (fracciones 15 a 21), mientras que esta muestra presentó muchas fracciones con elevada actividad antioxidante (fracciones 13 a 29, 0,11 a 6 kDa), alcanzando valores de secuestro del radical $\text{ROO}\cdot$ entre 55 y 89 % de (**Tabla I.14**). Las fracciones 1 a 5 (PM > 10 kDa) disminuyeron su concentración peptídica y su actividad con respecto a **As** (por proteólisis). A diferencia de **HDs**,

en **ADs** todas las fracciones a partir de la 6 (desde >10 kDa hasta < 0,1 kDa) aumentaron su actividad luego de la DGIS.

A partir de estos resultados, se puede concluir parcialmente que las fracciones que resultaron más activas en la neutralización de $\text{ROO}\cdot$ en las muestras digeridas fueron las mismas (fracciones 15 a 29), comprendidas entre 0,11 y 4 kDa que podrían corresponder principalmente a péptidos generados por la DGIS. Existen algunas diferencias entre la actividad de las fracciones de **HDs** y **ADs**; estas diferencias podrían estar dadas por la generación de diferentes productos de proteólisis así como también por la diferente composición de compuestos fenólicos (que se hayan solubilizado en PBS) de ambas muestras (*sección 1.4.2.2*).

Tabla I.13. Concentración de polipéptidos/péptidos y actividad ORAC de fracciones separadas por FPLC a partir de H_s y HD_s.

Fracción	PM (kDa)	Muestra			
		H _s		HD _s	
		Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO [·] (ORAC)	Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO [·] (ORAC)
1	>10	0,35 ± 0,06	45 ± 2	0,06 ± 0,01	9 ± 7
2	>10	0,3 ± 0,1	56 ± 12	0,066 ± 0,001	13 ± 10
3	>10	0,21 ± 0,02	47 ± 2	0,035 ± 0,002	18 ± 7
4	>10	0,149 ± 0,001	59 ± 6	0,016 ± 0,007	12 ± 1
5	>10	0,10 ± 0,02	50 ± 3	0,024 ± 0,007	14 ± 7
6	>10	0,088 ± 0,002	47 ± 9	0,011 ± 0,004	16 ± 4
7	>10	0,072 ± 0,002	49,2 ± 0,3	0,014 ± 0,005	22 ± 13
8	>10	0,084 ± 0,001	57 ± 2	0,020 ± 0,008	32 ± 5
9	>10	0,10 ± 0,02	40 ± 8	0,043 ± 0,001	34 ± 3
10	>10	0,056 ± 0,005	34 ± 9	0,039 ± 0,001	19 ± 10
11	10-8	0,021 ± 0,008	22 ± 8	0,059 ± 0,007	32 ± 4
12	8-6,4	0,03 ± 0,02	17 ± 2	0,082 ± 0,003	20 ± 7
13	6,4-5	0,016 ± 0,009	17 ± 12	0,10 ± 0,02	25 ± 2
14	5-4	0,019 ± 0,009	27 ± 10	0,081 ± 0,004	25 ± 5
15	4-3,1	0,026 ± 0,006	8 ± 3	0,089 ± 0,003	60 ± 4
16	3,1-2,5	0,025 ± 0,008	19 ± 11	0,10 ± 0,01	63,3 ± 0,8
17	2,5-1,9	0,015 ± 0,008	12 ± 4	0,120 ± 0,009	51 ± 11
18	1,9-1,5	0,032 ± 0,007	6 ± 2	0,146 ± 0,008	52 ± 7
19	1,5-1,2	0,02 ± 0,01	22 ± 7	0,15 ± 0,03	58 ± 7
20	1,2-0,95	0,020 ± 0,006	15 ± 8	0,15 ± 0,04	64 ± 9
21	0,95-0,75	0,01435 ± 0,00003	23 ± 11	0,15 ± 0,04	55 ± 1
22	0,75-0,59	0,029 ± 0,007	34 ± 7	0,07 ± 0,01	70 ± 6
23	0,59-0,47	nd	76 ± 9	0,048 ± 0,002	58 ± 8
24	0,47-0,37	0,0124 ± 0,0009	81 ± 6	0,028 ± 0,005	49 ± 3
25	0,37-0,29	nd	73 ± 4	0,008 ± 0,004	64 ± 7
26	0,29-0,23	nd	66 ± 12	0,015 ± 0,001	41 ± 17
27	0,23-0,18	0,016 ± 0,003	28 ± 7	0,06 ± 0,02	74 ± 7
28	0,18-0,14	0,005 ± 0,001	38 ± 4	0,10 ± 0,02	87 ± 1
29	0,14-0,11	0,014 ± 0,003	37 ± 4	0,06 ± 0,02	81 ± 2
30	0,11-0,08	nd	35 ± 2	nd	35 ± 2
31	0,08-0,07	nd	33 ± 2	nd	29 ± 3
32	0,07-0,06	nd	15 ± 2	nd	27 ± 3
33	0,06-0,04	nd	21 ± 7	nd	20,4 ± 0,9
34	0,04-0,03	nd	15 ± 1	nd	11 ± 2
35	0,03-0,02	nd	9 ± 3	nd	15 ± 11
36	0,02	nd	15 ± 10	nd	7 ± 1

nd: no detectado

Tabla 1.14. Concentración de polipéptidos/péptidos y actividad ORAC de fracciones separadas por FPLC a partir de A_s y AD_s

Fracción	PM (kDa)	Muestra			
		As		ADs	
		Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO [·] (ORAC)	Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO [·] (ORAC)
1	>10	0,47 ± 0,02	75 ± 2	0,005 ± 0,003	16 ± 5
2	>10	0,967 ± 0,002	89 ± 3	0,029 ± 0,002	15,5 ± 0,1
3	>10	0,379 ± 0,006	84 ± 3	0,038 ± 0,002	11 ± 7
4	>10	0,069 ± 0,002	59 ± 2	0,016 ± 0,001	20 ± 2
5	>10	0,033 ± 0,002	28,8 ± 0,2	0,028 ± 0,007	14 ± 1
6	>10	0,05 ± 0,02	5,9 ± 0,5	0,011 ± 0,004	20 ± 4
7	>10	0,11 ± 0,01	12 ± 3	0,008 ± 0,003	22 ± 3
8	>10	0,025 ± 0,001	25 ± 8	0,039 ± 0,007	34 ± 3
9	>10	0,12 ± 0,02	20 ± 2	0,029 ± 0,006	41 ± 3
10	>10	0,056 ± 0,001	17 ± 3	0,026 ± 0,004	38 ± 4
11	10-8	0,029 ± 0,004	9 ± 4	0,0218 ± 0,0008	40 ± 1
12	8-6,4	0,03 ± 0,01	19 ± 7	0,033 ± 0,003	45,0 ± 0,4
13	6,4-5	0,016 ± 0,002	6 ± 2	0,0718 ± 0,0008	56 ± 7
14	5-4	0,020 ± 0,009	19 ± 3	0,062 ± 0,002	58 ± 1
15	4-3,1	0,026 ± 0,006	10,3 ± 0,9	0,135 ± 0,004	61 ± 3
16	3,1-2,5	0,025 ± 0,008	55 ± 12	0,169 ± 0,004	62 ± 3
17	2,5-1,9	0,0008 ± 0,0001	13 ± 5	0,141 ± 0,003	69 ± 4
18	1,9-1,5	0,032 ± 0,007	35 ± 8	0,1889 ± 0,0008	66 ± 1
19	1,5-1,2	0,020 ± 0,001	21 ± 2	0,14 ± 0,01	70 ± 3
20	1,2-0,95	0,020 ± 0,006	50 ± 5	0,146 ± 0,007	75 ± 1
21	0,95-0,75	0,014 ± 0,003	40 ± 36	0,132 ± 0,009	61 ± 17
22	0,75-0,59	0,018 ± 0,004	30 ± 15	0,072 ± 0,003	76 ± 3
23	0,59-0,47	0,013 ± 0,005	57 ± 4	0,031 ± 0,006	77,8 ± 0,2
24	0,47-0,37	0,0082 ± 0,0008	68 ± 1	0,042 ± 0,009	78,5 ± 0,7
25	0,37-0,29	0,028 ± 0,001	72 ± 2	0,05 ± 0,02	81 ± 3
26	0,29-0,23	0,010 ± 0,003	67 ± 5	0,019 ± 0,009	78,1 ± 0,2
27	0,23-0,18	nd	39 ± 2	0,064 ± 0,003	84,8 ± 0,4
28	0,18-0,14	nd	19 ± 2	0,1377 ± 0,0008	89 ± 1
29	0,14-0,11	nd	14 ± 10	0,06 ± 0,02	88,2 ± 0,8
30	0,11-0,08	nd	1,7 ± 0,1	0,18 ± 0,01	55 ± 5
31	0,08-0,07	nd	9 ± 2	0,0093 ± 0,0008	34 ± 17
32	0,07-0,06	nd	11 ± 2	nd	52 ± 2
33	0,06-0,04	nd	12,05 ± 0,02	nd	51 ± 4
34	0,04-0,03	nd	9 ± 1	nd	32 ± 7
35	0,03-0,02	nd	11 ± 3	nd	28 ± 1
36	0,02	nd	6,7 ± 0,2	nd	25 ± 8

nd: no detectado

Fraciones etanólicas.

Se estudió también la actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos por EAU (**H_e**, **A_e**, sus digeridos **HD_e** y **AD_e** y las fracciones bioaccesibles **HD_{esb}** y **AD_{esb}**), en este caso por el método ORAC y por el ensayo de neutralización del radical ABTS^{•+}. **A_e** no mostró diferencias en la potencia antioxidante en comparación con **H_e** (Tabla I.15). Anton et al. (2008) informaron una correlación positiva entre la actividad antioxidante frente al DPPH (diphenyl-picryl hydrazyl) y el contenido fenólico total en porotos. Zhao et al. (2014) analizaron la correlación entre CFT y la actividad antioxidante de 10 variedades de leguminosas e informaron que en general se observó una correlación positiva significativa entre CFT y la actividad antioxidante total, en la eliminación de DPPH y el poder reductor total. En nuestro caso, un aumento en el contenido de CFT (expresados con respecto a la masa seca de ingrediente) y los cambios en el perfil de CF de **A_e** con respecto a **H_e** previamente descritos no se tradujeron en cambios significativos ($p > 0,05$) en los valores de IC₅₀ por los métodos ORAC y ABTS.

La DGIS no produjo cambios en la potencia ORAC de **H_e**, ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de IC₅₀ de **H_e** y **HD_e** (Tabla I.15). Los valores obtenidos por el método ABTS^{•+} mostraron una actividad significativamente menor de **HD_e** respecto a **H_e** especialmente al expresar los valores de IC₅₀ en función de la masa seca de los ingredientes. En el caso de **A_e**, la DGIS produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) (aunque pequeña) de la potencia ORAC y un aumento de la potencia en el método de ABTS^{•+}. Según los presentes resultados, la DGIS de **H** y **A** liberó componentes extraíbles en etanol 60 % y que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, es interesante observar que, aunque los niveles de CFT fueron más altos para los extractos de las muestras digeridas, las actividades de eliminación de radicales libres no fueron necesariamente las más altas. **AD_e** mostró la mayor actividad medida por ABTS^{•+} pero la más baja por el ensayo ORAC, mientras que **HD_e** presentó una potencia ORAC más alta y similar a las muestras no digeridas y la actividad ABTS^{•+} más baja. Estos comportamientos estarían relacionados con los diferentes perfiles de CF de cada muestra, descritos anteriormente (Tabla I.11, Figura I.12). Muchos estudios en diferentes productos de origen vegetal informaron una disminución en la actividad antioxidante después de la DGIS. Por ejemplo, el estudio descrito anteriormente de Cao et al. (2021) demostraron que la DGIS tuvo un efecto negativo sobre las actividades DPPH y FRAP de extractos etanólicos de harina de cáscara de maracuyá; sin embargo, se mejoró la capacidad de eliminación de

ABTS^{•+}. En el caso de cáscaras de arvejas amarillas, se informó una buena correlación entre la actividad neutralizante de ABTS^{•+} y el CFT, ambos reducidos después de la DGIS, pero se encontró una mala correlación entre esta actividad y el contenido total de flavonoides (Ma et al., 2021).

Tabla 1.15. CFT (Folin-Ciocalteu) y actividad antioxidante (ORAC y ABTS) de los extractos etanólicos (EAU)¹.

A. Valores referidos a CFT en las fracciones solubles				
Muestra		CFT mg AGE/ml	ORAC IC ₅₀ (µg AGE/ml)	ABTS IC ₅₀ (µg AGE/ml)
Sin digerir	H _e	0,033 ± 0,001 ^a	1,2 ± 0,1 ^{ab}	23 ± 2 ^{ab}
	A _e	0,044 ± 0,002 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	29 ± 5 ^{bc}
Después de DGIS	HD _e	0,181 ± 0,004 ^c	0,8 ± 0,1 ^a	29 ± 4 ^{bc}
	AD _e	0,467 ± 0,004 ^e	1,3 ± 0,1 ^b	13 ± 5 ^a
Después de colestiramina (bioaccesible)	HD _{esb}	0,141 ± 0,005 ^b	2,8 ± 0,4 ^d	37 ± 3 ^c
	AD _{esb}	0,356 ± 0,006 ^d	1,9 ± 0,2 ^c	19 ± 5 ^{ab}

B. Valores expresados en base seca de muestra original				
Muestra		CFT mg AGE/g b.s. ²	ORAC IC ₅₀ (mg AGE/g b.s.) ²	ABTS IC ₅₀ (mg AGE/g b.s.) ²
Sin digerir	H _e	0,68 ± 0,02 ^a	0,023 ± 0,002 ^a	0,47 ± 0,03 ^{ab}
	A _e	0,98 ± 0,04 ^b	0,017 ± 0,002 ^a	0,6 ± 0,1 ^{bc}
Después de DGIS	HD _e	5,04 ± 0,07 ^d	0,022 ± 0,002 ^a	0,8 ± 0,1 ^c
	AD _e	13,5 ± 0,1 ^f	0,039 ± 0,001 ^b	0,3 ± 0,1 ^a
Después de colestiramina (bioaccesible)	HD _{esb}	3,1 ± 0,1 ^c	0,06 ± 0,01 ^c	0,81 ± 0,07 ^c
	AD _{esb}	10,3 ± 0,1 ^d	0,06 ± 0,01 ^c	0,6 ± 0,1 ^{bc}

¹ EAU: EtOH 60 %, 15 min, 40 % amplitud

² En el caso de **HD** y **AD**, se refirió a la masa original de **H** y **A** usadas en la DGIS
Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05)

Las actividades antioxidantes son resultado del aporte de todos los compuestos presentes en cada extracto. Sin embargo, para intentar explicar las diferencias, podemos considerar los componentes mayoritarios de cada digerido: OH-tirosol, polidatina y *trans*-resveratrol (mayoritarios), rutina y (-)-epicatequina y galato de (-)-galocatequina en **HD_e**; ácidos siríngico (ampliamente mayoritario) y elágico, *trans*-resveratrol y galato de (-)-galocatequina en **AD_e**. Platzer et al. (2022) investigaron la influencia estructural de los CF en el resultado del ensayo

ORAC (basado en un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno), comparándolo con los de los ensayos ABTS^{•+}, DPPH y CFT (tres reacciones de transferencia de un solo electrón) que se habían reportado previamente. Estos autores no encontraron una correlación clara entre los cuatro ensayos, lo que sugiere que están influenciados por diferentes propiedades estructurales. El comportamiento antioxidante de los CF está dominado por los sustituyentes, mientras que su columna vertebral juega un papel menor. El número de grupos hidroxilo presentes en las sustancias tuvo la mayor influencia en la actividad ORAC. Cuantos más grupos hidroxilo, mejor será el resultado, excepto en el caso de moléculas con dos o más grupos hidroxilo uno al lado del otro, probablemente relacionado con un impedimento estérico. Los residuos de azúcar en C-3 o C-5 redujeron el efecto antioxidante. Según este estudio, entre los diferentes subgrupos de CF, los flavonoles presentaron la mayor actividad ORAC media. Ferreyra et al. (2019) establecieron que el flavanol (-)-epicatequina (encontrado en **HD_e** pero no en **AD_e**) presentó una buena correlación con la actividad ABTS^{•+} pero una mala correlación con la actividad ORAC. Grzesik et al. (2018) demostraron que las catequinas mostraron la mayor estequiometría de reducción de ABTS^{•+} en comparación con otros antioxidantes entre los que podemos mencionar algunos que se encuentran en nuestros digeridos como los flavonoles (por ejemplo, rutina) y el resveratrol. Además, el galato de (-)-galocatequina (que se encuentra tanto en **HD_e** como en **AD_e**) presentó una alta actividad ABTS^{•+}, siendo algo menor para la (-)-epicatequina (He et al., 2018). Los estilbenos *trans*-resveratrol (presente en **HD_e** y en **AD_e**) y polidatina (presente solo en **HD_e**) han demostrado buena actividad ORAC y ABTS^{•+} (Li et al., 2021). El OH-tirosol (componente relevante de la **HD_e**) mostró una pobre correlación con ambas actividades antioxidantes (Ferreyra et al., 2019). Estos autores también informaron que el ácido siríngico (el componente más abundante del **AD_e**) tenía fuerte correlación con la actividad ABTS^{•+}. De esta manera, el alto contenido de ácido siríngico en **AD_e** podría, al menos parcialmente, explicar la mayor actividad ABTS^{•+} de este digerido. Luo et al. (2022) informaron una alta bioaccesibilidad de este compuesto en tres variedades de semillas de sésamo durante la digestión gastrointestinal y metabolismo fecal, señalando la oxidación de la lignina como una posible razón para la generación de ácido siríngico. Finalmente, cabe recordar que estos extractos etanólicos contendrían compuestos no pertenecientes al grupo de los polifenoles que podrían aportar a la actividad antioxidante (por ejemplo, aminoácidos y péptidos) (**Figura I.13**).

Se cuantificó el CFT y se analizó la actividad de ORAC y ABTS de las fracciones bioaccesibles de los extractos etanólicos (Tabla I.15). El CFT disminuyó después del tratamiento con colestiramina en un 39 % para **HD_{esb}** y un 24 % para **AD_{esb}**, y fue indetectable para **BR_{esb}**. Además, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la potencia antioxidante ORAC y ABTS⁺⁺ para **HD_{esb}** y solo ORAC para **AD_{esb}**. Estos cambios pueden correlacionarse con la eliminación de diferentes compuestos por la colestiramina, descrita en la sección I.4.2.

I.4.3.2. Actividad antioxidante en cultivos celulares.

Fracciones acuosas

Para lograr una mayor aproximación a la potencial actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos presentes en **HD** y **AD**, se llevaron a cabo ensayos celulares. Dado que se evidenció la presencia de sales biliares en los solubles directos de los digeridos y teniendo en cuenta que han demostrado tener poder citotóxico y oxidante en las células (Rodríguez y Tironi, 2023), se realizó un tratamiento con colestiramina a los solubles **HD_{sd}** y **AD_{sd}** para obtener las denominadas fracciones bioaccesibles, **HD_{sb}** y **AD_{sb}**, cuya composición ya se discutió previamente.

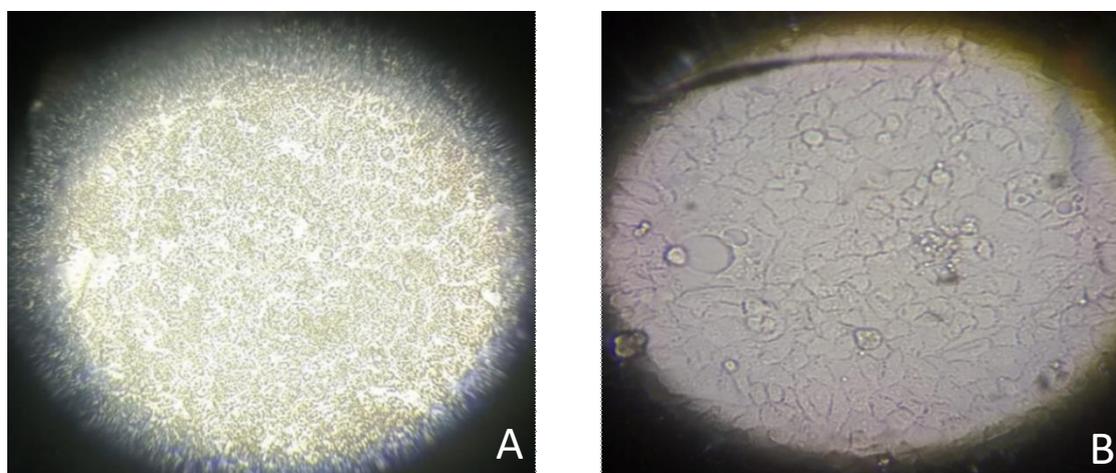


Figura I.15. A. Cultivo de células Caco-2 TC7 tratadas con **BR_{sb}**; B. Monocapa normal de células Caco2-TC7.

En la **Figura I.15** se muestran las capturas de imágenes obtenidas en un microscopio óptico (aumento 10X) de un cultivo de células Caco-2 TC7 en confluencia luego de la incubación durante 7 días a 37 °C y 5 % CO₂. La imagen **A** corresponde a células de Caco-2 TC7 tratadas con 100 µl de **BR_{sb}** sin diluir en la que se observa la presencia de sales biliares (como cristales precipitados) y una pérdida de la integridad de la membrana celular con la consecuente ruptura

de la monocapa. La imagen **B** corresponde a la monocapa de células Caco-2 TC7 sin tratamiento.

Se analizó la citotoxicidad de las muestras por el método de LDH. La primera observación a realizar es que la fracción **BR_{sb}** resultó ser significativamente más citotóxico que **HD_{sb}** y **AD_{sb}**. En el caso de éstos últimos, ninguna de las concentraciones evaluadas generó una liberación importante de LDH indicando que ninguna produjo daño en la integridad celular (**Tabla I.16**).

Tabla I.16. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (**HD_{sb}**, **AD_{sb}** y **BR_{sb}**) en diferentes concentraciones.

Muestra	Diluciones	C _{prot} (mg/ml)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
HD_{sb}	-	20	19 ± 1 ^c	81	92 ± 1 ^d
	1/5	4	16 ± 2 ^{bc}	84	87 ± 2 ^{cd}
	1/10	2	16 ± 5 ^{bc}	84	80 ± 4 ^{bc}
	1/20	1	14 ± 1 ^b	86	58 ± 5 ^a
AD_{sb}	-	8,3	9 ± 1 ^a	91	92 ± 2 ^d
	1/5	1,66	8 ± 2 ^a	92	86 ± 1 ^{cd}
	1/10	0,83	8 ± 2 ^a	92	74 ± 3 ^b
	1/20	0,42	7 ± 4 ^a	93	59 ± 4 ^a
BR_{sb}	-	0,4	62 ± 1	38	-
	1/5	0,08	43 ± 1	57	-
	1/10	0,04	31 ± 4	69	-
	1/20	0,02	16 ± 2	84	-

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

*Valor calculado teniendo en cuenta la viabilidad de la muestra y de su correspondiente dilución de **BR_{sb}**

En el caso de **BR**, la citotoxicidad fue dependiente de la dilución realizada, alcanzándose valores de liberación de LDH bajos y similares a los de las muestras digeridas recién cuando la dilución fue de 1/20. Una posible explicación para estos resultados, es que el contenido remanente de sales biliares luego del tratamiento con colestiramina es suficiente para producir una alta citotoxicidad, pero en el caso de **HD_{sb}** y **AD_{sb}** los productos de la digestión ejercen un efecto protector frente a las mismas, por ejemplo, captando sales biliares remanentes. Tampoco puede descartarse la posibilidad de que compuestos presentes en **HD** y **AD** (por ejemplo, péptidos, polipéptidos, componentes de la fibra) interaccionen con las sales biliares y favorezcan su eliminación durante la obtención de la fracción soluble y/o durante el tratamiento con la colestiramina. Estos posibles efectos frente a las sales biliares podrían constituirse en un potencial mecanismo de acción hipocolesterolémica de los componentes de

H y **A** que sería interesante estudiar en el futuro. Asimismo, la menor citotoxicidad en presencia de los productos de digestión de **H** y **A** podría relacionarse con un efecto protector dado por la prevención del estrés oxidativo producido por las sales biliares en las células.

La actividad antioxidante intracelular se evaluó a través del ensayo de determinación de ROS intracelulares. Este ensayo consiste en la detección de fluorescencia derivada de la sonda dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), la cual es permeable en las células y retenida en ellas como DCFH luego de que se le remueven los grupos acetato por esterasas intracelulares. Este compuesto puede reaccionar con varias ROS incluyendo H_2O_2 , radicales hidroxilos y peroxinitrito, oxidándose al compuesto fluorescente DCF (Gomes et al., 2005). Se utilizó un tratamiento estresor (H_2O_2 500 μM , 1 h) de las células Caco-2 TC7 el cual ha demostrado no producir una pérdida importante de viabilidad (García Fillería y Tironi, 2021). Dados los resultados de citotoxicidad obtenidos, se decidió evaluar ambas muestras (**HD_{sb}** y **AD_{sb}**) en las mismas diluciones para analizar el contenido de ROS intracelulares.

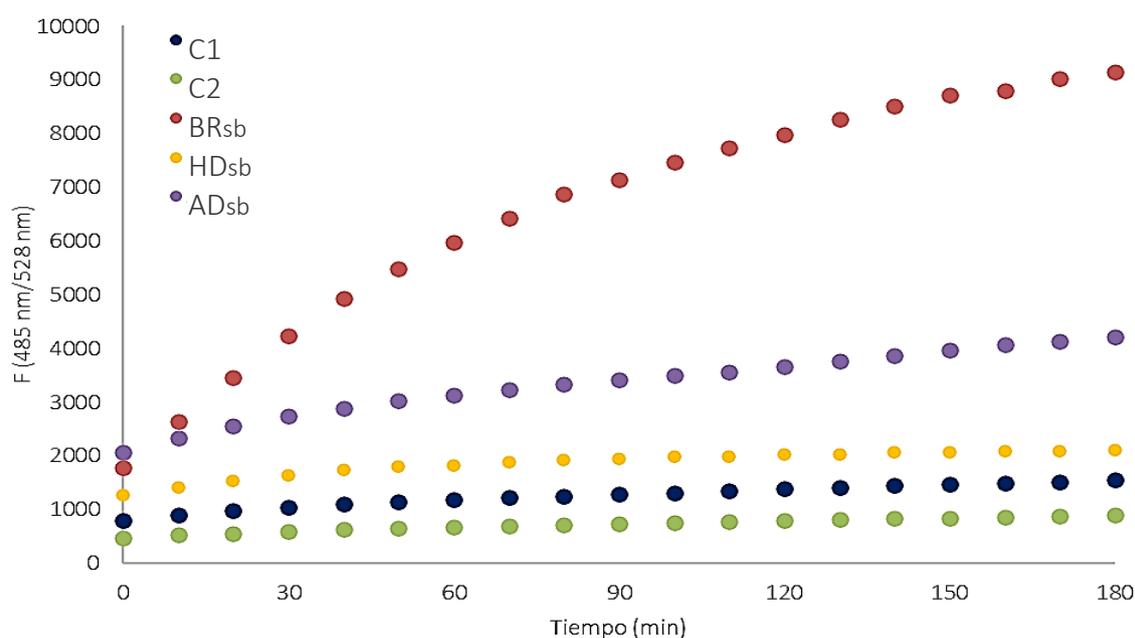


Figura 1.16. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H_2O_2 : evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con las fracciones bioaccesibles **BR_{sb}**, **HD_{sb}** y **AD_{sb}**.

La **Figura 1.16** muestra la evolución de la fluorescencia para los sistemas control C1 (máxima oxidación en ausencia de muestra) y C2 (estado celular basal) y para los cultivos celulares pretratados con **BR_{sb}**, **HD_{sb}** y **AD_{sb}** sin dilución. C1 mostró un aumento de la fluorescencia a lo

largo del tiempo mayor que C2, indicando que el agregado de H₂O₂ 500 µM generó un incremento en la formación de ROS. También se puede observar que la velocidad del cambio en la fluorescencia fue disminuyendo en función del tiempo de incubación. El sistema C2 mostró una cierta evolución de la fluorescencia indicando la existencia de un nivel de ROS endógeno de las células. En general, en los ensayos realizados, el sistema control basal (C2) mostró un contenido de ROS de la mitad al correspondiente a C1, esto es, el tratamiento con H₂O₂ produjo un aumento de ROS a aproximadamente el doble del contenido celular basal.

El pretratamiento de las células con **BR_{sb}**, **HD_{sb}** y **AD_{sb}** indujo un incremento de fluorescencia mucho mayor que en el caso de C1 (**Figura I.16**). Este efecto ha sido reportado previamente (Rodríguez y Tironi, 2023) y podría estar asociado principalmente a ácidos/sales biliares que son capaces de inducir la generación de ROS en células Caco-2 no polarizadas (Erleijman et al., 2006). Por lo tanto, para calcular los % de inhibición de las diferentes diluciones de **HD_{sb}** y **AD_{sb}** se emplearon las correspondientes diluciones de **BR_{sb}** como control de máxima oxidación.

Puede notarse que los incrementos de fluorescencia fueron menores para **HD_{sb}** y **AD_{sb}** respecto a **BR_{sb}**. Los resultados mostraron un efecto de inhibición de las ROS dado por la presencia de los componentes solubles derivados de la digestión de **H** y **A**. Esta inhibición presentó un efecto de la concentración de polipéptidos/péptidos solubles en el rango ensayado al disminuir los valores de inhibición en ambas muestras para las fracciones más diluidas (**Tabla I.16**). Si bien a las máximas concentraciones de muestra evaluadas, el porcentaje de inhibición de ROS fue alto (92 %) y no tuvo diferencias significativas entre ellos, la concentración de proteína soluble de **AD_{sb}** era 2,4 veces menor a la de **HD_{sb}**. Cabe notar que para estas altas concentraciones existió una falta de correlación entre la concentración peptídica (dosis) y la respuesta. Cabe mencionar que, dado que el aumento de la fluorescencia y por lo tanto la cantidad de ROS generadas fue diferente para cada dilución de **BR_{sb}**, los valores de % de inhibición mostrados en la **Tabla I.16** fueron calculados con respecto a diferentes máximos, por lo que, en términos absolutos, concentraciones más altas de péptidos solubles fueron capaces de inhibir una mayor cantidad de ROS (aún con % de inhibición parecidos). Con el fin de comparar la potencia de ambos digeridos en este ensayo, se estimaron los valores de IC₅₀ a partir de curvas dosis-respuesta construidas sin considerar las fracciones sin diluir, siendo de 0,26 y 0,62 mg proteína/ml para **AD_{sb}** y **HD_{sb}**, respectivamente. Estos resultados evidencian una

mayor potencia de **AD_{sb}** respecto a **HD_{sb}** para lograr la inhibición de las ROS intracelulares, probablemente relacionadas con diferencias en el perfil de péptidos/polipéptidos solubles (u otros compuestos) en cada muestra. Rodríguez y Tironi (2023) informaron valores alrededor del 80 % de inhibición de ROS para la fracción soluble de un digerido gastrointestinal de harina de amaranto luego del tratamiento con colestiramina (1,28-12,8 mg proteína/ml, sin efecto por la dilución), las cuales presentaron muy bajo efecto citotóxico.

A partir de los resultados obtenidos de concentración de proteína soluble y del ensayo ORAC presentados en la *sección 1.4.3.1* se escogieron algunas fracciones separadas por FPLC de filtración en gel para realizar similares estudios en cultivo celular. Según el ensayo de liberación de la enzima LDH, ninguna de estas fracciones ejerció efecto citotóxico (**Tabla I.17**). Cuando se evaluó la capacidad de inhibición de ROS intracelulares de las fracciones separadas a partir de **HD_{sb}**, se comprobó que las fracciones 22 (0,59-0,75), 27 (0,18-0,23 kDa), 20 (0,95-1,2 kDa) y 16 (2,5-3,1 kDa) presentaron los mayores % de inhibición. Estas fracciones presentaron también valores elevados de neutralización de radicales ROO· cuando se evaluaron por el método de ORAC. Por otro lado, las fracciones 28 y 29 (0,11-0,18 kDa) habían mostrado los mayores valores de actividad antioxidante medida por el método de ORAC pero cuando fueron analizadas en el ensayo celular, los valores de inhibición de ROS intracelulares fueron bajos.

En cuanto a **AD**, las fracciones 23 y 24 (0,37-0,59 kDa) mostraron los mayores % de inhibición de ROS y se observó una correlación entre el ensayo celular y el método acelular para todas las fracciones excepto las fracciones 20 y 25 (0,95-1,2 y 0,29-0,37 kDa respectivamente) las cuales presentaron valores de potencia antioxidante medida por ORAC elevados pero cuando se analizaron por el ensayo celular, los valores registrados fueron los menores.

Tabla 1.17. Concentración proteína soluble, actividad antioxidante (ORAC), % inhibición de ROS intracelulares y citotoxicidad celular (LDH) de las fracciones separadas por FPLC a partir de las fracciones solubles en PBS de **HD** y **AD**

Fracciones	PM (kDa)	Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO [·] (ORAC)	% inhibición ROS	LDH (U/l)	
HD_s	16	3,1-2,5	0,10 ± 0,01	63,3 ± 0,8 ^{abc}	22 ± 8 ^{bcd}	6 ± 1 ^{bc}
	17	2,5-1,9	0,120 ± 0,009	51 ± 11 ^a	17 ± 2 ^{abc}	8 ± 2 ^d
	18	1,9-1,5	0,146 ± 0,008	52 ± 7 ^a	4 ± 1 ^a	4,1 ± 0,5 ^{ab}
	19	1,5-1,2	0,15 ± 0,03	58 ± 7 ^{ab}	15 ± 1 ^{abc}	2,0 ± 0,4 ^a
	20	1,2-0,95	0,15 ± 0,04	64 ± 9 ^{abc}	27 ± 13 ^{cd}	9 ± 1 ^d
	21	0,95-0,75	0,15 ± 0,04	55 ± 1 ^a	28 ± 6 ^{cd}	8 ± 2 ^d
	22	0,75-0,59	0,07 ± 0,01	70 ± 6 ^{bcd}	35 ± 2 ^d	8 ± 1 ^{cd}
	27	0,23-0,18	0,06 ± 0,02	74 ± 7 ^{cde}	34 ± 11 ^d	4 ± 1 ^{ab}
	28	0,18-0,14	0,10 ± 0,02	87 ± 1 ^{de}	8 ± 3 ^{ab}	12 ± 1 ^e
AD_s	17	2,5-1,9	0,141 ± 0,003	69 ± 4 ^a	23 ± 6 ^{bc}	16 ± 1 ^b
	19	1,5-1,2	0,14 ± 0,01	70 ± 3 ^{ab}	22 ± 5 ^{abc}	15 ± 5 ^b
	20	1,2-0,95	0,146 ± 0,007	75 ± 1 ^{bc}	13 ± 1 ^a	8 ± 1 ^{ab}
	23	0,59-0,47	0,031 ± 0,006	77,8 ± 0,2 ^{cd}	38 ± 4 ^d	5 ± 1 ^a
	24	0,47-0,37	0,042 ± 0,009	78,5 ± 0,7 ^{cd}	31 ± 1 ^{cd}	9 ± 2 ^{ab}
	25	0,37-0,29	0,05 ± 0,02	81 ± 3 ^d	14 ± 3 ^{ab}	12 ± 7 ^{ab}

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Estadística realizada para cada muestra por separado.

Estos resultados demuestran que productos generados por la digestión gastrointestinal tanto de **H** como de **A** fueron capaces de lograr una inhibición de ROS en células epiteliales intestinales, encontrándose fracciones con gran actividad en un amplio rango de masas moleculares que implican desde aminoácidos a péptidos de hasta 30 aminoácidos sin descartar la presencia en algunas fracciones de otras sustancias como compuestos fenólicos. La disminución de ROS debido al pretratamiento de las células con estas las fracciones bioaccesibles de **H** y **A** podría ocurrir debido a compuestos (presumiblemente péptidos) que ingresan a la célula y actúan eliminando directamente las ROS dentro de la célula (en ese caso, una alta actividad ORAC y/o HORAC sería importante), y/o modulan las vías de señalización que conducen a la inducción de enzimas o compuestos antioxidantes luego de entrar a la célula o por algún tipo de interacción con la membrana plasmática. La bibliografía sobre este tipo de acciones celulares en compuestos derivados de arvejas es escasa. Zhao y Liu (2023) identificaron tres péptidos antioxidantes, YLVN, EEHLCFR y TFY, obtenidos a partir de hidrolizados de arveja con alcalasa, los cuales exhibieron una fuerte actividad antioxidante *in*

vitro. EEHLCFR mostró una mayor actividad eliminadora de DPPH mientras que YLVN mostró una mayor actividad eliminadora de ABTS y valores de ORAC altos. Además, estos péptidos no produjeron pérdida de viabilidad de células LO2 y inhibieron la acumulación de ROS al mejorar las actividades de las enzimas antioxidantes en dichas células con estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

Fracciones etanólicas

La citotoxicidad de **HD_{esb}**, **AD_{esb}** y **BR_{esb}** se evaluó en términos del % de liberación de LDH como indicador de daño celular. La **Tabla I.18** muestra la actividad LDH del sobrenadante de células Caco2-TC7 tratadas con diferentes diluciones de las muestras. Se pudo observar, al igual que en el caso de la fracción soluble en agua, que **BR_{esb}** (o sea después del tratamiento con colestiramina) presentó una alta citotoxicidad (74 %), probablemente relacionada con sales biliares remanentes, que disminuyó con la dilución de esta muestra. Además, esta muestra no presentó un contenido de CFT detectable. **HD_{esb}** presentó un valor de citotoxicidad alto pero menor (56 %) que también disminuyó a medida que se diluyó la muestra. En el caso de **AD_{esb}** los valores de citotoxicidad fueron aún menores. El contenido de CFT medido por el método de Folin-Ciocalteu de **AD_{esb}** fue mayor que el de **HD_{esb}**. Estos resultados sugieren que la citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles está dada por los restos de reactivos de digestión y que está atenuada por la presencia de CF (u otros compuestos) presentes en **HD_e** y **AD_e**, efecto similar al observado para las fracciones bioaccesibles acuosas aunque de menor intensidad en este caso.

Tabla I.18. Citotoxicidad (actividad LDH %), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS en células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (**HD_{esb}**, **AD_{esb}** y **BR_{esb}**).

Muestra	CFT (µg AGE/ml)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
HD_{esb}	141	56 ± 8 ^c	44	66 ± 4 ^c
	28	26 ± 2 ^b	74	48 ± 2 ^b
	7	12 ± 4 ^a	88	22 ± 7 ^a
AD_{esb}	356	33 ± 14 ^b	67	83 ± 5 ^d
	71	11 ± 1 ^a	89	67 ± 3 ^c
	18	11 ± 4 ^a	89	50 ± 3 ^b
BR_{esb}	nd	74 ± 2	26	-
	nd	55 ± 8	45	-
	nd	23 ± 4	77	-

nd: no detectable

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05)

* Valor calculado en base a la cantidad de células viables

La **Figura I.17** muestra la evolución de la fluorescencia para los sistemas control (C1: oxidación máxima, C2: estado basal), así como para **HD_{esb}**, **AD_{esb}** y **BR_{esb}**, todos en la misma dilución (1:5). Como se puede observar, el pretratamiento de las células con **BR_{esb}** indujo un incremento de fluorescencia mucho mayor que en el caso de C1, de la misma manera que fue descrito antes para **BR_{sb}** (fracción acuosa).

De manera similar a lo descrito para las fracciones acuosas, dado que el incremento de ROS respecto a C1 dependía de la concentración de **BR_{esb}**, el % de inhibición de ROS de cada dilución de **HD_{esb}** o **AD_{esb}** se calculó utilizando la misma dilución de **BR_{esb}** como control máximo de oxidación (**Tabla I.18**). Tanto **HD_{esb}** como **AD_{esb}** presentaron un % de inhibición de ROS que fue dependiente de la dilución y en consecuencia de la concentración de CFT. **AD_e** presentó una mayor potencia para la neutralización de ROS ya que los valores de IC₅₀ obtenidos a partir de los datos presentados en la **Tabla I.18** fueron 42 y 17 µg AGE/ml para **HD_{esb}** e **AD_{esb}**, respectivamente. Estos resultados muestran que los productos del DGIS de **H** y **A** solubles en EtOH al 60 % son capaces de inhibir las ROS intracelulares en células Caco2-TC7 inducidas por H₂O₂. Los compuestos responsables de esta actividad podrían ser los CF antes identificados aunque también otro tipo de compuestos activos como péptidos en estos extractos.

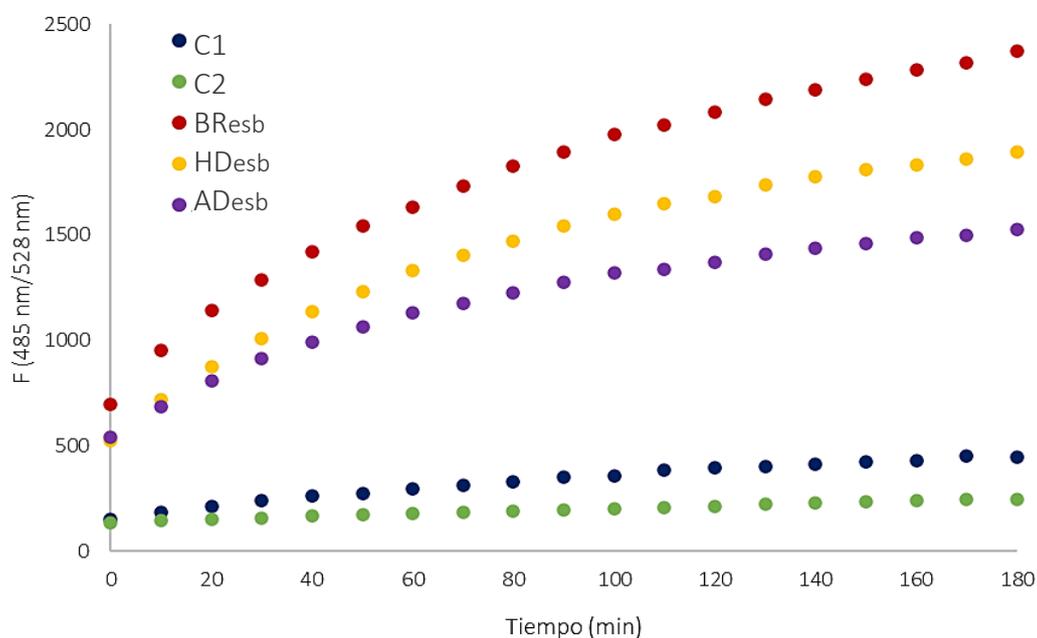


Figura I.17. Evolución de ROS en células Caco2-TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con diluciones 1/5 de las fracciones bioaccesibles **BR_{esb}**, **HD_{esb}** y **AD_{esb}**.

Como ha sido ampliamente demostrado, diversos CF tienen claras propiedades antioxidantes *in vitro*, ya que pueden actuar, dependiendo de sus estructuras químicas, inhibiendo la reacción radical en cadena, neutralizando los radicales libres o inhibiendo su formación. Si bien muchas de sus acciones biológicas se han atribuido a tales propiedades, la evidencia acumulada indica que los CF exhiben varias acciones adicionales en sistemas biológicos complejos. Se ha informado que los antioxidantes fenólicos pueden influir en la expresión de los genes dependientes del elemento sensible a los antioxidantes (ARE) a través de la activación de las proteínas MAPK, probablemente implicadas en la estabilización del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) a través de su fosforilación, una vía que en última instancia conduce a la estimulación de la transcripción de los sistemas de defensa antioxidante y desintoxicante. La diferente eficiencia mostrada por las estructuras de los CF indica claramente una fuerte relación estructura-actividad que puede estar relacionada con la capacidad antioxidante de cada compuesto o con la diferente capacidad para actuar como ligandos de receptores (Masella et al., 2005).

Los compuestos extraídos con etanol/agua a partir de los digeridos gastrointestinales de **H** y **A** fueron capaces de ejercer una actividad de eliminación directa de radicales libres mediante mecanismos HAT y SET, así como una actividad de eliminación de ROS intracelulares. La eliminación de ROS en células Caco2-TC7 inducidas por H₂O₂ pretratadas con fracciones bioaccesibles de **HD_e** o **AD_e** podría deberse a compuestos que ingresan a la célula y ejercen mecanismos directos de neutralización de ROS, y/o compuestos que ingresan a la célula o interactúan con la membrana plasmática produciendo un efecto sobre las vías de señalización que conducen a la inducción de enzimas o compuestos antioxidantes.

Uno de los CF mayoritario en **HD_e** fue la (-)-epicatequina. La eficacia antioxidante de las catequinas se ejerce a través de mecanismos directos que eliminan las ROS a través de grupos hidroxilo fenólicos que son capaces de estabilizar los radicales libres y quelan iones metálicos a través de grupos hidroxilos adyacentes en la molécula. Además, pueden actuar por mecanismos indirectos a través de la vía celular de señalización previamente mencionada, induciendo enzimas antioxidantes, inhibiendo enzimas prooxidantes y produciendo enzimas de desintoxicación de fase II y enzimas antioxidantes (Bernatoniene y Kopustinskiene, 2018; Fraga et al., 2018). Estos autores también demostraron efectos beneficiosos de la (-)-epicatequina y sus derivados mediante la modulación directa de las funciones mitocondriales cardíacas. El (-)-

galato de galocatequina estuvo en menor concentración en **HD_e**, y también se encontró en **AD_e** pero no fue el polifenol mayoritario. El otro CF mayoritario en **HD_e** fue la polidatina (sólo se detectó en ese digerido). Este compuesto, así como el *trans*-resveratrol (presente en menor concentración en los digeridos) proporcionó protección contra el daño oxidativo en las células HepG2 mediante una mayor actividad de catalasa, actividad de superóxido dismutasa y contenido de glutatión, y una disminución de la generación de ROS, nivel de LDH y contenido de malondialdehído (Li et al., 2021). Se considera que la polidatina ejerce efectos protectores y curativos significativos sobre las enfermedades hepáticas asociadas al estrés oxidativo a través de diversos mecanismos moleculares, incluidos los mencionados anteriormente (Tang et al., 2022). Es posible que este compuesto también ejerza un efecto antioxidante sobre las células Caco2-TC7 utilizadas en el presente estudio. Para la polidatina se han descrito otras posibles actividades biológicas predominantemente a través de la modulación de las vías de señalización implicadas en la inflamación y la apoptosis, además del estrés oxidativo (Karami et al., 2022). El tercer compuesto principal en **HD_e** fue el OH-tirosol (no detectado en **AD_e**). Se ha informado que el efecto antioxidante de este compuesto no depende sólo de la capacidad de eliminar especies químicas oxidantes, sino que también depende de la capacidad de estimular la actividad y síntesis de enzimas antioxidantes, proteínas reparadoras del ADN o de fase II enzimas desintoxicantes, entre otras actividades biológicas interesantes (Bertelli et al., 2020).

Finalmente, el ácido siríntrico (ácido hidroxibenzoico) fue ampliamente mayoritario en **AD_e**. Se ha informado que el ácido siríntrico se encuentra en muchas verduras, frutas y especias, incluidas la calabaza, las aceitunas, las uvas, la palma de acai, el vino tinto, el arroz, el centeno, el trigo, la avena, el maíz, la cebada, el sorgo, la caña de azúcar e incluso la miel, pero, hasta donde sabemos, no había sido informado en arvejas. Los estudios tanto de ácido siríntrico puro como de extractos que contienen el compuesto en cultivos celulares y modelos animales mostraron que regula positivamente las vías bioquímicas, como Nrf-2, que están implicadas en la producción de compuestos antioxidantes endógenos, así como otras bioactividades beneficiosas (Vo et al., 2020; Fontana et al., 2017). Shahzad et al. (2020) investigaron el efecto protector del ácido siríntrico en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con infarto de miocardio e informaron que el contenido de ROS, el nivel de oxidación de lípidos y proteínas mostró una disminución, mientras que la defensa antioxidante mejoró con el tratamiento con este compuesto.

I.4.4. Simulación de la absorción intestinal

Como se describió en la Introducción General, la biodisponibilidad de un compuesto bioactivo es fundamental. La biodisponibilidad de los péptidos suele ser baja. En primer lugar, la bioaccesibilidad (estudiada en las secciones anteriores) depende del ataque enzimático de las diferentes áreas del tracto gastrointestinal. Tras su administración oral, una proteína o péptido será sometida a la acción de al menos 40 diferentes enzimas durante su paso por el intestino delgado. La digestión de las proteínas comienza en el estómago por acción de la pepsina que junto con la alta acidez inician la proteólisis. En el lumen intestinal, las endopeptidasas pancreáticas, principalmente la tripsina, elastasa y quimotripsina junto con exopeptidasas como la carboxipeptidasa A y B, producen péptidos y aminoácidos libres. Los oligopéptidos producidos por acción de las enzimas gástricas y pancreáticas pueden ser hidrolizados por exo y endopeptidasas en la membrana intestinal de borde en cepillo de las células epiteliales, las cuales contienen al menos quince peptidasas que en conjunto tienen una amplia especificidad pudiendo degradar tanto proteínas como péptidos. En función de ello, surge la necesidad de incluir una fase de degradación de péptidos con enzimas del borde en cepillo dentro de cualquier modelo de digestión *in vitro*, para poder imitar la digestión final que ocurre *in vivo* en el yeyuno ya que las peptidasas intestinales contribuyen a hidrolizar los péptidos liberados por la hidrólisis gastroduodenal hasta un “núcleo” de (oligo)péptidos, resistentes a una posterior escisión hidrolítica (Picariello et al., 2015; García Fillerías, 2019).

No obstante, algunos fragmentos parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis podrán ejercer una función local o, podrán ser susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas, alcanzar la circulación sanguínea y ejercer una acción sistémica. En este último caso, las peptidasas lisosomales cuyo número se estima en más de 60, también representan una barrera para los péptidos y proteínas que son transportados a través de las células epiteliales.

Las posibles vías para la absorción de péptidos desde el lumen intestinal incluyen (Miner-Williams et al., 2014; Xu et al., 2019):

- vía paracelular, a través de las uniones estrechas que unen células epiteliales intestinales adyacentes. Las uniones estrechas forman poros que permiten la difusión principalmente de cationes y moléculas pequeñas (< 600 Da) como péptidos solubles en agua.

- difusión pasiva a través de los enterocitos. Los péptidos altamente solubles en lípidos pueden ingresar a los enterocitos por esta vía y serán susceptibles a la degradación hidrolítica por enzimas citosólicas.

- endocitosis. Debido a que las moléculas polares grandes, como los fragmentos de péptidos >600 Da, no pueden atravesar la membrana celular hidrofóbica del enterocito, pueden ser capturadas por invaginación de la membrana apical en vesículas que normalmente se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas. La función principal de los fagolisosomas es la digestión enzimática de las macromoléculas que contienen. Sólo las proteínas que escapan a la hidrólisis dentro de estas estructuras pueden ser arrastradas a través de los enterocitos para ser secretadas en la membrana basolateral.

- sistemas de transporte mediados por transportadores. El gradiente de protones transmembrana y la diferencia de potencial de membrana resultante proporcionan la fuerza impulsora para la captación de péptidos en las células epiteliales intestinales a través de transportadores ubicados en las membranas apicales. Los péptidos que son resistentes a la hidrólisis por peptidasas intracelulares son transportados a través de la membrana basolateral a través de los transportadores basolaterales de péptidos. El intercambiador de Na^+/H^+ genera y mantiene el gradiente interno de protones en la superficie luminal, mientras que la Na^+/K^+ -ATPasa presente en la membrana basolateral mantiene una baja concentración de sodio intracelular. Los transportadores de péptidos pueden aceptar di- y tri-péptidos como sustratos fisiológicos, lo que indica que tienen una especificidad de sustrato mucho más amplia que otros transportadores nutricionales. Uno de los transportadores más importantes es el PEPT1 intestinal; un transportador localizado en el borde de cepillo (membrana apical). Por otro lado, existe un cotransporte o transporte activo secundario, en el que los péptidos o aminoácidos libres se unen en la membrana de la microvellosidad con una proteína de transporte específica, la cual también requiere de la unión del sodio para que el transporte se pueda hacer efectivo.

Se evaluaron las posibles modificaciones por células intestinales y el transporte intestinal en dirección apical-basolateral de los productos de la DGIS de **H** y **A** simulando el epitelio intestinal mediante una monocapa de células Caco-2 TC7 y analizando los cromatogramas RP-HPLC de las fracciones correspondientes. Para este ensayo, fue necesario que la monocapa se encuentre bien formada, sin discontinuidades y en confluencia, lo cual se logró a los 15 días de sembradas las células. Como método de evaluación de la formación de la monocapa se

realizaron medidas de la resistencia eléctrica transepitelial durante la evolución de las mismas, alcanzando un valor final entre 390 y 510 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Dado que las muestras utilizadas se encontraban solubilizadas en PBS (pH = 7,4) se analizó el perfil cromatográfico de este buffer así como el de la fase móvil utilizada en la corrida (**Figura I.18**). Como podía esperarse, a 210 nm, el buffer presentó un pico inicial principal correspondiente a sustancias muy hidrofílicas. La fase móvil registró varios picos de naturaleza más hidrofóbica entre los 25 a 30 min y luego de los 40 min de corrida.

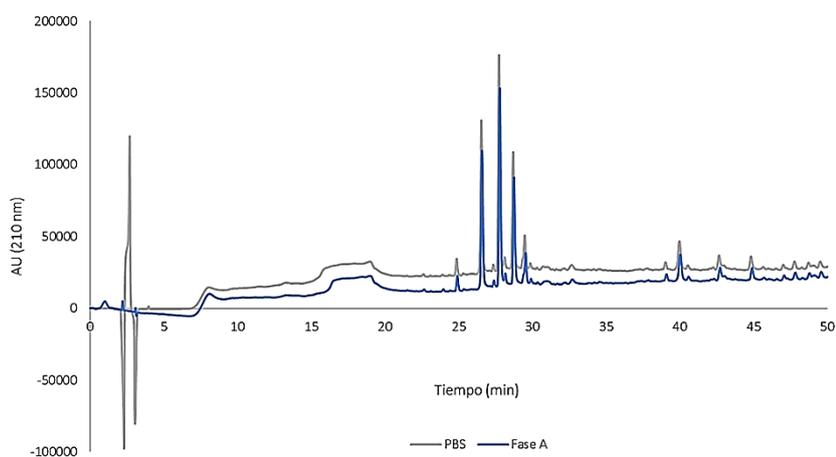


Figura I.18. Perfiles RP-HPLC correspondientes a la fase móvil (Fase A) y el buffer utilizado en el ensayo (PBS)

En primer lugar, fue necesario estudiar los perfiles cromatográficos de las fracciones solubles directa y bioaccesible de las muestras y tratar de distinguir aquellos picos aportados por reactivos de digestión de los correspondientes a las muestras. Asimismo, y dada la imposibilidad de hacer estudios de identificación por espectrometría MS/MS para la determinación de compuestos, se intentó dilucidar al menos la naturaleza de las sustancias involucradas en los principales picos.

En las proteínas, el enlace amida absorbe en la región UV lejana (180-230 nm), donde ocurren dos transiciones significativas, una a 195 nm y una segunda más débil a 220 nm. La región UV cercana (240–295 nm) es donde absorben las cadenas laterales de residuos aromáticos como tirosina, triptófano, fenilalanina y cisteína. El grupo indol del triptófano presenta un máximo cerca de 280 nm y una transición menos intensa alrededor de 292 nm, generalmente observada como una forma de hombro de los espectros. La absorbancia de tirosina es menor que la de triptófano, con un máximo observado a ~ 276 nm y dos pequeños

hombros a ~ 267 y 280 nm. La fenilalanina exhibe la transición más débil alrededor de la región de 250 a 270 nm, apareciendo como múltiples puntos de inflexión sutiles, con un pico centrado cerca de 260 nm. Los aminoácidos aromáticos no absorben por encima de 310 nm y la absorbancia de la proteína debe ser cercana a cero por encima de esta longitud de onda (Pignataro et al., 2020). En función de esta información, se analizaron los cromatogramas a 210 , 220 , 257 y 278 nm a fin de obtener información sobre la composición del **BR** y las muestras.

Teniendo en cuenta que las muestras utilizadas para el ensayo de absorción intestinal eran digeridos gastrointestinales, lo primero que se analizó fue el **BR** para identificar los aportes que podrían tener las enzimas y las sales biliares en los cromatogramas de las muestras. La **Figura I.19.A** muestra el cromatograma detectado a 210 nm para la fracción soluble directa (**sd**) y la fracción soluble luego del tratamiento con colestiramina (**sb**) de **BR**. Dejando de lado los picos correspondientes a la fase móvil y el buffer, **BR** aportó principalmente tres picos a tiempos de retención (t_R) 11 , 14 y 19 min. En el cromatograma detectado a 220 nm (**Figura I.19.B**) se observaron los mismos picos pero con un cambio de intensidad de algunos, especialmente hubo una disminución del pico correspondiente a $t_R = 14$ min. En las **Figuras I.19.C** y **D** también aparecieron los picos correspondientes a $t_R = 11$ y 19 min pero no se detectó el pico de $t_R = 14$ min. En función de estos resultados podríamos inferir que este pico no correspondería a compuestos de naturaleza proteica, o si fueran proteínas, no contendrían aminoácidos aromáticos, lo cual no resulta muy probable.

Los ácidos biliares amidados con glicina y taurina pueden ser detectados a 200 - 210 nm con una sensibilidad moderada, no así los ácidos biliares no conjugados y sus conjugados sulfatados y glicosilados debido a su absorbancia marcadamente baja (Kakiyama et al., 2006). Por lo tanto, algunos ácidos biliares conjugados podrían contribuir al pico de $t_R = 14$ min que presentó baja intensidad a 220 nm y sin absorción a mayores longitudes de onda. Además, este pico disminuyó su absorbancia luego del tratamiento con colestiramina (**Figura 1.19.A**). Por otro lado, los picos correspondientes a $t_R = 11$ y 19 parecerían corresponder a moléculas de naturaleza proteica dados sus características de absorción (absorben a 220 , 257 y 278 nm). Los mismos también disminuyeron luego del tratamiento con colestiramina, lo cual estaría en concordancia con la disminución en la concentración de proteína descrita en la *sección 1.4.2.2*. No puede descartarse que hubiera proteínas interaccionando con sales biliares.

Se realizó la comparación de los cromatogramas obtenidos para las fracciones soluble directa y bioaccesible de **HD** (**Figura I.20**) a las diferentes longitudes de onda. La **Figura I.20.A** muestra los cromatogramas detectados a 210 nm, los cuales presentan una gran variedad de picos de distintas intensidades. En primer lugar, aparecen tres picos con mayor intensidad entre los 10 y los 20 min que coinciden con los detectados en **BR**. Se detectaron además una gran variedad de picos pequeños, dentro de los que pueden resaltarse picos correspondientes a compuestos hidrofílicos entre los 4 y los 6 min, uno a los 22 min, y otros más hidrofóbicos a los 33 y 36 min, todos ellos no presentes en **BR**. En general, en la fracción bioaccesible se encontró una disminución en la intensidad de los picos presentes en la fracción soluble completa, excepto en el caso de aquellos correspondientes a $t_R = 22$ y 33 min, los cuales fueron detectados en la fracción bioaccesible con mayor intensidad y no se encontraron en **BR_{sb}**. Teniendo en cuenta que la absorción a 210 nm es bastante inespecífica, se realizó un cromatograma a 220 nm (**Figura I.20.B**). Los picos con mayor intensidad (t_R : 11, 14 y 19 min) mostraron el comportamiento ya descrito para **BR**. En estos cromatogramas también se encontró una disminución de las intensidades de los picos de la fracción bioaccesible con respecto a la completa, y al igual que en el cromatograma realizado a 210 nm, los picos detectados a $t_R = 22$ y 33 min se encontraron con mayor intensidad en **HD_{sb}**. Analizando la **Figura I.20.C** correspondiente a cromatogramas a 257 nm para **HD_{sd}**, se observaron muchos picos a $t_R < 10$ min que podrían estar relacionados con péptidos de naturaleza hidrofílica o aminoácidos libres. En la fracción bioaccesible, se encontró que, como se venía observando, hubo una disminución de la mayoría de los picos con excepción de algunos particulares ($t_R = 6$ y 39 min). A 278 nm (**Figura I.20.D**), así como a 257 nm, **HD_{sd}** presentó muchos picos a $t_R < 10$ min, y otros más hidrofóbicos. En **HD_{sb}** también se detectó el pico a los 6 min y otro a los 22 min que tampoco estaba en **HD_{sd}**. Estos resultados sugieren que en la fracción bioaccesible de **HD** hay péptidos de diferente naturaleza con aminoácidos aromáticos en su cadena.

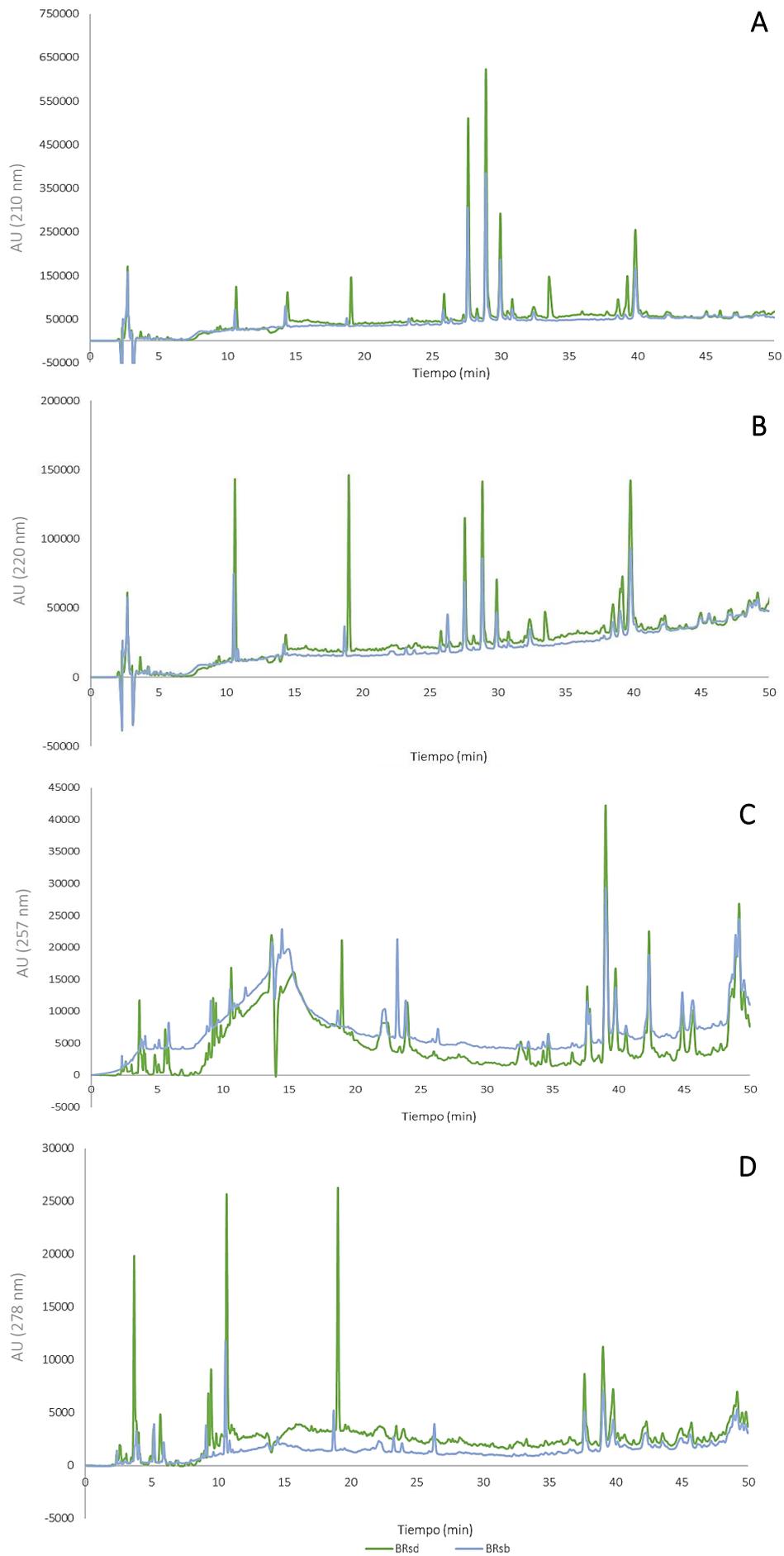


Figura I.19. Perfiles RP-HPLC de **BRsd** (1,8 mg proteína/ml) y **BRsb** (0,4 mg proteína/ml). **A.** 210 nm; **B.** 220 nm; **C.** 257 nm; **D.** 278 nm 175

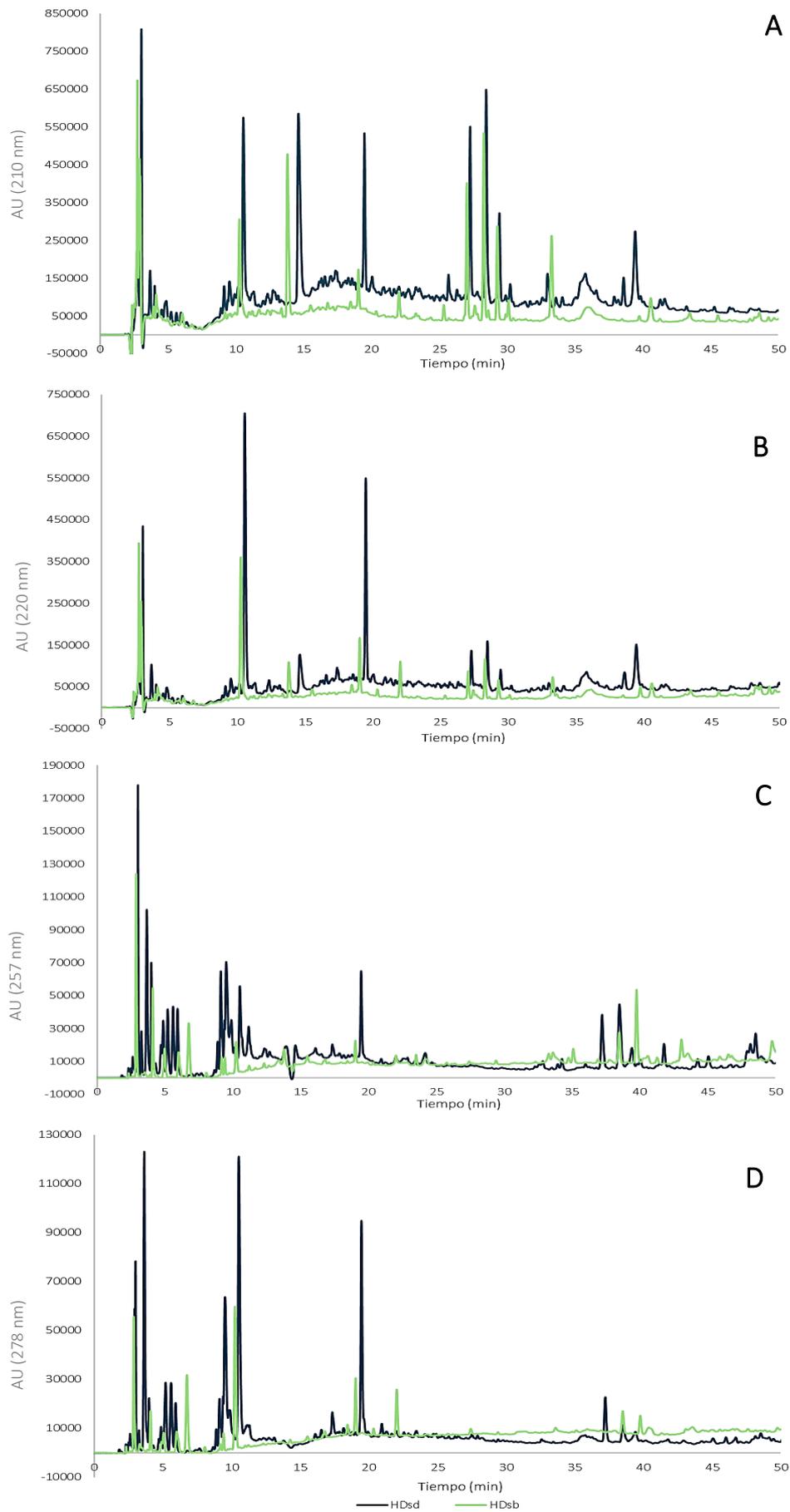


Figura I.20. Perfiles RP-HPLC de HD_{sd} (28 mg proteína/ml) y HD_{sb} (20 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

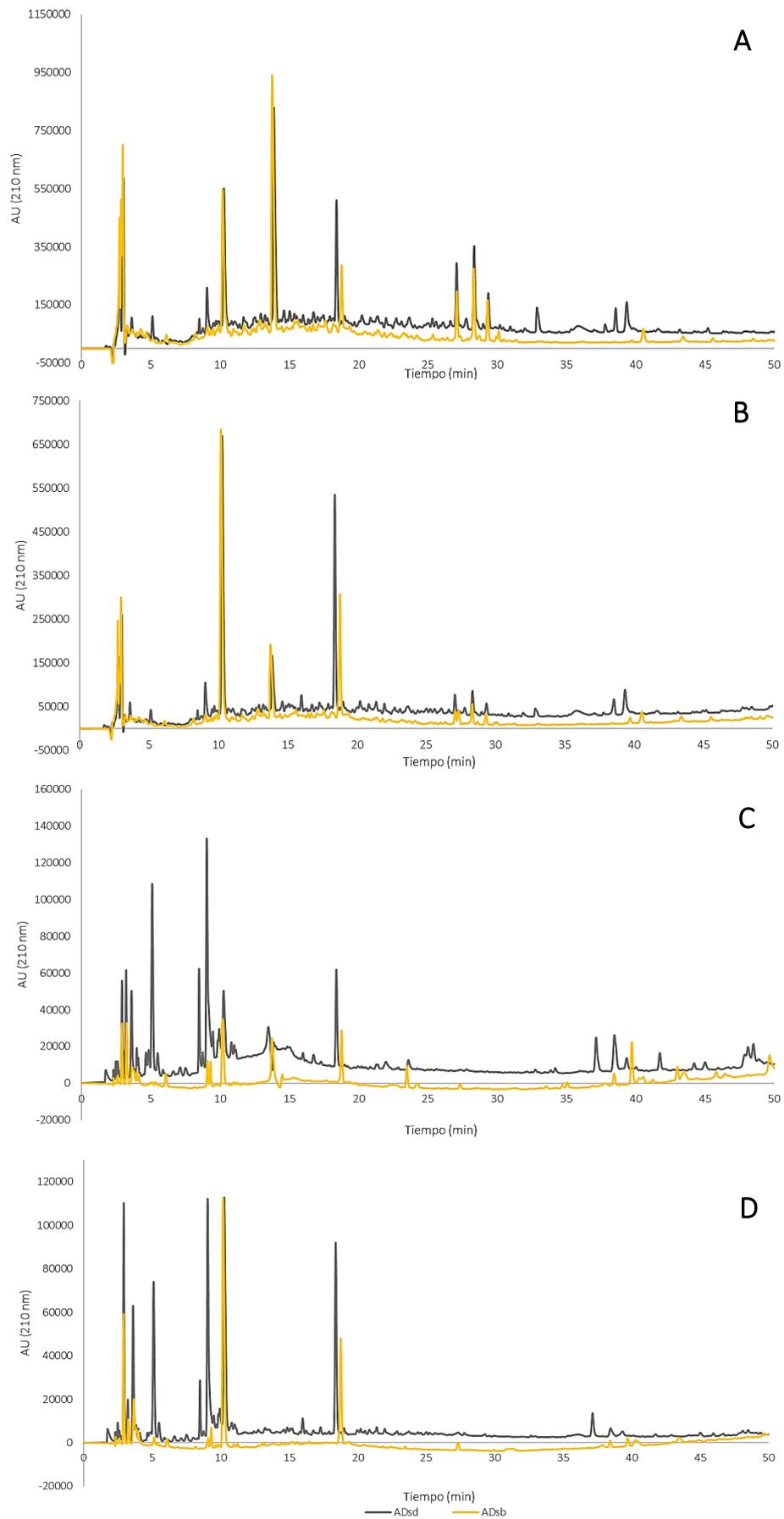


Figura I.21. Perfiles RP-HPLC de **AD_{sd}** (21 mg proteína) y **AD_{sb}** (8,3 mg proteína/ml). **A.** 210 nm; **B.** 220 nm; **C.** 257 nm; **D.** 278 nm

Teniendo en cuenta todo lo descrito anteriormente, en la muestra **HD_{sb}** se podrían discriminar por un lado los picos correspondientes a t_R 11, 14 y 19 min que provendrían, al menos parcialmente de los reactivos de la digestión (enzimas y sales biliares) y, por otro lado, los picos más relevantes detectados a t_R 4, 6, 22, 33 y 36 min que provendrían exclusivamente de los productos de digestión de **H** y serían de naturaleza proteica ya que también se detectaron en los cromatogramas a 220, 257 y 278 nm.

Continuando con el análisis, se compararon los cromatogramas a diferentes longitudes de onda obtenidos para la fracción soluble directa y la bioaccesible de **AD** (Figura I.21). Al igual que en los cromatogramas de **HD**, **AD** presentó los picos correspondientes a los reactivos de digestión; sin embargo, la disminución luego del tratamiento con colestiramina de los picos con $t_R = 11$ y 14 min fue menor que en el caso de **HD_{sd}** y **BR_{sb}** (Figura I.21.A y B). El cromatograma a 220 nm de **AD_{sd}** mostró varios picos ($t_R = 3, 5, 8, 9, 16, 33$ y 36 min), los cuales bajaron su intensidad o directamente no fueron detectados en **AD_{sb}**. A 257 y 278 nm (Figura I.21.C y D) se detectaron en **AD_{sd}** muchos picos a $t_R < 10$ min y algunos picos algo hidrofóbicos ($t_R < 20$ min). En la fracción **AD_{sb}**, los picos más hidrofílicos no fueron detectados o disminuyeron su intensidad mientras que, dos picos ($t_R = 23$ y 27 min) aumentaron su intensidad con respecto a la fracción soluble directa.

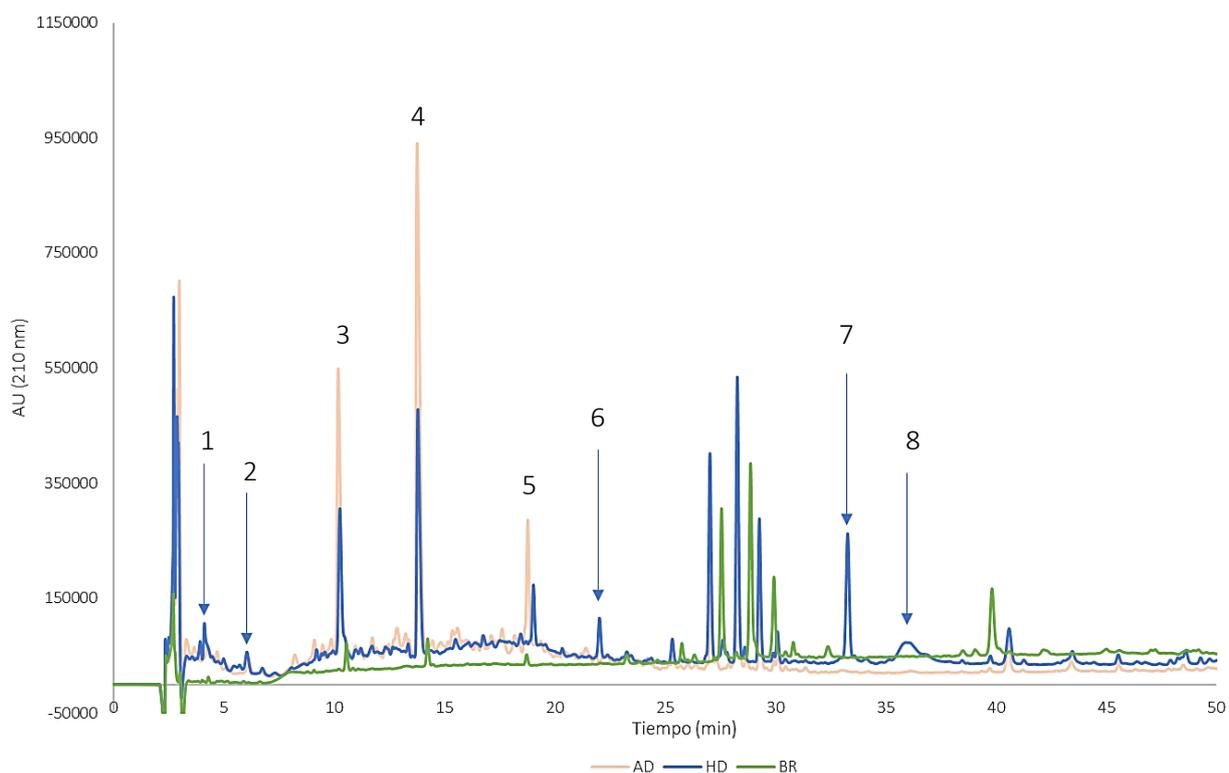


Figura I.22. Perfiles RP-HPLC de **HD_{sb}** (20 mg proteína/ml), **AD_{sb}** (8,3 mg proteína/ml) y **BR_{sb}** (0,4 mg proteína/ml)

Finalmente, podemos comparar los cromatogramas de las fracciones bioaccesibles **HD_{sb}**, **AD_{sb}** y **BR_{sb}** (Figura I.22) ya que fueron las fracciones que se utilizaron para el ensayo de absorción intestinal. Tanto los cromatogramas de **AD_{sb}** y **HD_{sb}** presentaron los picos 3, 4 y 5 (11, 14 y 19 min) que están presentes en **BR**, por lo que corresponderían al menos parcialmente a reactivos de la digestión. Sin embargo, estos picos aparecen con mucha mayor intensidad en **HD_{sb}** y **AD_{sb}** que en **BR_{sb}**, siendo mayor en **AD_{sb}** que en **HD_{sb}**. Con el fin de evaluar con mayor profundidad la composición de estos picos, se analizaron los espectros de absorción de los mismos (Figura I.23). Lo primero a observar es que las intensidades obtenidas para **AD** fueron superiores, como se había mencionado al describir los cromatogramas de la Figura I.22. En los espectros del pico 3 ($t_R = 11$ min), **HD_{sb}** y **AD_{sb}** presentaron dos zonas de absorción relevantes, una con máximo a ~ 220 nm y la otra entre 270-280 nm que corresponderían al enlace peptídico y aminoácidos aromáticos respectivamente, mientras que para **BR_{sb}** se observó un perfil similar pero en mucha menor intensidad. En el pico 5, **HD_{sb}** y **AD_{sb}** también presentaron máximos compatibles con sustancias proteicas; sin embargo, **BR** no presentó máximos de absorción a 220 y 280 nm, por lo que podría involucrar algún otro tipo de compuesto. En cuando al espectro de absorción del pico 4, se observó un gran pico que va entre ~ 190 y 220 nm y una absorción extremadamente débil de los 260 nm. Esto reforzaría la hipótesis de que el pico 4 estaría relacionado con presencia de las sales biliares y no con algún compuesto de naturaleza proteica. Teniendo en cuenta estos resultados, planteamos posibles hipótesis para entender este comportamiento. Una de ellas, aunque poco probable, es que podría haber componentes en la muestra que tuvieran los mismos t_R que los compuestos del **BR** y por eso aumentaría la intensidad de la señal. También cabe considerar que, en **BR**, dada la ausencia de otras proteínas, podría ocurrir una mayor proteólisis de las enzimas digestivas, disminuyendo la cantidad de moléculas de enzimas intactas. Otra hipótesis podría ser que componentes de **BR** se encuentren interaccionando con algún componente resultante de la digestión de **H** y **A** que lleve a intensificar la señal sin modificar los t_R cromatográficos, o que produzca un aumento de su concentración en las fracciones soluble directa y bioaccesible. Como se describió en la sección I.4.2.3, la interacción de péptidos productos de la digestión de **H** o **A** con sales biliares es altamente probable, lo que podría modificar las características de absorción de los picos.

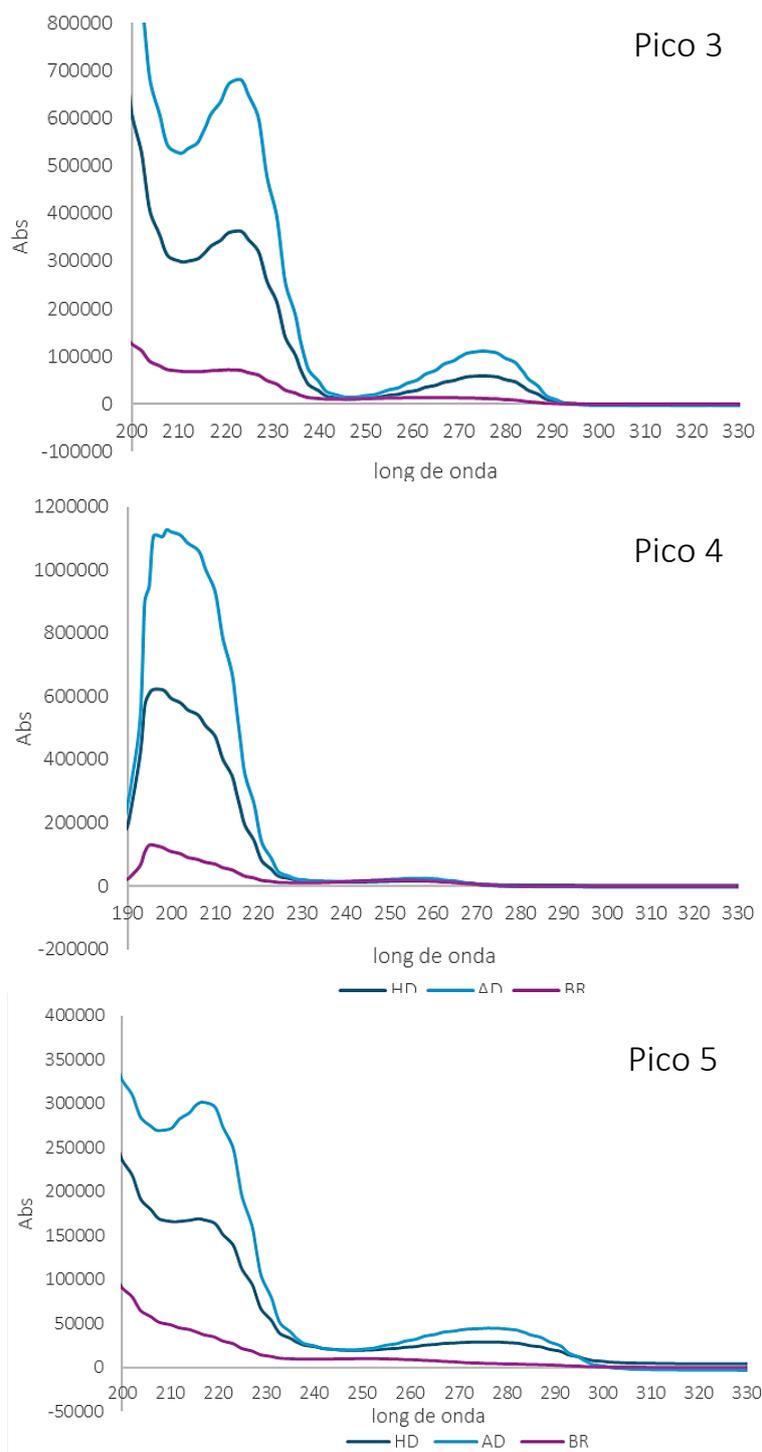


Figura I.23. Espectros de absorción de los picos 3, 4 y 5 de las muestras HD_{sb} , AD_{sb} y BR_{sb} .

Los picos más hidrofílicos (1 y 2, $t_R = 4$ y 6 min, y muchos otros más pequeños) de baja intensidad y diversos picos de t_R mayores correspondientes a moléculas más hidrofóbicas (6, 7 y 8, t_R : 22, 33 y 36) se detectaron sólo en HD_{sb} (Figura I.22). Tanto en AD_{sb} como en HD_{sb} aparecen muchos picos pequeños entre los 3 y los 35 min (no presentes en BR_{sb}), los cuales podrían corresponder a una gran diversidad de compuestos de naturaleza proteica, con

diferencias entre ambas fracciones bioaccesibles. No puede descartarse la presencia de otro tipo de sustancias asociadas a estos picos con absorción en el UV, y particularmente en las longitudes de onda analizadas, como los compuestos fenólicos. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por uno o varios máximos de absorción UV, con variaciones bastante amplias en su capacidad de absorción molecular. Los ácidos hidroxibenzoicos presentan máximos de absorción alrededor de los 280 nm, mientras que para los derivados del ácido hidroxicinámico se esperan picos a 290 y 305-330 nm. En el caso de los flavonoides, los flavanoles como las catequinas y los flavonoles presentan un máximo entre 270-280 nm, estos últimos muestran además otra absorción a 350-380 (Shahidi y Naczk, 2004).

Se realizó la evaluación de la absorción de **HD_{sb}** a través de la monocapa de células Caco-2 TC7. En la **Figura I.24** se muestran los cromatogramas (a diferentes longitudes de onda) obtenidos para la muestra original de **HD_{sb}** (20 mg proteína/ml) y los contenidos de las cámaras apical y basolateral luego de 3 h de incubación. Teniendo en cuenta que las intensidades de los picos de la muestra completa fueron muy superiores que las registradas para las fracciones apical y basolateral, se muestra también una figura conteniendo solo los cromatogramas de dichas fracciones a fin de facilitar su análisis (**Figura I.25**).

En primer lugar, se presentan los cromatogramas realizados a 220 nm (**Figura I.25.A**), donde se puede observar que los perfiles de la fracción apical y de la basolateral fueron similares. El cromatograma de la fracción basolateral presentó varios picos pequeños, en particular pueden destacarse los detectados a $t_R = < 10, 32, 33$ y 36 min que serían provenientes de los productos de digestión de **H**. Este comportamiento pudo corroborarse en los cromatogramas correspondientes a 257 y 278 nm (**Figura I.25.B** y **Figura I.25.C**). Esto indicaría que una proporción de las moléculas presentes en la cámara apical con $t_R < 10$ min y > 30 min serían capaces de atravesar la monocapa celular y alcanzar la cámara basolateral.

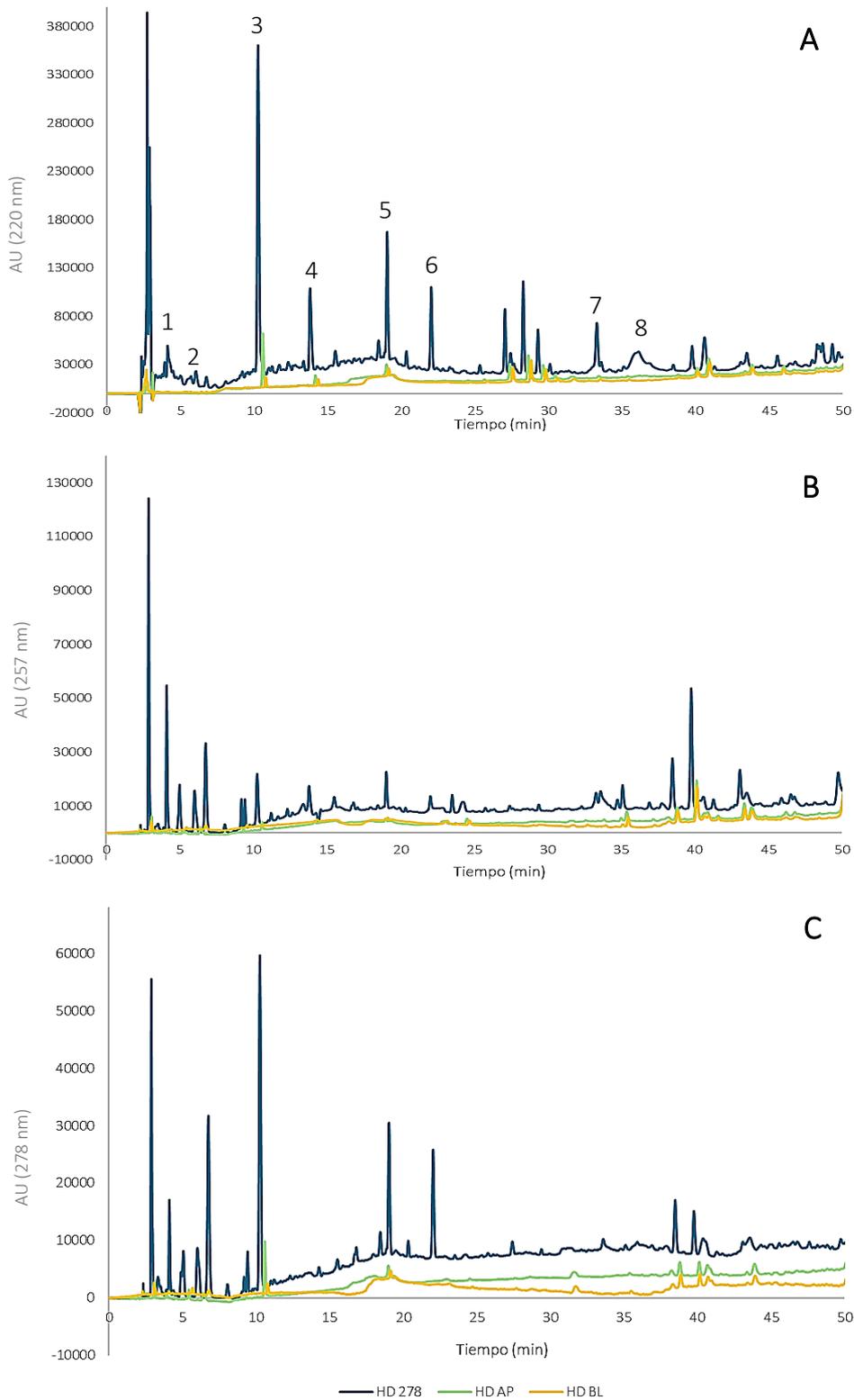


Figura 1.24. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HD_{sb} (20 mg proteína/ml), Cámara apical (HD AP) y cámara basolateral (HD BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm.

La fracción **AD_{sb}** (8,3 mg proteína/ml) también fue analizada a las diferentes longitudes de onda. En la **Figura I.26** se pueden observar las comparaciones entre la fracción completa y las apicales y basolaterales a las tres longitudes de onda evaluadas y en la **Figura I.27** la comparación de las fracciones apicales y basolaterales. Analizando las tres longitudes de onda (**Figura I.27.A, B y C**), en la fracción apical se detectaron con mayor intensidad los picos correspondientes a los reactivos de la digestión (t_R entre 11 y 19 min) y varios picos muy pequeños en todo el rango de corrida, en especial algunos picos de naturaleza hidrofílica (hasta 6 min), y algunos picos más hidrofóbicos ($t_R > 35$ min). En la fracción basolateral, se ve una clara disminución de esos picos de los reactivos y los picos más hidrofílicos ($t_R < 10$ min) y una persistencia de algunos picos más hidrofóbicos entre 32 y 34 min.

Analizando los resultados de las fracciones basolaterales para **HD_{sb}** y **AD_{sb}** puede inferirse que hubo pasaje de algunos compuestos provenientes de las muestras, presumiblemente de naturaleza proteica y sin modificaciones durante el pasaje dados los similares t_R en ambas cámaras, aunque esto no puede afirmarse sin una identificación de los péptidos presentes en cada caso. En términos generales y de acuerdo con estos ensayos podemos decir que ocurrió pasaje de moléculas con variabilidad en sus características de hidrofobicidad/hidrofobicidad. Además de las moléculas asociadas a los picos compartidos con **BR** y de las que no podemos afirmar o no la presencia de compuestos derivados de **H** o **A**, moléculas derivadas de la digestión de **H** (en **HD_{sb}**) correspondientes a t_R entre 3 y 6 min y 32 y 36 min y de naturaleza proteica habrían atravesado la monocapa. Un comportamiento similar ocurriría para **AD_{sb}**, aunque en este caso resultó más difícil detectar el pasaje ya que los picos presentes en la fracción basolateral eran demasiado pequeños.

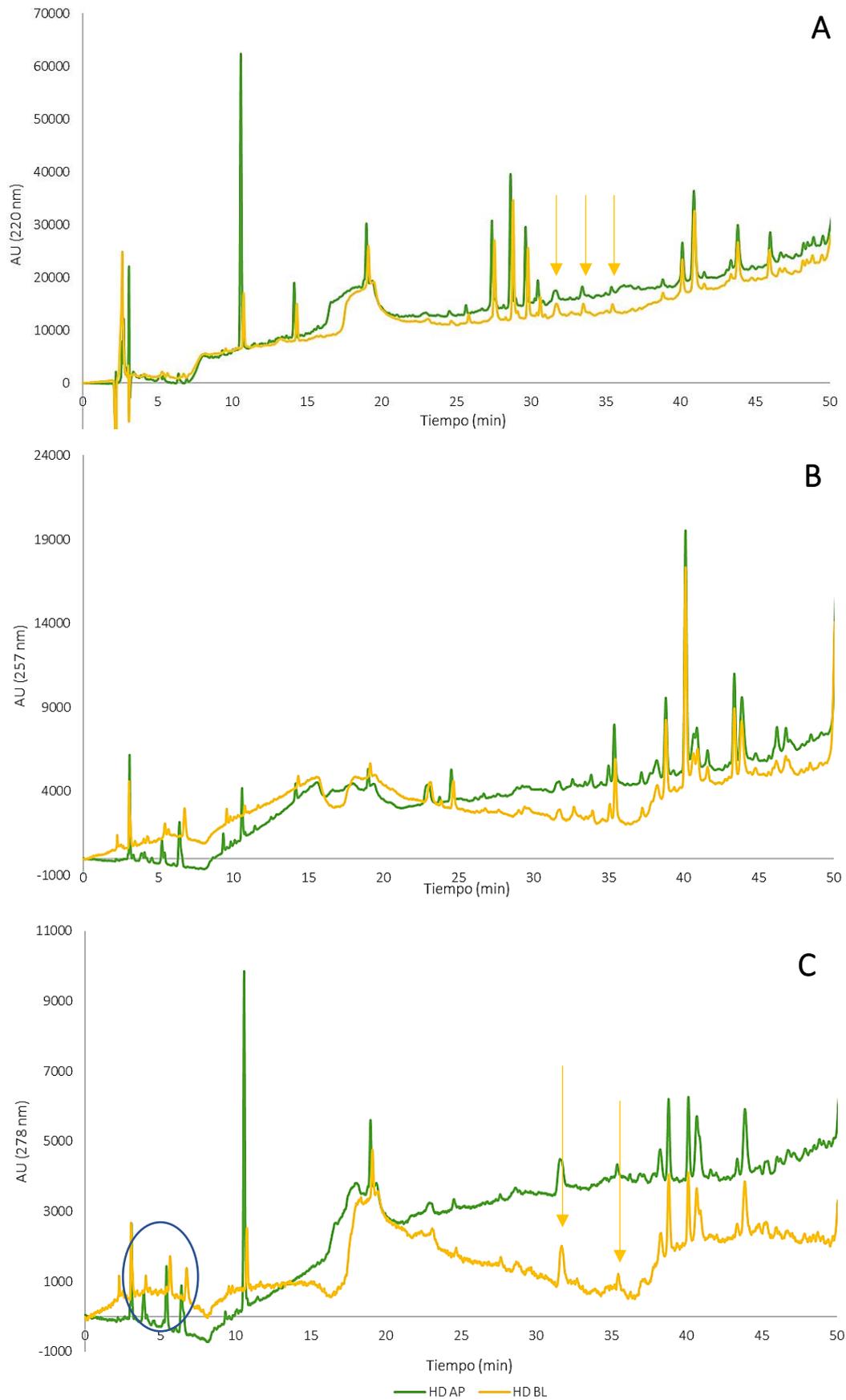


Figura 1.25. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HD_{sb} (20 mg proteína/ml), Cámara apical (HD AP) y cámara basolateral (HD BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm.

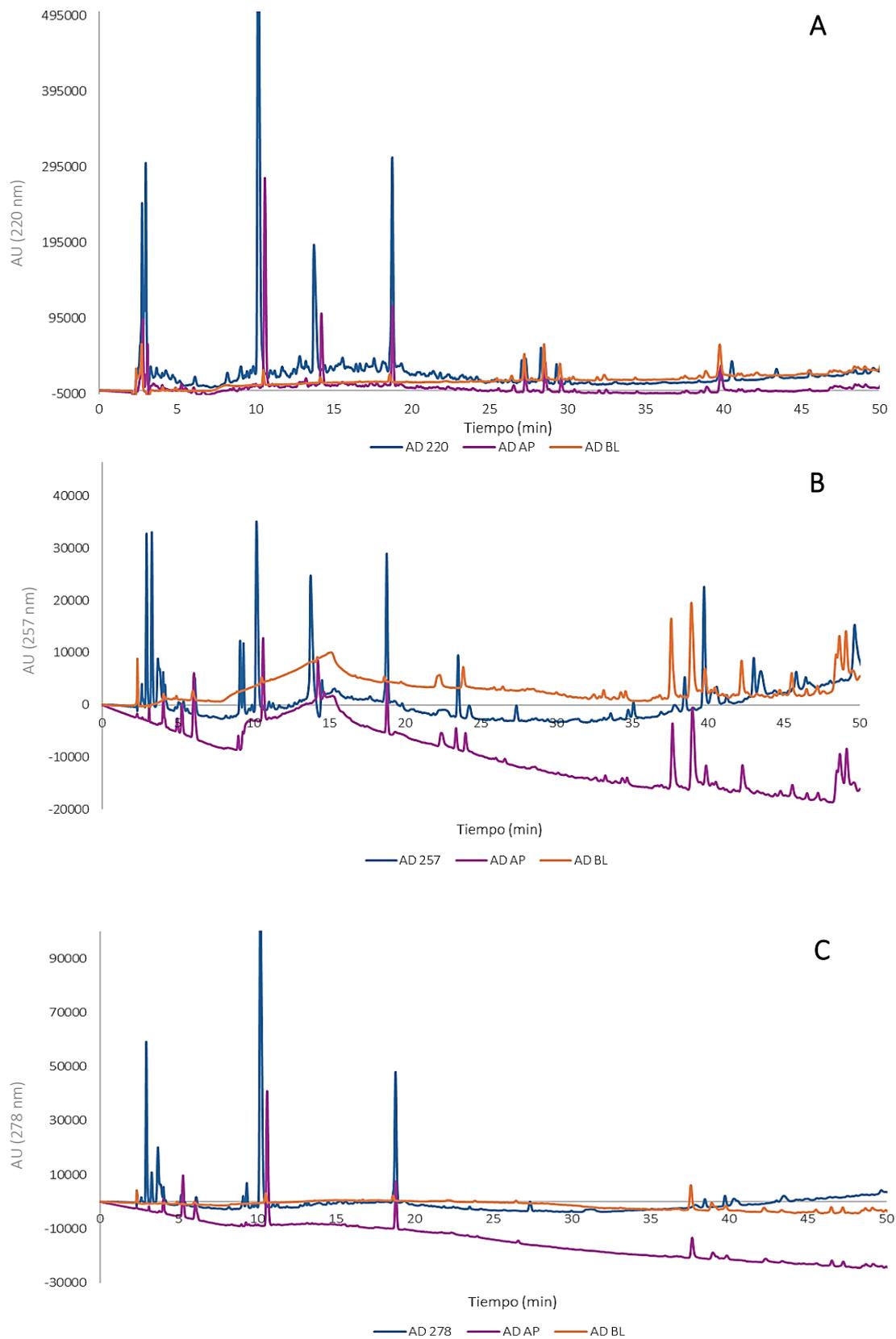


Figura 1.26. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **AD_{sb}** (8,3 mg proteína/ml), Cámara apical (AD AP) y cámara basolateral (AD BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm.

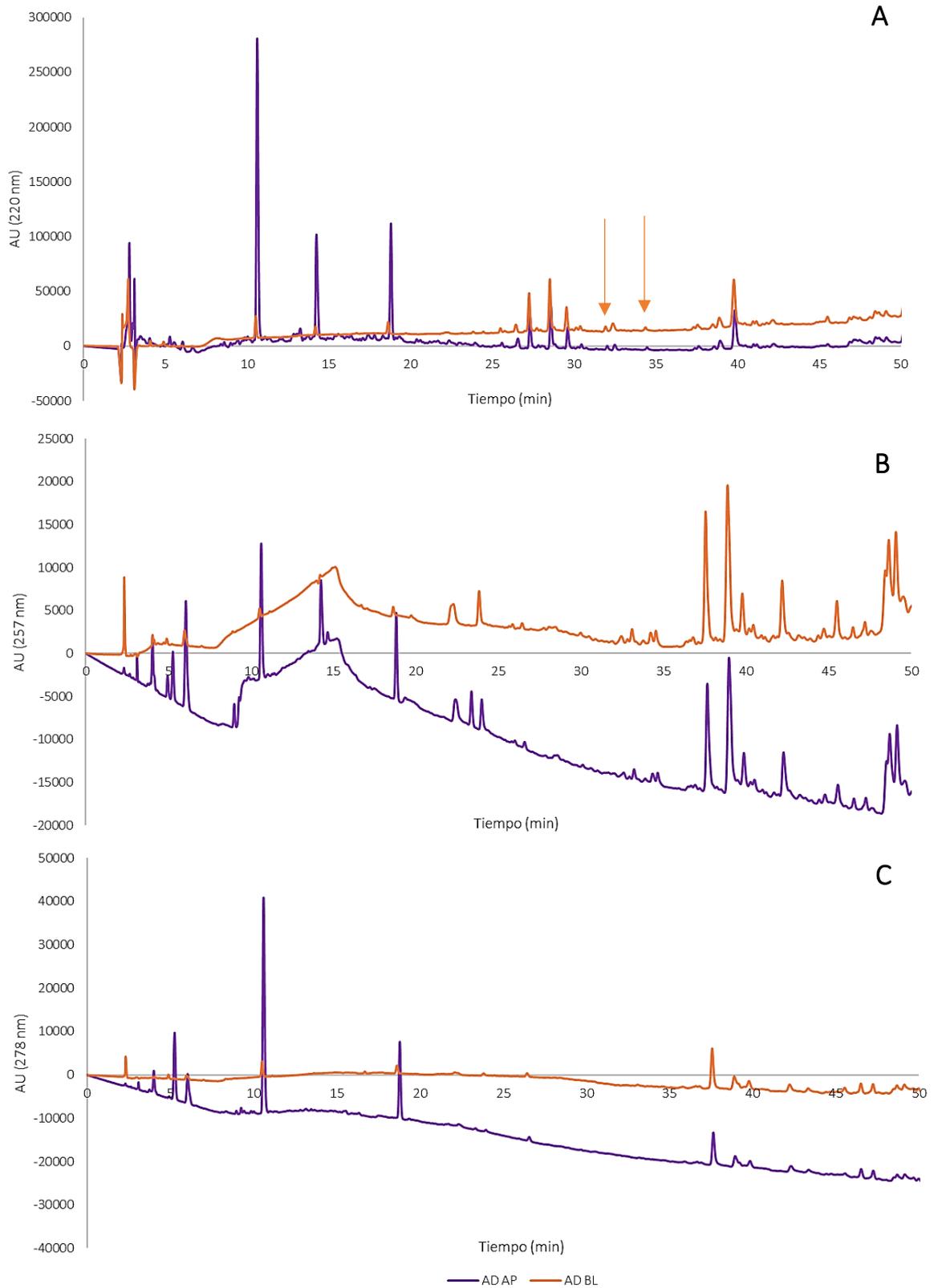


Figura 1.27. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **AD_{sb}** (8,3 mg proteína/ml), Cámara apical (AD AP) y cámara basolateral (AD BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm.

Para ambas muestras, se detectó que en la fracción apical disminuyeron o no se detectaron muchos de los picos que si estaban en la fracción completa (**Figuras 1.24 y 1.26**). Esta disminución puede ocurrir por dos razones: 1) parte de las moléculas en la cámara apical, al estar en contacto con las células intestinales, fueron hidrolizadas por la acción de las peptidasas del borde en cepillo; 2) parte de las moléculas atravesaron la monocapa. Este proceso podría ocurrir, como se describió previamente, a través de mecanismos paracelulares (llegando el péptido intacto a la cámara apical) o transcelulares. En este último caso, podría ocurrir hidrólisis intracelular completa o parcial del péptido, pudiendo llegar a la cámara basolateral una molécula diferente. En función de los resultados obtenidos puede inferirse que ambos procesos pueden haber ocurrido sobre los componentes de **HD_{sb}** y **AD_{sb}**. García Fillerías y Tironi (2021) realizaron la evaluación de la absorción de la fracción soluble completa de un aislado proteico de amaranto digerido a través de la monocapa celular utilizando la misma metodología que en este trabajo. En ese caso, informó que detectaron picos en la cámara basolateral (que también estaban presentes en la cámara apical) pero en menor intensidad por lo que postuló que hubo pasaje de moléculas por la monocapa celular con variabilidad en sus características de hidrofiliidad/hidrofobicidad.

Por otra parte, no puede descartarse que moléculas de compuestos fenólicos presentes en las fracciones bioaccesibles hayan atravesado la monocapa. La tasa de absorción intestinal de los compuestos fenólicos es baja y muy dependiente de las estructuras. Normalmente, los polifenoles se presentan en la dieta en forma de ésteres, glicósidos o formas poliméricas, que no se absorben directamente y deben hidrolizarse por enzimas de la pared intestinal para poder absorberse. Las características de algunos esqueletos de agliconas flavonoides permiten su transporte a través de las membranas del intestino delgado por difusión pasiva. Cuando la molécula contiene azúcares formando un derivado glicosídico aumenta la hidrofilia, lo que reduce la posibilidad de difusión pasiva. La tasa de absorción depende también de la naturaleza del azúcar presente en la molécula (Pérez Gregorio et al., 2020). La literatura muestra que los CF más abundantes en **HD** ((-)-epicatequina, polidatina, OH-tirosol) son absorbidos en el intestino delgado en tasas apreciables (Borges et al., 2018; Yang et al., 2024; Malapert et al., 2018). Por otro lado, en el caso de **AD**, el CF ampliamente mayoritario fue el ácido siríngico. Hithamani et al. (2017) investigaron la absorción de algunos CF puros, así como la absorción de compuestos fenólicos de distintas fuentes vegetales en el modelo de monocapa Caco-2 y

encontraron que, entre los compuestos fenólicos puros, el ácido siríngico presentó la máxima absorción y que la permeabilidad de los ácidos fenólicos a través de la monocapa de Caco-2 fue mayor que la de los flavonoides.

Aunque la digestión ha sido ampliamente investigada, especialmente durante el último siglo, todavía se está lejos de una comprensión completa de lo que la mucosa intestinal "hace" a los péptidos dietarios y lo que los péptidos dietarios "hacen" al cuerpo humano a través de la interacción con la mucosa intestinal. Es por esto, que varios aspectos esperan ser abordados definitivamente, como por ejemplo la contribución dinámica de las proteínas endógenas que surgen de las células epiteliales descamadas tanto para la digestión como para el digestoma (Picariello et al., 2016). Por otra parte, en el presente estudio, si bien hay indicios de pasaje de moléculas a través de la monocapa de células intestinales, resta aún mucho por hacer para poder identificar y definir que modificaciones sufren esas moléculas, cuál es el mecanismo y magnitud del proceso de absorción intestinal, y si mantienen su actividad luego del mismo.

I.5. Conclusiones

Con el fin de analizar la potencialidad de la harina (**H**) y del aislado proteico (**A**) de arvejas como ingredientes alimentarios antioxidantes, se estudiaron extractos acuosos y orgánicos (presumiblemente enriquecidos en compuestos de naturaleza proteica y en compuestos fenólicos, respectivamente) obtenidos a partir de estos ingredientes, antes y después de ser sometidos a procesos de DGIS, evaluando su composición y actividad.

En cuanto a los *ingredientes*:

- ✓ Se prepararon **H** y aislado proteico (**A**) a partir de arvejas amarillas argentinas.
- ✓ Se comprobó que estas arvejas contienen un bajo nivel de factor antitriptico.
- ✓ Se obtuvo la composición centesimal de **H** y de **A** que fue comparable con las obtenidas en la bibliografía para arvejas de otros países. Se caracterizó la composición polipeptídica y la fracción de compuestos fenólicos (CF) de ambos.
- ✓ Se comprobó que **A** presentó un alto contenido de proteína con buena solubilidad y que durante su preparación se pierden polipéptidos menores a 43 kDa, probablemente correspondientes mayormente a albúminas, presentes en la harina.
- ✓ Se evaluó la mejor condición para la extracción de CF, extracción “convencional”, extracción ácida y, extracción asistida por ultrasonido (EAU), seleccionándose esta última. Se comprobó que algunos CF presentes en **H** se perdieron durante la preparación de **A** (**H_e** versus **A_e**).

Como es sabido, para poder analizar la bioaccesibilidad de los componentes potencialmente activos es necesaria la aplicación de un protocolo de DGIS que simule lo mejor posible la situación *in vivo*.

En cuanto a la *digestión gastrointestinal simulada*:

- ✓ Se compararon dos protocolos de DGIS utilizando el método consensuado internacionalmente de la acción COST INFOGEST; un primer ensayo (protocolo 1) realizado en tubo con algunas modificaciones (enzimas y actividades enzimáticas) y un segundo ensayo (protocolo 2) en el cual la DGIS se llevó a cabo en bio-reactor utilizando

las condiciones del método COST INFOGEST. Se evaluó la influencia de las condiciones de digestión y la matriz alimentaria. Aunque las condiciones de digestión fueron diferentes con respecto a las actividades enzimáticas, el grado de hidrólisis de las proteínas fue similar en los digeridos de aislado proteico (**A**), pero fue diferente entre los digeridos de **H**. La DGIS de **H** por ambos métodos no produjo cambios en la solubilidad proteica; para los digeridos de **A**, la DGIS realizada con el protocolo 2 produjo un incremento significativo en la solubilidad en buffer. Tanto en los digeridos de **H** como de **A** (por ambos protocolos), las proteínas se hidrolizaron en una alta proporción, generando principalmente péptidos de bajo peso molecular (< 6 kDa). La mayor proporción de moléculas que aparecieron después de la digestión estuvo en el rango de PM entre 0,67 y 4,2 kDa con una intensidad máxima correspondiente a ~ 1,7 kDa (~15 aminoácidos), aunque también se encontraron moléculas entre 0,42 y 0,1 kDa en todos los digeridos. A partir de estos resultados, se continuó el estudio realizando el protocolo 2.

- ✓ **AD** presentó una mayor disminución de las moléculas mayores a 6,5 kDa, presentando una mayor proporción de moléculas con PM < 2 kDa con respecto a **HD**.
- ✓ Muchos de los CF presentes en **H_e** no fueron detectados en **HD_e**, especialmente algunos compuestos flavonoides no mayoritarios (quercetina-3-glucósido, naringenina, hesperetina, (+)-catequina) y los más abundantes (procianidina B1) y (-)-epigallocatequina. Sin embargo, la (-)-epicatequina aumentó y apareció (-)-galocatequina galato en la muestra **HD_e**.
- ✓ De todos los CF detectados en **A_e**, solo 4 se identificaron en **AD_e**: ácido elágico y (+)-catequina (aumentaron), ácido rosmarínico (disminuyó), y trans-resveratrol (sin cambios). Además, en **AD_e** aparecieron (-)-galocatequina galato (como en **HD_e**), miricetina y una cantidad muy importante de ácido siríngico.
- ✓ Los extractos etanólicos pudieron ser perfectamente solubilizados en buffer PBS. Este hecho junto con información bibliográfica indica que es esperable que las fracciones solubles acuosas estudiadas contengan CF.

*Estos resultados mostraron algunas diferencias en la composición peptídica/polipeptídica en la fracción acuosa de ambos digeridos y diferencias notables entre la composición de CF de **HD_e** y **AD_e**.*

Dado el conocimiento previo acerca de la elevada citotoxicidad e inducción de estrés oxidativo por parte de las sales biliares sobre células epiteliales intestinales (también comprobadas en esta Tesis), se recurrió al uso de la resina colestiramina activada conocida por su capacidad de remoción de este tipo de compuestos, para la obtención de la denominada fracción bioaccesible (**sb**) a partir de las fracciones soluble directa (centrifugación directa del digerido, **sd**).

En cuanto a las *fracciones solubles y “bioaccesibles” acuosas*:

- ✓ **HD_{sb}** y **AD_{sb}** presentaron una disminución muy importante de las moléculas mayores a 6,5 kDa y de las moléculas más pequeñas (en ambos casos correspondientes en gran parte a reactivos de digestión), y una disminución parcial de las moléculas entre 6,5 y 0,1 kDa (entre las que se encontrarían las sales biliares y también sustancias pepticas y fenólicas derivadas de la DGIS de **H** y **A**).

Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de todas las fracciones, utilizando dos metodologías: ORAC (evaluando la capacidad secuestrante de radicales peroxilos) y HORAC (midiendo la inhibición de radicales hidroxilos).

Por el método de *ORAC*:

- ✓ Las fracciones solubles en el buffer PBS mejoraron la potencia ORAC luego del proceso de DGIS: alrededor de 3 veces en el caso de **HD_s** y más de 4 veces en el caso de **AD_s**, alcanzando ambos digeridos potencias similares.
- ✓ Las fracciones solubles directas **HD_{sd}** y **AD_{sd}** presentaron similares valores de IC₅₀ que sus correspondientes fracciones solubles en PBS.
- ✓ Luego del tratamiento con colestiramina, la potencia ORAC disminuyó significativamente respecto a las fracciones solubles completas para ambos digeridos, pero el cambio fue mayor en el caso de **HD_{sb}**. **AD_{sb}** presentó mayor potencia (alrededor

del doble) que **HD_{sb}** indicando que en **AD** permanecen mayor proporción de componentes con alta capacidad antioxidante luego tratamiento con colestiramina.

Por el método de *HORAC*:

- ✓ **HD_s** no tuvo diferencia con la muestra sin digerir, mientras que **HD_{sd}** presentó una potencia mayor que **H_s**, mostrando en este caso un efecto del solvente de solubilización de los compuestos
- ✓ **AD_s** y **AD_{sd}** aumentaron su potencia *HORAC* con respecto a **A_s**
- ✓ **HD_{sb}** presentó menor potencia que **HD_s** y **HD_{sd}**
- ✓ **AD_{sb}** no presentó cambios respecto a **A_{sd}**
- ✓ **AD_{sb}** y **HD_{sb}** presentaron similares potencias.

*A partir de los resultados obtenidos se concluyó que la actividad registrada en **HD_{sb}** y **AD_{sb}** estaría dada por los componentes derivados de la digestión de los ingredientes de arveja ya que los reactivos de digestión prácticamente no aportan componentes con potencialidad antioxidante.*

*Las diferencias de comportamientos registradas entre ambos métodos están relacionadas con los distintos mecanismos de acción en cada caso y la capacidad de distintas moléculas de ejercer cada unos de ellos. El tratamiento con colestiramina produjo una disminución de la potencia *ORAC* y *HORAC* de ambos digeridos, indicando que se eliminaron moléculas con alta actividad en ese proceso. Esto también podría ocurrir in vivo por interacción de péptidos derivados de la digestión gastrointestinal que interaccionan con sales biliares y podrían dejar de estar disponibles para actuar a nivel intestinal o para su absorción.*

En cuanto a las *fracciones solubles y "bioaccesibles" de los extractos etanólicos*:

- ✓ Se comprobó que estas fracciones, además de los CF, contienen otros componentes, presumiblemente péptidos y aminoácidos.
- ✓ Después del tratamiento con la resina, el CFT disminuyó en mayor proporción en **HD_{esb}** que en **AD_{esb}**.

En estas fracciones también se evaluó su actividad antioxidante acelular *in vitro* utilizando el método de ORAC y el método de secuestro de radical ABTS*+.

- ✓ Para las fracciones de **H**, la DGIS no produjo cambios en la potencia ORAC, pero disminuyó por el método de ABTS
- ✓ **AD_e** mostró aumento de la potencia ORAC (pequeño) y ABTS.
- ✓ Para las fracciones bioaccesibles **HD_{esb}** y **AD_{esb}** disminuyó la potencia antioxidante: ORAC y ABTS para **HD_{esb}** y solo ORAC para **AD_{esb}**. Este comportamiento estaría relacionado con las diferencias en la composición de cada fracción bioaccesible, que como se mencionó previamente, resultó en una pérdida mayor de CFT para **HDe** luego del tratamiento con la colestiramina.

*La DGIS aumentó la potencia antioxidante solo en el caso de **AD_e**. El tratamiento con colestiramina produjo una disminución de la potencia de ambos digeridos, de manera más importante en **HDe**, indicando que se eliminaron moléculas con alta actividad en ese proceso. Las diferencias entre ambas muestras puede atribuirse fundamentalmente a la gran diferencia en la composición de CF anteriormete descrita para **AD_e** (principalmente ácido siríngico) y **HDe** (principalmente epicatecatequina, polidatina e OH-tirosol), los cuales podrían presentar diferentes comportamientos de interacción con otras sustancias y frente al tratamiento con la colestiramina, así como distintas potencias y mecanismos antioxidantes, sin descartarse diferencias en otros compuestos (péptidos y aminoácidos).*

Se realizaron ensayos de actividad antioxidante en cultivos de celulares intestinales (Caco-2 TC7), evaluando los niveles de citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles (acuosas y etanólicas) y el % de inhibición de ROS intracelulares.

- ✓ Todas las fracciones presentaron menores citotoxicidades que las correspondientes diluciones de los reactivos de digestión, indicando un efecto protector de los compuestos derivados de la DGIS de **H** y **A**
- ✓ Todas las fracciones bioaccesibles mostraron capacidad para disminuir el contenido de ROS intracelulares, con un efecto dependiente de la concentración.
- ✓ La potencia antioxidante de **AD_{sb}** fue superior a la de **HD_{sb}** ya que los valores de IC₅₀ fueron 0,26 y 0,62 mg proteína /ml respectivamente.

- ✓ En las fracciones etanólicas también se evidenció una mejora en la potencia **AD_{esb}** frente a **HD_{esb}** ya que los valores de IC₅₀ fueron 17 y 42 µg AGE/ml respectivamente, mostrando una pequeña mejora en la potencia de los compuestos presentes en el extracto obtenido a partir de los digeridos del aislado.
- ✓ La disminución de ROS debido al pretratamiento con las fracciones bioaccesibles conteniendo péptidos y/o fenoles de arvejas podría ocurrir por diferentes mecanismos:
 - 1) ingreso a la célula y acción como secuestradores de ROS dentro de la célula;
 - 2) ingreso a la célula y efecto sobre las vías de señalización que conducen a la inducción de enzimas o compuestos antioxidantes;
 - 3) interacción con la membrana plasmática desencadenando alguna vía de señalización que lleva a la producción de enzimas o compuestos antioxidantes o modificando la permeabilidad de la membrana (efecto reportado en el caso de los polifenoles).

Finalmente se evaluó el transporte intestinal de compuestos presentes en las fracciones bioaccesibles acuosas en dirección apical-basolateral simulando el epitelio intestinal mediante una monocapa de células Caco-2 TC7.

- ✓ Se detectó que en la fracción apical disminuyeron o no se detectaron componentes de la fracción completa, lo que sugiere una degradación parcial en la cámara apical al estar en contacto con las células intestinales, posiblemente por la acción de las peptidasas del borde en cepillo y/o dentro de la célula por peptidasas citoplasmáticas.
- ✓ Pudo inferirse que hubo pasaje de algunos compuestos provenientes de **HD_{sb}** y **AD_{sb}**, presumiblemente de naturaleza proteica (aunque no pueden descartarse compuestos fenólicos) y sin modificaciones durante el pasaje dados los similares t_R en ambas cámaras.

En términos generales podemos decir que se encontraron indicios de pasaje de moléculas con variabilidad en sus características de hidrofobicidad/hidrofobicidad.

Estos estudios son solo preliminares y deberán profundizarse para poder tener una mejor evaluación de la biodisponibilidad de los compuestos derivados de la digestión gastrointestinal

de H y A. Para todas las fracciones y péptidos que presumiblemente atravesaron la monocapa intestinal quedan por realizar a futuro estudios para la identificación y la evaluación de la actividad de los mismos.

En Conclusión, los estudios realizados en este Capítulo muestran que la harina y el aislado proteico de arveja constituyen ingredientes con buena potencialidad para ser incorporados en alimentos que pretendan ejercer un efecto preventivo del estrés oxidativo.

La **Figura 1.28** muestra un resumen de los resultados encontrados y las diferencias entre estos dos ingredientes.

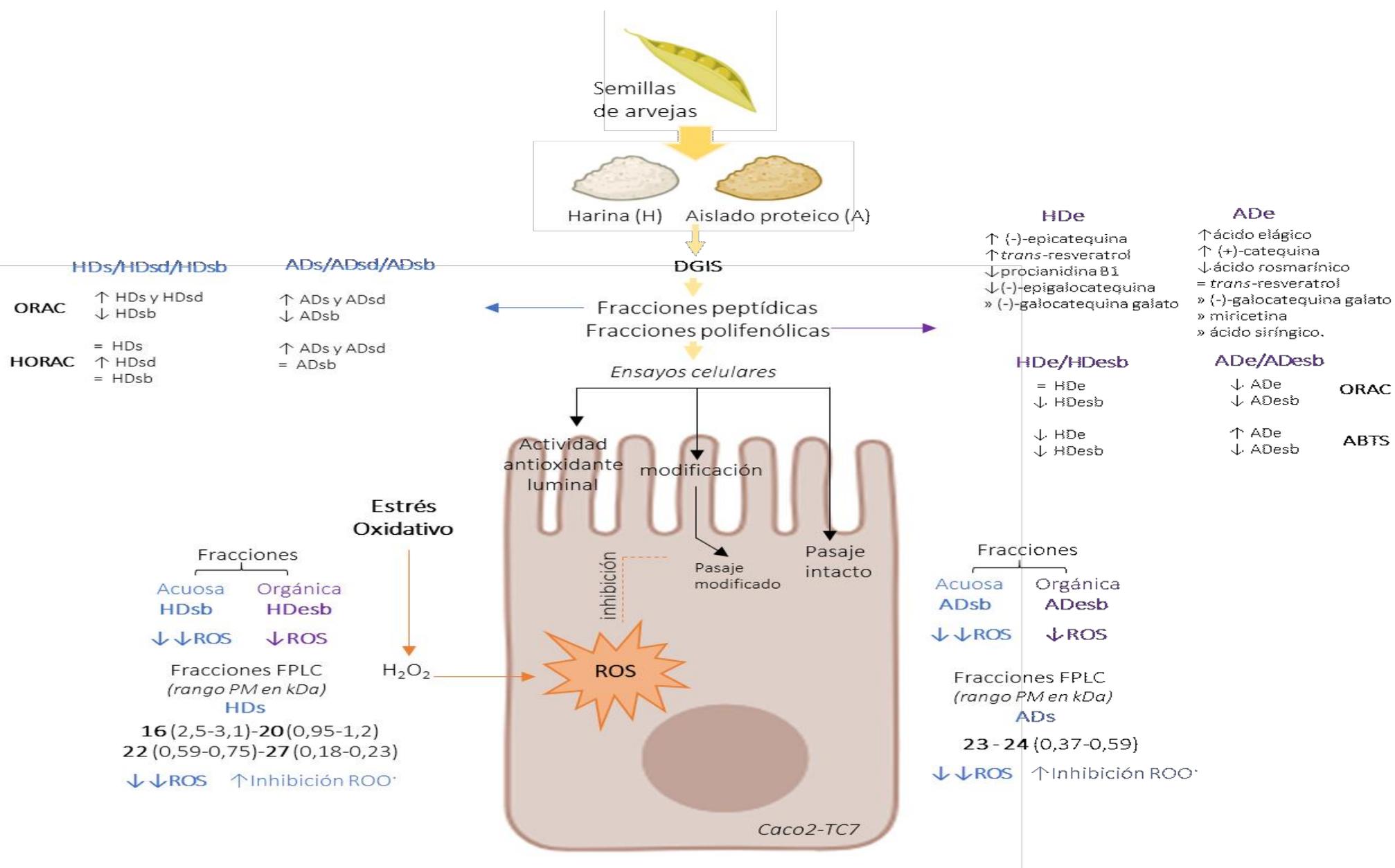


Figura 1.28. Resumen de los resultados.

Ensayos *in vitro* acelulares: ↑ indica aumento de actividad; ↓ indica disminución de actividad; = indica que no hubo diferencias significativas. Todo el análisis realizado con respecto a la correspondiente fracción sin digerir.

I.6.Bibliografia

- Adler – Nissen, J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 27, 1256-1262.
- Allen, W. F. (1931). A micro-Kjeldahl method for nitrogen determination. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 8 (10), 391-397.
- Almeida, D. T., Greiner R., Furtunado D. M. N., Trigueiro I. N. S., Araujo M. D. P. (2008). Content of some antinutritional factors in bean cultivars frequently consumed in Brazil. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 243-249.
- Anton, A. A., Ross, K. A., Lukow, O. M., Fulcher, R. G., Arntfield, S. D. (2008). Influence of added bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.) on some physical and nutritional properties of wheat flour tortillas. *Food Chemistry* 109(1), 33-41. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.005.
- AOAC (1990). In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (15th ed.). Arlington, U.S.A.: Association of Official Analytical Chemists.
- Artursson, P. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Science*, 79(6), 45–54.
- Barbana, C., Boye, J. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127, 94–101.
- Beermann, C., Euler, M., Herzberg, J., Stahl, B. (2009). Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. *European Food Research Technology* 229, 637–644. doi.org/10.1007/s00217-009-1093-1.
- Bellesi, F. A., Pilofof, A. M. R. (2021). Potential implications of food proteins-bile salts interactions. *Food Hydrocolloids*, 118,106766, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106766.
- Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D. (2018). The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules*, 23, 965. doi:10.3390/molecules23040965.
- Bertelli, M., Kiani, A., Paolacci, S., Manara, E., Kurtie, D., Dhuli, K., Bushati, V., Miertus, J., Pangallo, D., Baglivo, M., Beccari, T., Michelini, S. (2020). Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *Journal of Biotechnology*, 309, 29–33.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93–99.

- Borges, G., Ottaviani, J., van der Hooft, J., Schroeter, H., Crozier, A. (2018). Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 18-30. doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.002.
- Boye, J. I., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414–431
- Cao, Q., Teng, J., Wei, B., Huang, L., Xia, N. (2021). Phenolic compounds, bioactivity, and bioaccessibility of ethanol extracts from passion fruit peel based on simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 356, 129682.
- Chakraborty, P., Sosulski, F., Bose, A. (1979). Ultracentrifugation of salt soluble proteins in ten legume species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30: 766–771.
- Champ, M. M-J. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition* 88: S307–19
- Chen, L., Cao, H., Xiao, J. (2018). Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. In *Polyphenols: properties, recovery, and applications* (pp. 45-67). Woodhead Publishing.
- Chen, H., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 49–53.
- Cipollone, M. A. (2018). Evaluación de potenciales ingredientes funcionales antioxidantes obtenidos a partir de arveja. Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Coelho, L. M., Silva, P. M., Martins, J. T., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A. (2018). Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food & Function*, 9(11), 5499–5512. [doi:10.1039/C8FO01422A](https://doi.org/10.1039/C8FO01422A).
- Cubero, J. I., Moreno, M. T. (1983). Leguminosas de grano. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 31-47.
- Cui, L., Bandillo, N., Wang, Y., Ohm, J. B., Chen, B., Rao, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, 108, 106008.
- Czerwinski, J., Bartnikowsk, E., Leontowicz, H., Lange, E., Leontowicz, M., Katrich, E., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S. (2004). Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*)

meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol containing diets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 622–629

- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. López Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Proteins*, 67: 1939-1944.
- Delgado, M. C. O., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160-1167.
- Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. (2021) Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients* 13:273. doi:10.3390%2Fnu13010273
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernandez, T., Estrella, I., Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 297-304.
- Edwards, A. D., Slater, N. K. (2009). Protection of live bacteria from bile acid toxicity using bile acid adsorbing resins. *Vaccine*, 27(29), 3897-3903.
- Erlejman, A. G., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2006). Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 41 (8), 1247–1256.
- Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M. T., Del Barrio, A. S., Martinez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4): 331–342.
- Fontana, A., Antonioli, A., D'Amario Fernández, M. A., Bottinia, R. (2017). Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. *RSC Advance*, 7, 29446-29457
- Fraga, C., Oteiza, P., Galleano, M. (2018). Plant bioactives and redox signaling: (-)-epicatechin as a paradigm. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 31-40.
- Fратиanni, F., Cardinale, F., Cozzolino, A., Granese, T., Albanese, D., Di Matteo, M., ... Nazzaro, F. (2014). Polyphenol composition and antioxidant activity of different grass pea (*Lathyrus sativus*), lentils (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*) ecotypes of the Campania region (Southern Italy). *Journal of Functional Foods*, 7, 551-557.

- García Fillería, S. F. (2019). Evaluación de aislado proteico de amaranto como fuente de péptidos antioxidantes: estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- García Fillería, S., Nardo, A. E., Paulino, M., Tironi, V. (2021). Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100053. doi:10.1016/j.fochms.2021.100053
- García Fillería, S. F., Rodríguez, M., Tironi, V. A. (2021). Antioxidant effect of amaranth flour or protein isolate incorporated in high-fat diets fed to Wistar rats. Influence of dose and administration duration. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1), e13552.
- Gahlawat, P., Sehgal, S. (1992). Antinutritional content of developed weaning foods as affected by domestic processing. *Food Chemistry*, 47 (4): 333-336.
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., Sagratini, G. (2017). Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chemistry*, 221, 689-697.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80. doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J., Arruda, P. (1991). Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 851-854.
- Grzesik M., Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry* 241:480-492. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
- Gueguen, J., Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42, 209–224.
- He, J., Xu, L., Yang, L., Wang, X. (2018). Epigallocatechin gallate is the most effective catechin against antioxidant stress via hydrogen peroxide and radical scavenging activity. *Medical Science Monitor*, 24, 8198-8206

- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolomé, B. (2007). ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3392-3397.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactoalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 588-593.
- Hithamani, G., Kizhakayil, D., Srinivasan, K. (2017). Uptake of phenolic compounds from plant foods in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Biosciences* 42, 603–611. doi.org/10.1007/s12038-017-9705-6.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., Mc.Clements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12
- Jakubczyk, A., Baraniak, B. (2014). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after *in vitro* hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) globulins. *BioMed Research International*, 2014.
- Jiang, H., Gu, Z., Manthey, F., Chen, B., Rao, J. (2021). Comparison of the proximate compositions, nutritional minerals, pasting properties, and aroma differences of flours from selected yellow pea cultivars grown across the northern great plains. *ACS Food Science & Technology*, 1(9), 1529-1537.
- Kakiyama, G., Hosoda, A., Iida, T., Fujimoto, Y., Goto, T., Mano, N., ... Nambara, T. (2006). A direct method for the separation and quantification of bile acid acyl glycosides by high-performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography A*, 1125(1), 112–116. doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.037.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Ioannou, M., Karathanos, V., Hassapidou, M. (2010). Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 121, 682–690.
- Karami, A., Fakhri, S., Kooshki, L., Khan, H. (2022). Polydatin: Pharmacological mechanisms, therapeutic targets, biological activities, and health benefits. *Molecules* 2022, 27, 6474. doi.org/10.3390/molecules27196474.
- Karlsson, J., Artursson, P. (1991). A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial

- (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *International Journal of Pharmaceutics*, 71(1–2), 55–64.
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D., (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments. Antinutritional factors. *Food Science and Technology*, 42: 1113–1118.
- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., Romero, A. (2015). Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophysics*. [doi:10.1007/s11483-015-9411-6](https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6).
- Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., Mauer, L. J. (2012). Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12531–12539
- Liu, Y., Ragaee, S., Marcone, M. F., Abdel-Aal, E. S. M. (2020). Composition of phenolic acids and antioxidant properties of selected pulses cooked with different heating conditions. *Foods*, 9(7), 908.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J., Serna-Saldívar, S. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of Food Science*, 79(3), 273–283.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265–275
- Lu, B-Y., Quillien, L., Popineau, Y. (2000). Foaming and emulsifying properties of pea albumin fractions and partial characterisation of surface-active components. *Journal of the Science of Food & Agriculture* 80, 1964-1972.
- Luo, J., Li, M., Wu, H., Liu, Z., Barrow, C., Dunshea, F., Suleria, H. (2022). Bioaccessibility of phenolic compounds from sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation* 16669. doi.org/10.1111/jfpp.16669.

- Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., & Chen, G. (2018). Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112, 296-304
- Lv Q-z., Long, J-t., Gong, Z-F, Nong K-y, Liang, X-m, Qin T., Huang W., Yang, L. (2021). Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of polyphenolic compounds. *Natural Product Communications*, 16(7), 1–13
- Ma, Y., Gao, J., Wei, Z., Shahidi, F. (2021). Effect of *in vitro* digestion on phenolics and antioxidant activity of red and yellow colored pea hulls. *Food Chemistry*, 337, 127606
- Ma, Z., Boye, J. I., Hu, X. (2017). *In vitro* digestibility, protein composition and techno-functional properties of Saskatchewan grown yellow field peas (*Pisum sativum* L.) as affected by processing. *Food Research International*, 92, 64-78.
- Makri, E., Papalamprou, E., Doxastakis, G. (2005). Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 19: 583–594.
- Malapert, A., Tomao, V., Dangles, O., Reboul, E. (2018). Effect of foods and β cCyclodextrin on the bioaccessibility and the uptake by Caco-2 cells of hydroxytyrosol from either a pure standard or alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(18), 4614-4620. doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00556.
- Manassero, C., Vaudagna, S., Sancho, A., Añón, M., Speroni, F. (2016). Combined high hydrostatic pressure and thermal treatments fully inactivate trypsin inhibitors and lipoxygenase and improve protein solubility and physical stability of calcium-added soymilk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 86–95.
- Martín-Cabrejas, M. A., Ariza, N., Esteban, R., Mollá, E., Waldron, K., López-Andréu, F. J. (2003). Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1254-1259.
- Martínez, E. N., Añón, M.C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2523-2530

- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577–586.
- Millar, K. A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., Barry-Ryan, C. (2019). Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103233.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113-24.
- Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews*, 27(2), 308-329. [doi:10.1017/S0954422414000225](https://doi.org/10.1017/S0954422414000225).
- Naveeda, K., Jamuna, P. (2006). Nutritive value and sensory profile of microwave and pressure cooked decorticated legumes (dals). *Journal of Food Processing and Preservation*, 30, 299-313.
- Nawaz, M. A., Tan, M., Øiseth, S., Buckow, R. (2022). An emerging segment of functional legume-based beverages: A review. *Food Reviews International*, 38(5), 1064-1102.
- Nenadis, N., Zhang, H. Y., Tsimidou, M. Z. (2003). Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1874–1879. [doi:10.1021/jf0261452](https://doi.org/10.1021/jf0261452).
- Nishiki, T., Sato, I., Kataoka, T (1993). Partitioning behavior and enrichment of proteins with reversed micellar extraction: 1. Forward extraction of proteins from aqueous to reversed micellar phase. *Biotechnology & Bioengineering*, 42, 596-600.
- Norton, G. (1991). Proteinase inhibitors. En: J. P. F. D' Mello, C. M. Duffus, & J. H. Duffus (Eds.), *Toxic substances in crop plants*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 68–106
- Oelke, E. A.; Oplinger, E. S.; Hanson, C.V.; Davis, D.W.; Putnam, D. H.; Fuller, E. L.; Rosen, C. J. (1991). *Dry Field Pea en Alternative Field Crops Manual*. www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/drypea.html.

- Oh, J. H., Lee, C. Y., Lee, Y. E., Yoo, S. H.; Chung, J. O., Rha, C. S., Park, M. Y., Hong, Y. D., Shim, S. M. (2021). Profiling of *in vitro* bioaccessibility and intestinal uptake of flavonoids after consumption of commonly available green tea types. *Molecules* 26, 1518. doi:10.3390/molecules26061518.
- Olivera-Castillo, L., Pereira-Pacheco, F., Polanco-Lugo, E., OlveraNovoa, M., Rivas-Burgos, J., Grant, G. (2007). Composition and bioactive factor content of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp) raw meal and protein concentrate. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 87, 112–119
- Oliveira, S., Souza, G. A., Eckert, C. R., Silva, T. A., Silva Sobra, E. S., Fávero, O. P., Ferreira, M. J. P., Romoff, P., Baader, W. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure artigo. *Quimica Nova*, 37(3), 497–503.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Orsini Delgado, M., Galleano, M., Añón, M., Tironi, V. (2015). Amaranth peptides from gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against physiological reactive species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 27–34.
- Orsini Delgado, M., Tironi, V., Añón, M. (2011). Antioxidant activity of amaranth proteins or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1752–1760
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2772-2777.
- Ou, B., Hampsch-Woodil, M., Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4,619–4,626.
- Pająk, P., Socha, R., Gałkowska, D., Rożnowski, J., Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300-306.
- Pelgrom, P., Vissers, A., Boom, R., Schutyser, M. (2013). Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. *Food Research International*, 53(1), 232-239.

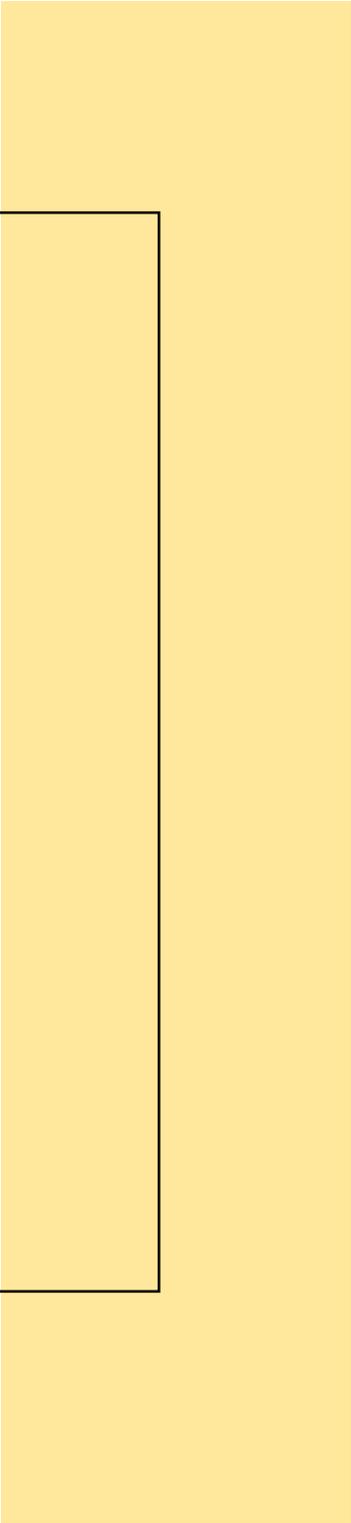
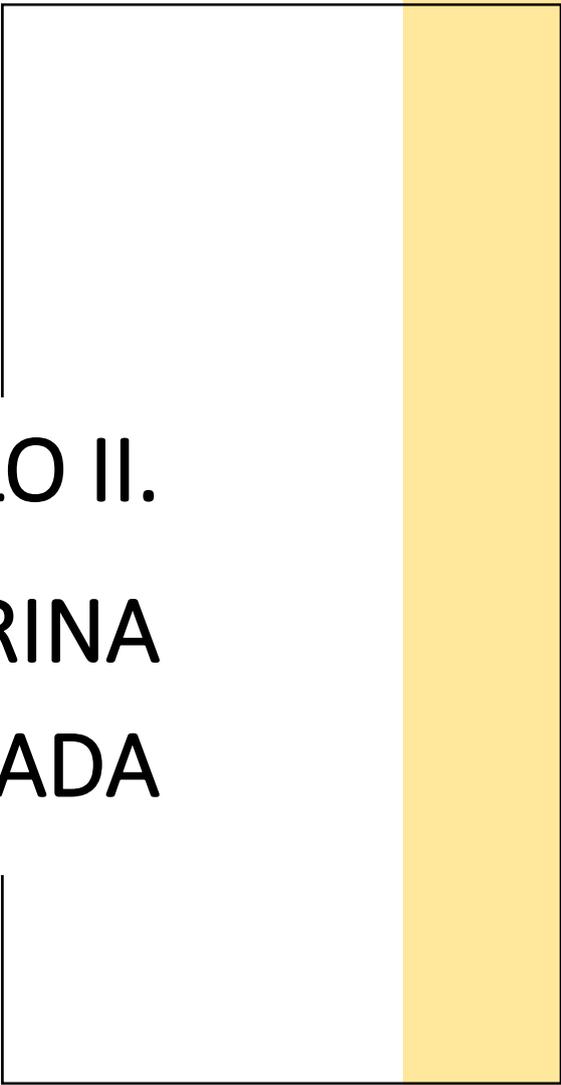
- Picariello, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2016). Use of brush border membrane vesicles to simulate the human intestinal digestion. *Food Research International*, 88, 327-335.
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(5), 948-956.
- Pignataro, M. F., Herrera, M. G., Doderio, V. I. (2020). Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. *Molecules*, 25(20), 4854.
- Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. (2022). Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: A quantitative structure-property relationship (QSPR) study. *Frontiers Nutrition*, 9, 882458. doi: 10.3389/fnut.2022.882458.
- Pohanka, M. (2016). Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 160(1).
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2011). Effects of cationic property on the *in vitro* antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Research International*, 44(4), 1069-1074.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.). Enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 58: 4712–4718
- Qayyum, M. M. N., Butt, M. S, Anjum, F. M., Nawaz, H. (2012). Composition analysis of some selected legumes for protein isolates recovery. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(4): 1156-1162.
- Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang, C. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rodríguez, M., Tironi, V. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International* 113410, doi:10.1016/j.foodres.2023.113410.
- Rodríguez, M., Tironi, V. A. (2020). Polyphenols in amaranth (*A. manteggianus*) flour and protein isolate: Interaction with other components and effect of the gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 137, 109524.

- Roy, F., Boye, J., Simpson, B. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43, 432–442.
- Saito, K., Hao, J.D., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674
- Salunkhe, D.K., Sathe, S.K., Reddy, N.R. (1989). Lipids. En: D.K. Salunkhe and S.S. Kadam (eds), *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*, Boca Raton, FL, CRC Press, 99–116.
- Sancho, R. A. S., Pavan, V., Pastore, G. M. (2015). Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76, 74-78.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10): 1949-1956
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16–22
- Shahzad, S., Mateen, S., Kausar, T., Naeem, S., Hasan, A., Abidi, M., Nayeem, S., Faizy, A., Moin, S. (2020). Effect of syringic acid and syringaldehyde on oxidative stress and inflammatory status in peripheral blood mononuclear cells from patients of myocardial infarction. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 393, 691–704.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2004). Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. In *phenolics in food and nutraceuticals* (pp. 480–527). Boca Raton: CRC Press. doi.org/10.1201/9780203508732.
- Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P.K.J.P.D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry* 102, 1119–1130.
- Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B., Najda, A. (2022). The current situation of pea protein and its application in the food industry. *Molecules*, 27(16), 5354.
- Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sosulski, F. W., McCurdy, A. R. (1987). Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean. *Journal of Food Science*, 52, 1010–1014.
- Southgate, D.A.T. (1976). *Determination of food carbohydrates*. London: Applied Science Publishers, Book

- Stoughton-Ens, M. D., Hatcher, D. W., Wang, N., Warkentin, T. D. (2010). Influence of genotype and environment on the dietary fiber content of field pea (*Pisum sativum* L.) grown in Canada. *Food research international*, 43(2), 547-552.
- Tabbaco, A., Meiattini, F., Moda, E., Tarli, P. (1979). Simplified enzymic/-colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical Chemistry*, 25, 336–337
- Tang, D., Zhang, Q., Duan, H., Ye, X., Liu, J., Peng, W., Wu, C. (2022). Polydatin: A critical promising natural agent for liver protection via antioxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9218738. doi.org/10.1155/2022/9218738.
- Tironi, V. A., Añón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43(1), 315–322. [doi:10.1016/j.foodres.2009.10.001](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.001).
- Tom, M (2008). A design for six sigma protein concentration process scale-up for black beans. Tesis de Maestría 3561. http://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/3561
- Ur-Rehman, Z., Salariya, A. M. (2005). The effects of hydrothermal processing on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *International Journal of Food Science and Technology* 40(7), 695-700.
- Vaz Patto, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H-J., Martín-Cabrejas, M. A., Domoney, C. (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105–143
- Vázquez-Sánchez, K., Martínez-saez, N., Rebollo-hernanz, M., Dolores, M., Gaytán-martínez, M., Campos-vega, R. (2018). *In vitro* health promoting properties of antioxidant dietary fiber extracted from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. *Food Chemistry*, 261, 253–259. [doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.064)
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Hernández, A., Martín-Alvarez, P. J., Sierra, I., Rodríguez, C., Blazquez, I., Vicente, G. (2002). Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Journal of the Science of Food & Agriculture* 83, 298–306.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Estrella, I., Gorospe, M. J., Ruiz, R., Bacon, J. (1994). Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 42, 2291-2295.
- Vidal-Valverde, C.; Frias, J.; Valverde, S. (1992). Effect of processing on the soluble carbohydrate content of lentils. *Journal of Food Proteins*, 55, 301-304.

- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C., Chemat, K. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 1066–1074
- Vo, Q. V., Bay, M. V.; Nam, P. C., Quang, D. T., Flavel, M., Hoa, N. T., Mechler, A. Theoretical and experimental studies of the antioxidant and antinitrosant activity of syringic acid. *The Journal of Organic Chemistry*, 85, 23, 15514–1552
- Wang, J., Kadyan, S., Ukhanov, V., Cheng, J., Nagpal, R., Cui, L. (2022). Recent advances in the health benefits of pea protein (*Pisum sativum*): Bioactive peptides and the interaction with the gut microbiome. *Current Opinion in Food Science*, 100944.
- Wang, W. Y., De Mejia, E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides may prevent age – related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308-322.
- Wolfe, K. L., Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907. *doi:10.1021/jf0715166*.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., Matwijczuk, A. (2020). Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review. *Nutrients*, 12(5), 1401.
- Wu, D. T., Li, W. X., Wan, J. J., Hu, Y. C., Gan, R. Y., Zou, L. (2023). A comprehensive review of pea (*Pisum sativum* L.): Chemical composition, processing, health benefits, and food applications. *Foods*, 12 (13), 2527.
- Xiao, Y., Zhang, Q., Miao, J., Rui, X., Li, T., Dong, M. (2015). Antioxidant activity and DNA damage protection of mung beans processed by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 216-225.
- Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 399–411.

- Yang J., Wang Y., Cai X., Qu B., Zhang Y., Sun Z., Yan, J. (2024). Comparative pharmacokinetics and tissue distribution of polydatin, resveratrol, and emodin after oral administration of Huzhang and Huzhang-Guizhi herb-pair extracts to rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 318, Part B, 17010, doi.org/10.1016/j.jep.2023.117010.
- Yin, S.W., Chen, J.C., Sun, S.D., Tang, C.H., Yang, X.Q., Wen, Q.B., Qi, J.R. (2011). Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). *Food Chemistry* 128: 420–426.
- Zhou, Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Zheng, J., Li, Y., Zhang, J. J., ..., Li, H. B. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from the seed coats of red sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.). *Antioxidants*, 8(7), 200.
- Zink, J. I., Zehnder-Wyss, O., Dällenbach, D., Nyström, L., Windhab, E. J. (2024). Enzymatic degradation of pea fibers changes pea protein concentrate functionality. *Current Research in Food Science*, 8, 100744.



CAPÍTULO II.
HARINA
FERMENTADA

INTRODUCCIÓN

II.1. INTRODUCCIÓN

La fermentación es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos en la producción de alimentos a base de cereales y legumbres. La fermentación natural o espontánea es la forma más común de fermentación en los países en desarrollo. La masa madre (“sourdough”) consiste en una mezcla de harina y agua, fermentada con la microbiota nativa de las semillas. La masa madre es una opción adecuada para incrementar el consumo de legumbres en la dieta diaria, utilizando sus harinas en las fórmulas para la elaboración de productos de panadería, y mejorando sus características sensoriales y funcionales mediante la fermentación (Gobbetti et al., 2019).

La fermentación natural se produce mediante la acción secuencial y competitiva de una gran cantidad de microorganismos, donde las cepas mejor adaptadas tienen una mejor tasa de crecimiento y eventualmente dominan la microbiota (Gobbetti et al., 2019; Adebo et al., 2022). La microbiota original de los granos, y por ende de la harina, se ve afectada por diversos factores como el clima (temperatura y humedad), las condiciones de almacenamiento, el ataque de insectos y la aplicación de fungicidas. Otra variable que afecta el proceso de fermentación es el tipo de grano debido a diferencias en la cantidad y calidad de los carbohidratos como sustratos iniciadores de la fermentación, en las fuentes de nitrógeno y en los factores de crecimiento. Esta microbiota está compuesta por una gran diversidad de bacterias, especialmente bacterias ácido lácticas (BAL), y levaduras (Adebo et al., 2022). A lo largo de la fermentación prevalecerán los microorganismos más adaptados a las condiciones ambientales, generalmente las BAL. Los parámetros tecnológicos utilizados en la preparación de productos fermentados, como el tiempo, la temperatura, la proporción de harina y agua para que la fermentación se produzca en un medio sólido o líquido, y la agitación, también tienen una influencia relevante en las comunidades microbianas. En este sentido, las masas o harinas fermentadas se pueden clasificar en tres tipos: el *tipo I* preparado mediante un proceso de refrescos diarios; el *tipo II* obtenido en un solo paso de fermentación generalmente en medio líquido en biorreactores; y el *tipo III* correspondería a las del tipo II que posteriormente son secadas y estabilizadas. Cada tipo tendrá diferentes características y usos, y se ha demostrado la prevalencia de diferentes tipos de microorganismos (Adebo et al., 2022; Carnevali et al., 2007; Rizzello et al., 2016).

Hay varios factores, como la temperatura de fermentación, tiempo, humedad y otras condiciones que afectan a la eficiencia de la fermentación en medio líquido. La fermentación natural se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas (30, 37 o 42 °C) lo que probablemente se asocie con los principales microorganismos que podrían ser transportados por las diferentes semillas. En ese sentido, la temperatura se puede controlar dependiendo de los microorganismos que se quieran seleccionar, por ejemplo, si se fermenta a 37 °C habrá preponderancia de BAL, pero si se hace a 30 °C puede haber crecimiento de *B. subtilis* y algunas levaduras. Otras variables de selección serán el tiempo de fermentación, principalmente entre 24/96 h y la agitación, que resulta relevante ya que se puede llevar a cabo con una velocidad de 200 a 450 rpm pudiendo acelerar el crecimiento de microorganismos, aumentar la interacción entre los mismos y los sustratos y de esa manera mejorar la eficiencia de la fermentación (Gan et al., 2017).

La fermentación de productos a base de semillas produce varias mejoras en la vida útil, la textura, el sabor, la calidad nutricional y la bio-funcionalidad. Tiene efectos beneficiosos sobre el síndrome del intestino irritable ya que varios compuestos, incluido las proteínas formadoras de gluten, los inhibidores de las enzimas digestivas y ciertos carbohidratos o polioles fermentables (FODMAPs) podrían hidrolizarse, previniendo los síntomas (Adebo et al., 2022; Gan et al., 2017). Además, tiene un efecto sobre la biodisponibilidad de los fitoquímicos, particularmente de los compuestos fenólicos (CF), al liberar CF unidos y sus agliconas. También, la fermentación puede producir proteólisis a través de proteasas endógenas de semillas que pueden activarse por reducción del pH, o mediante proteasas y peptidasas microbianas. Además de los aspectos funcionales, físicos y químicos de la modificación de proteínas, la fermentación puede producir la liberación de péptidos bioactivos mediante hidrólisis de proteínas, lo que conferiría efectos positivos sobre la salud humana (Adebo et al., 2017).

Varios estudios han demostrado que la fermentación (con microorganismos iniciadores o a través de la flora autóctona) de leguminosas potencia su valor nutritivo, reduce algunos compuestos endógenos antinutricionales como el ácido fítico, ejerce efectos beneficiosos sobre la digestibilidad de las proteínas y su valor biológico, y produce la liberación de compuestos bioactivos (Adebo et al., 2022; Gan et al., 2017). Por ejemplo, Boukid et al. (2021) informaron que la fermentación con *Lactiplantibacillus plantarum* de un concentrado de proteína de arveja produjo hidrólisis de las proteínas, lo que dio lugar a la formación de nuevos

sabores, con una reducción concomitante de antinutrientes y un aumento de péptidos bioactivos. Este proceso también puede permitir adaptar la funcionalidad de las proteínas fermentadas según el pH y la duración de la fermentación. Por ejemplo, las proteínas de arvejas fermentadas mejoraron la estabilidad de una emulsión (a pH = 7, después de 5 h de fermentación) y la capacidad de espumado (a pH = 4, después de 5 h de fermentación).

En resumen, las semillas comestibles fermentadas y sus productos generalmente contienen mayores niveles de componentes bioactivos, como algunas vitaminas, ácido γ -aminobutírico (GABA), CF y péptidos bioactivos, en comparación con los productos no fermentados. Más importante aún, exhiben diversas bioactividades, como efectos antioxidantes, antihipertensivos y anticancerígenos, lo que sugiere que pueden tener beneficios potenciales e integrales para la salud (**Esquema II.1**). En este sentido, los productos alimenticios fermentados pueden ser considerados como "alimentos funcionales" debido a sus potenciales beneficios para la salud (Adebo et al., 2022).



Esquema II.1. Productos derivados de la fermentación de semillas comestibles (Gan et al., 2017)

En cuanto a la actividad antioxidante, la fermentación podría producir un aumento a través de diferentes mecanismos, como la liberación de péptidos antioxidantes y la liberación y/o transformación de CF. También se ha informado que los microorganismos podrían aumentar la capacidad antioxidante de los productos fermentados mediante la secreción de enzimas antioxidantes, glutatión y otras biomoléculas como los exopolisacáridos con esta actividad (Adebo et al., 2017; 2022). Diversos estudios han registrado diferentes influencias de la fermentación sobre el efecto antioxidante en las semillas comestibles y sus productos, probablemente asociadas con diferencias en los métodos de fermentación, los componentes antioxidantes presentes en las muestras, así como en los métodos de extracción y evaluación del efecto antioxidante (Gan et al., 2017).

OBJETIVOS

II.2.Objetivos

El objetivo general del presente capítulo consistió en obtener harina de arveja naturalmente fermentada con actividad antioxidante mejorada como un nuevo ingrediente que pueda ser utilizado en el desarrollo de productos alimenticios. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos:

- I. Establecer condiciones para la preparación de harina de arveja naturalmente fermentada con características deseadas. Caracterizar fisicoquímicamente este ingrediente.
- II. Aplicar un proceso de digestión gastrointestinal simulada a la harina fermentada. Caracterizar los digeridos obtenidos, analizando la bioaccesibilidad de péptidos y compuestos fenólicos.
- III. Analizar la potencial actividad antioxidante de los digeridos gastrointestinales y fracciones obtenidas a partir de ellos, haciendo foco en péptidos y compuestos fenólicos.
- IV. Analizar la potencial absorción intestinal de los compuestos presentes en las fracciones bioaccesibles.
- V. Evaluar el efecto de la fermentación natural sobre los aspectos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.3. Materiales y Métodos

II.3.1 Preparación de las harinas fermentadas.

Se usaron semillas de arvejas amarillas (*Pisum sativum*) de la variedad Yams cultivada en la provincia de Buenos Aires (Argentina). La harina (H) fue obtenida por molienda en un molino Udy de laboratorio usando una malla de 0,5 mm y almacenadas en frascos a 4 °C.

II.3.1.1. Ensayos preliminares. Fermentación en tubo

Condiciones de concentración. Se ensayaron diferentes relaciones H/agua destilada para determinar la que mejor se adecuaba al procedimiento de fermentación. Se mantuvo constante la masa de harina (2 g) y se varió el contenido de agua destilada desde 1 a 3,5 ml. Todas las muestras fueron fermentadas en tubo sin agitación por 24, 48 y 72 h a 30 y 37 °C. Se les midió la evolución de pH (pHmetro Van London Co., previamente calibrado), el grado de proteólisis y la proteína total.

Condiciones de fermentación. Con los resultados obtenidos en el punto anterior, se llevó a cabo un primer *screening* para ajustar las diferentes condiciones de fermentación. En una primera instancia, los ensayos fueron realizados en tubo con agitación mediante un agitador rotacional. Se dispersó H en agua destilada en una relación 1/1,75 (concentración de H: 36,4 % p/p) la cual se incubó a dos tiempos (24 y 48 h) y dos temperaturas (30 y 37 °C). Luego de la fermentación, las muestras fueron congeladas a -20 °C. El pH final, el grado de proteólisis, el contenido de proteína total y soluble y la actividad antioxidante medida por el método de ORAC fueron analizados para las 4 muestras obtenidas de acuerdo con la metodología indicada posteriormente.

II.3.1.2. Fermentación en bio-reactor

Luego de los ensayos preliminares, la fermentación fue realizada en un bio-reactor (capacidad: 500 ml) termostatzado con camisa de vidrio conectada a un baño de agua (LAUDA RMT6) que permitió la recirculación de agua termostatzada (37 °C). La agitación se logró empleando un agitador vertical Dlab OS20-PRO20L (250 rpm) (**Imagen II.3**). Se llevaron a cabo ensayos en dos condiciones diferentes.

Condición 1: se dispersó H en agua destilada en una relación 1/1,75 y la dispersión fue incubada a 30 °C durante 24 h (HF1).

Condición 2: se dispersó H en agua destilada en una relación de 1/6 y la fermentación se llevó a cabo a 37 °C por 24 h (HF2).

Se registraron medidas de pH (Van London Co., previamente calibrado) durante diferentes tiempos de fermentación. Luego de la fermentación, las muestras fueron liofilizadas. Similares dispersiones de H inmediatamente liofilizadas luego de la preparación fueron usadas como controles (H1 y H2).



Imagen II.1. Bio-reactor utilizado en la fermentación natural de H

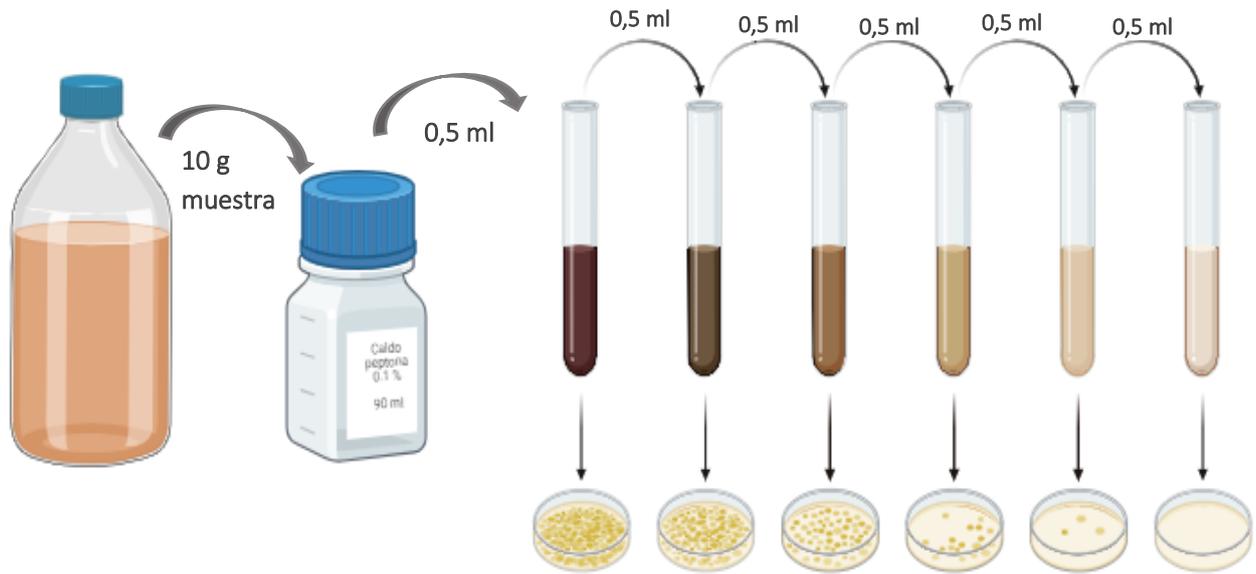
II.3.2. Análisis microbiológico.

Se realizaron diluciones seriadas de las harinas fermentadas (HF1/HF2) y sus controles (H1/H2) en caldo peptona (Esquema II.2), las que fueron sembradas en diferentes medios sólidos:

- MRS (de Man, Rogosa & Sharpe; Biokar Diagnostics, Argentina) incubación 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

- AN (agar nutritivo, Britania, Argentina) incubado por 24 h a 37 °C.

- YGC (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, Biokar Diagnostics, Argentina) incubado por 48 h a 30 °C.



Esquema II. 2. Diluciones seriadas de las harinas fermentadas y sus controles

Medios de Cultivo y coloraciones utilizadas

Agar MRS

- Peptona universal 10 g/l
- Extracto de carne 10 g/l
- Extracto de levadura 5 g/l
- D (+) glucosa 20 g/l
- Fosfato ácido de dipotasio 2 g/l
- Tween 80 1 g/l
- Citrato ácido de amonio 2 g/l
- Acetato de sodio 5 g /l
- Sulfato de magnesio 0.1 g/l
- Sulfato de manganeso 0,05 g/l
- Agar 15 g/l
- (pH = 6,5 ± 0,1)



Imagen II.2. Placa de cultivo con medio MRS

Agar PCA

- Triptona 5 g/l
- Extracto de levadura 2,5 g/l



Imagen II.3. Placa de cultivo con medio PCA

Glucosa 1 g/l

Agar 12 g/l

(pH = 7 ± 0,2)

Agar YGC

Extracto de levadura 5 g/l

Glucosa 20 g/l

Cloranfenicol 0,1 g/l

Agar 15 g/l

Diluyente para recuentos

Peptona 1 g/l

Los medios fueron esterilizados (121 °C, 15 min). Los que contenían agar fueron plaqueados en condiciones de esterilidad para su posterior utilización como medio de recuento para los microorganismos.

Todas las colonias obtenidas fueron testeadas con la tinción de Gram y la prueba de la enzima catalasa según los protocolos que se detallan a continuación:

Tinción de Gram

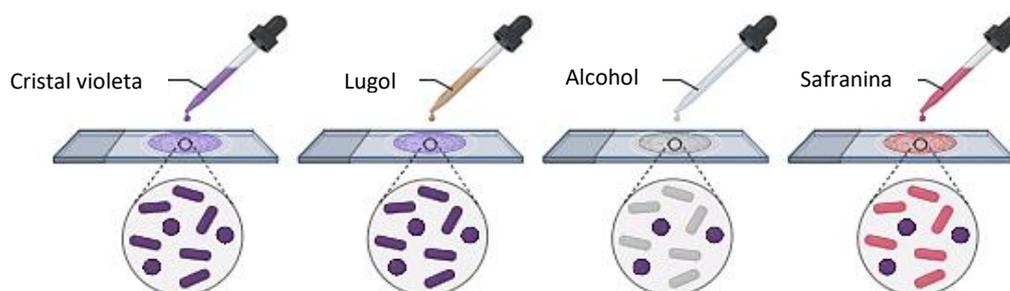
Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/l en etanol; solución de trabajo: solución madre diluida 1/10 con agua.

Lugol: 10 g I₂ + 20 g KI en 1 l de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona 4:1.

Las soluciones fueron filtradas antes de utilizarlas. Se realizó el protocolo que se muestra en el **Esquema II.3**.



	Tiempo de contacto (s)
Cristal violeta	120
Lugol	30
Lugol	30
	Lavar con agua
Decolorante	10
	Lavar con agua
Safranina	120

Esquema II. 3. Protocolo para la tinción de Gram

Prueba de la enzima catalasa

Se tomó una ansada de la colonia seleccionada y se colocó sobre un portaobjetos formando un botón. Sobre el mismo se vertió una gota de H₂O₂ 10 vol. (sustrato de la enzima). La presencia de burbujas (O₂) confirma presencia de la enzima catalasa positiva, en contra punto, ausencia de burbujas indica que es catalasa negativa, de acuerdo con la reacción mostrada en el **Esquema II.4.**



Esquema II. 4. Reacción mediada por la enzima catalasa

II.3.3 Digestión gastrointestinal simulada (DGIS).

Se realizó el protocolo consensuado de Minekus et al. (2014) según el *protocolo 2* (en bioreactor) descrito en el Capítulo I, sección I.3.2.1. Las muestras digeridas **H1D**, **H2D**, **HF1D**, **HF2D** fueron liofilizadas. Se prepararon también los controles de digestión correspondientes: Blancos de muestra: muestra + fluidos de digestión simulados sin enzimas, blanco de reactivos **BR**: fluidos de digestión simulados + enzimas + sales biliares, sin muestra. Las soluciones de electrolitos FSS, FGS y FIS fueron preparadas de acuerdo con Minekus et al. (2014).

II.3.4. Caracterización molecular y funcional de las muestras

Se analizaron los siguientes parámetros en las dispersiones de harinas (**H1**, **H2**), las harinas fermentadas (**HF1**, **HF2**) y los digeridos gastrointestinales (**H1D**, **H2D**, **HF1D**, **HF2D**) utilizando las mismas metodologías que en el Capítulo I:

II.3.4.1 Composición centesimal. Ver sección 1.3.1.3 (Capítulo I).

II.3.4.2. Determinación del grado de hidrólisis proteica. Ver sección 1.3.2.2 (Capítulo I)

II.3.4.3 Electroforesis. Ver sección 1.3.3.1 (Capítulo I).

II.3.4.4. Obtención fracciones solubles y determinación de la concentración de proteína soluble.

Las fracciones acuosas solubles fueron:

1) *solubles resuspendidos*: se resuspendieron las muestras **H2D** y **HF2D** liofilizadas (20 mg/ml) en buffer PBS (pH = 7,4) (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1h, 500 rpm), y posteriormente se centrifugó (10000×g, 10 min) conservando el sobrenadante (**H2D_s** y **HF2D_s** y **BR_s**).

2) *solubles directos (fracción digerible)*: el liofilizado se reconstituyó en agua milliQ en la misma proporción en la que se encontraba en la digestión; se homogenizó (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g, 10 min) conservando el sobrenadante (**HD_{sd}**, **HF2D_{sd}**, y **BR_{sd}**).

3) *solubles bioaccesibles*: para reducir el contenido de sales biliares de los solubles directos **HD_{sd}** y **HF2D_{sd}**, se agregó la resina colestiramina (C4650 SIGMA) en una concentración de 10 % p/v, se homogenizó (Thermomixer Eppendorf, 25 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g, 20 min) para remover la resina y los ácidos biliares adsorbidos conservando el sobrenadante que se filtró (0,22 µm) (**HD_{sb}**, **HF2D_{sb}**, y **BR_{sb}**) (Edwards y Slater, 2009; Vázquez-Sánchez et al., 2018; Rodríguez y Tironi, 2023).

La determinación de la concentración proteica en las fracciones solubles se realizó mediante el método de Lowry (sección 1.3.3.3, Capítulo I)

II.3.4.5 Cromatografía líquida de alta presión (FPLC) de filtración en gel. Tal como se describió en la sección 1.3.3.4 (Capítulo I).

II.3.4.6. Extracción de polifenoles

A partir de los resultados obtenidos en 1.3.4.1., el método de extracción utilizado para las muestras obtenidas con la fermentación en la *condición 2* fue el de los EAU en las condiciones de 15 min y 40 % de amplitud, usando un procesador ultrasónico VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, EE. UU.). Los extractos se centrifugaron (Hermle, Labortechnik GmbH, Alemania) durante 5 min, 10.000×g, temperatura ambiente y se conservó el sobrenadante.

Todos los extractos sobrenadantes obtenidos se evaporaron (30°C, ciclos de 2 h, Concentrator plus/Vacufuge® plus) y se resuspendieron en buffer PBS. Las muestras obtenidas se denominaron **H_e**, **HD_e**, **HF2_e**, **HF2D_e**, y **BR_e**.

Se obtuvieron también para estos extractos liofilizados los *solubles directos* (**HD_{esd}** y **HF2D_{esd}**) y los *solubles bioaccesibles* (**HD_{esb}**, **HF2D_{esb}**, **BR_{esb}**) según lo descrito en la sección 1.3.5.1 (Capítulo I).

11.3.4.7. Determinación de polifenoles totales (CFT). Descrito en Capítulo I, sección 1.3.4.2

11.3.4.8. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Descrito en Capítulo I, sección 1.3.4.3.

11.3.4.9. Actividad antioxidante

Ensayos in vitro acelulares. La actividad antioxidante de las distintas fracciones solubles (distintas diluciones) así como las fracciones separadas por FPLC fueron evaluadas mediante el método ORAC. Las fracciones solubles en buffer PBS pH = 7,4 de las harinas fermentadas en ambas condiciones y sus digeridos también fueron analizadas por el método de HORAC. En cuanto a los extractos etanólicos, se ensayó ORAC y ABTS⁺. La descripción completa de las técnicas puede encontrarse en la sección 1.3.5.2 del Capítulo I.

Ensayos celulares. Se utilizaron el mismo cultivo celular (células Caco2 TC7) y metodologías que en el Capítulo I (sección 1.3.5.3).

Citotoxicidad de las muestras mediante determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH). Sección 1.3.5.3.2.

Inducción de la oxidación celular y determinación del contenido de ROS intracelulares. Sección 1.3.5.3.3.

Se evaluaron los solubles bioaccesibles de **HD**, **HF2D**, las fracciones obtenidas por FPLC de filtración en gel de los solubles en PBS de las mismas muestras, y los extractos etanólicos obtenidos a partir de dichos digeridos.

11.3.5. Simulación de la absorción intestinal

Se utilizó la técnica descrita en la sección 1.3.6. del Capítulo I.

11.3.6. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion con un nivel de confianza (α) de 95 %. Para la evaluación de diferencia de medias se utilizó el test de diferencias significativas (HSD) de Tukey.

RESULTADOS

II.4. Resultados

II.4.1. Ensayos preliminares para la evaluación de condiciones de fermentación natural.

II.4.1.1. Condiciones de concentración

La **Tabla II.1** muestra los primeros ensayos realizados, en los que se varió la relación H/agua y la incubación se realizó en tubos cónicos *sin* agitación. Se observó que en las muestras más concentradas (**M1**, **M2** y **M3**) se formó una masa sin fluidez por lo que fueron descartadas para el procedimiento. Los ensayos continuaron con las muestras **M4** (44,4 % H p/p), **M5** (40 % H p/p) y **M6** (36,4 % H p/p) a las cuales se les registró la evolución de pH midiéndose al inicio, luego de las 24, 48 y 72 h.

Tabla II.1. Evaluación del descenso de pH para mezclas (no agitadas) con distinta relación H/agua: **A.** incubación a 37 °C; **B.** incubación a 30 °C.

A						
Muestra	Harina (g)	Agua destilada (ml)	pH inicial	pH 24h	pH 48h	pH 72h
M1	2,0744	1	-	-	-	-
M2	2,0244	1,5	-	-	-	-
M3	2,0642	2	-	-	-	-
M4	2,0423	2,5	6,40	4,33	4,15	4,09
M5	2,0989	3	6,32	4,38	4,06	3,99
M6	2,0059	3,5	6,25	4,33	4,03	3,98

B						
Muestra	Harina (g)	Agua destilada (ml)	pH inicial	pH 24h	pH 48h	pH 72h
M1	2,0695	1	-	-	-	-
M2	2,0348	1,5	-	-	-	-
M3	2,0708	2	-	-	-	-
M4	2,0738	2,5	6,40	5,53	4,31	4,12
M5	2,0501	3	6,32	5,53	4,22	4,04
M6	2,0400	3,5	6,25	5,32	4,08	4,03

La incubación a 37 °C (**Tabla II.1.A**) produjo un descenso más rápido del pH, con un cambio muy pequeño luego de las 24 h de fermentación. El cambio de pH para las muestras

fermentadas a 30 °C (**Tabla II.1.B**) fue más paulatino, alcanzando un valor mínimo luego de 48 h. No se observaron diferencias importantes en los valores de pH relacionadas con la concentración de **H** en la dispersión en el rango evaluado.

Dado que uno de nuestros principales intereses en este estudio fue analizar la potencialidad de la fermentación natural para favorecer la liberación de péptidos bioactivos, se evaluó el grado de hidrólisis proteica por el método de TNBS. Los valores (entre 13 y 17 %) no mostraron diferencia significativa ($p < 0,05$) en ninguno de los casos.

En función de estos resultados, se decidió profundizar el estudio de la fermentación con la relación de la dispersión **H**/agua destilada 36,4 % p/p a dos tiempos (24 y 48 h) y dos temperaturas (30 y 37 °C).

II.4.1.2. Condiciones de incubación

La fermentación se llevó a cabo en tubos cónicos *con* agitación (agitador rotacional) para la condición de dispersión de harina de arveja en agua destilada 36,4 % p/p a dos tiempos, 24 y 48 h, y dos temperaturas (30 y 37 °C) obteniendo las muestras fermentadas **H₂₄₃₀**, **H₂₄₃₇**, **H₄₈₃₀** y **H₄₈₃₇**. La evolución de pH fue registrada a diferentes tiempos de fermentación. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en ninguno de los tiempos medidos para ambas temperaturas ensayadas (**Tabla II.2**).

Tabla II.2. Evolución del pH durante la fermentación de una dispersión 36,4 % **H** a las temperaturas ensayadas, con agitación rotacional.

Tiempo (h)	30 °C	37 °C
0	6,25 ± 0,01	6,23 ± 0,04
3	6,07 ± 0,01	6,10 ± 0,02
6	6,07 ± 0,01	6,04 ± 0,02
24	5,1 ± 0,1	4,7 ± 0,2
48	3,94 ± 0,06	3,9 ± 0,1

El grado de hidrólisis proteica medida por el método de TNBS mostró que, para ambas temperaturas, a las 24 h de fermentación, ya se había llegado al valor de hidrólisis máximo sin registrar diferencia a las 48 h. Cuando el valor de solubilidad proteica en buffer PBS fue analizado, se registró una disminución de la misma para todas las muestras fermentadas con respecto a la dispersión **H₀** (**Tabla II.3**).

Tabla II.3. Parámetros relacionados con las proteínas en las muestras fermentadas

Muestra	GH (%)	PT (% p/p)	S (g PS/ 100 g PT)
H ₀	9,6 ± 0,6 ^a	17,1 ± 0,3 ^a	68 ± 4 ^b
H ₂₄₃₀	16,8 ± 0,7 ^b	18,1 ± 0,3 ^{ab}	52 ± 5 ^a
H ₄₈₃₀	17 ± 2 ^b	20,1 ± 0,4 ^c	54 ± 4 ^a
H ₂₄₃₇	13 ± 2 ^{ab}	17,6 ± 0,3 ^a	54 ± 3 ^a
H ₄₈₃₇	13 ± 2 ^{ab}	19,2 ± 0,6 ^{bc}	57 ± 6 ^{ab}

GH: grado de proteólisis

PT: proteína total (método microKjeldahl)

S: solubilidad proteica, PS: proteína soluble (Lowry)

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Para estudiar la composición polipeptídica/peptídica de las harinas fermentadas se realizaron electroforesis SDS-PAGE y tricina-SDS-PAGE. Analizando la electroforesis **SDS-PAGE** (**Figura II.1.A**) se observó una disminución de la intensidad de algunas bandas tales como: banda 1 (97 kDa), banda 2 (73 kDa), banda 3 (45 kDa), banda 4 (40 kDa) y banda 5 (26 kDa) en las harinas fermentadas. Los cambios de intensidad fueron más evidentes luego de 48 h (30 y 37 °C). Por otro lado, se observó la aparición de moléculas que no ingresaron al gel lo que sugiere la presencia de agregados formados durante el proceso de fermentación. Esto podría explicar la disminución de solubilidad proteica observada (**Tabla II.3**).

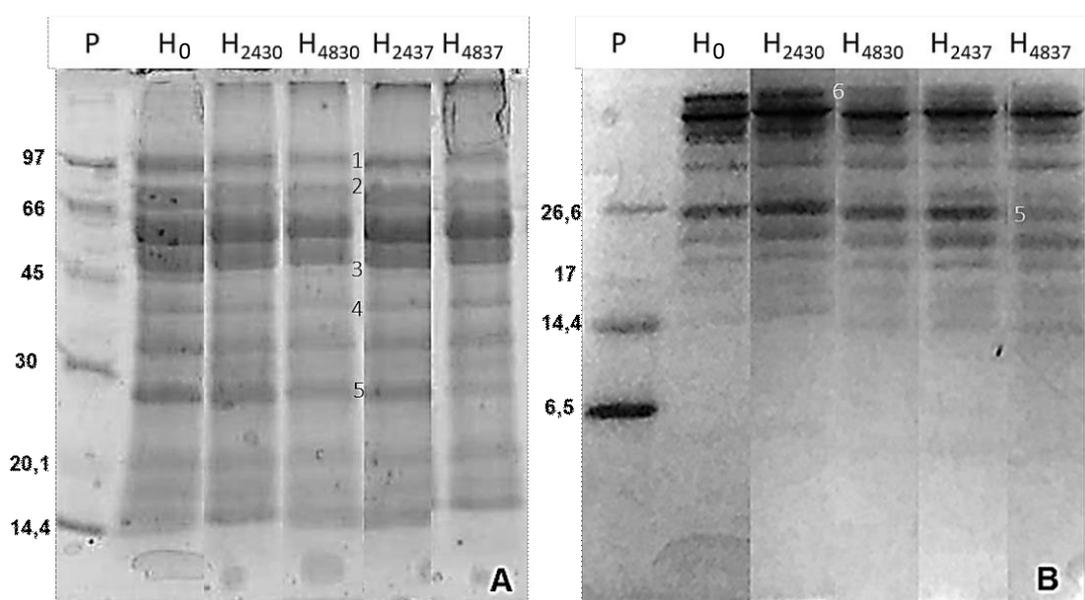


Figura II.1. Electroforesis de las muestras fermentadas y su control **A.** SDS-PAGE, (P) Patrón de bajo peso molecular; **B.** Tricina SDS-PAGE, (P) Patrón de muy bajo peso molecular

Las harinas fermentadas también fueron analizadas mediante *SDS-PAGE en geles de tricina*, metodología que permite detectar péptidos de baja masa molecular. En este caso también se observó la disminución en la intensidad de algunas bandas debido a la fermentación como la banda 5 de aproximadamente 26 kDa, al igual que en el perfil de SDS-PAGE (**Figura II.1.B**).

Se analizó la composición molecular de las fracciones solubles en PBS por cromatografía de filtración en gel (FPLC). En primer término, se utilizó una columna *Superdex 75* (límite de exclusión = 100 kDa). Analizando los cromatogramas (**Figura II.2.A**) se observó que el pico 1, correspondiente al V_0 de la columna, presentó un aumento en su área para todas las harinas fermentadas con respecto a H_0 lo que podría atribuirse a la formación de agregados mencionada anteriormente. El pico 2 (PM entre 25 y 35 kDa) presentó una disminución del área para las muestras fermentadas durante 48 h siendo mayor para la que fue incubada a 37 °C. También se evidenció una disminución en todos los fermentos del pico 3 (PM alrededor de 11,5 kDa), mientras que los picos 4 y 5 (entre 3,6 y 5,2 kDa) presentaron un aumento de sus áreas, que fue superior para las muestras incubadas durante 48 h. Finalmente, se observó que la fermentación produjo un aumento en las moléculas menores a 2 kDa para las 4 condiciones.

A fin de poder realizar un mejor análisis de las moléculas de baja masa molecular, se llevaron a cabo corridas de las muestras solubles en una columna *Superdex 30* (rango de separación óptimo < 10 kDa). En este caso, se observó que, el pico 1 correspondiente al V_0 de la columna presentó áreas menores para las muestras fermentadas. Asimismo, desapareció el pico correspondiente a PM > 6,5 kDa (pico 8). Por último, el comportamiento para moléculas menores a 2 kDa fue similar entre H_0 y las harinas fermentadas, teniendo un pequeño aumento en las áreas de los picos 9, 10 y 11 para la muestra que fue fermentada a 30 °C por 48 h (**Figura II.2.B**).

Para completar este análisis, se realizó una medida de actividad antioxidante por el método de ORAC. En la **Tabla II.4** se presentan los valores de la concentración inhibitoria del 50 % de los radicales (IC_{50}) de todas las muestras. Se observó que la fermentación produjo una disminución entre 1,3 y 2 veces de los valores de IC_{50} lo que indicó un aumento en la potencia antioxidante medida por este método. Además, se registraron algunas pequeñas diferencias dadas por el tiempo de incubación a cada temperatura y también por la temperatura de incubación a cada tiempo; los menores valores de IC_{50} se obtuvieron para las condiciones 24 h/30 °C y 48 h/37 °C, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos.

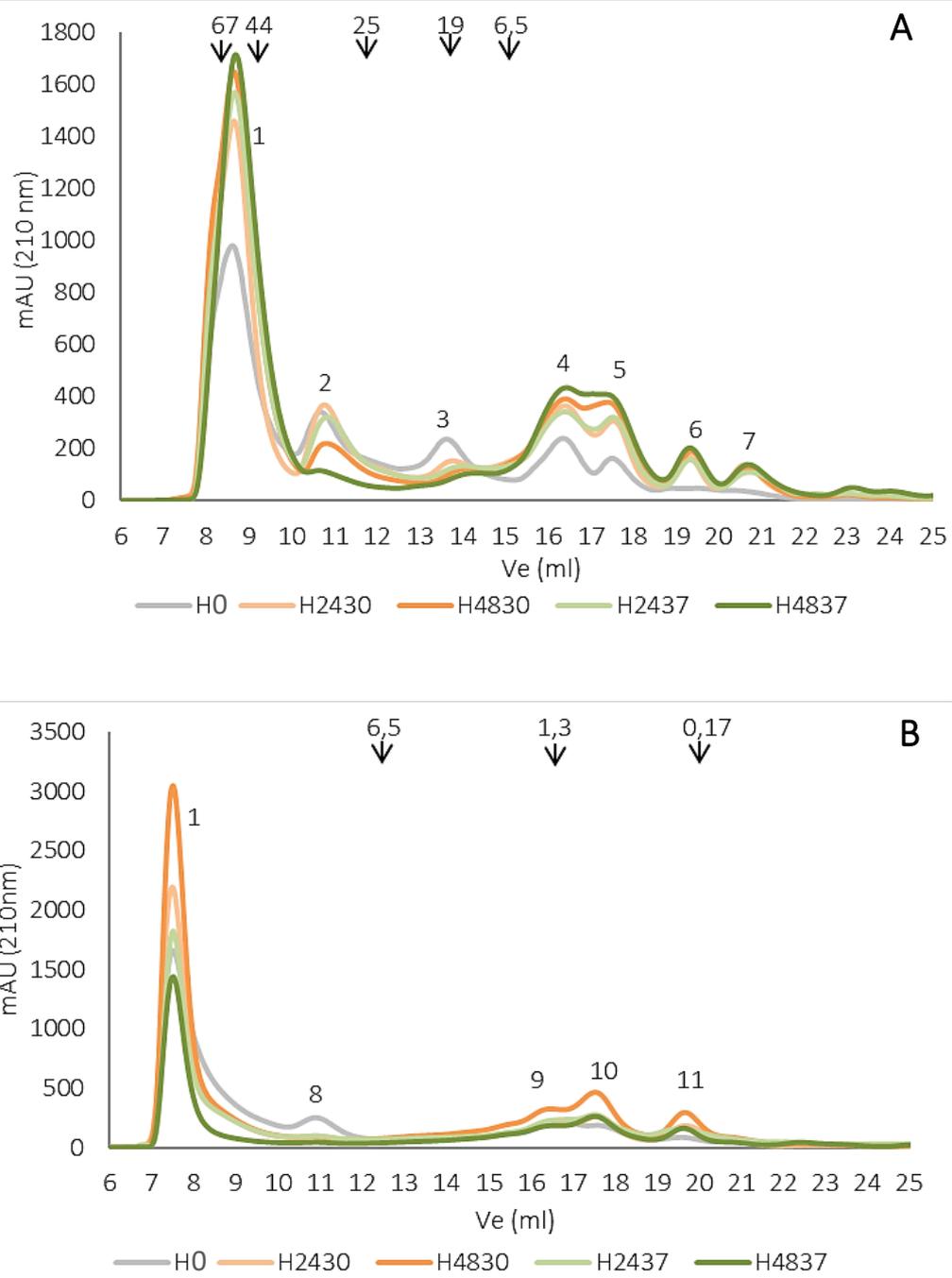


Figura II.2. Cromatografía FPLC de filtración en gel de las muestras fermentadas y su control. **A.** Superdex 75; **B.** Superdex 30

Tabla II.4. Actividad antioxidante medida por el método de ORAC

Muestra	IC ₅₀ (mg PS/mL)
H ₀	0,128 ± 0,004
H ₂₄₃₀	0,071 ± 0,003 ^a
H ₄₈₃₀	0,093 ± 0,004 ^b
H ₂₄₃₇	0,087 ± 0,005 ^b
H ₄₈₃₇	0,066 ± 0,002 ^a

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los fermentos

II.4.2 Fermentación natural de H en bio-reactor

II.4.2.1 pH y recuento microbiológico.

Teniendo en cuenta la información obtenida en los ensayos preliminares, se realizaron pruebas de fermentación natural en bio-reactor donde se estudiaron dos sistemas diferentes:

En la *condición 1*, la harina fermentada **HF1** se obtuvo utilizando una dispersión de **H** al 36,4 % p/p e incubando durante 24 h a 30 °C. Se registró la evolución del pH, los valores bajaron desde 6,2-6,3 ($t = 0$) hasta un valor final (24 h) de 4,75 (**Tabla II.5**). Así, los valores de pH disminuyeron en mayor medida que en la fermentación en tubo en las mismas condiciones (**Tabla II.2**). Cabe señalar que esta dispersión presentaba una viscosidad elevada y cierta dificultad de agitación, por lo que se ensayaron otras condiciones.

En la *condición 2*, la harina fermentada **HF2** se obtuvo utilizando una menor concentración de **H** (14,3 % p/p) e incubando durante 24 h a 37 °C para lograr una mayor fluidez de la dispersión y una fácil agitación. El valor de pH alcanzado después de 20 h de incubación fue de 4,75 (similar a los alcanzados a las 24 h por **HF1**) y después de 24 h fue de aproximadamente 4,4 (**Tabla II.5**), mostrando una disminución ligeramente mayor ($p < 0,05$) que en **HF1**. Estos resultados sugieren un aumento en la tasa de fermentación en condiciones de menor relación **H**/agua. Sáez et al. (2018) informaron una disminución del pH de 6,30-6,43 a 4,80-4,83 luego del primer *back-slopping* para la fermentación natural (24 h a 37°C) de diferentes variedades de porotos de Argentina en “masas” preparadas con una relación de harina/agua de 1 g/ml.

Se realizó un *screening* microbiológico de las muestras no fermentadas y fermentadas utilizando agar nutritivo (AN) (microbiota mesófila total), YGC para hongos y levaduras, y MRS con factor de selección (anaerobiosis) para observar el crecimiento de bacterias ácido-lácticas

(BAL). Los recuentos microbiológicos antes de la fermentación fueron de $4,7 \pm 0,1$ log ufc/g de H en el caso de la dispersión H1 tanto en MRS como en AN, y de $5,4 \pm 0,3$ y $5,3 \pm 0,2$ log ufc/g de H (MRS y AN, respectivamente) cuando se analizó H2. Si los recuentos se expresan por g de dispersión, los valores estuvieron en el rango de 4,2 y 4,5 log ufc/g tanto en AN como en MRS, sin crecimiento evidente en medio YGC (Tabla II.5). Los resultados sugieren en ambos casos la presencia preponderante de BAL.

En este punto cabe mencionar que los ensayos en las condiciones 1 y 2 se realizaron con diferentes lotes de arvejas (ambos de la zona norte de la provincia de Buenos Aires, diferentes años de cosecha (2016 para la condición 1 y 2018 para la 2) y diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente (2 años de almacenamiento en el caso de la condición 1, 3 años para la condición 2). Las diferentes partidas de semillas y el tiempo de almacenamiento no tuvieron en este caso una influencia importante en los recuentos de las harinas, siendo apenas mayores cuando se analizó la dispersión H2 ($4,7 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ ufc/g H y $1,9 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$ ufc/g H en MRS para H1 y H2, respectivamente), y tampoco en el tipo de microorganismos encontrados. Cabe también mencionar que para otro lote de arvejas usado en otra etapa de la Tesis (Capítulo 3) también procedente de la provincia de Buenos Aires (año de cultivo: 2023) y con poco tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (3 meses), los recuentos en una dispersión similar a H2 fueron diferentes: 3,4 log ufc/g de en AN, 1,37 ufc/g en YGC y sin recuento detectable en MRS. Sáez et al. (2018) informaron valores entre 3,65 y 4,53 log ufc/g para mesófilos totales, < 1 log ufc/g de BAL y recuentos del orden de 3,8 log ufc/g de hongos y levaduras para harinas de diferentes porotos argentinos.

Se ha demostrado que la microbiota de semillas de diferentes variedades de plantas y de diferentes sitios geográficos comparte los mismos géneros microbianos dominantes, incluidos *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Microbacterium* *Methylobacterium*, para las bacterias, y *Alternaria* y *Cladosporium* para los hongos. Algunos géneros como *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Curtobacterium* se encuentran con mayor frecuencia en las semillas, mientras que otros géneros como *Xanthomonas* se encuentran específicamente en la superficie de la semilla. Además de estos géneros compartidos, las comunidades microbianas de una misma variedad vegetal están compuestas por otros géneros diferentes según el sitio geográfico, lo que pone de relieve el concepto de un microbioma central y un microbioma

accesorio que depende de factores ambientales (temperatura, luz, disponibilidad de agua y nutrientes) y antropogénicos (vinculados a la actividad humana). Además, el sitio geográfico puede tener un impacto más fuerte en la estructura de la microbiota fúngica que en la de las bacterias (Chartrel et al., 2021).

La bibliografía respecto al microbioma de arvejas es escasa. Chartrel et al. (2021) estudiaron la microbiota de arvejas cultivadas en tres países (Canadá, Francia y Suecia) y almacenadas en diferentes lugares dentro de esos países. Encontraron que, aunque se observaron diferencias en la concentración entre muestras de los diferentes lugares, la mayoría de las colonias fúngicas y bacterianas aisladas tenían morfotipos aproximadamente similares. Se identificaron un total de 19 morfotipos individuales, que mostraban apariencias de colonias completas circulares con pigmentación que iba desde beige, amarillo y naranja hasta marrón. En total, se identificaron 49 especies bacterianas y tres especies de levaduras. Trece fueron asignadas a la clase Actinobacteria (géneros *Rhodococcus*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus* y *Oerskovia*), 24 fueron asignadas a la clase Bacilli (géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*), una fue asignada a la clase α -Proteobacteria y género *Ochrobactrum*, y 11 a la clase γ -Proteobacteria (géneros *Raoultella*, *Erwinia*, *Pantoea* y *Pseudomonas*). Los tres aislamientos de levaduras fueron asignados a la clase Saccharomycetes y pertenecían a los géneros *Candida*, *Pichia* e *Hyphopichia*. Estos estudios revelaron además que las semillas de arvejas presentaban cargas microbianas totales relativamente bajas que variaron de 10^3 a 10^6 UFC/g entre los distintos lugares, en concordancia con los antes. Luego de una secuenciación de alto rendimiento de la región eucariota ITS2 y las regiones procarionas V3-V4 del ARNr 16S, se demostró que el microbioma central bacteriano incluyó 4 géneros pertenecientes a los filos Proteobacteria (γ) y Firmicutes (50% para ambos), mientras que el microbioma central fúngico incluyó 16 géneros de dos filos Ascomycota (64%) y Basidiomycota (36%). Se observaron diferencias en la abundancia relativa de las especies dominantes y subdominantes entre los países de origen y los lugares de almacenamiento. Los autores concluyeron que la composición de la microbiota de las semillas de arvejas estuvo significativamente influenciada por el sitio geográfico de cultivo (país) y el sitio de almacenamiento poscosecha, planteando que existiría una relación entre los perfiles de la comunidad microbiana y las condiciones climáticas y, más

precisamente, la temperatura media anual. En este estudio no se hizo énfasis en el tiempo de almacenamiento.

Más allá de las influencias del sitio geográfico y sus condiciones climáticas, el microbioma de las semillas puede verse afectado por los tratamientos de las semillas, la gestión de la producción, el manejo poscosecha, las condiciones de almacenamiento y la mezcla de semillas durante la siembra. Los estudios centrados en el efecto del almacenamiento y los bancos de semillas son escasos. Por ejemplo, se ha demostrado que el almacenamiento de maíz puede tener un impacto en la diversidad y composición microbiana de las semillas, mientras que otro estudio mostró que el almacenamiento de trigo durante hasta 6 meses tuvo poco o ningún efecto en la diversidad microbiana o la composición de la comunidad (Abdelfattah et al., 2023). En el caso de soja, almacenamientos a 4 o -20°C mantuvo una alta abundancia de géneros en la mayoría de los puntos de tiempo, aunque la temperatura ambiente provocó mayores fluctuaciones en las abundancias, con desaparición más rápida de los géneros de baja abundancia (Chandel et al., 2021).

En función de la bibliografía y de lo hasta el momento observado, podemos inferir que podrían producirse cambios en la microbiota inicial de las arvejas en función del tiempo de almacenamiento, disminuyendo los hongos/levaduras y aumentando las BAL. Sin embargo, la confirmación de este aspecto requiere recabar más datos en función del tiempo de almacenamiento así como una identificación de los microorganismos presentes.

Tabla II.5. Valores de pH y recuentos microbianos de las muestras fermentadas y sin fermentar

Muestra	pH	Recuento microbiano (log ufc/g)		
		YGC	MRS	NA
H1	$6,2 \pm 0,1^c$	Nd	$4,2 \pm 0,1^a$	$4,2 \pm 0,1^a$
HF1	$4,75 \pm 0,03^b$	Nd	$9,1 \pm 0,6^b$	$8,9 \pm 0,6^b$
H2	$6,29 \pm 0,01^c$	Nd	$4,5 \pm 0,3^a$	$4,4 \pm 0,2^a$
HF2	$4,43 \pm 0,01^a$	Nd	$9,5 \pm 0,3^b$	$8,8 \pm 0,8^b$

Condiciones de fermentación: **1.** 36,4 % p/p, 24 h, 30°C ; **2.** 14,3 % p/p, 24 h, 37°C

nd: no detectable en la menor dilución ensayada (-2)

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Después de la fermentación, se registraron recuentos de alrededor de 9 log ufc/g (AN y MRS) para HF1 y HF2 (Tabla II.5). Al observarlas al microscopio, estas colonias presentaron

morfologías tipo cocos y bacilos encadenados. La tinción de Gram (positiva) y la prueba de catalasa (negativa) realizadas a las diferentes unidades formadoras de colonias indicaron que estas colonias podrían identificarse presuntivamente como BAL (Manual de Bergey). Generalmente, una masa madre contiene un número variable de BAL que oscila entre 7 y 9 log ufc/g (Corsetti, 2013). Se han informado valores de alrededor de 8 log ufc/g para diferentes masas fermentadas de porotos después del primer día de fermentación (Saéz et al., 2018). No se observó crecimiento en el medio YGC, lo que indica un recuento indetectable de levaduras después del proceso de fermentación.

II.4.2.2. Composición centesimal

La composición de macrocomponentes de las harinas fermentadas liofilizadas se determinó en comparación con las muestras no fermentadas (Tabla II.6). No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los contenidos de cenizas y lípidos para ninguna de las muestras. Las harinas fermentadas presentaron cambios significativos ($p < 0,05$) en el contenido de proteína respecto a las correspondientes muestras no fermentadas siendo mayor en el caso de **HF1** frente a **H1** y algo menor para **HF2** con respecto a **H2**.

Tabla II.6. Composición centesimal de las harinas y harinas fermentadas liofilizadas (g/100 g en b.s)

Muestra	Proteína total	Lípidos	Carbohidratos*	Fibra	Cenizas	Humedad
H1	17,9 ± 0,3 ^a	2,3 ± 0,3 ^a	61,7	15,3 ± 0,8 ^a	2,8 ± 0,5 ^a	4,61 ± 0,06 ^{ab}
H2	24,2 ± 0,9 ^c	2,3 ± 0,2 ^a	55,5	15,2 ± 0,8 ^a	2,8 ± 0,5 ^a	4 ± 1 ^a
HF1	22,1 ± 0,3 ^{bc}	2,1 ± 0,1 ^a	55,5	17,2 ± 0,2 ^{ab}	3,1 ± 0,1 ^a	4,12 ± 0,04 ^a
HF2	21,9 ± 0,3 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	53,2	18,8 ± 0,6 ^b	3,8 ± 0,1 ^a	5,73 ± 0,08 ^b

Condiciones de fermentación: **1.** 36,4 % p/p, 24 h, 30 °C; **2.** 14,3 % p/p, 24 h, 37 °C

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Calculado por diferencia

En cuanto a la fibra dietaria, el contenido obtenido para **H1** y **H2** fue comparable a otros reportados previamente para semillas de arvejas (15,3 %, Martín-Cabrejas et al., 2003). En relación con el efecto de la fermentación sobre este componente, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) en el caso del **HF2**. La bibliografía muestra datos variables sobre este macrocomponente. Se ha informado que la fermentación espontánea del poroto mungo aumentó el contenido de fibra cruda (Onwurafor et al., 2014). Sin embargo, Curiel et al. (2015)

informaron que las harinas de arvejas y garbanzos que contenían altos niveles de fibra dietética no mostraron variaciones significativas después del proceso de fermentación (*Lactiplantibacillus plantarum* o *Levilactobacillus brevis*, 24 h, 30 °C). Además, en otro estudio, la fermentación natural de lenteja y soja no afectó el contenido de fibra soluble, insoluble y total (Kaczmarek et al., 2017). Serán necesarios más estudios para analizar el efecto de la fermentación sobre la composición de la fibra e intentar explicar el pequeño aumento registrado para **HF2** y su potencial beneficio para la salud.

II.4.2.3. Efecto de la fermentación sobre la fracción proteica, su bioaccesibilidad y actividad antioxidante.

Como ya se describió en los ensayos preliminares, la fermentación natural produjo una proteólisis parcial. El grado de hidrólisis proteica (GH) no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las fermentaciones en tubo y en reactor de **HF1** (alrededor de 17 %, **Tabla II.3** y **Tabla II.7**). Tampoco hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los valores finales de las dos condiciones probadas en el biorreactor (**HF1** y **HF2**, **Tabla II.7**). Sin embargo, considerando los valores de partida de **H1** y **H2** (los cuales son diferentes dada la diferente cantidad de proteína en cada dispersión), en el caso de **HF1** hubo una duplicación del valor de GH mientras que, en el caso de **HF2** el valor se quintuplicó con respecto a **H2**, indicando un mayor nivel de actividad proteolítica en este caso.

Se realizó un ensayo complementario para determinar si proteasas endógenas de la arveja podían ser activadas por el descenso del pH, produciendo proteólisis. La movilización de las proteínas de almacenamiento en las semillas en germinación se inicia mediante endoproteasas que convierten las proteínas de almacenamiento insolubles en agua en péptidos solubles. La mayoría de las proteasas vegetales son neutras o alcalinas y hay pocas proteasas ácidas (pH óptimo: 2-3) ampliamente distribuidas en las semillas de las plantas (Ramakrishna y Rao, 2005). Por ejemplo, Ganzle et al. (2008) al comparar masas fermentadas y masas acidificadas químicamente informaron que la proteólisis primaria en las masas madre de trigo y centeno se atribuyó principalmente a las proteasas endógenas de los cereales. Para evaluar esta posibilidad en la harina de arvejas, se bajó el pH de la dispersión de **H** (14,3 % p/p) con HCl 2 N al valor final obtenido en las fermentaciones (4,2) y se midió el grado de hidrólisis de proteínas (método TNBS). Se obtuvo un valor muy bajo (cercano a 0), incluso inferior a los registrados

para las dispersiones de harina en agua antes de la fermentación. De acuerdo con esto, no se evidenció activación de proteasas endógenas. Akhtaruzzaman et al. (2012) extrajeron las proteasas de siete semillas de leguminosas embebidas durante una noche y encontraron que las proteasas alcalinas involucradas en todas las semillas eran más potentes que las proteasas ácidas. En función de lo observado, la proteólisis en las muestras fermentadas sería producto de la acción de proteasas de microorganismos.

Comparando los resultados obtenidos para fermentaciones en tubo y en reactor en las mismas condiciones (36,4 % p/p, 24 h, 30 °C), no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) en los valores de solubilidad de la proteína (52 y 56 %, respectivamente) (Tabla II.3 y Tabla II.7). En las fermentaciones realizadas en biorreactor también se observó una disminución en la solubilidad luego de la fermentación.

Tabla II.7. Proteína soluble (método de Lowry), solubilidad y GH de las dispersiones de harina, harinas fermentadas y sus digeridos gastrointestinales.

Muestra	Proteína soluble (PS) (mg/ml)	Solubilidad proteica (g PS/100 g PT)	Grado de hidrólisis GH %
H1	2,6 ± 0,1 ^{ab}	75 ± 5 ^{cd}	8,5 ± 0,6 ^a
HF1	2,3 ± 0,1 ^a	56 ± 4 ^{ab}	17 ± 2 ^b
H1D	4,1 ± 0,6 ^d	86 ± 10 ^{cd}	45 ± 2 ^c
HF1D	3,8 ± 0,7 ^d	76 ± 10 ^{cd}	64 ± 4 ^e
H2	3,3 ± 0,1 ^{bcd}	71 ± 2 ^{bc}	4 ± 1 ^a
HF2	2,1 ± 0,2 ^a	49 ± 3 ^a	20 ± 2 ^b
H2D	3,5 ± 0,4 ^{cd}	88 ± 8 ^d	44 ± 3 ^c
HF2D	2,9 ± 0,2 ^{abc}	79 ± 5 ^{cd}	53 ± 4 ^d

Condiciones de fermentación: **1.** 36,4 % p/p, 24 h, 30°C; **2.** 14,3 % p/p, 24 h, 37°C
Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La solubilidad proteica puede verse afectada por varios parámetros, incluido el valor del pH, la temperatura, la fuerza iónica, el tipo de solvente y la concentración de proteínas. A valores de pH por encima y por debajo del punto isoeléctrico, la solubilidad aumenta debido a la repulsión electrostática provocada por cargas netas positivas y negativas en la superficie de la proteína. Una proteína exhibe la solubilidad más baja en su pH isoeléctrico ya que lleva una carga neta cero, minimizando así las fuerzas electrostáticas de repulsión. En estas condiciones, las interacciones hidrófobas entre proteínas vecinas pueden provocar agregación y, una vez que los agregados son suficientes en tamaño y número, se produce la precipitación. En general,

los aislados de proteína de arveja exhiben la solubilidad más baja entre pH 4 y 6, independientemente del método de extracción o el cultivo de arvejas (Lam et al., 2018). Los valores de solubilidad más altos se alcanzan por encima de pH 6,0 y por debajo de 4,0 (alrededor del 80 %), mientras que los más bajos están entre 4 y 6 (menos del 30 %) (Boukid et al., 2021), lo cual explica la disminución de solubilidad registrada en las harinas fermentadas. Cabe tener en cuenta que, al ocurrir además una proteólisis, el descenso de solubilidad podría no ser tan marcado como el que existiría en ausencia de proteólisis, como ha sido reportado (Boukid et al., 2021).

La composición peptídica y polipeptídica fue analizada mediante electroforesis glicina SDS-PAGE. El perfil SDS-PAGE de **H** fue analizado en el *Capítulo I, sección I.4.1.3*. Las dispersiones **H1** y **H2** presentaron el mismo perfil que **H** sin dispersar (**Figura II.3**). Luego de la fermentación, se observó un descenso en la intensidad de todas las bandas siendo más evidente para la banda 1 (93 kDa) y en bandas correspondientes a PM < 40 kDa. En las muestras de **HF** se pudo apreciar un aumento de moléculas de alto PM que no entraron en el gel, lo que, como ya se había descrito para las fermentaciones en tubo, sugiere la presencia de agregados incluso en presencia de SDS y urea (**Figura II.3**, perfiles de **HF1** y **HF2**). La formación de agregados puede correlacionarse con la menor solubilidad observada en las muestras fermentadas (**Tabla II.7**).

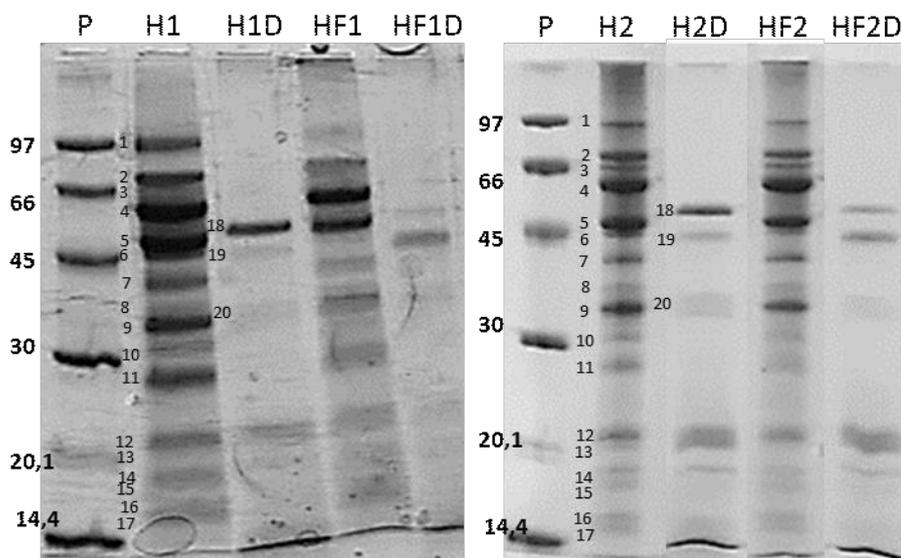


Figura II.3. Electroforesis SDS-PAGE de las harinas, harinas fermentadas y sus digeridos, (P) patrón de bajo peso molecular

La banda 10 (31 kDa), que podría corresponder al factor antinutricional lectina (Ma et al., 2017) apareció mucho más intensa en las muestras **H2** y **HF2** que en **H1** y **HF1**, mientras que la banda 12 (25 kDa) que podría incluir un inhibidor de tripsina tipo Kunitz (Ma et al., 2017) tiene una mayor intensidad para **H1** y **HF1** con respecto a **H2** y **HF2** (**Figura II.3**). Más allá de estas diferencias entre ambas dispersiones, la intensidad de estas bandas disminuyó después de las fermentaciones, lo que sugiere una disminución de los factores antinutricionales mencionados. La reducción de la intensidad del color de varias bandas después de la fermentación podría estar asociada tanto a su participación en la formación de agregados, así como a la disminución de los polipéptidos debido a la actividad proteolítica. Byanju et al. (2021) también observaron este patrón de decoloración de bandas en harinas de arveja, lenteja y soja después de la fermentación con *L. plantarum* y *P. acidilactici*. Barkholt et al. (1998) indicaron que la fermentación de la harina de arveja con tres BAL (*P. pentosaceus*, *L. raffinolactis* y *L. plantarum*) dio como resultado patrones similares de los geles teñidos con Coomassie blue, que no fueron muy diferentes del extracto de la harina sin fermentar, excepto por la desaparición de algunas bandas de alto peso molecular.

La composición peptídica/polipeptídica de las fracciones solubles en PBS de las harinas fermentadas y no fermentadas se analizó mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna *Superdex 30* (separación óptima en el rango de PM < 10 kDa) para evaluar péptidos de bajo PM. Como era de esperar, los cromatogramas de **H1** y **H2** (**Figura II.4**) fueron similares. La fermentación provocó un aumento de moléculas menores de 6,5 kDa en ambas condiciones (**HF1** y **HF2**). Sin embargo, se pueden describir algunas diferencias entre **HF1** y **HF2**. El pico 2 (PM > 6,5 kDa) tuvo una disminución mayor en el caso de **HF1**, mientras que los picos 1 (PM > 10 kDa), 3 (1,5-0,8 kDa), 5 (0,47-0,18 kDa) y 6 (0,18-0,08 kDa) aumentaron más en el caso de **HF2**.

Luego de la DGIS, el grado de proteólisis (método TNBS) aumentó significativamente ($p < 0,05$) para todas las muestras (**Tabla II.7**). Sin embargo, se obtuvieron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) cuando **H** fue previamente fermentada (**HF1D** y **HF2D** respecto de **H1D** y **H2D**), lo que indicaría que el proceso de fermentación mejoraría la digestión gastrointestinal de las proteínas. Cuando se compararon los resultados de las muestras fermentadas y digeridas posteriormente, se observó que **HF1D** presentó un valor significativamente mayor ($p < 0,05$) que **HF2D**. Sin embargo, el valor de GH de **HF1D** fue 7,5 veces mayor que el de **H1**, mientras

que el valor de GH de **HF2D** fue 13 veces mayor que el de **H2** mostrando una mayor proporción de proteólisis en el segundo caso (**Tabla II.7**). Por lo tanto, los resultados sugieren que la fermentación en la condición 2 (menor relación H/agua, 24 h, 37 °C) produjo un mayor ataque proteolítico durante la fermentación y también durante la DGIS de esa harina fermentada.

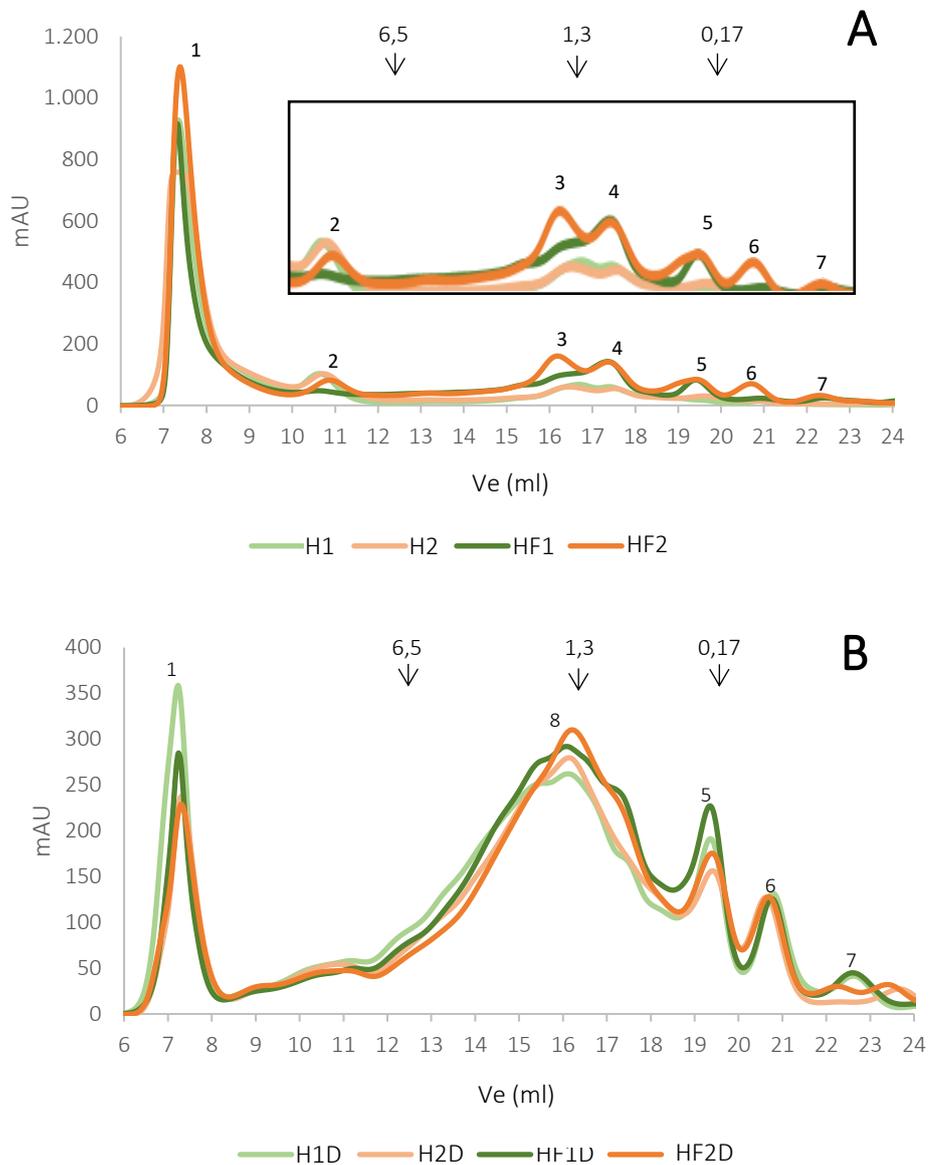


Figura II.4. FPLC de filtración en gel, columna *Superdex 30*. **A.** Dispersiones de harinas (**H1** y **H2**) y harinas fermentadas (**HF1** y **HF2**); **B.** Digeridos gastrointestinales (**H1D**, **H2D**, **HF1D**, **HF2D**).

El análisis por *SDS-PAGE* (**Figura II.3**) indicó que en las muestras sometidas a DGIS desaparecieron la mayoría de los polipéptidos, aparecieron bandas como la 18 (51 kDa), 19 (43 kDa) y 20 (una banda ancha de unos 35 kDa). Algunas bandas originales de PM < 25 kDa,

(leguminas y albúminas) permanecieron parcialmente en todos los digeridos (**H1D**, **H2D**, **HF1D** y **HF2D**), evidenciando que algunos polipéptidos presentes en la arveja resistieron la digestión gastrointestinal. Este hecho también fue observado previamente cuando se analizaron los digeridos gastrointestinales de **H** y **A** (*Capítulo I*). Asimismo, Ma et al. (2017) reportaron que un hidrolizado de proteína de arveja presentó una reducción de la mayoría de las bandas presentes en el perfil de arveja cruda pero con persistencia de bandas con PM entre 10 y 30 kDa. Se pudieron detectar algunas diferencias entre los digeridos: la intensidad de la banda 18 fue mayor para los digeridos de harina no fermentada (**H1D** y **H2D**) mientras que la intensidad de la banda 19 fue mayor para los digeridos de harina fermentada (**HF1D** y **HF2D**). Asimismo, las bandas 20 y 12 fueron mucho más intensas en los perfiles de **H2D** y **HF2D** que en los de **H1D** o **HF1D** (**Figura II.3**). Estas bandas podrían atribuirse a la presencia de subunidades ácidas y básicas de leguminosas como segmentos libres (Lu et al., 2000). Al analizar el efecto de la fermentación seguida del proceso de DGIS, los perfiles electroforéticos mostraron una menor intensidad en algunas de las bandas remanentes en las harinas fermentadas, lo que está en concordancia con los valores más altos de GH obtenidos para los digeridos de harinas fermentadas. La proteólisis parcial debida al proceso de fermentación puede lograr una mayor susceptibilidad a las enzimas digestivas, como ya ha sido anteriormente informado (Rizzello et al., 2016).

En los cromatogramas de filtración en gel (**Figura II.4**), los picos correspondientes al volumen de exclusión (>10 kDa) disminuyeron con respecto a las muestras no digeridas en mayor o menor medida para los diferentes digeridos, y aumentaron significativamente la cantidad de moléculas menores de 6,5 kDa en todas las muestras digeridas. Similar comportamiento fue descrito al analizar los cromatogramas obtenidos por *Superdex 30* de **H** y **A** y sus correspondientes muestras digeridas (*Capítulo I*). Considerando cada pico en particular, se observó que el pico 8 (0,4 a 6,5 kDa) presentó mayor área para los digeridos de las harinas fermentadas (**HF1D** y **HF2D**) representando entre el 60 y 63 % del área total. El pico 1 (las moléculas remanentes de PM > 10 kDa) representó alrededor del 30-33 % del área, presentando **H1D** el valor más alto y **HF1D** el más bajo. El pico 5 (0,47-0,18 kDa) representó aproximadamente el 2,5 y el 4 %, y el pico 6 (< 0,18 kDa) entre el 2,5 y el 3 %. Finalmente, el pico 7 fue el mismo para **H1D** y **HF1D** y prácticamente no se encontró en las muestras **H2D** y **HF2D**.

II.4.2.3.1. Actividad antioxidante por ensayos químicos (no celulares).

Como ya se ha explicado, el ensayo ORAC mide la capacidad de eliminación de radicales peroxilo (generados a partir de AAPH a 37 °C) mediante la degradación oxidativa de la fluoresceína (Ou et al., 2001). Se obtuvieron curvas de dosis-respuesta ORAC (% de eliminación de ROO· versus concentración de péptidos) para las fracciones solubles en PBS (s) y se calcularon los valores de IC₅₀ (Tabla II.8). La actividad ORAC aumentó significativamente ($p < 0,05$) por el proceso de fermentación, con una disminución de los valores de IC₅₀ de 2,5 veces para **HF1s** respecto a **H1s**, y 2,7 veces para **HF2s** con respecto a **H2s**, obteniendo un valor de IC₅₀ significativamente ($p < 0,05$) menor para **HF2s** (Tabla II.11). Además, se realizó el ensayo HORAC, en el que la degradación oxidativa de la fluoresceína se produce por radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton (Ou et al., 2002). Las curvas dosis-respuesta presentaron en este caso un ajuste lineal. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de IC₅₀ de las harinas fermentadas y no fermentadas en cualquier condición de fermentación (Tabla II.11), lo que indica que la fermentación no tuvo efecto sobre la actividad medida por este método.

Tabla II.8. Actividad ORAC y HORAC de las fracciones solubles en PBS de las dispersiones de harina antes y después de la fermentación y los correspondientes digeridos gastrointestinales.

Muestra	ORAC IC ₅₀ (mg PS/mL)	HORAC IC ₅₀ (mg PS/mL)
H1s	0,178 ± 0,019 ^d	7,4 ± 0,5 ^b
HF1s	0,071 ± 0,007 ^c	7,7 ± 0,5 ^b
H1Ds	0,049 ± 0,003 ^b	3,7 ± 0,2 ^a
HF1Ds	0,024 ± 0,001 ^a	3,8 ± 0,3 ^a
H2s	0,089 ± 0,001 ^c	7,9 ± 0,9 ^b
HF2s	0,033 ± 0,007 ^{ab}	7 ± 1 ^b
H2Ds	0,017 ± 0,001 ^a	3,6 ± 0,4 ^a
HF2Ds	0,017 ± 0,001 ^a	3,6 ± 0,3 ^a

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Después de la DGIS, analizando cada condición de fermentación por separado, se observó que en el caso de la *condición 1* (36,4 % p/p, 24 h, 30°C) se produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad ORAC, tanto en el caso de **H1Ds** como de **HF1Ds** siendo ese aumento de unas 4 y 9 veces con respecto a **H1s**, respectivamente. En cuanto a la *condición 2* (14,3 % p/p,

24 h, 37 °C), se encontró que **H2Ds** y **HF2Ds** también presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) en la actividad ORAC con respecto a la muestra inicial (**H2s**) con un incremento de potencia de 5 veces. **HF2Ds** presentó un valor de IC_{50} ligeramente (pero significativamente, $p < 0,05$) inferior al de **HF1Ds** (**Tabla II.8**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la harina fermentada **HF2** y la muestra digerida **HF2Ds**, probablemente relacionada con el hecho de que este proceso de fermentación produjo una mejora mayor en la actividad medida por ORAC (**Tabla II.8**).

El proceso de DGIS produjo un aumento en la potencia HORAC ya que los valores de IC_{50} se redujeron a la mitad, sin diferencia significativa entre los diferentes digeridos ($p > 0,05$). Los valores HORAC obtenidos para las muestras digeridas fueron comparables con los mostrados previamente para **Hs** y **As** luego de la DGIS (*Capítulo I*).

Con base en estos resultados, podemos concluir que la fermentación natural de la harina de arveja produjo un aumento en la actividad ORAC asociado en principio a la liberación de péptidos, pero no tuvo ningún efecto perceptible sobre la actividad HORAC. La diferencia en la sensibilidad y en los mecanismos de acción relacionados con ambos métodos podría explicar las diferencias en el comportamiento de las harinas fermentadas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y algunas consideraciones prácticas relacionadas con la facilidad de agitación y dispersión, se decidió continuar estudiando la harina fermentada en la *condición 2* (14,3 % p/p, 24 h, 37 °C).

Para estudiar mejor la distribución de moléculas que contribuyen a la actividad antioxidante de estas muestras, se separaron fracciones de diferente PM mediante filtración en gel FPLC de **H2s**, **HF2s**, **H2Ds** y **HF2Ds**, a los que se les determinó su concentración peptídica (**Figura II.5.A**) y su actividad eliminadora de $ROO\cdot$ mediante el ensayo ORAC (**Figura II.5.B**)

De manera similar a lo descrito para **H** en el *Capítulo 1*, en la muestra **H2s**, las fracciones con mayor concentración de polipéptidos fueron aquellas con $PM > 10$ kDa (fracciones 1 a 9). Estas fracciones presentaron actividad secuestrante de $ROO\cdot$ (40-60 %); sin embargo, las fracciones que presentaron mayores actividades (66 a 81 %; **Figura II.5.B**) fueron aquellas con PM entre 0,29 y 0,59 kDa (fracciones 23-26), las cuales presentaron concentración baja o no detectable de péptidos (**Figura II.5.A**). Según el PM de estas fracciones, podría tratarse de péptidos de entre 3 y 5 aminoácidos, aunque no se puede descartar la presencia de otros

componentes como compuestos fenólicos, los cuales presentarían un importante poder antioxidante.

Después de la fermentación (**HF2s**), las fracciones 1 a 8 (>10 kDa) disminuyeron su concentración de polipéptidos (**Figura II.5.A**) y también su actividad ORAC (**Figura II.5.B**). También las fracciones 23 a 26 (0,29-0,59 kDa) disminuyeron su actividad eliminadora de ROO[·], mientras que varias fracciones en el rango de 0,75 a 4 kDa (fracciones 15-22) y 0,18-0,23 kDa (fracciones 28-29, 65-74 %) la incrementaron (**Figura II.5.B**). En este sentido, el aumento de la potencia ORAC registrado después de la fermentación de la harina de arveja podría estar relacionado principalmente con la aparición de moléculas en el rango de 0,75-4 kDa y 0,18-0,3 kDa con una mejor eliminación de ROO[·]. La mayoría de los estudios que involucran la formación de péptidos bioactivos por fermentación la atribuyen a BAL que poseen un sistema complejo de proteasas y peptidasas (Verni et al., 2019). Según lo informado por Venegas-Ortega et al. (2019), las diferencias encontradas dentro de las proteinasas de las BAL explican la variedad de péptidos bioactivos producidos, incluso cuando se utiliza la misma matriz proteica. En un trabajo anterior (Stanisavljević et al., 2015), se evaluó la capacidad de nueve cepas de *Lactobacillus* para crecer en un medio basado en proteínas de semillas de arvejas y su capacidad para hidrolizar proteínas de arvejas purificadas para producir péptidos con actividad antioxidante. Dos cepas, *Lacticaseibacillus rhamnosus* BGT10 y *Lactobacillus zeae* LMG17315, exhibieron una fuerte actividad proteolítica frente a las proteínas de arveja. Estos autores demostraron que la actividad antioxidante (ensayo DPPH) de la fracción con PM < 10 kDa aumentó después de 12 h de fermentación con *Lacticaseibacillus rhamnosus* BGT10. Esta fracción presentó actividad antioxidante mediante diferentes ensayos y al realizar una separación por cromatografía de intercambio iónico, mostraron que una subfracción de péptidos básicos de baja abundancia presentó la mayor actividad.

El proceso de DGIS (**H2Ds** y **HF2Ds**) produjo un aumento en la concentración de péptidos de todas las fracciones con PM < 3 kDa (**Figura II.5.A**), y también un incremento del % de eliminación de ROO[·] (**Figura II.5.B**) para casi todas las fracciones con PM < 6,5 kDa. La muestra **H2Ds** mostró valores de % de eliminación más altos para fracciones entre 0,14 y 4 kDa (fracciones 15-29; 41-87 %; **Figura II.5.B**). **HF2Ds** presentó mayores valores de captación con respecto a **H2Ds** en casi todas las fracciones mayores a 4 kDa (< 45 % de captación), algunas de las fracciones en el rango de 2 a 0,3 kDa (18-26) y menores de 0,10 kDa (< 40 % de captación)

y ambos digeridos presentaron su máxima inhibición de ROO[·] en las fracciones alrededor de 0,14-0,18 kDa (28 y 29), siendo 84 ± 1 y 87 ± 1 % para HF2Ds y H2Ds respectivamente (Figura II.5.B). Estos resultados también mostraron algunas diferencias en la composición molecular del digerido gastrointestinal de harina de arveja fermentada y no fermentada.

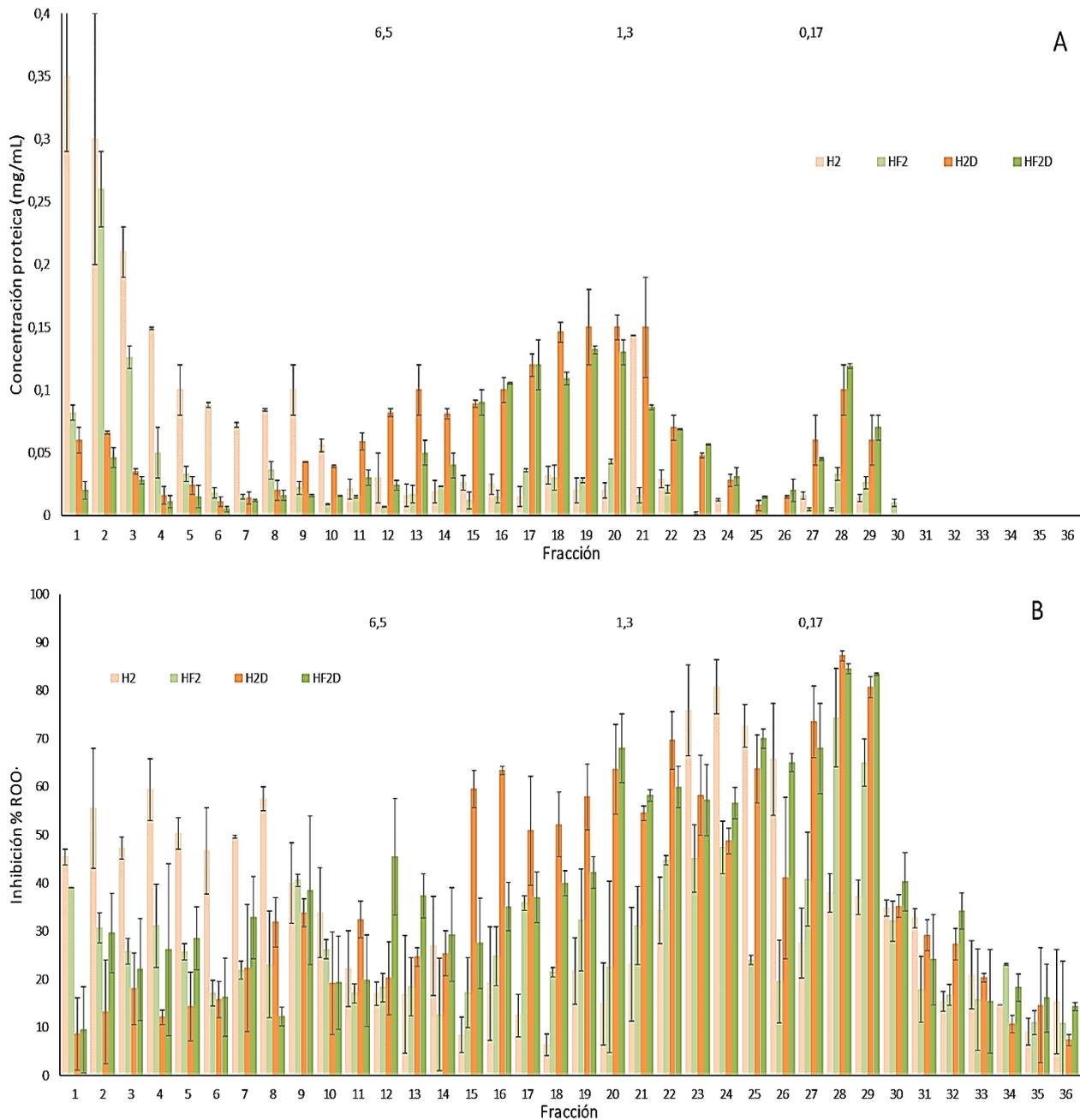


Figura II. 5. Fracciones separadas por FPLC de filtración en gel. **A.** Concentración polipeptídica/peptídica. **B.** % inhibición de ROO[·] (ensayo ORAC). Los valores se expresan como promedio \pm SD.

Con el fin de profundizar el estudio de **HF2D**, se analizaron la fracción soluble directa (**sd**) y la fracción bioaccesible (**sb**), en las cuales se cuantificó la concentración de polipéptidos/péptidos y se realizaron ensayos de actividad antioxidante *in vitro* acelulares. En la **Tabla II.9** se presentan estos resultados en comparación con los obtenidos para **HD** ya presentados en el *Capítulo I*. Al igual que fue descrito para **HD** en el *Capítulo I*, la potencia ORAC no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fracciones soluble en PBS y directa de **HF2D**, pero sí con la fracción bioaccesible, la cual presentó un valor de IC_{50} significativamente mayor, indicando una pérdida de la actividad antioxidante luego del tratamiento con colestiramina. Sin embargo, la potencia ORAC de **HF2D_{sb}** fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que la de **HD_{sb}**. Mediante el método HORAC se obtuvo un comportamiento similar que el descrito para ORAC, y nuevamente la potencia HORAC de **HF2D_{sb}** fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que la de **HD_{sb}**. En función de estos resultados, la fermentación previa de **H** llevó a una mejora en la actividad antioxidante de los digeridos gastrointestinales luego del tratamiento con colestiramina.

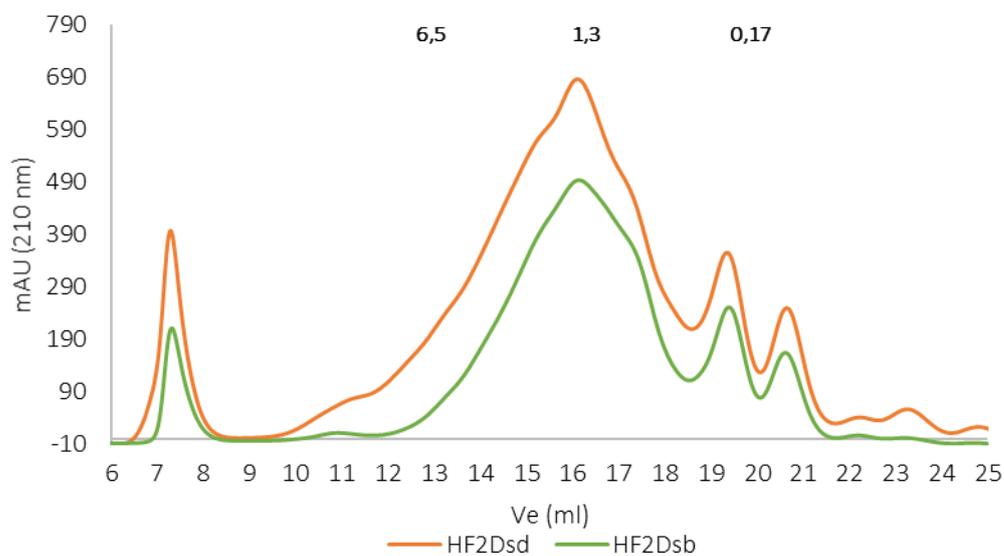


Figura II.6. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **HF2D_{sd}** y **HF2D_{sb}**. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Tabla II.9. Concentración de proteína y actividad antioxidante de las fracciones solubles en PBS (**s**), solubles directos (**sd**) y bioaccesibles (**sb**) de **HF2D** en comparación con **HD**.

Muestra	C (mg/ml)	ORAC IC ₅₀ (mg/ml)	HORAC IC ₅₀ (mg/ml)
HD_s	3,5 ± 0,4	0,017 ± 0,001 ^{aA}	3,6 ± 0,4 ^{bcA}
HD_{sd}	28 ± 4	0,05 ± 0,01 ^{bA}	2,6 ± 0,2 ^{abA}
HD_{sb}	20 ± 2	0,28 ± 0,02 ^{dB}	6,0 ± 0,9 ^{dB}
HF2D_s	2,9 ± 0,2	0,017 ± 0,001 ^{a1}	3,6 ± 0,3 ^{bc12}
HF2D_{sd}	29 ± 3	0,05 ± 0,01 ^{b1}	2,4 ± 0,3 ^{a1}
HF2D_{sb}	19 ± 2	0,12 ± 0,02 ^{c2}	4,4 ± 0,5 ^{c2}

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En letras minúsculas, estadística realizada sobre todas las muestras. Letras mayúsculas, estadística realizada entre las fracciones de **HD**. Números, estadística realizada entre las fracciones de **HF2D**.

II.4.2.3.2 Actividad antioxidante en cultivos celulares

Las fracciones solubles de **HF2D** también fueron analizadas en cultivos celulares para profundizar el estudio de la actividad antioxidante. En la **Tabla II.10** se presentan los resultados de evaluación de la citotoxicidad mediante la actividad LDH de distintas diluciones de las fracciones bioaccesibles de las muestras y del blanco de reactivos (**BR**). Como se detalló en el *Capítulo I, sección I.4.3.2*, el **BR_{sb}** presentó una alta citotoxicidad, que disminuyó con la dilución de la muestra.

La concentración de proteína soluble en **HF2D_{sb}** fue similar a la de **HD_{sb}** (**Tabla II.10**). Cuando se analizó la citotoxicidad de **HF2D_{sb}** se observó que ninguna de las diluciones presentó un valor elevado, con % de viabilidad entre 78 y 93 %. Este comportamiento fue similar al mostrado por **HD_{sb}**.

Tabla II.10. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (**HD_{sb}**, **HF2D_{sb}** y **BR_{sb}**).

Muestra	C _{prot} (mg/ml)	LDH (U/l)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS *
HD_{sb}	20	19 ± 1 ^{bc}	81	92 ± 1 ^d
	4	16 ± 2 ^b	84	87 ± 2 ^d
	2	16 ± 5 ^b	84	80 ± 4 ^{bc}
	1	14 ± 1 ^b	86	58 ± 5 ^a
HF2D_{sb}	19	22 ± 1 ^c	78	92 ± 1 ^d
	3,8	7 ± 5 ^a	93	92 ± 1 ^d
	1,9	15 ± 3 ^b	85	86 ± 2 ^{cd}
	0,95	18 ± 3 ^{bc}	82	75 ± 3 ^b
BR_{sb}	0,4	62 ± 1	38	-
	0,08	43 ± 1	57	-
	0,04	31 ± 4	69	-
	0,02	16 ± 2	84	-

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

*Valores calculados teniendo en cuenta la viabilidad celular de la muestra y su correspondiente dilución de BR

En cuanto a la actividad de inhibición de las ROS intracelulares, como ya fue descrito en el *Capítulo I, sección 1.4.3.2*, las células pretratadas con **BR_{sb}** y luego inducidas con H₂O₂ presentaron un aumento de fluorescencia mucho mayor que el control C1 (células inducidas sin pretratamiento con muestra) (**Figura II.7**). **HF2D_{sb}** presentó altos % de inhibición de las ROS intracelulares en todo el rango de concentración ensayado. Para las mayores concentraciones no presentó diferencia significativa ($p < 0,05$) para las correspondientes diluciones de **HD_{sb}** (en estos niveles de concentraciones se alcanzaron efectos máximos con achatamiento de la curva dosis respuesta), mientras que para menores concentraciones (alrededor de 1 mg proteína/ml) **HF2D_{sb}** presentó un % de inhibición de ROS significativamente mayor ($p < 0,05$) que **HD_{sb}** (**Tabla II.10**). Con el fin de comparar la potencia de ambos digeridos en este ensayo, se estimaron los valores de IC₅₀ a partir de curvas dosis-respuesta construidas sin considerar las fracciones sin diluir, siendo de 0,11 y 0,62 mg proteína/ml para **HF2D_{sb}** y **HD_{sb}**, respectivamente. Estos resultados evidencian una mayor potencia de **HF2D_{sb}** respecto a **HD_{sb}** para lograr la inhibición de las ROS intracelulares. Nuevamente, en este ensayo puede observarse un efecto positivo de la fermentación previa de **H** sobre la actividad antioxidante, que también se reflejó a nivel de la prevención del estrés oxidativo celular.

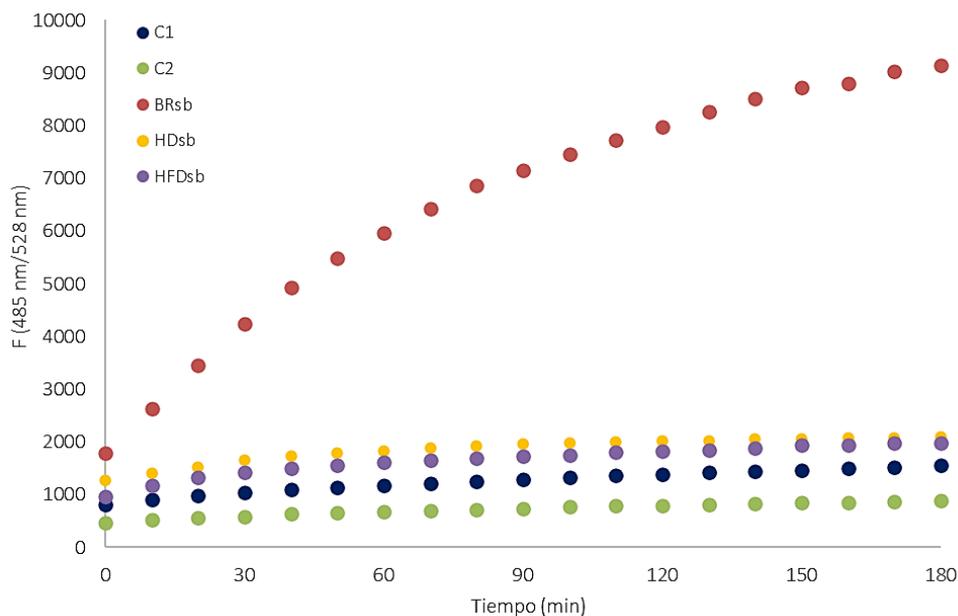


Figura II.7. Evolución de ROS en células Caco2 TC7 inducidas por H₂O₂: evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas, basal); células pretratadas con las fracciones bioaccesibles BR_{sb}, HD_{sb} y HF2D_{sb}.

A partir de los resultados obtenidos en la separación de fracciones mencionadas anteriormente (**Figura II.8**), se seleccionaron algunas de esas fracciones para evaluar la capacidad de inhibición de ROS intracelulares. A todas las fracciones seleccionadas se les cuantificó el % de citotoxicidad antes de evaluar la inhibición de ROS. Se observó que ninguna de las fracciones evaluadas presentó citotoxicidad importante (> 80 % de viabilidad celular) (**Tabla II.11**). Las fracciones obtenidas de HD_s fueron analizadas previamente en la *Sección I.4.3.2 del Capítulo I*, mostrando que las fracciones 16, 20, 21, 22 y 27 presentaron los mayores % de inhibición de ROS. Este comportamiento se modificó en HF2D_s, ya que algunas fracciones como la 16 (2,5-3,1 kDa), la 21 (0,75-0,95 kDa) y la 27 (0,18-0,23 kDa) disminuyeron su actividad, mientras que el resto de las fracciones (17-20: 0,95-2,5 kDa; 22: 0,59-0,75 kDa; 28-29: 0,11-0,18) aumentaron su actividad de inhibición de las ROS intracelulares. Las fracciones 20, 22, 28 y 29 que presentaron los mayores % de inhibición de ROS también habían presentado altos valores de neutralización de ROO· (ORAC); sin embargo, la fracción 27 con alta actividad ORAC, no presentó actividad de inhibición de ROS celulares (**Tabla II.11**).

Tabla II.11. Concentración proteína soluble, actividad antioxidante (ORAC), % inhibición de ROS intracelulares y citotoxicidad celular (LDH) de las fracciones separadas por FPLC de las muestras solubles en buffer PBS de HD y HF2D.

Fracciones	PM (kDa)	Proteína soluble (mg/ml)	% secuestro ROO· (ORAC)	% inhibición ROS	LDH (U/l)	
HD _s	16	3,1-2,5	0,10 ± 0,01	63,3 ± 0,8 ^{abc}	22 ± 8 ^{bcd}	5,6 ± 0,9 ^{bc}
	17	2,5-1,9	0,120 ± 0,009	51 ± 11 ^a	17 ± 2 ^{abc}	8 ± 2 ^d
	18	1,9-1,5	0,146 ± 0,008	52 ± 7 ^a	4 ± 1 ^a	4,1 ± 0,5 ^{ab}
	19	1,5-1,2	0,15 ± 0,03	58 ± 7 ^{ab}	15 ± 1 ^{abc}	2,0 ± 0,4 ^a
	20	1,2-0,95	0,15 ± 0,04	64 ± 9 ^{abc}	27 ± 13 ^{cd}	9 ± 1 ^d
	21	0,95-0,75	0,15 ± 0,04	55 ± 1 ^a	28 ± 6 ^{cd}	8 ± 2 ^d
	22	0,75-0,59	0,07 ± 0,01	70 ± 6 ^{bcd}	35 ± 2 ^d	7,7 ± 0,9 ^{cd}
	27	0,23-0,18	0,06 ± 0,02	74 ± 7 ^{cde}	34 ± 11 ^d	3,7 ± 0,8 ^{ab}
	28	0,18-0,14	0,10 ± 0,02	87 ± 1 ^{de}	8 ± 3 ^{ab}	12 ± 1 ^e
	29	0,14-0,11	0,06 ± 0,02	81 ± 2 ^e	17 ± 1 ^{abc}	9 ± 2 ^d
HF2D _s	16	3,1-2,5	0,105 ± 0,001	35 ± 5 ^a	11 ± 5 ^{ab}	9 ± 1 ^b
	17	2,5-1,9	0,12 ± 0,02	37 ± 5 ^a	23 ± 1 ^{cd}	9 ± 2 ^b
	18	1,9-1,5	0,109 ± 0,005	40 ± 2 ^a	29 ± 1 ^{def}	5 ± 1 ^a
	19	1,5-1,2	0,132 ± 0,003	42 ± 3 ^a	26 ± 1 ^{de}	8 ± 1 ^b
	20	1,2-0,95	0,13 ± 0,04	68 ± 7 ^b	36,6 ± 0,3 ^{fg}	7 ± 2 ^{ab}
	21	0,95-0,75	0,086 ± 0,002	58 ± 1 ^b	14,8 ± 0,8 ^{bc}	15,1 ± 0,5 ^c
	22	0,75-0,59	0,069 ± 0,001	60 ± 4 ^b	55 ± 10 ^h	19 ± 1 ^d
	27	0,23-0,18	0,045 ± 0,008	68 ± 9 ^b	4,9 ± 0,5 ^a	18 ± 2 ^{cd}
	28	0,18-0,14	0,117 ± 0,002	84 ± 1 ^c	33 ± 6 ^{ef}	20 ± 1 ^d
	29	0,14-0,11	0,07 ± 0,01	83,4 ± 0,2 ^c	44 ± 5 ^g	19,1 ± 0,8 ^d

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada muestra.

Estos resultados indican que la fermentación previa de la harina produjo cambios en la composición molecular que se reflejan en cambios en la actividad antioxidante de ciertas fracciones, aumentando la actividad de varias fracciones de bajo PM (< 2,5 kDa) especialmente a nivel celular.

II.4.2.4. Efecto de la fermentación sobre los CF, su bioaccesibilidad y actividad antioxidante.

Para evaluar si la fermentación generaba alguna modificación en los CF, se analizó el extracto de HF2 obtenido con etanol al 60 % mediante EAU (HF2_e) y se lo comparó con H_e previamente descrito en el *Capítulo 1*. Los resultados indicaron que el proceso de fermentación aumentó significativamente ($p < 0,05$) (aproximadamente 3 veces) el CFT medido por el método de Folin-Ciocalteu (**Tabla II.12**). Gan et al. (2016) informaron que la fermentación natural aumentó el CFT en la mayoría de las leguminosas, especialmente en el caupí moteado,

donde aumentó aproximadamente un 80 %. Xiao et al. (2015) realizaron extracciones con diferentes solventes (metanol 80 %, etanol 80 %, acetona 80 %, agua) de poroto mungo fermentado y en todas ellas, el contenido de CFT aumentó con respecto a las muestras no fermentadas. Estos autores sugirieron que las estructuras químicas y solubilidades de los compuestos fenólicos del poroto mungo estaban significativamente influenciadas por el proceso de fermentación.

Tabla II.12. Contenido fenólico total (CFT) y actividad antioxidante de extractos (EAU, etanol al 60 %) de HF2 y HF2D en comparación con H y HD.

Muestra	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	ORAC IC_{50} ($\mu\text{g AGE/mL}$)	ABTS IC_{50} ($\mu\text{g AGE/mL}$)
H _e	33 \pm 1 ^a	1,2 \pm 0,1 ^{ab}	23 \pm 2 ^a
HF2 _e	96 \pm 2 ^b	1,4 \pm 0,3 ^b	48 \pm 10 ^c
HD _e	181 \pm 4 ^d	0,8 \pm 0,1 ^a	29 \pm 4 ^{ab}
HF2D _e	193 \pm 4 ^e	0,8 \pm 0,1 ^a	22 \pm 3 ^a
HD _{esb}	141 \pm 1 ^c	2,7 \pm 0,1 ^c	36 \pm 1 ^b
HF2D _{esb}	193 \pm 2 ^e	2,6 \pm 0,2 ^c	50 \pm 2 ^c

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El perfil de CF de HF2_e se analizó mediante HPLC-DAD-FLD y se comparó con el de H_e (Tabla II.13). Este último fue descrito previamente (Capítulo I, sección 1.4.2.2), con (-) -epigallocatequina (un flavan-3-ol) y polidatina (estilbeno) como CF mayoritarios. Se observaron varios cambios después de la fermentación. Se detectaron aumentos en los ácidos elágico, rosmarínico y especialmente cafeico, pero disminución en los ácidos gálico (un ácido hidroxibenzoico), *p*-cumárico y ferúlico (ácido hidroxicinámico). Por otro lado, el OH-tirosol no fue detectable después de la fermentación. Entre los flavonoides (mayoritarios en H_e), sólo disminuyeron (-)-epicatequina y naringenina (flavanona), mientras que la flavanona hesperitina, los flavan-3-oles (-)-epigallocatequina y (+)-catequina, y los flavonoles rutina (quercetina-3-O-rutinósido), quercetina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido y quercetina-3-glucósido aumentaron; inclusive apareció quercetina que no se encontraba en H_e (Tabla II.13).

La cantidad total de CF detectados por HPLC, al igual que los CFT (por Folin), aumentó después de la fermentación, principalmente debido a un incremento de flavonoides. Dueñas et al. (2005) llevaron a cabo fermentaciones espontáneas y con *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 de harina de caupí (48 h, 37 °C) e informaron que ambas fermentaciones modificaron el

contenido de los CF pero de manera diferente. Encontraron, como en nuestro caso, que la fermentación daba lugar a algunos compuestos fenólicos no detectados en la harina, como la quercetina, por lo que explicaron que la disminución del pH podría activar algunas enzimas que hidrolizan los glucósidos de quercetina, obteniéndose dicha aglicona.

La familia *Lactobacillaceae* posee un amplio espectro de actividades enzimáticas para la biotransformación de CF de la dieta que podrían haber participado en el cambio del perfil de los CF previamente descrito. Las esterasas, reductasas y descarboxilasas participarían en la conversión de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. Además, las BAL contienen glicosilhidrolasas que actúan sobre la hidrólisis de glucósidos de metabolitos secundarios de plantas como los flavonoides glicosilados, aunque se sabe poco sobre la especificidad de sustrato de estas enzimas (Gaur y Ganzle, 2023).

Luego de la DGIS se observó un aumento en el CFT tanto en **HD_e** como en **HF2D_e** con respecto a las muestras no digeridas, siendo mayor cuando la harina había sido fermentada previamente (**Tabla II.12**). De acuerdo con esto, Ketnawa y Ogawa (2019) informaron un aumento en los valores de CFT después de someter soja fermentada a un proceso de DGIS.

En la *Sección 1.4.2.2 del Capítulo 1* hemos analizado los cambios en el perfil de los CFs producidos por la DGIS de **H_e**. Estos datos los tendremos en cuenta también en este capítulo ya que serán de relevancia para poder realizar una comparación y analizar el efecto producido por el proceso de fermentación (**Tabla II.12**). **HF2D_e** presentó un mayor contenido de algunos ácidos fenólicos que **HD_e**, como los ácidos gálico, siríngico, cafeico y rosmarínico.

Tabla II.13. Perfil de CF. Efecto de la fermentación y DGIS

Compuesto fenólico	H _e	HF2 _e	HD _e	HF2D _e
OH-tirosol	1,7 ± 0,1 ^a	nd	13,6 ± 0,1 ^c	7,2 ± 0,1 ^b
Ácidos fenólicos				
Ácido elágico	0,28 ± 0,02 ^b	0,44 ± 0,01 ^c	0,221 ± 0,006 ^a	0,24 ± 0,01 ^{ab}
Ácido gálico	0,78 ± 0 ^a	nd	nd	0,818 ± 0 ^b
Ácido siríngico	nd	nd	nd	4,13 ± 0,03
Ácido cafeico	2,1 ± 0,5 ^{ab}	8,9 ± 0,5 ^c	0,7 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,6 ^b
Ácido <i>p</i> -coumárico	1,53 ± 0,01 ^d	0,22 ± 0 ^a	1,11 ± 0,04 ^c	0,46 ± 0,01 ^b
Ácido ferúlico	0,45 ± 0,09 ^b	0,19 ± 0,01 ^a	0,80 ± 0,03 ^c	0,46 ± 0,02 ^b
Ácido rosmarínico	5,2 ± 0,4 ^b	6,4 ± 0,1 ^c	3,30 ± 0,02 ^a	4,69 ± 0,03 ^b
Total ácidos fenólicos	10 ± 1	16,1 ± 0,7	6,1 ± 0,2	13,7 ± 0,7

Estilbenos				
Polidatina	26,05 ± 0,04 ^c	25,61 ± 0,01 ^c	23,2 ± 0,3 ^b	22,44 ± 0 ^a
<i>trans</i> -resveratrol	2,6 ± 0,1 ^a	4,8 ± 0,1 ^b	7,5 ± 0,1 ^d	6,67 ± 0 ^c
Total estilbenos	28,6 ± 0,1	30,39 ± 0,09	30,7 ± 0,3	29,11 ± 0
Flavonoides				
Rutina	5,2 ± 0,4 ^a	13,2 ± 0,7 ^b	nd	nd
Quercetin-3-glucosido	0,88 ± 0,01 ^a	1,59 ± 0,01 ^b	nd	0,96 ± 0,04 ^a
Kaempferol-3-glucosido	2,3 ± 0,3 ^b	6,5 ± 0,5 ^c	0,8 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^{ab}
Quercetina	nd	3,01 ± 0,01	nd	nd
Procianidina B1	13 ± 6 ^a	21 ± 8 ^a	nd	nd
(+)-catequina	1,05 ± 0,04 ^a	1,25 ± 0,04 ^b	nd	nd
(-)-epigallocatequina	59,7 ± 0,2	82 ± 6	27 ± 4	0,06 ± 0,08
(-)-epicatequina	0,55 ± 0,02	nd	27 ± 5 ^c	nd
(-)-galocatequin gallato	nd	nd	6,3 ± 0,2	nd
Naringenina	0,32 ± 0,02	nd	nd	nd
Hesperetina	0,71 ± 0,08 ^a	1,65 ± 0,07 ^b	nd	1,71 ± 0,02 ^b
Total flavonoides	84 ± 6	140 ± 12	40 ± 5	3,86 ± 0,05
Total	125 ± 6	187 ± 12	90 ± 5	47 ± 1

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Sin embargo, la mayor diferencia la encontramos en los flavonoides, cuyo contenido fue mucho menor en **HF2D_e** ya que no se pudieron detectar compuestos del grupo de los flavan-3-ol (catequinas y procianidina).

Estos resultados sugieren que, después de la fermentación, estos compuestos estaban más disponibles para las modificaciones que pueden ocurrir durante el proceso de digestión gastrointestinal, como la inestabilidad de las catequinas a pH neutro (Oh et al., 2021) y de la procianidina a pH ácido gástrico (Bouayed et al., 2012).

II.4.2.4.1. Actividad antioxidante química (no celular).

Analizando la actividad antioxidante de los CF extraídos, se observó que la actividad ABTS disminuyó significativamente ($p < 0,05$) después de la fermentación (**Tabla II.12**). Además, la fermentación no tuvo efecto sobre la eliminación de ROO· ya que **HF2_e** presentó un valor de IC₅₀ similar a **H_e** cuando se analizó por el método de ORAC ($p > 0,05$). Este comportamiento fue diferente al registrado para las fracciones solubles en PBS en las que la actividad ORAC aumentó después de la fermentación (**Tabla II.8**). Dlamini et al. (2007) informaron una reducción de los

niveles de antioxidantes después de la fermentación de harina de sorgo (25 °C, hasta pH = 3,6) que atribuyeron a cambios durante el procesamiento que afectaron la extracción de fenoles y taninos totales. Plantearon la hipótesis de que tales cambios probablemente implicaban asociaciones entre los taninos, fenoles, proteínas y otros compuestos del grano. También postularon que, durante la fermentación, los taninos por ejemplo, pueden ser degradados por enzimas microbianas. En nuestro caso, la fermentación no produjo una disminución del contenido de CF, aunque si un cambio en el perfil de compuestos que no trajo aparejada una modificación de la potencia ORAC pero si de la potencia en el ensayo de ABTS.

El proceso de DGIS produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores de IC_{50} (aumento de la potencia) de ambos digeridos en el ensayo ORAC, sin diferencias significativas entre ellos (**Tabla II.12**). También condujo a un aumento en la actividad de ABTS en el caso de **HF2_e**, y ambos digeridos mostraron valores de IC_{50} similares. Por lo tanto, aunque la fermentación produjo modificaciones en el perfil de CFs de **H_e**, estas no se tradujeron en cambios importantes en las actividades ORAC y ABTS después de la DGIS. Sancho et al. (2015) midieron la actividad antioxidante en extractos metanólicos de porotos rojos y negros crudos antes y después de la digestión e informaron que no hubo diferencia significativa en los valores cuando se cuantificó por ABTS y solo hubo diferencia en el extracto de porotos negros cuando se midió por el método ORAC.

El tratamiento con colestiramina produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la potencia en los ensayos ORAC y de neutralización de ABTS de **HF2D_{esb}** de manera similar a la producida en el caso de la harina no fermentada (**HD_{esb}**), con similares valores para ambas fracciones en ORAC, pero una potencia significativamente menor ($p < 0,05$) para **HF2D_{esb}** en la neutralización de ABTS (**Tabla II.12**).

Es importante señalar que, aunque el contenido total de CF detectados por HPLC fue mucho menor en el caso de **HF2D_e**, su CFT determinado por Folin fue algo mayor que para **HD_e**, lo que indica que los extractos contenían otras sustancias reactivas a Folin como podrían ser péptidos y aminoácidos. Además, ambos digeridos presentaron un contenido de CFT más alto, pero CF detectados por HPLC más bajos que las muestras no digeridas (**Tablas II.12 y II.13**).

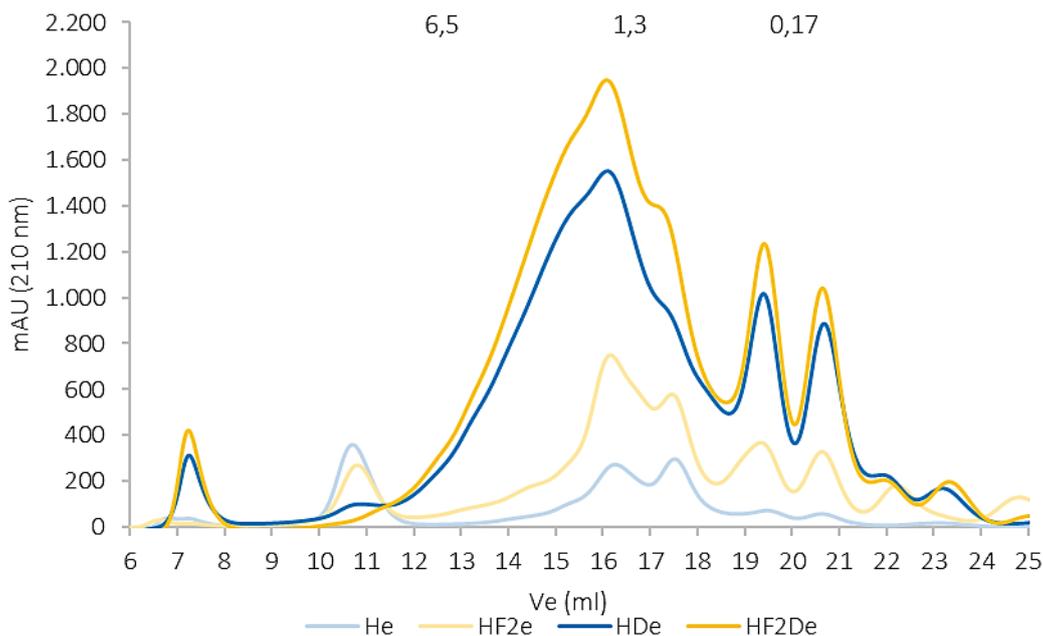


Figura II.8. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de extractos obtenidos con etanol 60 % (EAU), evaporados y solubilizados en PBS. Se indican los marcadores de PM (kDa) en la parte superior de las figuras.

En este sentido, cromatogramas FPLC de filtración en gel (**Figura II.7**) mostraron que tanto **H_e** como **HF2_e** presentaron moléculas con PM en un amplio rango (< 10 kDa), pero no contenían los polipéptidos más grandes (> 10 kDa) que aparecen en el pico correspondiente a V_0 (a diferencia de las fracciones solubles en PBS, **Figura II.4**). Al igual que en las fracciones solubles en PBS, el incremento de moléculas inferiores a 2 kDa fue evidente después de la fermentación (**Figura II.7**). Después de la DGIS, la presencia de moléculas con PM < 6,5 kDa aumentó fuertemente y, en mucha menor medida, la presencia de moléculas con PM > 10 kDa (**Figura II.7**); estas últimas presentaron una abundancia mucho menor que en el caso de las fracciones solubles en PBS (**Figura II.4**). Estos análisis demostraron la presencia de otro tipo de compuestos en los extractos etanólicos, como péptidos y aminoácidos, con mayor abundancia en **HF2D_e**. Por lo tanto, la actividad antioxidante de estos extractos etanólicos mostró el aporte tanto de CF como de péptidos y aminoácidos libres que pudieron solubilizarse en las condiciones de extracción.

II.4.2.4.2. Actividad antioxidante en cultivos celulares

Para analizar la actividad a nivel celular, como ya se ha descrito fue necesario remover sales biliares de los extractos etanólicos, obteniéndose la fracción **HF2D_{esb}**. La citotoxicidad de esta

fracción se evaluó en términos del % de liberación de LDH como indicador de daño celular y se comparó con la correspondiente a **HD_{esb}**, y a **BR_{esb}** (Tabla II.14).

Tabla II.14. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelular de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (**HD_{esb}**, **HF2D_{esb}** y **BR_{esb}**).

Muestra	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	LDH (U/l)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
HD_{esb}	141	56 ± 8^c	44	66 ± 4^c
	28	26 ± 2^b	74	48 ± 2^b
	7	12 ± 4^a	88	22 ± 7^a
HF2D_{esb}	193	21 ± 3^c	79	81 ± 1^c
	38,6	15 ± 1^b	85	57 ± 1^b
	9,6	9 ± 1^a	91	39 ± 4^a
BR_{esb}	nd	74 ± 2	26	-
	nd	55 ± 8	45	-
	nd	23 ± 4	77	-

Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

*Valores calculados teniendo en cuenta la viabilidad celular de la muestra y su correspondiente dilución de BR

Como se mencionó en el *Capítulo I*, sección I.4.3.2, después del tratamiento con colestiramina, el **BR_{esb}** presentó un contenido de CFT no detectable y una alta citotoxicidad (74 %) que disminuyó con la dilución de esta muestra, mientras que **HD_{esb}** presentó un valor de citotoxicidad alto pero menor (56 %) que también disminuyó a medida que se diluyó la muestra. En el caso de **HF2D_{esb}**, la citotoxicidad fue menor que para **HD_{esb}**. Los valores de viabilidad celular fueron altos (entre 79 y 91 %) para todas las diluciones ensayadas (Tabla II.14). Como se discutió en el *Capítulo I*, estos resultados sugieren que la citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles estaría dada por los restos de reactivos de digestión y que está atenuada por la presencia de CF (u otros compuestos) presentes en **HD_e** y **HF2D_e**. Sin embargo, esta protección frente a la citotoxicidad de los reactivos de digestión parece ser superior cuando se hace una fermentación previa de la harina.

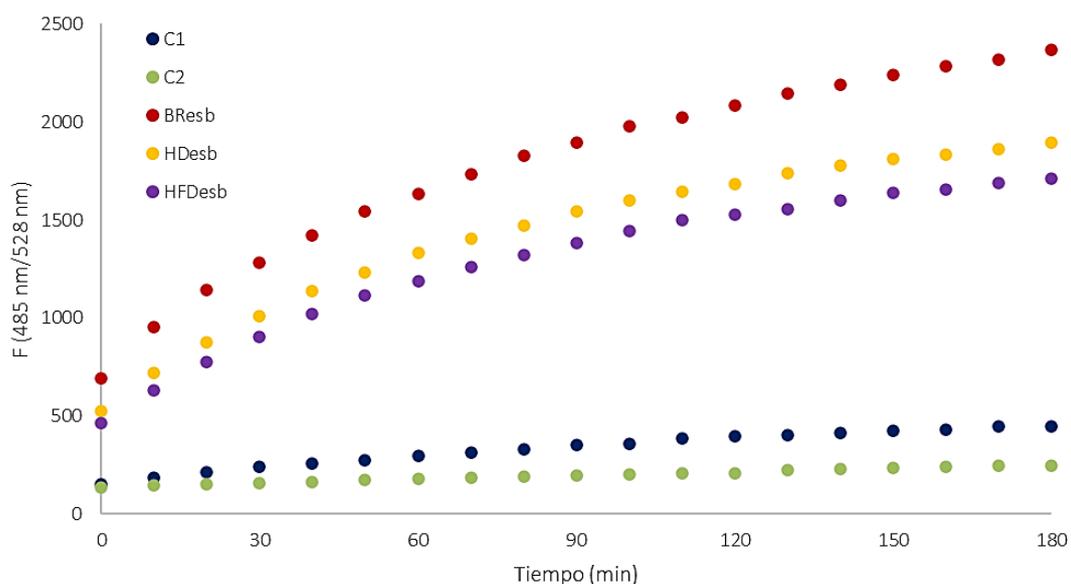


Figura II.9. Evolución de ROS en células Caco-2 TC7 inducidas por H_2O_2 : evolución de la fluorescencia de los sistemas control C1 (sin pretratamiento de muestra) y C2 (células no inducidas); células pretratadas con diluciones 1/5 de las fracciones bioaccesibles **BR_{esb}**, **HD_{esb}** y **HF2D_{esb}**.

La evolución de la fluorescencia para los sistemas control (C1: oxidación máxima, C2: estado basal), así como para **HD_{esb}**, **HF2D_{esb}** y **BR_{esb}**, todos en la misma dilución (1/5) se muestra en la **Figura II.9**. Como se mencionó en el *Capítulo I*, el pretratamiento de las células con **BR_{esb}** indujo un aumento de fluorescencia mayor que en el caso de C1 y por ese motivo fue utilizado en la dilución correspondiente como control de máxima oxidación para el cálculo del % de inhibición de ROS intracelulares. Tanto **HD_{esb}** como **HF2D_{esb}** presentaron un % de inhibición de ROS que fue dependiente de la dilución y en consecuencia de la concentración de CF totales. **HF2D_{esb}** presentó mayores valores de inhibición de ROS intracelulares con respecto a **HD_{esb}**. Con el fin de comparar la potencia de ambos digeridos en este ensayo se estimaron los valores de IC_{50} a partir de curvas dosis-respuesta. Estos valores fueron 29 y 22 μg AGE/ml para **HD_{esb}** y **HF2D_{esb}**, respectivamente, mostrando una pequeña mejora en la potencia de los compuestos presentes en el extracto obtenido a partir de los digeridos de la harina fermentada frente a la sin fermentar.

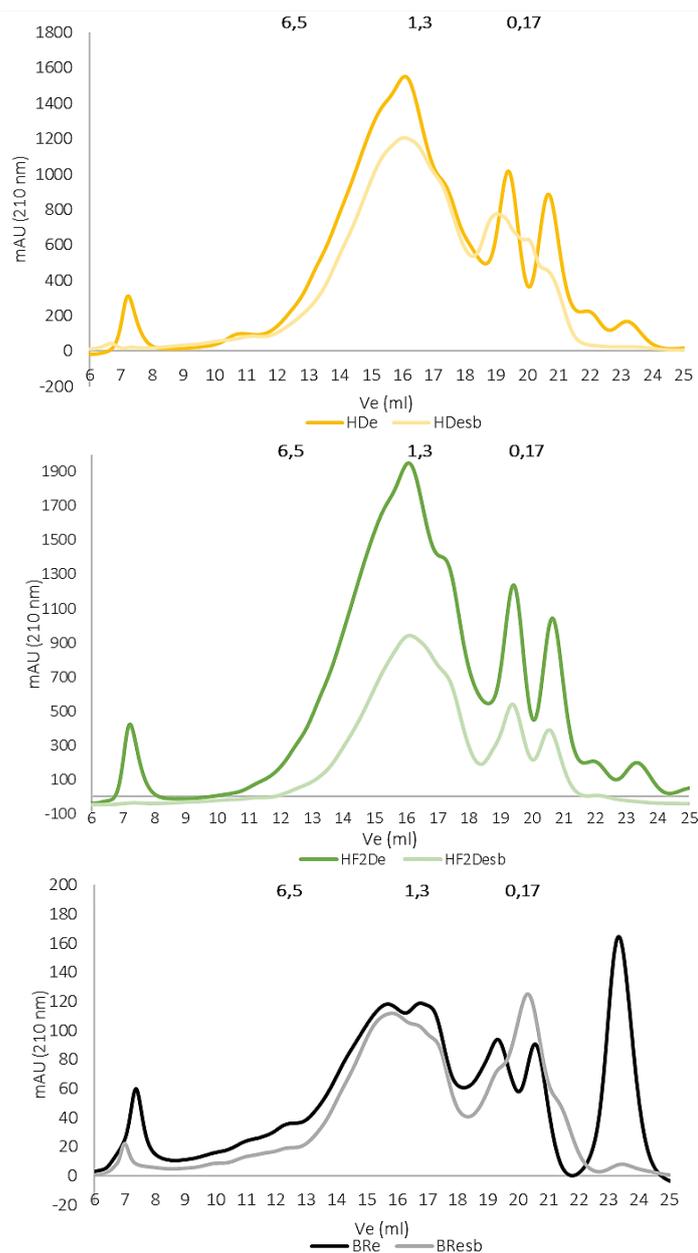


Figura II.10. Cromatografía de filtración en gel FPLC (*Superdex 30*) de extractos etanólicos resolubilizados en PBS. **A.** HD_e y su fracción bioaccesible (HD_{esb}); **B.** HF2D_e y su fracción bioaccesible (HF2D_{esb}); **C.** BRe y su fracción bioaccesible BResb. Los marcadores de PM (kDa) se indican en la parte superior de las figuras.

Como se describió en la *Sección 1.4.2.2 del Capítulo I*, la comparación de los cromatogramas FPLC de filtración en gel de HD_e y HD_{esb} mostró que después del tratamiento con colestiramina de los extractos etanólicos, se perdieron principalmente las moléculas con PM > 10 kDa y aquellas con PM < 0,17 kDa, mientras que hubo una pérdida parcial de moléculas con PM entre 0,17 y 6,5 kDa (**Figura II.10.A**), en las que se incluirían las sales biliares. En el caso de HF2D_{esb} también se observó una pérdida de estas moléculas. Aunque dicho cambio fue mayor en comparación con HD_{esb} (**Figura II.10.B**), esto no afectó negativamente la actividad antioxidante

celular. Como mencionamos previamente, no se puede descartar la pérdida de algunos CF después del tratamiento con colestiramina.

II.4.3. Simulación de la absorción intestinal

Se evaluó el transporte de compuestos presentes en **HF2D_{sb}** a través de una monocapa de células Caco-2 TC7 en dirección apical-basolateral. En la **Figura II.11** se presentan nuevamente a modo de recordatorio los cromatogramas del buffer PBS (pH = 7,4) y de la fase móvil utilizada en la corrida cromatográfica, los cuales fueron analizados previamente en la sección I.4.4 del *Capítulo I*.

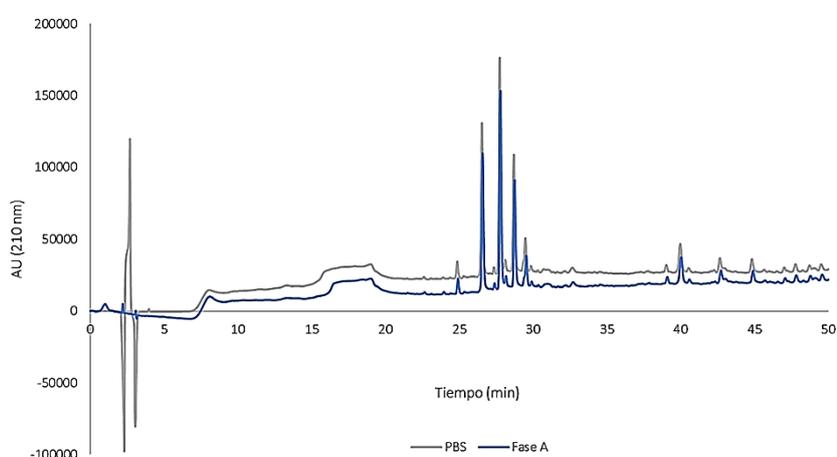


Figura II.11. Perfiles RP-HPLC correspondientes a la fase móvil (Fase A) y el buffer utilizado en el ensayo (PBS)

Se realizó la comparación de los perfiles obtenidos para la fracción soluble directa y la bioaccesible de **HF2D** (**Figura II.12**) a las diferentes longitudes de onda. La **Figura II.12.A** muestra los cromatogramas detectados a 210 nm, los cuales presentan una gran variedad de picos de distintas intensidades. Como sucedió para **HD** y **AD**, en estos cromatogramas aparecen los tres picos con mayor intensidad entre los 10 y los 20 min que como se mencionó previamente, coinciden con los detectados en **BR**. Estos tres picos presentaron una menor disminución en la fracción bioaccesible que en el caso de **HD**.

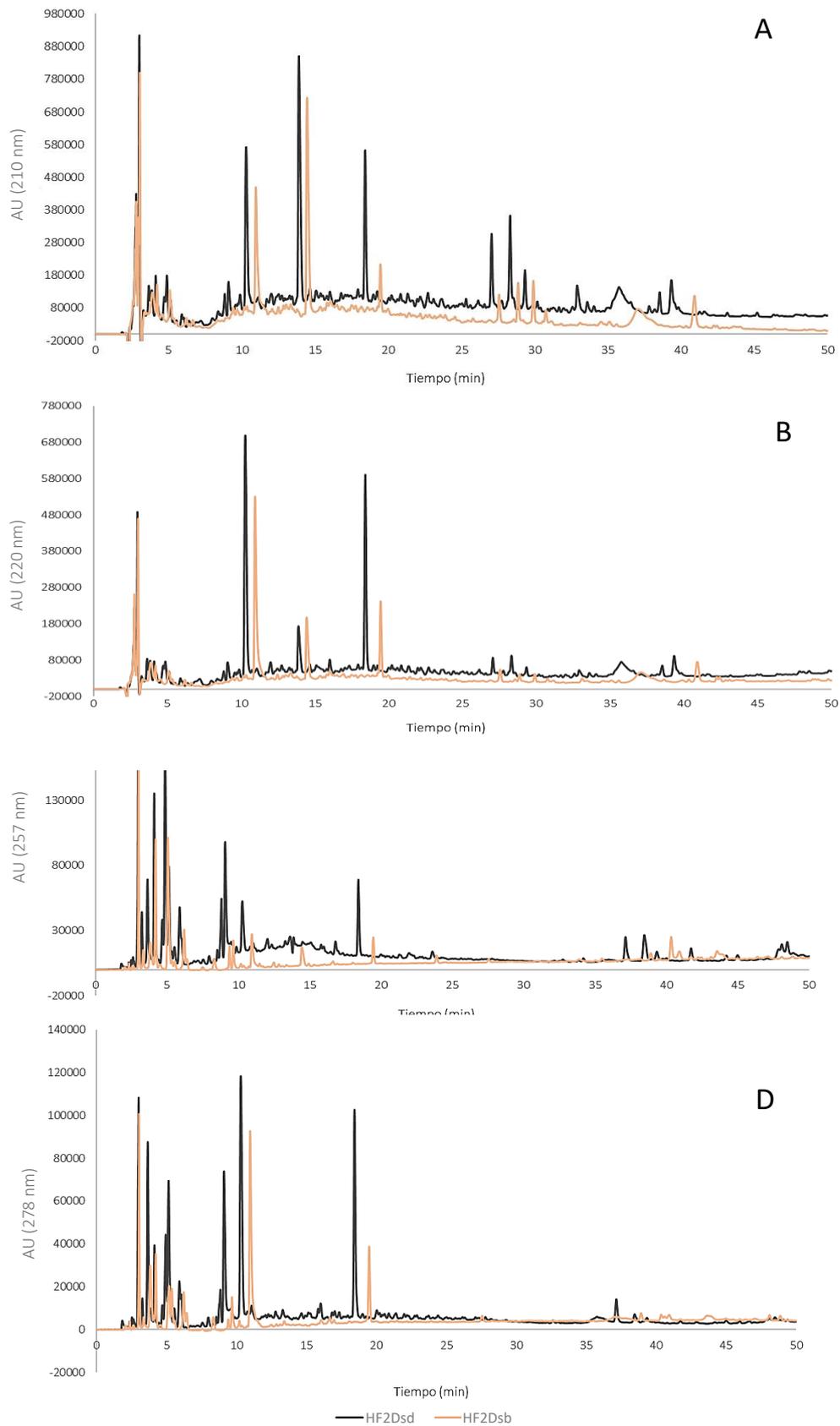


Figura II.12. Perfiles RP-HPLC de HF2D_{sd} (29 mg proteína/ml) y HF2D_{sb} (19 mg proteína/ml). A. 210 nm; B. 220 nm; C. 257 nm; D. 278 nm

Al analizar los espectros de absorción de estos picos, al igual que lo que se observó para **HD** y **AD** (sección 1.4.4, Capítulo I), el pico 3 para **HD** y **HF2D** presentó dos máximos, uno mayor a 220 nm y otro más pequeño alrededor de los 280 nm, mientras que el **BR** presentó los mismos máximos pero en menor intensidad. El pico 4 no mostró absorción relacionada con péptidos para ninguna de las tres muestras, sin embargo, en el caso de **HF2D** presentó un corrimiento del máximo a mayor longitud de onda (~210 nm). El pico 5, para **HD** y **HF2D** presentó espectros similares a los del pico 3, pero en el **BR** los máximos de absorción no coinciden con los de las muestras (Figura II.13).

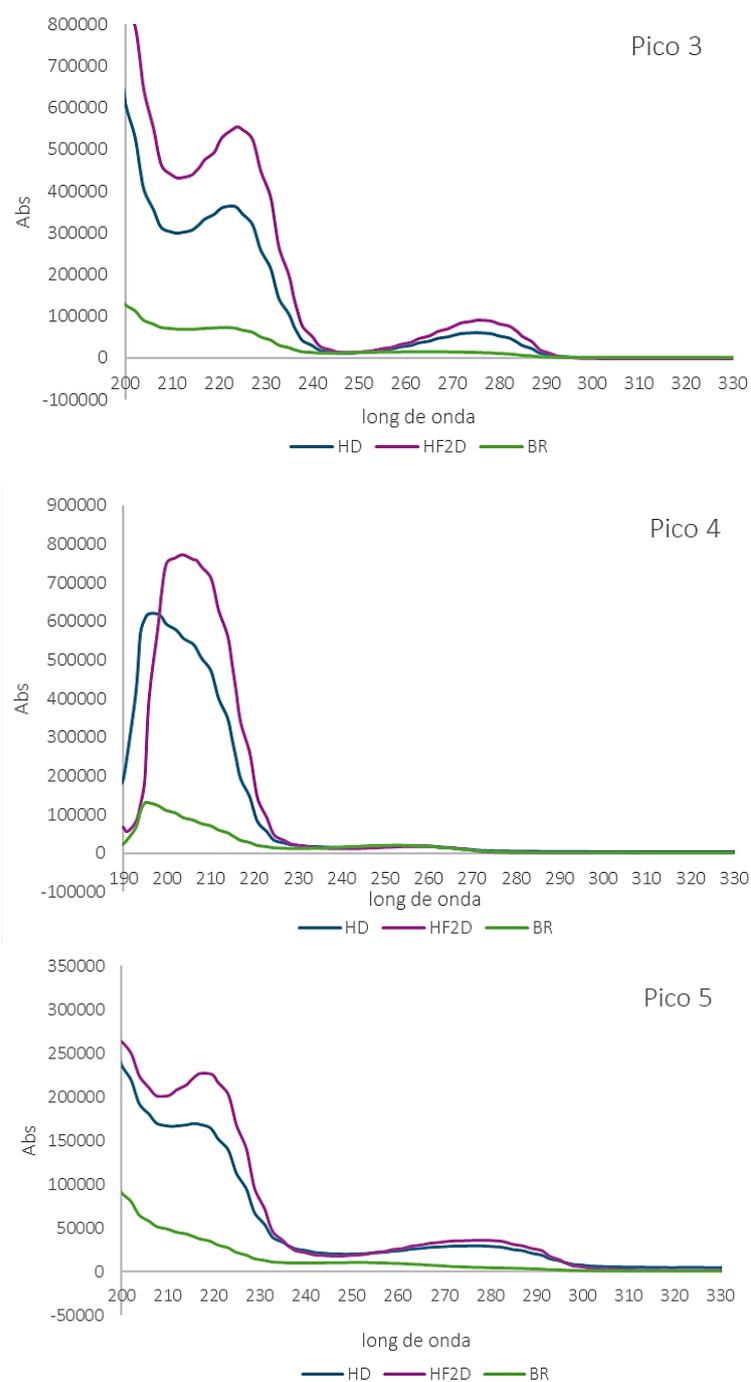


Figura II.13. Espectros de absorción de los picos 3, 4 y 5 de las muestras **HD_{sb}**, **HF2D_{sb}** y **BR_{sb}**. 264

En todos los casos, **HF2D** presentó mayor absorbancia a 210/220 nm pero similar a 280 nm con respecto a **HD**. Estas diferencias, considerando la hipótesis de que estos picos podrían estar relacionados con polipéptidos/péptidos interaccionando con sales biliares (*sección 1.4.4, Capítulo 1*), sugieren cambios en estas interacciones debidos a modificaciones en la composición peptídica de **HF2D**. Sin embargo, estas hipótesis deberán ser confirmadas estudiando específicamente la interacción entre las distintas fracciones bioaccesibles y las sales biliares.

Se detectaron además una gran variedad de picos pequeños en todo el rango de corrida dentro de los que pueden resaltarse picos correspondientes a compuestos hidrofílicos con $t_R < 10$ min y otros más hidrofóbicos a los 33 y 36 min, todos ellos no presentes en **BR**. La **Figura II.12.B** (220 nm) mostró una gran cantidad de picos (como a 210 nm) entre los cuales sobresalen los correspondientes a t_R : 11, 14 y 19 min (ya descritos para **BR** en el *Capítulo 1*). En estos cromatogramas tampoco se observa una disminución de las intensidades de los picos de la fracción bioaccesible con respecto a la completa. Analizando la **Figura II.12.C** correspondiente a cromatogramas a 257 nm se observaron muchos picos a $t_R < 10$ min que podrían estar relacionados con péptidos de naturaleza hidrofílica o aminoácidos libres tanto para **HF2D_{sd}** como para **HF2D_{sb}**. Una situación similar se había observado en los cromatogramas (257 nm) de **HD_{sd}** en los cuales se detectaron muchos picos hidrofílicos pero que en **HD_{sb}** la disminución de la intensidad de los mismos había sido más pronunciada. Los cromatogramas realizados a 278 nm (**Figura II.12.D**), así como en el correspondiente a 257 nm, también mostraron principalmente muchos picos a $t_R < 10$ min para **HF2D_{sd}**. En la fracción bioaccesible se observó la disminución de algunos de esos picos, en particular los comprendidos entre 5 y 10 min.

Se compararon los perfiles cromatográficos de **HF2D_{sb}** y de **HD_{sb}** a fin de evidenciar diferencias debida a la fermentación previa de **H** (**Figura II.14**). Si bien ambas muestras presentaron una gran diversidad de picos pequeños en todo el rango de corrida, pueden llegar a detectarse algunas diferencias entre ellos. Las diferencias más notables se encuentran en un pico correspondiente a $t_R = 5$ min, unos picos pequeños entre 33 y 34 min y otro un poco más pronunciado a los 37 min que sólo se detectaron en **HF2D_{sb}**. También esta muestra mostró picos (pequeños) más evidentes en la zona comprendida desde el inicio de la corrida y hasta los 24 min.

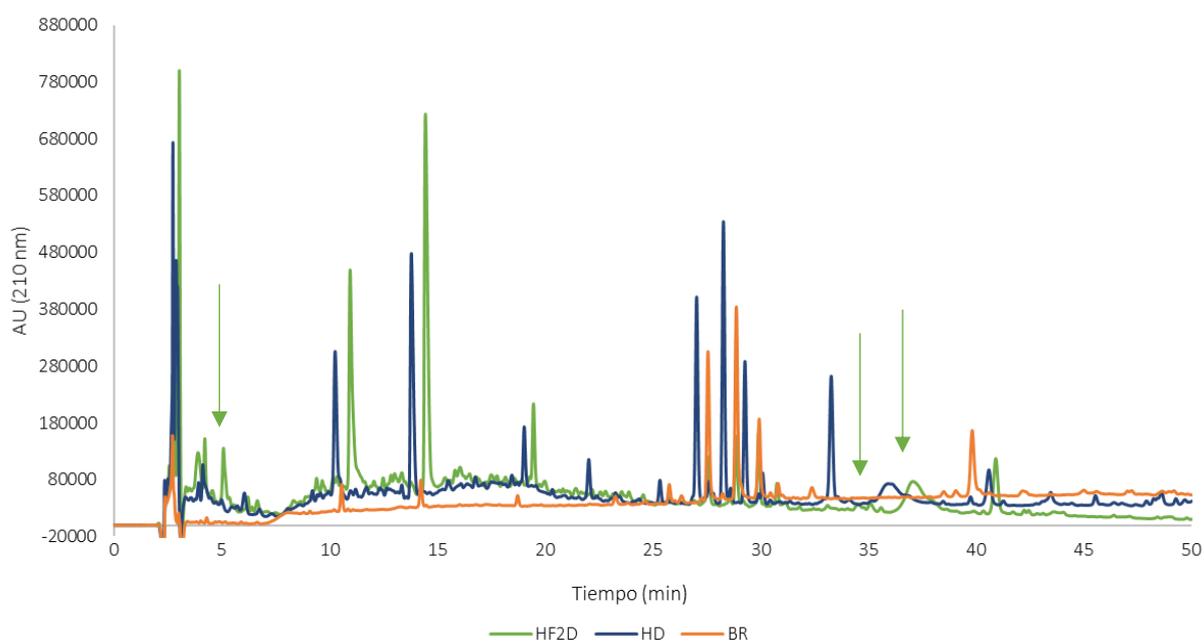


Figura II.14. Perfiles RP-HPLC (210 nm) de **HD_{sb}** (20 mg proteína/ml), **HF2D_{sb}** (19 mg proteína/ml) y **BR_{sb}** (0,4 mg proteína/ml).

Se realizó la evaluación de la absorción de la fracción soluble bioaccesible completa **HF2D_{sb}** a través de la monocapa celular. En la **Figura II.15** se muestran los cromatogramas obtenidos para la solución original de **HF2D_{sb}** (19 mg proteína/ml) y los contenidos de las cámaras apical y basolateral luego de 3 h de incubación. En la **Figura II.16** se presentan los cromatogramas a las tres longitudes de onda sólo de esas fracciones para poder mejorar el análisis de ambas cámaras. En la **Figura II.16.A** (220 nm) se detectaron varios picos principales entre los 4 y 6,5 min (señalados con flechas) y otros de naturaleza más hidrofóbica a los casi 33, 36 y 37 min; los picos de 33 y 36 min también estaban en **HD_{sb}**, pero los de $t_R < 6,5$ kDa y el de 37 min no aparecían en esas muestras por lo que se infiere que serían exclusivos de **HF2D_{sb}**. A 257 y 278 nm (**Figura II.16.B** y **Figura II.16.C**) se observaron los picos previamente mencionados (círculos naranjas), lo que indicaría que existe alguna proporción de moléculas de naturaleza peptídica presentes en **HF2D_{sb}** capaces de atravesar la monocapa celular y que presumiblemente no habrían sufrido modificaciones ya que los t_R coinciden. Otros picos que se pudieron observar fueron los que fueron analizados en el *Capítulo I*, que presumiblemente pertenecerían a los reactivos de digestión, aunque como se discutió previamente, al aumentar tanto la señal de los mismos en los cromatogramas de **HF2D_{sb}** no se puede descartar presencia de algún componente de la muestra que estuviera interactuando la señal.

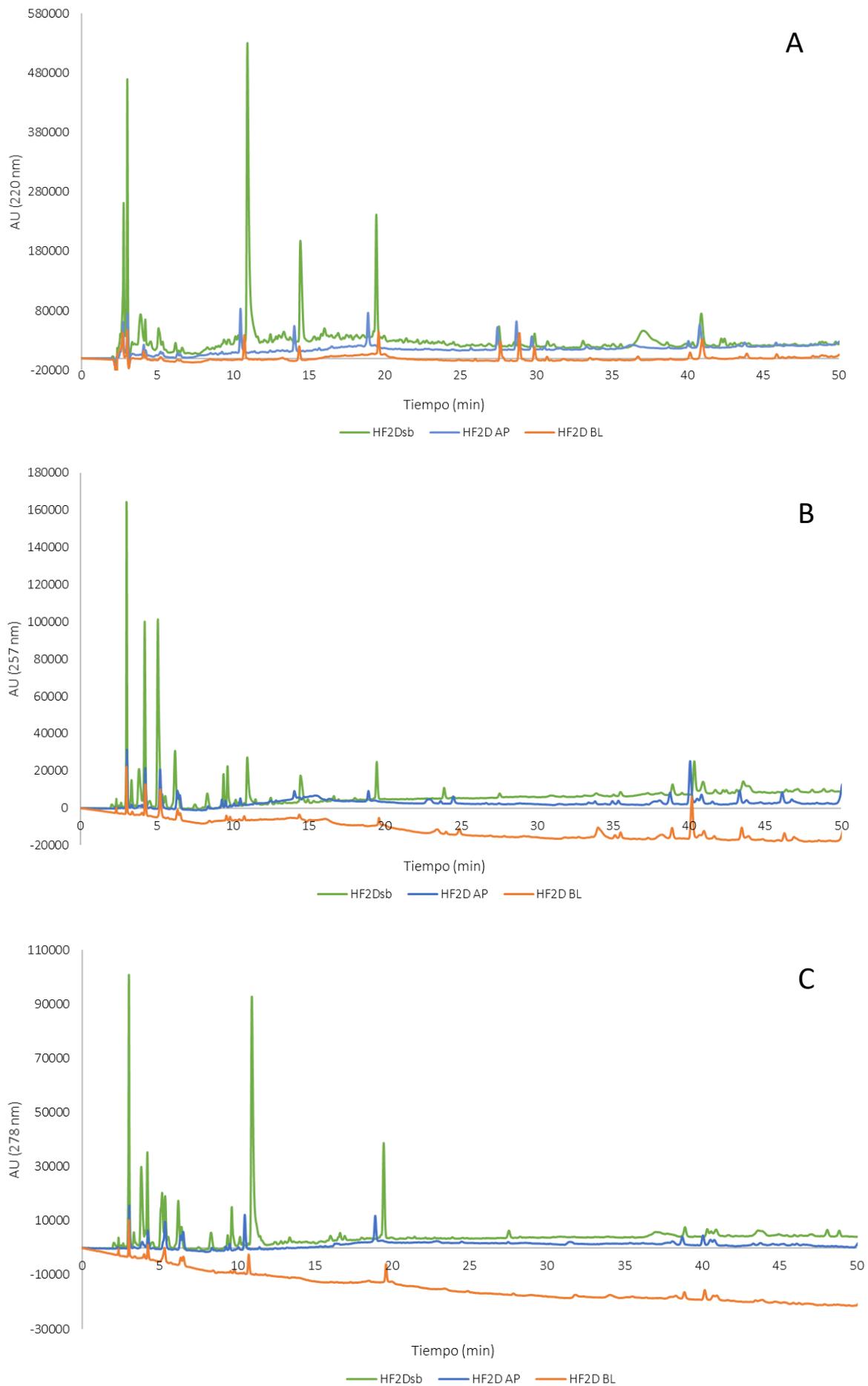


Figura II.15. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HF2D_{sb}** (19 mg proteína/ml), Cámara apical (HF2D AP) y cámara basolateral (HF2D BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm.

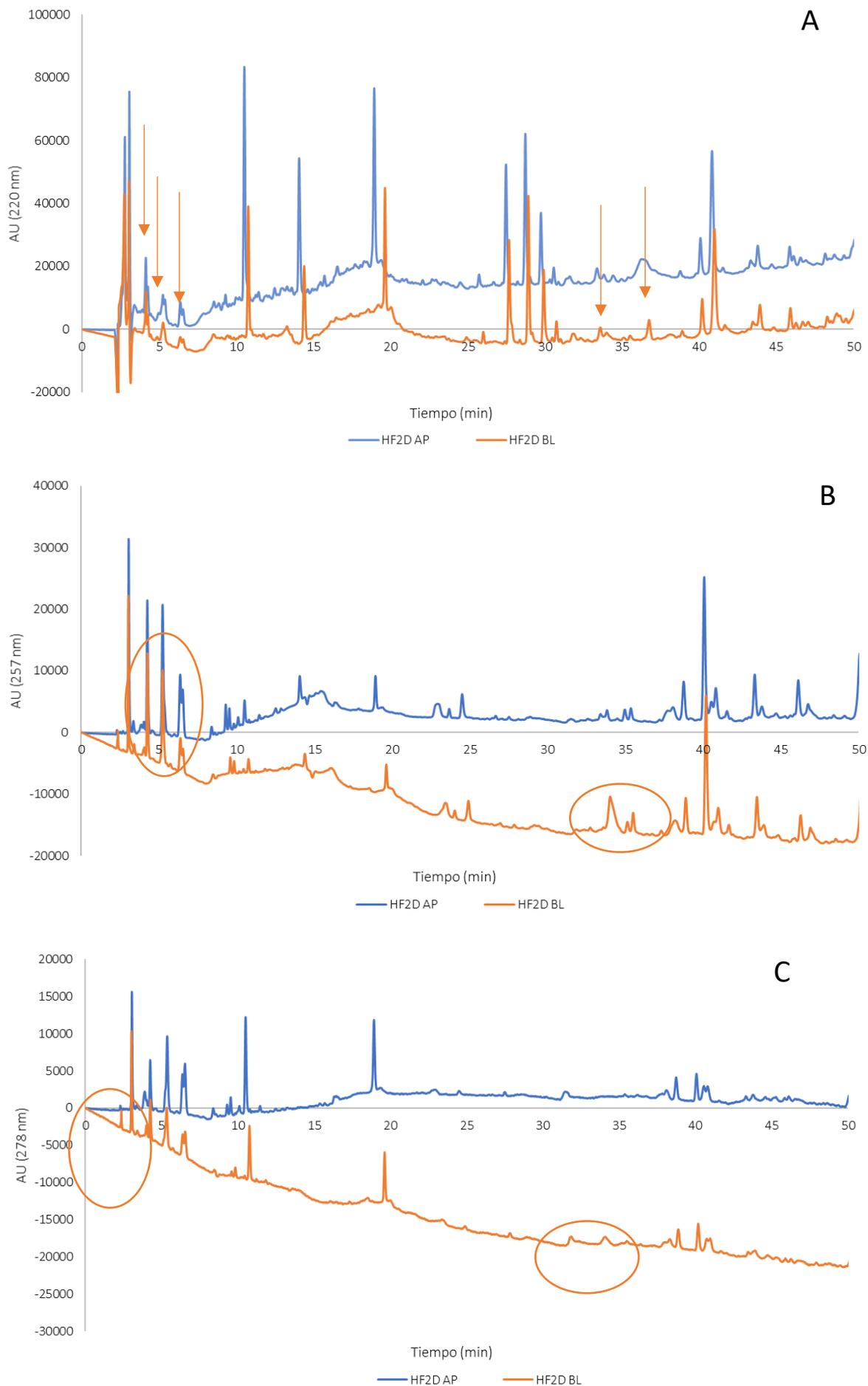


Figura II.16. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HF2D_{sb} (19 mg proteína/ml), Cámara apical (HF2D AP) y cámara basolateral (HF2D BL) luego de 3 h de incubación. **A.** Cromatograma realizado a 220 nm; **B.** Cromatograma realizado a 257 nm; **C.** Cromatograma realizado a 278 nm. 268

Finalmente, como sucedió tanto para **HD_{sb}** como para **AD_{sb}**, en **HF2D_{sb}** se detectó que en la fracción apical disminuyeron o no se detectaron muchos de los picos que si estaban en la fracción completa (**Figura II.15**), lo que indicaría que, como se discutió en el *Capítulo I*, esos compuestos habrían sido degradados en la cámara apical por el contacto con las células intestinales posiblemente por la acción de las peptidasas del borde en cepillo y/o dentro de la célula por peptidasas citoplasmáticas.

II.5.Conclusiones

Se llevaron a cabo ensayos preliminares para evaluar las condiciones óptimas de fermentación. Teniendo en cuenta factores tecnológicos y que permitieran alcanzar un grado moderado de proteólisis, fueron seleccionadas:

- ✓ la *condición 1 (HF1)*: dispersión de **H** al 36,4 % p/p, incubando durante 24 h a 30 °C
- ✓ la *condición 2 (HF2)*: menor concentración de **H** (14,3 % p/p), incubando durante 24 h a 37 °C para lograr una mayor fluidez de la dispersión y una fácil agitación.

Se realizó un *screening* microbiológico de las muestras no fermentadas y fermentadas:

- ✓ Los valores iniciales de recuento en las harinas (**H1** y **H2**) prácticamente no tuvieron diferencias.
- ✓ La fermentación llevó a similares recuentos de bacterias mesófilas totales y BAL (8,8 y 9,5 log ufc/g de dispersión) sin diferencias significativas entre **HF1** y **HF2**, sin diferencias en el valor de pH final registrado (entre 4,4 y 4,7) ni en el grado de proteólisis alcanzado (entre 17 y 20 %).
- ✓ En ninguna de las fermentaciones se detectaron hongos ni levaduras

La composición peptídica y polipeptídica fue analizada mediante electroforesis *SDS-PAGE* y cromatografía de filtración en gel.

- ✓ Se observó la formación de agregados en las muestras fermentadas (correlacionado con el descenso en la solubilidad) y un descenso en la intensidad de las bandas con PM < 40 kDa.
- ✓ La fermentación provocó un aumento de moléculas menores de 6,5 kDa en ambas condiciones (**HF1** y **HF2**).

Las harinas y los fermentos fueron sometidas a DGIS utilizando el protocolo de consenso internacional COST INFOGEST.

- ✓ El GH fue mayor cuando **H** fue previamente fermentada (**HF1D** y **HF2D** respecto de **H1D** y **H2D**), indicando que el proceso de fermentación mejoró la digestión gastrointestinal de las proteínas.
- ✓ El análisis por *SDS-PAGE* mostró que la fermentación produjo una disminución de gran parte de los polipéptidos de **H**, siendo más evidente para aquellos de 93 kDa y menores a 40 kDa. También se evidenció la formación de agregados (aún en presencia de SDS y urea) lo que puede correlacionarse con la menor solubilidad observada en las muestras fermentadas.
- ✓ En los cromatogramas de filtración en gel, la fermentación provocó un aumento de moléculas menores de 6,5 kDa en ambas condiciones (**HF1** y **HF2**).

La actividad antioxidante acelular *in vitro* se analizó mediante los métodos de ORAC y HORAC:

- ✓ La actividad ORAC aumentó significativamente ($p < 0,05$) por el proceso de fermentación, obteniéndose el menor valor de IC_{50} para la muestra **HF2s**.
- ✓ Para las fracciones digeridas (**HF1Ds** y **HF2Ds**) se observó un aumento en la potencia ORAC con respecto a las dispersiones sin fermentar.
- ✓ Luego de la DGIS se detectó un aumento en la potencia HORAC de las muestras digeridas frente a las no digeridas para ambas muestras, sin efecto de la fermentación previa.

La fermentación produjo una proteólisis parcial con una mejora en la digestión gastrointestinal de las proteínas y en la actividad ORAC de la harina fermentada y del digerido gastrointestinal de esta harina. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta la mayor facilidad de realización de la fermentación en la condición 2, se continuó estudiando la HF2.

Para evaluar si la fermentación generaba alguna modificación en los CF, se analizó el extracto de **HF2** obtenido con etanol al 60 % mediante EAU (**HF2e**) y se lo comparó con **He**.

- ✓ La cantidad total de CF detectados por HPLC, al igual que los CFT (por Folin), aumentó después de la fermentación, principalmente debido a un incremento de flavonoides.

- ✓ Luego de la DGIS, se observó un aumento en el CFT tanto en **HD_e** como en **HF2D_e** con respecto a las muestras no digeridas, siendo mayor cuando la harina había sido fermentada previamente.
- ✓ **HF2D_e** presentó un mayor contenido de algunos ácidos fenólicos que **HD_e**, como los ácidos gálico, siríngico, cafeico y rosmarínico. Sin embargo, la mayor diferencia se encontró en los flavonoides, cuyo contenido fue mucho menor en **HF2D_e**.

Estos resultados sugieren que, después de la fermentación, ciertos CF estaban más disponibles para las modificaciones que pueden ocurrir durante el proceso de digestión gastrointestinal.

Se evaluó la actividad antioxidante las fracciones solubles (**sd**) y bioaccesibles (**sb**) de **HD** y **HF2D**.

En las fracciones acuosas se ensayaron los métodos de ORAC y HORAC:

- ✓ La potencia ORAC no mostró diferencia entre las fracciones soluble en PBS y soluble directa (**HF2D_{sd}**). Luego del tratamiento con colestiramina, **HF2D_{sb}** presentó una disminución de la potencia.
- ✓ En la actividad HORAC, **HF2D_s** y **HF2D_{sd}** tampoco mostraron diferencias. Luego del tratamiento con colestiramina, **HF2D_{sb}** presentó una disminución de la potencia.
- ✓ Se evidenció que fracciones separadas a partir de **HF2D_s** de PM (kDa) entre 0,95-1,2, 0,59-0,75, 0,14-0,18, y 0,11-0,14 presentaron las mayores actividades ORAC.

En las fracciones etanólicas se ensayaron los métodos de ORAC y ABTS:

- ✓ Luego de la DGIS, **HF2D_e** aumentó la potencia ORAC con respecto a **HF2_e**. Luego del tratamiento con colestiramina, **HF2D_{sb}** presentó una disminución de la potencia.
- ✓ En la actividad ABTS, **HF2D_e** también mejoró la actividad antioxidante frente a **HF2_e**, mientras que en la fracción bioaccesible disminuyó la potencia.

*En las fracciones acuosas se encontró que por ambos métodos la potencia antioxidante de **HF2D_{sb}** fue mayor a la de **HD_{sb}** indicando que la fermentación previa llevó a una mejora en la actividad antioxidante de los digeridos luego del tratamiento con colestiramina. Este comportamiento fue diferente en las fracciones etanólicas, lo cual estaría relacionado con la pérdida de CF luego de la DGIS que se vio afectada por la fermentación previa de la harina y el posterior tratamiento con colestiramina. La fermentación mejoró mayormente la capacidad de neutralizar radicales ROO· y de inhibir la formación/neutralizar radicales OH· de compuestos solubles en agua, presumiblemente péptidos.*

Se realizaron ensayos de actividad antioxidante en cultivos de celulares intestinales (Caco-2 TC7), evaluando los niveles de citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles (acuosas y etanólicas) y el % de inhibición de ROS intracelulares.

- ✓ Como sucedió para **H** y **A**, todas las fracciones presentaron menores citotoxicidades que las correspondientes diluciones de los reactivos de digestión, indicando un efecto protector de los compuestos derivados de la DGIS de **HF**.
- ✓ Todas las fracciones bioaccesibles mostraron capacidad para disminuir el contenido de ROS intracelulares, con un efecto dependiente de la concentración.
- ✓ La potencia para inhibir las ROS intracelulares de **HF2D_{sb}** fue superior (IC₅₀ (mg proteína/ml) entre 5 y 6 veces menor) a la de **HD_{sb}**.
- ✓ En las fracciones etanólicas también se evidenció una mejora (IC₅₀ (µg AGE/ml) casi 2 veces menor) en la potencia de **HF2D_{esb}** frente a **HD_{esb}**, aunque menor a la registrada en la fracción acuosa bioaccesible.

*La fermentación previa de **H** tuvo un efecto positivo sobre la prevención del estrés oxidativo celular, tanto en las fracciones de compuestos solubles en agua (principalmente péptidos aunque probablemente haya CF) y en menor medida en la fracción de compuestos solubles en etanol/agua (principalmente CF pero también habría péptidos y aminoácidos). Por lo tanto, existió una cierta correlación entre los efectos en ensayos acelulares y celulares, aunque esta no es completa. Esto es entendible teniendo en cuenta los múltiples mecanismos de acción antioxidante posibles a nivel celular, como se discutió en el capítulo I.*

Finalmente se evaluó el transporte intestinal de compuestos presentes en las fracciones bioaccesibles acuosas en dirección apical-basolateral simulando el epitelio intestinal mediante una monocapa de células Caco-2 TC7.

- ✓ Como sucedió para las fracciones de **HD_{sb}** y **AD_{sb}**, para **HF2D_{sb}** también se detectó que en la fracción apical disminuyeron o no se detectaron componentes de la fracción completa, lo que, como se describió previamente, sugiere una degradación parcial en la cámara apical al estar en contacto con las células intestinales, posiblemente por la acción de las peptidasas del borde en cepillo y/o dentro de la célula por peptidasas citoplasmáticas.
- ✓ Pudo inferirse que hubo pasaje de algunos compuestos provenientes de **HF2D_{sb}** presumiblemente de naturaleza proteica (aunque no pueden descartarse compuestos fenólicos) y sin modificaciones durante el pasaje dados los similares t_R en ambas cámaras.

En la **Figura II.17** se presenta un esquema con el resumen de los resultados de este Capítulo.

Estos resultados constituyen la primera aproximación al estudio de la fermentación natural de arvejas y muestran que este proceso podría utilizarse como una herramienta económica y de fácil implementación para conseguir un ingrediente de arvejas amarillas con propiedades antioxidantes mejoradas cuya aplicación en la formulación de alimentos debe evaluarse desde un punto de vista tecnológico. Asimismo, resta mucho por hacer en cuanto a un estudio profundo de los aspectos microbiológicos y de la influencia de la flora inicial.

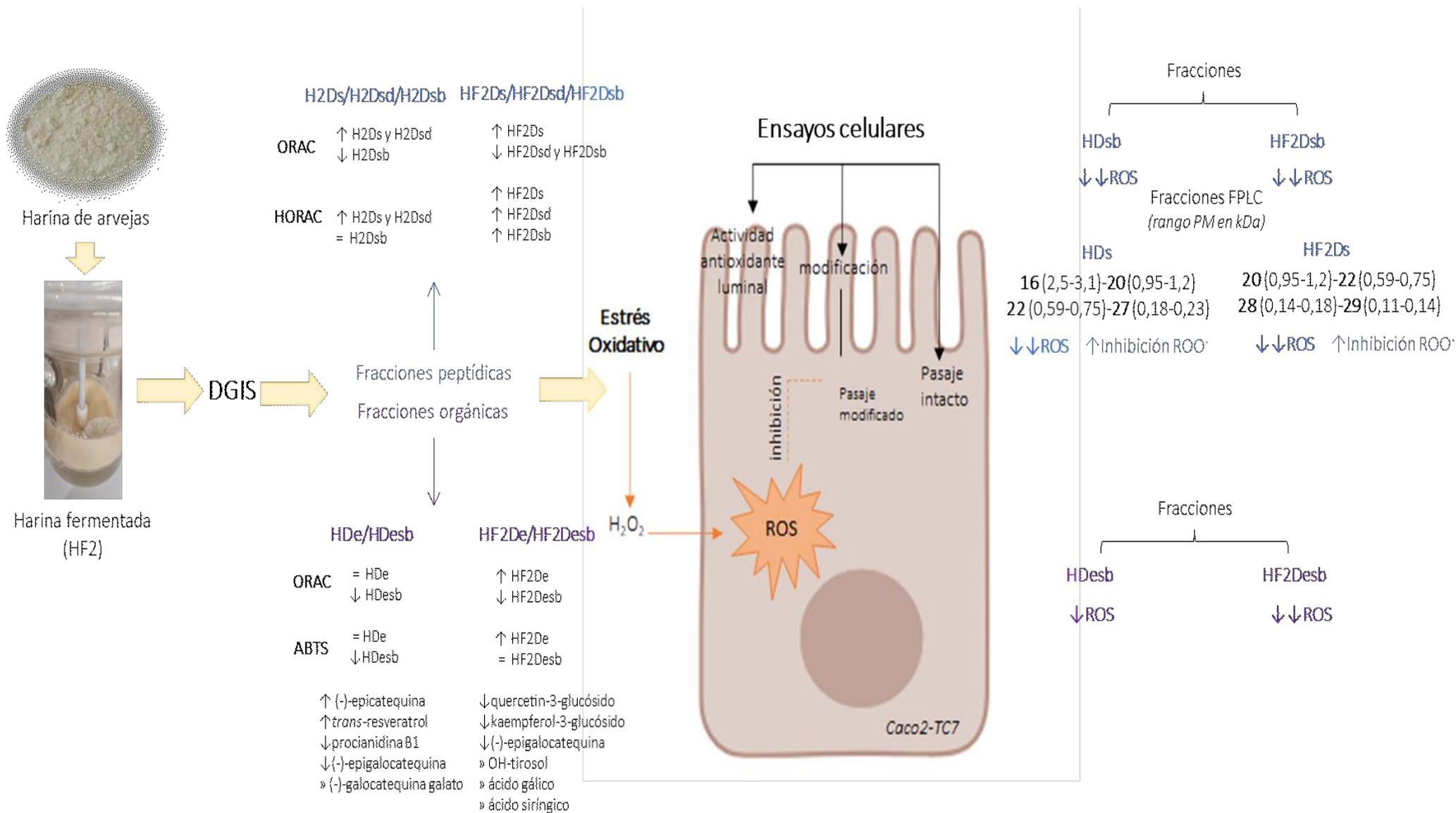


Figura II.17. Resumen de los resultados.

Ensayos *in vitro* acelulares: ↑ indica aumento de actividad; ↓ indica disminución de actividad; = indica que no hubo diferencias significativas. Todo el análisis realizado con respecto a la correspondiente fracción sin digerir.

II.6. Bibliografía

- Adebo J.A., Njobeh P.B., Gbashi S., Oyedeji A.B., Ogundele O.M., Oyeyinka, S.A., Adebo O.A. (2022). Fermentation of cereals and legumes: Impact on nutritional constituents and nutrient bioavailability. *Fermentation* 8, 63. [doi:/10.3390/fermentation8020063](https://doi.org/10.3390/fermentation8020063).
- Adebo O. A., Njobeh P. B., Adebisi J. A, Gbashi S., Phoku J. Z. & Kayitesi E. (2017). Fermented pulse-based food products in developing nations as functional foods and ingredients, M. C. Hueda, Ed., IntechOpen, Rijeka, p. Capítulo 5.
- Adler – Nissen, J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 27, 1256-1262
- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., Berg, G. (2023). From seed to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, 31 (4), 346-355. doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009.
- Allen, W. F. (1931). A micro-Kjeldahl method for nitrogen determination. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 8 (10): 391-397.
- AOAC. (1990). In W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (15th ed.). Arlington, U.S.A.: Association of Official Analytical Chemists.
- Akhtaruzzaman, N.H.M. Rubel Mozumder, Ripa Jamal, Atikur Rahman and Tanjina Rahman. (2012). Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agricultural Science Research Journals* Vol. 2(8), pp. 434-440
- Artursson, P. (1990). Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Science*, 79(6), 45–54.
- Barkholt V, Jorgensen PB, Sorensen D, Bahrenscheer J, Haikara A, Lemola E, Laitila A, Frokiaer H (1998). Protein modification by fermentation: effect of fermentation on the potential allergenicity of pea. *Allergy*, 53, 106-108.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L, Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131, 4, 1466-1472.
- Boukid, F., Rosell, C. M., Castellari, M. (2021). Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re) formulate innovative foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 729-742.

- Boye, J. I., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414–431.
- Byanju, B., Hojilla-Evangelista, M. P., Lamsal, B. P. (2021). Fermentation performance and nutritional assessment of physically processed lentil and green pea flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 5792-5806.
- Carnevali P, Ciati R, Leporati A y Paese M. (2007). Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology*, 24(2), 150–154.
- Chandel, A., Mann, R., Kaur, J., Norton, S., Edwards, J., Spangenberg, G., Sawbridge, T. (2021). Implications of seed vault storage strategies for conservation of seed bacterial microbiomes. *Frontiers in Microbiology* 12. doi:10.3389/fmicb.2021.784796
- Chartrel, V., Dugat-Bony, E., Sarthou, A. S., Huchette, S., Bonnarme, P., Irlinger, F. (2021). The microbial community associated with pea seeds (*Pisum sativum*) of different geographical origins. *Plant and Soil*, 462. 1-23. doi:10.1007/s11104-021-04856-6.
- Corsetti, A. (2013). Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications. In: Gobbetti, M., Gänzle, M. (eds) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4614-5425-0_4.
- Curiel, J. A., Coda, R., Centomani, I., Summo, C., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2015). Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 51-61.
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernandez, T., Estrella, I., & Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 297-304.
- Edwards, A. D., & Slater, N. K. (2009). Protection of live bacteria from bile acid toxicity using bile acid adsorbing resins. *Vaccine*, 27(29), 3897-3903.
- Gan, R. Y., Li, H. B., Gunaratne, A., Sui, Z. Q., Corke, H. (2017). Effects of fermented edible seeds and their products on human health: Bioactive components and bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 489-531.
- Gan, R. Y., Shah, N. P., Wang, M. F., Lui, W. Y., Corke, H. (2016). Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4), 875-884.
- Gänzle M. G., Loponen J., Gobbetti M. (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology* 19, 513-521.

- García Fillería, S., Nardo, A. E., Paulino, M., Tironi, V. (2021). Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100053. doi:10.1016/j.fochms.2021.100053.
- Gaur, G., Gänzle, M. (2023). Conversion of (poly)phenolic compounds in food fermentations by lactic acid bacteria: Novel insights into metabolic pathways and functional metabolites. *Current Research in Food Science*, 6, 100448.
- Gobbetti, M, De Angelis, M, Di Cagno, R, Calasso, M, Archetti, G, Rizzello, C G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 103-113.
- Gueguen, J., Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 42, 209–224.
- Kaczmarska, K., Chandra-Hioe, M., Zabarás, D., Frank, D., Arcot, J. (2017). Effect of germination and fermentation on carbohydrate composition of Australian sweet lupin and soybean seeds and flours. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 65 (46), 10064–10073.
- Karlsson, J., Artursson, P. (1991). A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *International Journal of Pharmaceutics*, 71(1–2), 55–64.
- Ketnawa, S., Ogawa, Y. (2019). Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions. *Journal of Functional Foods*, 52, 640-647.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food reviews international*, 34(2), 126-147.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265–275
- Lu, B.-Y., Quillien, L., Popineau, Y. (2000). Foaming and emulsifying properties of pea albumin fractions and partial characterization of surface-active components. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 80, 1964–1972.
- Ma, Z., Boye, J. I., Hu, X. (2017). In vitro digestibility, protein composition and techno-functional properties of Saskatchewan grown yellow field peas (*Pisum sativum* L.) as affected by processing. *Food Research International*, 92, 64-78.

- Martín-Cabrejas, M. A., Ariza, N., Esteban, R., Mollá, E., Waldron, K., López-Andréu, F. J. (2003). Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1254-1259.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food and Function* 5 (6), 1113-1124.
- Oh, J.H., Lee, C.Y., Lee, Y.E., Yoo, S.H., Chung, J.-O., Rha, C.S., Park, M.Y., Hong, Y.D., Shim, S.M. (2021). Profiling of *in vitro* bioaccessibility and intestinal uptake of flavonoids after consumption of commonly available green tea types. *Molecules*, 26, 1518. doi.org/10.3390/molecules26061518
- Onwurafor, E. U., Onweluzo, J. C., & Ezeoke, A. M. (2014). Effect of fermentation methods on chemical and microbial properties of mung bean (*Vigna radiata*) flour. *Nigerian Food Journal*, 32(1), 89-96.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Orsini Delgado, M., Galleano, M., Añón, M., Tironi, V. (2015). Amaranth peptides from gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against physiological reactive species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 27–34.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2772-2777.
- Ou, B., Hampsch-Woodil, M., Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
- Ramakrishna, V., Rao, P. R. (2005). Purification of acidic protease from the cotyledons of germinating Indian bean (*Dolichos lablab* L. var *lignosus*) seeds. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 703-707. doi.org/10.5897/AJB2005.000-3130
- Rizzello, C. G., Coda, R., Wang, Y., Verni, M., Kajala, I., Katina, K., Laitila, A. (2019). Characterization of indigenous *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc kimchii*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* for faba bean bioprocessing. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 24-34.

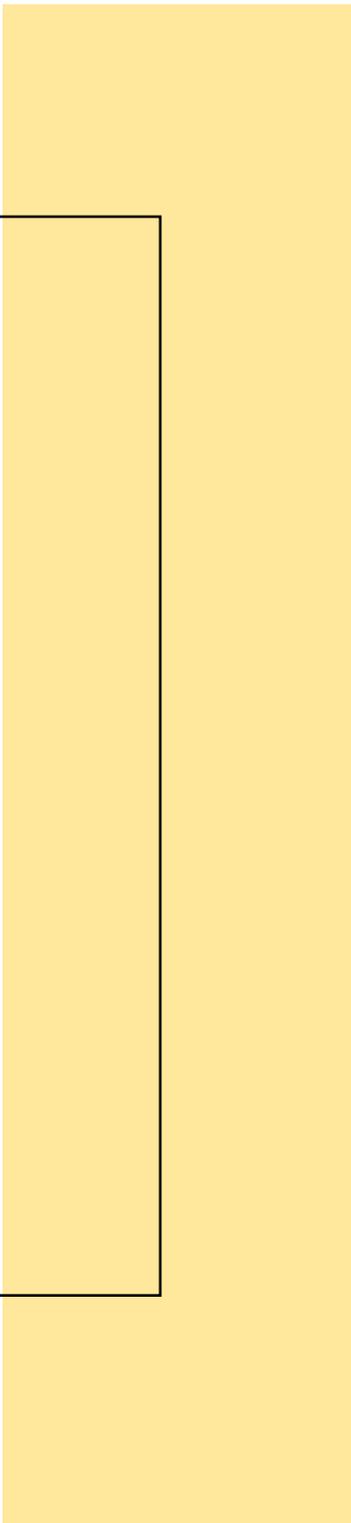
- Rizzello C. G., Lorusso A., Montemurro M., Gobbetti M. (2016). Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 1-13.
- Rodríguez, M., Tironi, V. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International* 113410, doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113410.
- Rodríguez, M., Tironi, V. A. (2020). Polyphenols in amaranth (*A. mantegazzianus*) flour and protein isolate: Interaction with other components and effect of the gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 137, 109524.
- Sáez, G. D., Saavedra, L., Hebert, E. M., Zárate, G. (2018). Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. *LWT-Food Science & Technology*, 93, 249-256.
- Sáez, G.D., Hébert, E.M., Saavedra, L., Zárate, G. (2017). Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (*Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus*) in northwestern Argentina. *Food Research International*, 102, 605-615.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16–22
- Singleton, V., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Southgate, D.A.T. (1976). Determination of food carbohydrates. London: Applied Science Publishers, Book
- Stanisavljević N. S.; Vukotić G. N.; Pastor F. T.; Sužnjević D.; Jovanović Z. S.; Strahinić I. D.; Fira D. A.; Radović S. S. Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Archives Biological Science Belgrade* 2015, 67(3), 1033-1042, 201
- Tabbaco, A., Meiattini, F., Moda, E., Tarli, P. (1979). Simplified enzymic/-colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical Chemistry*, 25, 336–337
- Vaz Patto, M, Amarowicz, R, Aryee, A, Boye, J, Chung, H-J, Martín-Cabrejas, M, Domoney, C. (2015). Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34:1-3, 105-143
- Vázquez-sánchez, K., Martínez-saez, N., Rebollo-hernanz, M., Dolores, M., Gaytán-martínez, M., Campos-vega, R. (2018). *In vitro* health promoting properties of antioxidant dietary

fiber extracted from spent coffee (*Coffee arabica* L.) grounds. *Food Chemistry*, 261, 253–259. doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.064.

Venegas-Ortega M. G., Flores-Gallegos A. C., Martinez-Hernandez J. L., Aguilar C. N., Nevarez-Moorillon G. V. (2019). Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1039-1051.

Verni, M.; Verardo, V.; Rizzello, C. G. (2019). How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *Foods*, 8(9), 362.

Xiao, Y., Zhang, Q., Miao, J., Rui, X., Li, T., Dong, M. (2015). Antioxidant activity and DNA damage protection of mung beans processed by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 216-225.



CAPÍTULO III.
BEBIDAS
VEGETALES

INTRODUCCIÓN

III.1.INTRODUCCIÓN

A pesar de los beneficios nutritivos y las recomendaciones generalizadas para el consumo de leche, en el primer cuatrimestre de 2024, su consumo tuvo una caída del 17,6% con respecto al mismo período de 2023 según datos del Observatorio de la Cadena Láctea Argentina (OCLA). Esta caída, que es especialmente evidente en los países occidentales, ha estado acompañada por el rápido crecimiento de nuevas bebidas a base de plantas que se introducen constantemente en el mercado, anunciadas como un sustituto de la leche y colocadas en los estantes cercanos a ella. Al mismo tiempo, los debates sobre la sostenibilidad y la huella de carbono han generado críticas sobre el impacto ambiental de los productos animales, lo que ha impulsado un cambio hacia una dieta más basada en plantas (OCLA, 2022). Según McClements y Grossmann (2021), los análogos vegetales de leche son actualmente los productos alimenticios de origen vegetal más consumidos, contribuyendo con más del 40 % de las ventas del mercado en este sector en 2019 en EE.UU. En el caso de Argentina, para mediados de 2021 se consumían 3,5 millones de litros de bebidas vegetales por año y se espera que para 2026 este número se pueda cuadruplicar (<https://www.iprofesional.com/negocios/377273-el-gran-peligro-que-enfrenta-el-negocio-de-las-leches-vegetales>).

Las razones para el surgimiento en el mercado de productos alternativos de origen vegetal a la leche podrían atribuirse a varias razones, incluida la intolerancia a la lactosa, alergias a la proteína de la leche, razones culturales o selección de dietas (vegetarismo, veganismo, dieta flexitariana, Paleo, entre otras). Se estima que el 9 % de la población argentina es vegana y vegetariana; aproximadamente 4 millones de personas. Con respecto a los antecedentes de las bebidas vegetales, la más popular ha sido la de soja, de origen chino (2800 AC); en el siglo XVIII se introdujo en Europa y a principios del siglo XIX fue llevada a América. En Argentina, la bebida de soja también es de las más populares junto con la leche de almendras, y una pequeña proporción de la población consume leche de coco y las demás variantes (Contreras et al., 2020).

Las bebidas de origen vegetal son medios complejos que contienen pequeñas partículas (p. ej., gotitas de grasa, partículas de proteínas o fragmentos de células vegetales) dispersos en un medio acuoso. Las características de estas partículas coloidales (es decir, su composición,

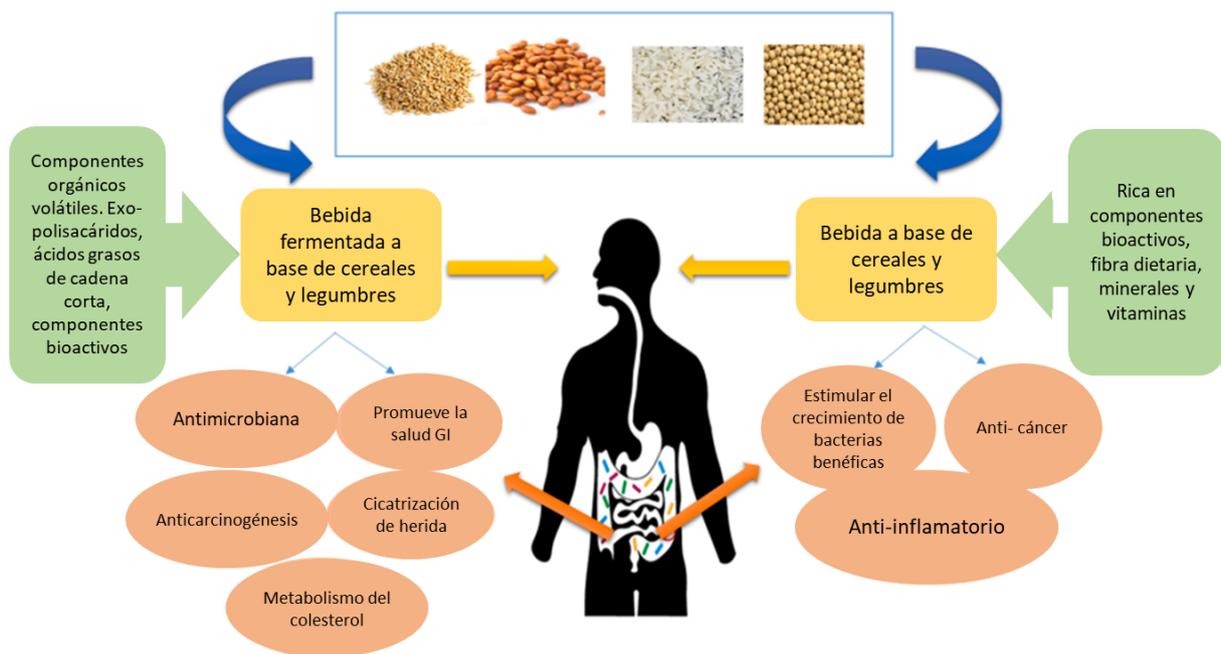
estructura, tamaño, propiedades interfaciales e interacciones) determinan en última instancia las propiedades físicas, funcionales, sensoriales y nutricionales de los sustitutos de la leche de origen vegetal. Ellos determinan la apariencia, textura, sabor y estabilidad de la bebida, así como la biodisponibilidad de los nutrientes individuales. Las características de las partículas contenidas en las bebidas vegetales y su estabilidad suelen estar determinadas por el tipo de proceso utilizado en su tecnología de producción y las condiciones de almacenamiento (Cichońska y Ziarno, 2021).

Las bebidas a base de legumbres presentan la composición más equilibrada y un contenido proteico similar al de la leche de vaca, pero enfrentan problemas tecnológicos a menudo relacionados con el procesamiento o la conservación. El tratamiento térmico, como la cocción y la pasteurización, puede eliminar los sabores, la barrera más difícil para la aceptación del consumidor. Sin embargo, las altas temperaturas pueden causar una desnaturalización excesiva y una menor solubilidad de las proteínas y pueden aumentar la viscosidad de las bebidas de leguminosas, afectando su estabilidad física. La molienda coloidal, por otro lado, es una intervención tecnológica capaz de aumentar la estabilidad física de la bebida al reducir el tamaño de las partículas dispersas (Lopes et al., 2020).

Las bebidas de origen vegetal a base de cereales o legumbres aportan diversos beneficios para la salud y nutrición básica dados por minerales, aminoácidos, almidón, oligosacáridos y vitaminas (**Esquema III.1**). Estas bebidas tienen un bajo índice glucémico dada la presencia de carbohidratos complejos y fibras dietéticas. También son fuentes ricas en prebióticos, tales como galacto y fructo-oligosacáridos, almidón resistente, y fibra soluble en agua como glucanos y arabinoxilanos (Mishra et al., 2023).

Las fuentes de proteínas vegetales actualmente muy utilizadas en la industria de bebidas son la soja, las arvejas, las almendras, el arroz, el coco, la avena y otras. Las proteínas vegetales presentan desafíos de solubilidad al crear alternativas de bebidas lácteas. En los últimos tiempos, ha aumentado el interés en las proteínas de arvejas como un ingrediente adecuado para reformular alimentos y bebidas, en lugar de proteínas animales o proteínas de soja, y mantener una ingesta proteica adecuada. De todos modos, la industria todavía enfrenta desafíos relacionados con el sabor, la textura, la funcionalidad y las propiedades nutricionales de los ingredientes proteicos de la arveja. Las proteínas de arveja ampliamente utilizadas son mezclas de legumina (11S), vicilina (7S) y convicilina (que contiene las subunidades 11S y 7S),

que comparten similitud estructural con la proteína de suero (George et al., 2024). Investigaciones actuales indican que las interesantes propiedades funcionales de los ingredientes de la proteína de arveja están fuertemente influenciadas por la extracción (por ejemplo, temperatura y solvente) y las condiciones de producción (por ejemplo, temperatura y pH). Sin embargo, todavía falta conocimiento sobre las complejas interacciones entre las proteínas de arvejas y los demás componentes de la matriz alimentaria (principalmente almidón, fibra y lípidos) (Boukid et al., 2021).



Esquema III.1. Beneficios para la salud de las bebidas a base de vegetales (Mishra et al., 2023)

Trikusuma et al. (2020) desarrollaron bebidas a base de proteínas de arveja, las cuales se prepararon a temperatura ambiente mezclando 0,03% p/p de carragenano (estabilizador) y aislado de proteína de arveja (3% p/p) a agua nanofiltrada, usando un mezclador de mesa de alto cizallamiento hasta lograr hasta que la mezcla fuera homogénea. Posteriormente, se aplicó un tratamiento de ultra-alta temperatura (UHT). En otro estudio, Veber et al. (2021) desarrollaron una bebida de arveja en la cual el procedimiento consistió en una primera etapa de lavado de las semillas, luego una germinación (T: 21 °C, t: 13-15 h, 40 a 90 % humedad), un nuevo lavado, una posterior molienda y homogeneización, filtración y finalmente, una pasteurización a 80-95 °C durante 5-10 min.

Diversos estudios (Deziderio et al., 2023; Fernandes et al., 2021) demostraron que ciertos ingredientes vegetales fermentados tienen un alto potencial en el desarrollo de nuevos productos análogos a los productos lácteos tradicionales para satisfacer una variedad de necesidades dietéticas y preferencias personales. La fermentación de productos de origen vegetal también contribuye a la diversificación y la innovación en la industria alimentaria. La preparación de bebidas vegetales fermentadas presenta un gran potencial en el desarrollo de un nuevo producto funcional. Las bebidas de origen vegetal no presentan el mismo valor nutricional que la leche, pero la fermentación puede enriquecer los aspectos funcionales del producto terminado, y se deben explorar estudios que determinen el perfil de estos alimentos, como las especies microbianas, la viabilidad celular y la supervivencia de microorganismos a lo largo de los periodos de almacenamiento, así como la aceptabilidad del producto en términos sensoriales. Por ejemplo, se comprobó que la fermentación de bebidas a base de avena mejora sus cualidades funcionales al mejorar la actividad de neutralización de radicales y liberar compuestos fenólicos. Se encontró que el ácido gálico, el ácido ferúlico, el ácido cafeico y la catequina aumentaron en un 50 % en las bebidas de avena fermentadas en comparación con las no fermentadas (Chen et al., 2020). También en el caso de bebidas fermentadas con bacterias ácido-lácticas a base de almendras aumentó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Wansutha et al., 2018). La fermentación de soja con bacterias ácido-lácticas puede producir péptidos bioactivos que inhiben las enzimas convertidoras de angiotensina y muestran efectos antihipertensivos (Cruz et al., 2007); la β -glucosidasa producida por dichas bacterias durante la fermentación puede convertir las isoflavonas conjugadas en las bebidas de soja en cetonas glucosídicas más bioactivas.

En nuestro laboratorio se había trabajado previamente en el desarrollo (condiciones de procesamiento y formulación) de un producto bebible a partir de semillas de amaranto, seguro y físicamente estable, con el objetivo de que tuviera un alto contenido de proteínas (similar a la leche de vaca) y bajo contenido de almidón. La separación del almidón se logró mediante un tratamiento alcalino en el que el almidón y otros componentes de la semilla permanecen insolubles mientras que las proteínas se solubilizan (Manassero et al., 2020). Este producto presentó interesantes propiedades antioxidantes (Rodríguez y Tironi, 2023).

En este capítulo se estudió el desarrollo de dos bebidas vegetales (una a base de harina de arveja y la otra a partir de harina de arveja fermentada), evaluándose aspectos de estabilidad

física y microbiológica, composición, bioaccesibilidad y potencial acción antioxidante de sus componentes.

OBJETIVOS

III.2.Objetivos

El objetivo general del presente capítulo fue evaluar dos formulaciones de productos bebibles –uno preparado a base de proteínas de arveja y otro preparado a base de harina de arveja fermentada- como potenciales alimentos funcionales con acción preventiva del estrés oxidativo.

A fin de lograr este objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- I. Optimizar la preparación de las bebidas
- II. Someter los productos bebibles preparados a partir de harina y harina fermentada de arvejas a una simulación del proceso de digestión gastrointestinal.
- III. Caracterizar los componentes potencialmente antioxidantes (péptidos/polipéptidos y compuestos fenólicos).
- IV. Realizar un *screening* de las propiedades antioxidantes de los componentes potencialmente activos (péptidos/polipéptidos y compuestos fenólicos) a través de metodologías *in vitro* acelular y celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

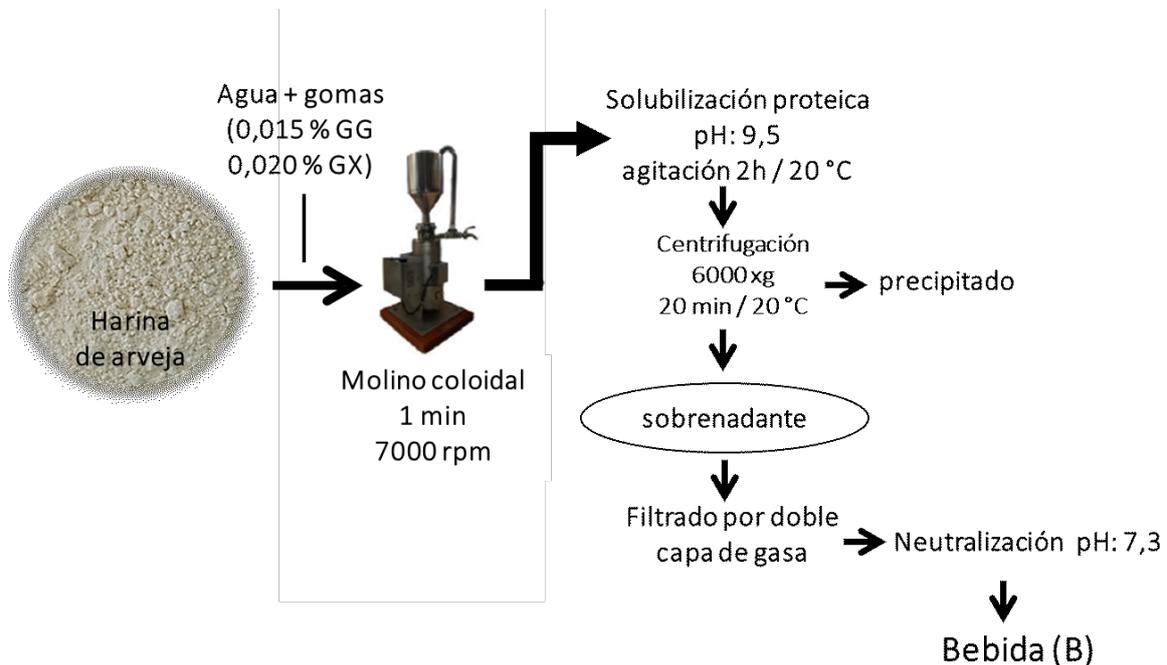


III.3. Materiales y Métodos

Se utilizó harina de arveja preparada a partir de la molienda en molino Udy (malla de 0,5 mm) de semillas de *Pisum sativum* var. Yams cosechadas en la provincia de Buenos Aires, (Argentina) en el año 2023.

III.3.1 Preparación de bebida vegetal a base de proteínas de harina de arvejas amarillas (B).

Se preparó una bebida a base de la harina (B) de acuerdo con el proceso establecido para amaranto por Manassero et al. (2020) con algunas modificaciones (Esquema III.2).



Esquema III.2. Preparación de bebida vegetal a base de harina de arvejas. **GG:** goma gelano, **GX:** goma xantano.

En la formulación de **B** se utilizaron hidrocoloides estabilizantes; Manassero et al. (2020) reportaron la disminución de la sensibilidad de las proteínas al tratamiento térmico en respuesta a la adición de gomas. Con este fin se prepararon dispersiones de goma gelano y goma xantano en caliente (90 °C), luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se agregaron al agua (concentraciones finales: 0,015 y 0,020 g/100 g de dispersión para gelano y xantano, respectivamente) colocada en un molino coloidal (modelo AD 35-R, ColMil, Argentina). Se agregó harina de arveja **H** en la proporción 1+6 p/p; esta relación permitió una concentración de proteína relativamente alta en la suspensión mientras que la viscosidad de la dispersión fue compatible con la molienda. Se molió durante 1 min a máxima velocidad (7000

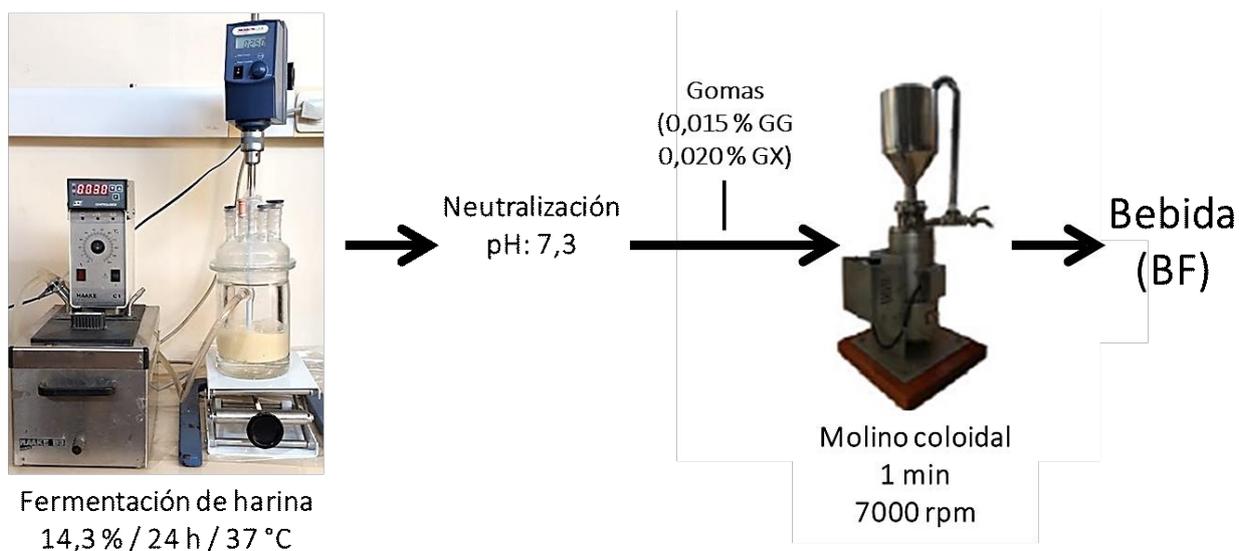
rpm) a 20 °C. El pH se ajustó a 9,5 con NaOH 10 M y se mantuvo bajo agitación magnética durante 2 h a 25 °C. Luego, la muestra se centrifugó a 6000×g durante 20 min a 20 °C (Beckman Coulter Avanti J-25 Brea, California, EE.UU.). El sobrenadante se filtró a través de doble capa de gasa. Se recogió el filtrado y se ajustó el pH a 7,30 con HCl 5 M.

A fin de lograr la pasteurización de **B**, se realizó un tratamiento térmico en baño de agua (Vicking modelo Masson 1002, Buenos Aires, Argentina) hasta que la temperatura en el centro de la muestra alcanzó los 63 °C, y se mantuvo a esos valores durante 30 min.

III.3.2 Preparación de bebida vegetal a base de harina de arvejas fermentada (BF).

La fermentación fue realizada con una dispersión de **H** en agua destilada en una relación de 1/7 y se llevó a cabo a 37 °C por 24 h en un bio-reactor (capacidad: 500 ml) termostatzado con camisa de vidrio conectada a un baño de agua (LAUDA RMT6) que permitió la recirculación de agua termostatzada (37 °C). La agitación se logró empleando un agitador vertical Dlab OS20-PRO20L (250 rpm).

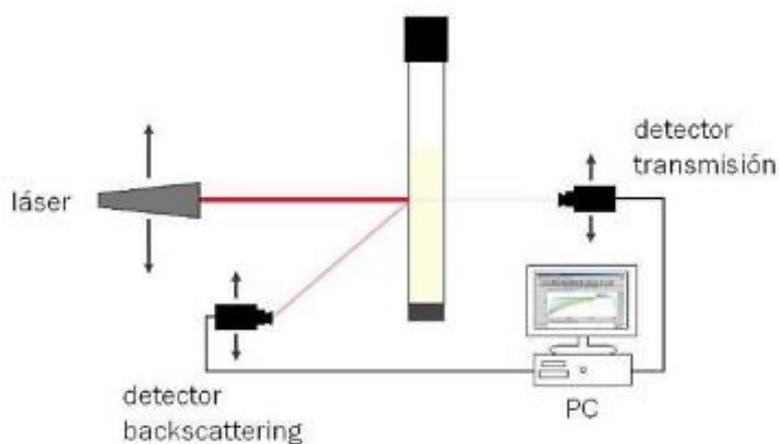
Finalizada la fermentación se neutralizó hasta pH: 7,3 durante 20 min, luego se adicionaron las gomas (0,015 % GG y 0,020 % GX) agitándose durante 30 min y, por último, se homogeneizó en el molino coloidal durante 1 min a 7000 rpm obteniéndose la bebida vegetal a base de harina fermentada (**BF**) (**Esquema III.3**). De la misma manera que para **B**, se realizó una pasteurización a 63 °C durante 30 min.



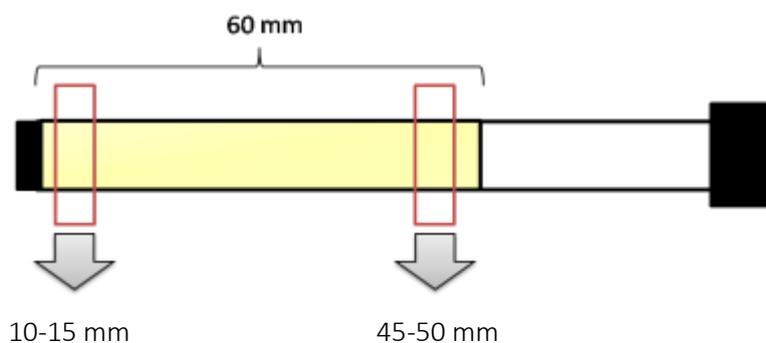
Esquema III.3. Preparación de bebida vegetal a base de harina de arvejas fermentada. **GG:** goma gelano, **GX:** goma xantano

III.3.3 Estabilidad física de las bebidas – Quick Scan

La estabilidad física de las bebidas se determinó utilizando un analizador óptico vertical de barrido modelo QuickScan (Beckman-Coulter inc., Estados Unidos) según Cabezas et al. (2012). La medida se basa en la aplicación de una fuente lumínica laser en el infrarrojo cercano (850 nm) a la celda de medida que contiene la dispersión. Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° desde la luz incidente, sensor de transmisión), y la dispersada por la muestra (45° desde la radiación incidente, detector de backscattering). Tanto la fuente de luz como los dos detectores se mueven a lo largo de la celda de medida periódicamente para analizar las muestras cada 40 μm y poder representar el estado de las mismas en toda su extensión (**Esquema III.4**). Las curvas obtenidas proveen el flujo de luz transmitida o dispersada respecto a un estándar (suspensión de esferas monodispersas y aceite de silicona) como función de la longitud de la muestra.



Esquema III.4. Esquema simplificado del sistema óptico y de adquisición de datos del analizador óptico vertical.



Esquema III.5. Esquema simplificado la celda de medida y las zonas de análisis.

Para la determinación, se colocaron 7 ml de las bebidas en la celda de medida y se procedió a ubicar la celda en el equipo. El backscattering (BS) de la luz monocromática ($\lambda = 850 \text{ nm}$) generado por las bebidas se registró, dependiendo el ensayo, cada 10 min durante 30 min o cada 1 min durante 40 min en función de la altura del tubo de muestra. Se obtuvieron cinéticas registrando la variación del % BS en función del tiempo en la parte inferior del tubo (10-15 mm desde la base) y en la parte superior (45-50 mm desde la base) del mismo (**Esquema III.5**).

Se analizaron muestras de las bebidas sin pasteurizar, recién pasteurizadas y pasteurizadas y almacenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a las 24 h y luego, cada 4 o 7 días. Las medidas a los 7 días se realizaron sobre muestras en envases que habían sido abiertos luego de la pasteurización y sobre envases cerrados.

III.3.4 Evaluación del comportamiento de flujo y determinación de la viscosidad de las bebidas.

Para la evaluación del comportamiento de flujo y la viscosidad se utilizó un reómetro Discovery HR20, TA Instruments (New Castle, EE. UU.), en su modo de viscosímetro rotacional empleando la geometría plato-plato lisos. El ensayo se llevó a cabo a $25,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Termohaake DC50) y la secuencia de rotación empleada fue: ascenso del gradiente de velocidad de 0 a 500 s^{-1} en 3 min, mantenimiento del gradiente de velocidad en 500 s^{-1} durante 1 min y descenso del gradiente de velocidad de 500 a 0 s^{-1} en 2 min. Se registró el esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de deformación y se determinó la viscosidad aparente (η_{ap}) a un gradiente de velocidad de 500 s^{-1} . Las mediciones se realizaron por triplicado.

III.3.5 Análisis microbiológico de las bebidas.

Los microorganismos evaluados fueron mesófilos totales (cultivo en medio Agar Nutritivo), bacterias del tipo ácido-lácticas (medio MRS con factor de selección anaerobiosis) y hongos y levaduras (medio YGC). El análisis se llevó a cabo siguiendo los protocolos detallados en el Capítulo II, sección II.3.2. Las muestras analizadas fueron **B** y **BF** sin pasteurizar, y pasteurizadas a distintos tiempos de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

III.3.6 Simulación de la digestión gastrointestinal (DGIS).

Se ensayó la DGIS de **B** y **BF** mediante el método internacionalmente estandarizado (Minekus et al., 2014) realizado en bioreactor según el protocolo 2 descrito en la sección

1.3.2.4 del Capítulo I, obteniéndose los digeridos **BD** y **BFD**. Se prepararon también los controles correspondientes: Blanco de muestra **BM** (**B** o **BF** + fluidos de digestión simulados sin enzimas), blanco de reactivos **BR** (fluidos de digestión simulados +enzimas+ sales biliares, sin muestra).

III.3.6.1. Grado de proteólisis.

Se determinó el grado de hidrólisis proteica de los digeridos por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Adler- Nissen, 1979) según lo detallado en el *Capítulo I*, sección *1.3.2.2*.

III.3.7. Composición centesimal de las bebidas y sus digeridos.

Con el fin de obtener la composición centesimal del **B** y **BF** se determinaron por duplicado el contenido de humedad, cenizas, grasas y proteínas (sobre muestras liofilizadas) utilizando los procedimientos descritos en la sección *1.3.1.3*. del *Capítulo I*. El factor de conversión de N a proteína usado fue de 5,6 g proteína/g nitrógeno.

III.3.8. Caracterización de la fracción proteica.

III.3.8.1. Electroforesis. Ver sección *1.3.3.3 (Capítulo I)*.

III.3.8.2. Obtención de fracciones solubles y determinación de la concentración de proteína soluble. Se prepararon las siguientes fracciones acuosas solubles:

1) *solubles resuspendidos (s)*: se resuspendieron las muestras liofilizadas (20 mg/ml) en buffer PBS (pH = 7,4) (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1h, 500 rpm), y posteriormente se centrifugó (10000×g, 10 min) conservando el sobrenadante.

2) *solubles directos (fracción digerible, sd)*: el liofilizado se reconstituyó en agua milliQ en la misma proporción en la que se encontraba en la digestión; se homogenizó (Thermomixer Eppendorf 37 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g ,10 min) conservando el sobrenadante.

3) *solubles bioaccesibles*: para reducir el contenido de sales biliares de los solubles directos, se agregó la resina colestiramina (C4650 SIGMA) en una concentración de 10 % p/v, se homogenizó (Thermomixer Eppendorf, 25 °C, 1 h, 500 rpm); luego se centrifugó (10000×g ,20 min) para remover la resina y los ácidos biliares adsorbidos conservando el sobrenadante que se filtró (0,22 µm) (Edwards y Slater, 2009; Vázquez-Sánchez et al., 2018; Rodríguez y Tironi, 2023).

II.3.8.3 Cromatografía líquida de alta presión (FPLC) de filtración en gel. Tal como se describió en la sección 1.3.3.4 (Capítulo I).

III.3.9. Compuestos fenólicos.

Se realizó una extracción asistida por ultrasonido (EAU) de las bebidas liofilizadas en las condiciones de 15 min y 40 % de amplitud, usando un procesador ultrasónico VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, EE. UU.). Los extractos se centrifugaron (Hermle, Labortechnik GmbH, Alemania) durante 5 min, 10.000×g, temperatura ambiente y se conservó el sobrenadante. Todos los extractos obtenidos se evaporaron (30°C, ciclos de 2 h, Concentrator plus/Vacufuge® plus) y se resuspendieron en buffer PBS. Las muestras obtenidas se denominaron **Be, BDe, BFe, BFDe, y BRe.**

III.3.9.1. Determinación de polifenoles totales (CFT). Según el protocolo descrito en *Capítulo I, sección 1.3.4.2.*

III.3.9.2. Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Según el protocolo descrito en la *sección 1.3.4.3 del Capítulo I.*

III.3.10. Actividad antioxidante

III.3.10.1. Ensayos in vitro acelulares.

La actividad antioxidante de las distintas fracciones solubles en buffer PBS pH =7,4 de las bebidas y sus digeridos (distintas diluciones) y de los extractos etanólicos fueron evaluadas mediante el método ORAC y de neutralización de ABTS⁺. La descripción completa de las técnicas puede encontrarse en la *sección 1.3.5.2 del Capítulo I.*

III.3.10.2 Ensayos celulares

III.3.10.2.1. Citotoxicidad de las muestras. Determinación de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH). Según protocolo descrito en *Capítulo I, sección 1.3.5.3.2.*

III.3.10.2.2. Inducción de la oxidación celular y determinación de parámetros relacionados con el estrés oxidativo. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Según protocolo descrito en *Capítulo I, sección 1.3.5.3.3.*

III.3.11. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion con un nivel de confianza (α) de 95 %. Para la evaluación de diferencia de medias se utilizó el test de diferencias significativas (HSD) de Tukey.

RESULTADOS



III.4. Resultados

El objetivo de este estudio fue formular bebidas a base de arvejas amarillas que resultaran estables, nutritivas y potencialmente bioactivas. En función de todos los estudios previos realizados y mostrados en los capítulos anteriores, se realizaron dos formulaciones:

- formulación partiendo de harina de arvejas y enriqueciendo en la fracción proteica (**B**)
- formulación a partir de harina de arvejas fermentada manteniendo todos sus componentes (**BF**)

Para prolongar la vida útil de estas bebidas es crucial elegir un tratamiento térmico capaz de lograr la eliminación de microorganismos patógenos y que a la vez conserve las propiedades organolépticas y nutricionales del producto. Los tratamientos térmicos más comunes son la pasteurización y la esterilización. Estos procedimientos se evaluaron especialmente sobre **BF** ya que presentaba un contenido importante de almidón como se detallará más adelante (PARTE B). Como se observa en la **Imagen III.1.C**, el proceso de esterilización provocó un pardeamiento y gelatinización de la bebida que resultaron no deseables para el producto final buscado. Por otro lado, se ensayó un proceso de pasteurización a 63°C durante 30 min, proceso que no produjo estas consecuencias indeseables (**Imagen III.1.B**) y fue elegido como tratamiento a realizar, teniendo en cuenta las limitaciones de equipamiento para la realización de estos procesos en nuestro laboratorio.

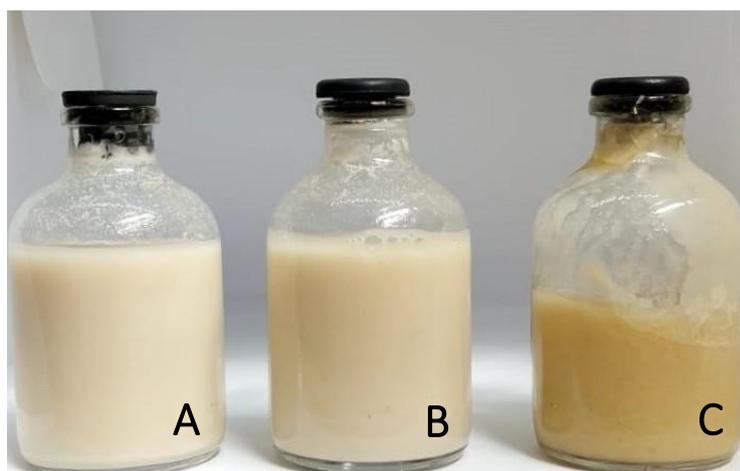


Imagen III.1. Bebida a base de harina fermentada (**BF**); **A.** Sin tratamiento térmico; **B.** Pasteurizada 63 °C, 30 min; **C.** Esterilizada 121°C, 15 min

PARTE A: Bebida a base de harina de arvejas (B)

Con esta formulación, se buscó obtener una bebida basada fundamentalmente en la fracción proteica de arveja. El proceso de obtención de la misma se basó, como se mencionó previamente, en el conocimiento existente sobre la separación de almidón y proteínas desarrollado previamente en nuestro laboratorio para obtener una bebida a partir de semillas de amaranto con un contenido de proteínas similar al de la leche vacuna y bajo contenido de almidón. La temperatura de gelatinización del almidón presente en las semillas de arveja está alrededor de 60 °C dependiendo de la variedad y de las condiciones de procesamiento (Ratnayake et al., 2001). Por lo tanto, evitar la gelatinización cuando hay almidón presente es difícil en la mayoría de los procesos térmicos necesarios para elaborar un alimento seguro. La separación de este carbohidrato se puede realizar mediante diversas técnicas. Algunos autores describieron métodos que implican una solubilización alcalina en la que el almidón y otros componentes de la semilla permanecen insolubles mientras que las proteínas se solubilizan (Pérez et al., 1993). Estos métodos, que además constituyen la primera etapa en el método de obtención de aislados proteicos (*Capítulo 1*), pueden ser ajustados para separar el almidón preservando al mismo tiempo la funcionalidad y propiedades nutricionales de las proteínas, las cuales servirían como base para la formulación de una bebida a base de arveja.

En el presente trabajo, para la preparación de **B** se utilizó un tratamiento alcalino de separación para solubilizar las proteínas, basado en un protocolo previamente optimizado en nuestro laboratorio para preparar bebida a base de amaranto (Manassero et al., 2020; Rodríguez y Tironi, 2023) al cual se le realizaron dos modificaciones:

- Dado el tamaño mucho mayor de los granos de arvejas y para lograr una mejor homogenización, la preparación se realizó a partir de harina en lugar de partir de las semillas enteras como en el caso de amaranto.
- A fin de lograr un producto con una concentración proteica cercana al 3 % se partió de una dispersión con 14,3 % p/p de harina (más diluida que en el caso de amaranto dado el mayor contenido proteico de las arvejas).
- La solubilización proteica se realizó a pH 9,5 (en lugar de 10) según las características de solubilidad de las proteínas de arvejas.

III.4.A.1. Composición centesimal

La composición de macrocomponentes de **B** se determinó sobre la bebida liofilizada y a partir del valor de humedad de este polvo y el de la bebida fluida se calcularon los valores en esta última, tanto en base seca como en base húmeda (**Tabla III.1**).

Tabla III.1. Composición centesimal de **B** liofilizada (base húmeda b.h.) y **B** fluida (b.s. (base seca) y b.h.

Muestra	Lípidos	Proteína	Cenizas	Carbohidratos*	FDT	Humedad
B liof b.h.	0,52 ± 0,01	47,36 ± 0,03	6,3 ± 0,3	35,82	2,8 ± 0,1	7,2 ± 0,2
B fluida b.s.	0,59 ± 0,01	55,02 ± 0,03	7,3 ± 0,3	41,6	3,2 ± 0,1	
B fluida b.h.	0,03	2,73	0,36	1,67	0,16	95,05 ± 0,07

* Calculado por diferencia

FDT: Fibra dietaria total

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

B corresponde a un producto bebible con contenido proteico algo menor al de la leche de vaca y en el rango de la mayoría de las bebidas de origen vegetal desarrolladas, que tienen contenidos proteicos entre 0,3 y 3 % (p/v) (Rodríguez, 2022). Por otro lado, se trata de un producto con menor aporte energético proveniente de lípidos y carbohidratos que el de una leche vacuna. El contenido de grasa e hidratos de carbono fue bajo, lo cual resultó esperable ya que **B** se preparó a partir del sobrenadante de un proceso de extracción acuosa de las proteínas de la harina (que contiene 2 % de lípidos y 55 % de hidratos de carbono, *Capítulo I*), quedando estos macronutrientes retenidos en el sedimento luego de la centrifugación. Además, en este proceso se elimina gran parte de la fibra dietaria. Teniendo en cuenta que el contenido de fibra en la harina de arveja era de 14,6 % p/p (*Capítulo I*) y la proporción de harina en **B** (14,3 % p/p), la fibra total inicial esperada sería de 2,1 g/100 g **B**; por lo tanto, en **B** (**Tabla III.1**) se retuvo menos del 10 % de la fibra de la harina. El contenido de agua fue comparable con los obtenidos para bebidas a base de semillas de amaranto informados por Manassero et al. (2020) y Rodríguez y Tironi (2023), siendo de 90,58 % y 94 % respectivamente. Estos valores están dentro de los informados por Chalupa-Krebzdak et al. (2018) quienes reportaron contenidos de agua entre 88 y 97 % para bebidas de origen vegetal de diferentes fuentes.

La energía que aportan 100 g de **B** es de 17,87 kcal, valor que fue menor al informado por Rodríguez y Tironi (2023) para la bebida a base de amaranto (23,1 kcal) y se encuentra en el rango reportado para 5 variedades de bebidas de almendras (entre 15 y 25 kcal) según Chalupa-

Krebsdak et al. (2018). Si se tiene en cuenta el aporte energético de cada macronutriente sobre el total se observó que solo el 1,5 % se debió al aporte de las grasas siendo el aporte mayoritario repartido entre las proteínas y los hidratos de carbono (61,1 y 37,4 %, respectivamente). Analizando las bebidas vegetales a base de arvejas que se encuentran en el mercado, se encontró la marca Vilay® con un contenido de proteína de 2 g/100 ml, la cual tiene un aporte de 23 kcal cada 100 ml de bebida, de las cuales el 62 % corresponde al aporte de lípidos, el 35 % a proteínas y el 3 % restante se debe al aporte de carbohidratos. Cabe aclarar que a esta bebida se le adicionó aceite hidrogenado de coco y aceite hidrogenado de palmito y es por eso que, el mayor aporte calórico está fuertemente dado por las grasas. En el mercado también se encuentra la bebida a base de proteína de arveja NotMilk de la marca NotCo® con un contenido proteico de 1,6 g/100 g de bebida, con un aporte calórico significativamente mayor (45 kcal/100g) de los cuales el 24 % del total corresponde a hidratos de carbono, el 66 % a lípidos y el 14,2 % restante se debe a las proteínas. En esta bebida también hay un agregado de aceites (de girasol y de coco) lo que aumenta considerablemente el aporte calórico debido a los lípidos. Por lo tanto, en nuestro caso, se trata de una bebida con un mayor contenido proteico y un aporte calórico de lípidos significativamente menor respecto a las opciones comerciales existentes.

III.4.A.2 Viscosidad

Se analizó la viscosidad de **B** utilizando un reómetro en su modo de viscosímetro rotacional empleando la geometría plato-plato lisos. En un primer análisis se comparó la bebida sin pasteurizar frente a la pasteurizada. Las **Figuras III.1 A y B** muestran un comportamiento del tipo no-newtoniano típico de los fluidos pseudo-plásticos, en el que, al aumentar la velocidad de corte, la viscosidad de las muestras disminuyó. Yao et al. (2022) informaron también un comportamiento pseudo-plástico para 6 diferentes bebidas de origen vegetal (soja, maní, adlay, poroto adzuki, avena y trigo sarraceno).

Al comparar los valores de viscosidad aparente de la bebida sin pasteurizar frente a la pasteurizada (**Tabla III.2**), se observó que cuando este parámetro fue calculado a un valor de gradiente de velocidad de deformación de 10 s^{-1} las muestras no tuvieron diferencias significativas entre ellas y los valores se asemejaron a los informados por McClements et al. (2019) para una bebida comercial de coco (47,80 mPa.s). Cuando la viscosidad se calculó a 500

s⁻¹ se encontró un muy pequeño pero significativo aumento ($p < 0,05$) luego de la pasteurización.

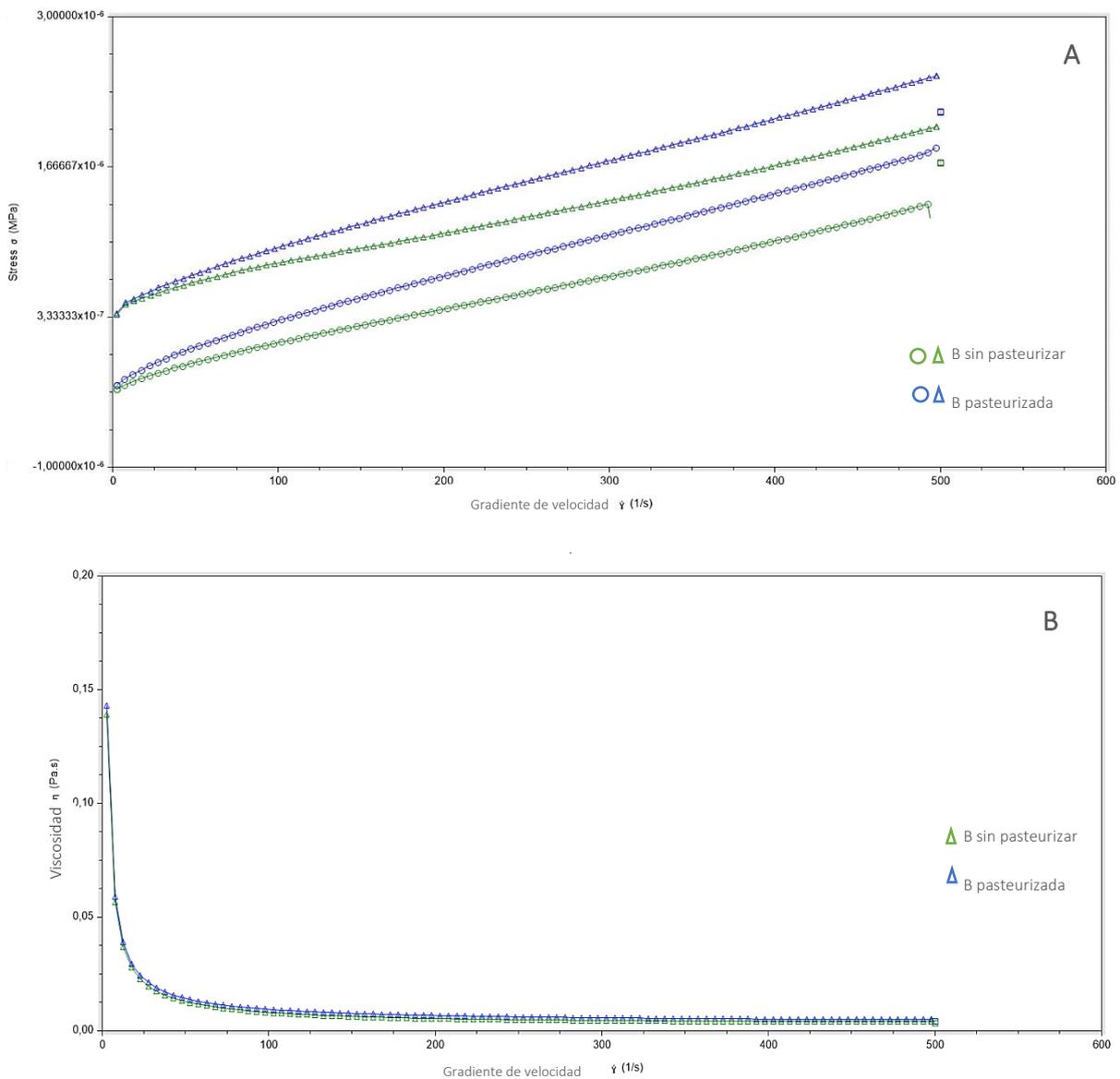


Figura III.1. Ensayos de viscosimetría rotacional de **B** pasteurizada y sin pasteurizar. Las muestras se homogeneizaron manualmente antes de la medida. **A.** Comportamiento de flujo; Δ ida; O vuelta. **B** Evolución de la viscosidad en función del aumento del gradiente de velocidad de deformación.

Tabla III.2. Viscosidad de **B** sin pasteurizar (s/p) y pasteurizada (p)

Muestra	Viscosidad (mPa.s)*	Viscosidad (mPa.s)#
B s/p	47 ± 14 ^a	4,311 ± 0,006 ^a
B p	49 ± 14 ^a	4,381 ± 0,005 ^b

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* calculado a un gradiente de velocidad de 10 s^{-1}

calculado a un gradiente de velocidad de 500 s^{-1}

Las propiedades reológicas de las bebidas de origen vegetal dependen de la cantidad y tamaño de cuerpos oleosos o gotas de grasa, las macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas que contienen, además de cualquier aditivo, incluidos los agentes espesantes. Los biopolímeros hidrófilos (como la goma guar, goma xantano, goma gelano, y otras) se añaden con frecuencia a las bebidas a base de plantas para aumentar la viscosidad de la fase acuosa. Los agentes espesantes pueden cambiar la sensación en boca y la textura de las bebidas y al mismo tiempo aumentar su resistencia a la separación gravitacional, evitando el cremado de cuerpos oleosos o la sedimentación de proteínas o fragmentos celulares. Las dispersiones coloidales que contienen biopolímeros frecuentemente muestran un comportamiento pseudoplástico en el que cuando la velocidad de corte aumenta, la viscosidad de corte disminuye (George et al., 2024), como el aquí observado.

Por otra parte, se analizó el comportamiento reológico de **B** pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura III.2 y Tabla III.3).

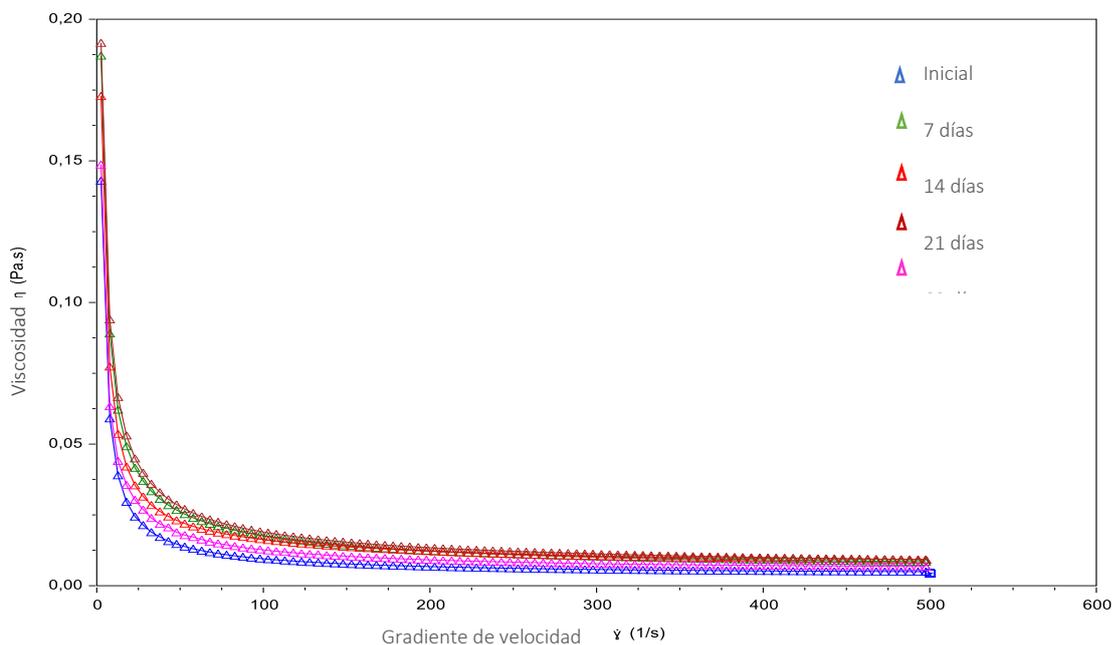


Figura III.2. Análisis de viscosidad de **B** en función del tiempo de almacenamiento. Las muestras fueron homogeneizadas manualmente antes de cada medida.

Como se observa en la **Tabla III.3**, hasta los 14 días de almacenamiento hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) del valor de viscosidad, siendo más pronunciado durante los primeros 7 días. El aumento de viscosidad podría estar relacionado con la formación de partículas de mayor radio de giro, por ejemplo, por formación de agregados entre proteínas o entre proteínas y gomas durante el almacenamiento refrigerado. Cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan en agua, puede producirse incompatibilidad o compatibilidad termodinámica, en la que las interacciones electrostáticas repulsivas y atractivas son las principales fuerzas impulsoras. Las interacciones electrostáticas asociativas pueden producir estructuras como geles, coacervados o complejos, según las condiciones ambientales (pH, relación proteína-polisacárido y contenido total de sólidos) (Cortez-Trejo et al., 2021).

Posteriormente, la viscosidad aparente disminuyó significativamente ($p < 0,05$) pero en pequeña magnitud a los 21 días, disminuyendo en mayor medida luego de 60 días de almacenamiento (**Tabla III.3**). Cabe destacar que cuando se realizó la medida para la bebida conservada durante 60 días, la misma presentaba visualmente una inestabilidad física (*Sección III.4.1.3*) y fue más difícil lograr la homogeneización manual con respecto a las muestras de menores tiempos de almacenamiento.

Tabla III.3. Viscosidad aparente (500 s^{-1}) de **B** pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento

Tiempo (días)	Viscosidad (mPa.s)
inicial	$4,381 \pm 0,005^a$
7	$7,76 \pm 0,04^c$
14	$8,48 \pm 0,09^e$
21	$8,1 \pm 0,1^d$
60	$6,02 \pm 0,06^b$

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

III.4.A.3. Estabilidad física.

La estabilidad de **B** fue estudiada utilizando un analizador óptico vertical de barrido modelo QuickScan, analizando el efecto del tratamiento térmico realizado y del tiempo de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. En todos los casos, al inicio de las determinaciones se realizó una homogeneización manual.

Como puede observarse en la **Imagen III.2**, no se apreciaron diferencias visuales entre la bebida pasteurizada **Bp (B)** y sin pasteurizar **B s/p (A)**. Sin embargo, al analizar la estabilidad

inmediatamente después de su preparación comparando los % BS medidos durante 30 min, se encontraron algunas diferencias entre **Bp** y **B s/p**. El valor inicial del % de BS en la parte inferior del tubo fue menor para **B s/p** (19,5 %) alcanzando un valor final de 20,1 % (aumento aproximado 0,5 %). La bebida pasteurizada (**Bp**) presentó inicialmente un BS mayor (21,16 %) y se mantuvo estable durante toda la medida (variación de 0,05%) (**Figura III.3**).

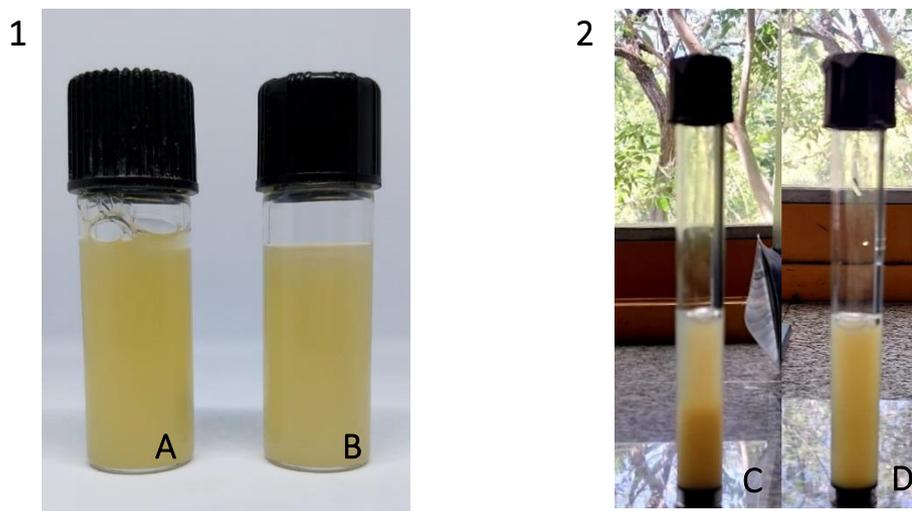


Imagen III.2. Bebida **B**: 1. **A.** sin pasteurizar; **B.** pasteurizada. 2. pasteurizada refrigerada a 4°C luego de 24 h: **C.** inicial; **D.** luego de homogeneización manual.

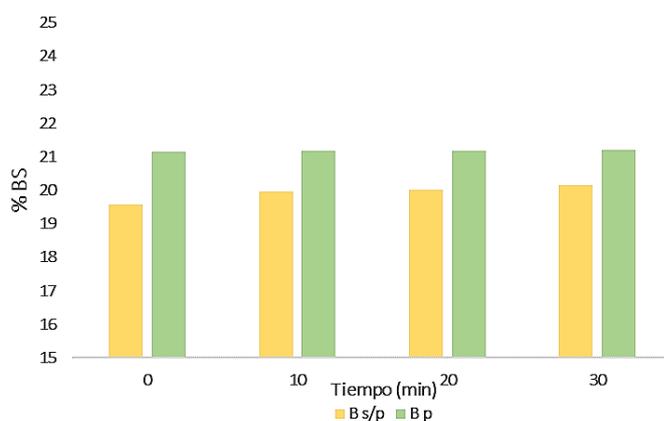


Figura III.3. % BS en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm) de **B**. Cinética (medida cada 10 min, en parte inferior (10-15 mm) del tubo) realizada el día de la preparación a la bebida sin pasteurizar (**B s/p**) y pasteurizada (**Bp**).

Pasadas las 24 h de almacenamiento a 4 °C, se volvió a medir la estabilidad de **Bp** sobre una muestra que ya había sido abierta, homogeneizándose manualmente. En esta oportunidad, se realizaron medidas durante 40 min con el fin de evaluar el comportamiento de **B** una vez que fue abierta y homogeneizada. La bebida resultó homogénea y estable durante ese tiempo

obteniéndose valores de BS entre 20,4-20,7% en ambas zonas de medida, registrando un valor de 20,8-21,1% luego de 91 min de ensayo (Figura III.4). Estos valores indicaron una buena reconstitución manual y buena estabilidad posterior, hasta al menos los 90 min después de la reconstitución.

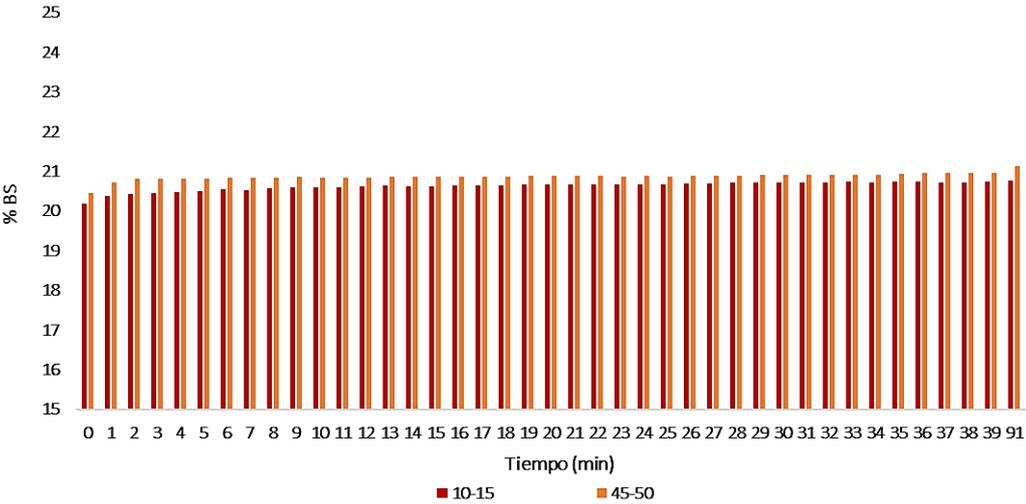


Figura III.4. BS % en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de B. Cinética (cada 1 min durante 40 min y a los 91 min) realizada a las 24 h de la preparación, posterior a una homogeneización manual.

Luego de los 4 días de la elaboración de Bp (conservada a 4 °C), se volvió a medir luego de una homogeneización manual de la muestra que había sido abierta, y se observó que los valores obtenidos también estaban en el rango de medida registrado a las 24 h (20,3 - 20,5 % BS) en ambas zonas de medida del tubo (Figura III.5).

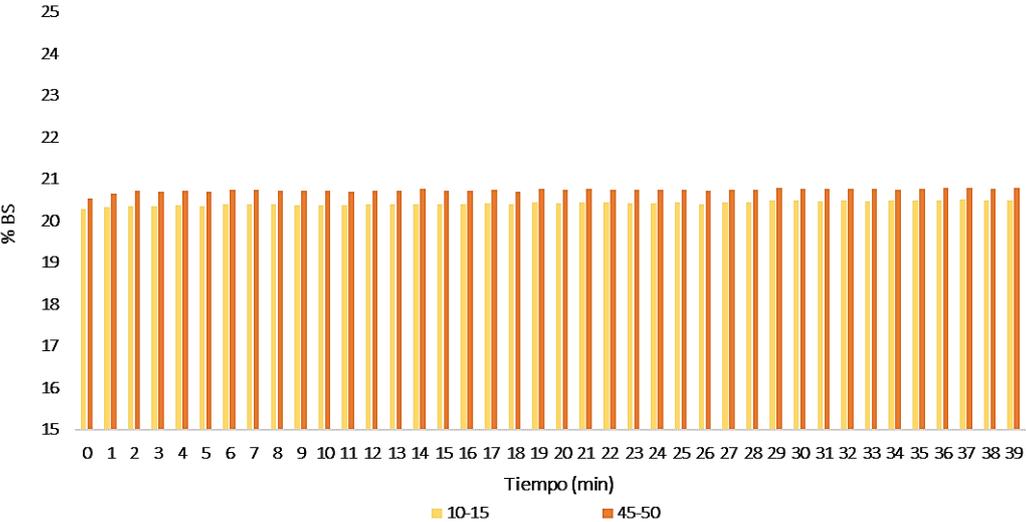


Figura III.5. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Cinética (cada 1 min) realizada luego de 4 días de almacenamiento a 4 °C de Bp.

Este comportamiento sería crucial pensando en una situación realista de consumo donde la bebida podría permanecer en un envase abierto en refrigeración por un tiempo antes de ser completamente consumida, mostrando que mantiene su calidad y apariencia luego de una agitación manual.

Pasados los 7 días, se volvieron a medir los % BS de **Bp** pero en esta oportunidad, las medidas se realizaron sobre:

- una muestra que estaba conservada a 4 °C pero había sido abierta previamente,
- sobre una muestra conservada a 4 °C pero que no había sido abierta.

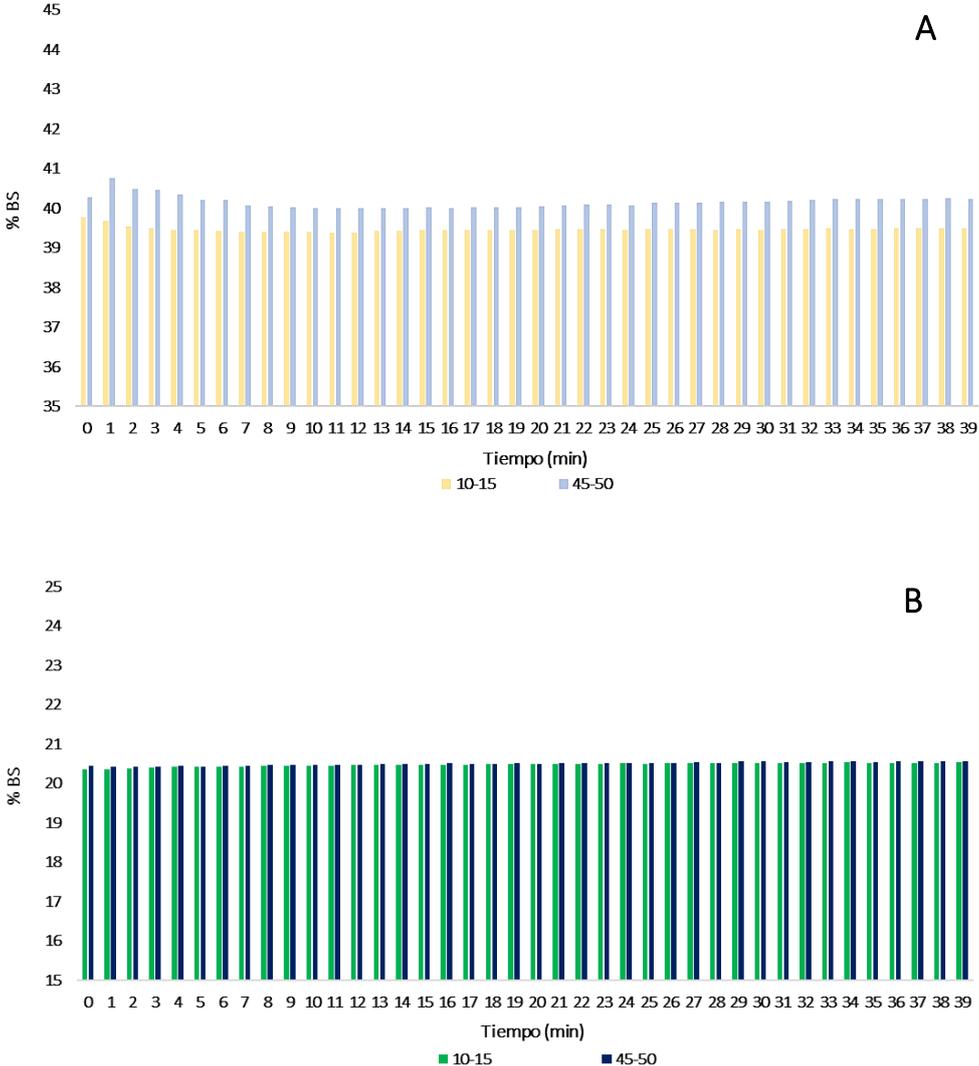


Figura III.6. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Cinética (medida cada 1 min) realizada luego de 7 días de almacenamiento refrigerado de **Bp**. **A.** Medida realizada sobre una muestra abierta; **B.** Medida realizada sobre una muestra cerrada.

Como puede observarse en la **Figura III.6.A**, pasados los 7 días, la bebida que había sido abierta al comienzo del almacenamiento presentó un aumento en el % BS, registrando valores

de alrededor de 40 % en las partes superior e inferior del tubo de medida. Este cambio era visible en el tubo de medida ya que la bebida presentó una separación de fases aún después de la homogeneización manual (**Imagen III.3.A**). Como es sabido, el aumento de BS en una muestra es un indicador de cambios en la distribución, tamaño o concentración de las partículas en suspensión. Este efecto puede ser causado por factores como la agregación de partículas, sedimentación, cambios en las propiedades fisicoquímicas y/o crecimiento microbiano.

Cuando se analizó la bebida pasteurizada que había sido conservada a 4 °C durante 7 días en un envase cerrado, se encontró que la misma mantenía el mismo % de BS que había registrado inicialmente (alrededor de 20%, **Figura III.6.B**) y que visualmente el aspecto también se había conservado (**Imagen III.3.B**).

Estos resultados sugieren una desestabilización por contaminación microbiana luego de los 4 días de almacenamiento cuando el envase estaba abierto.

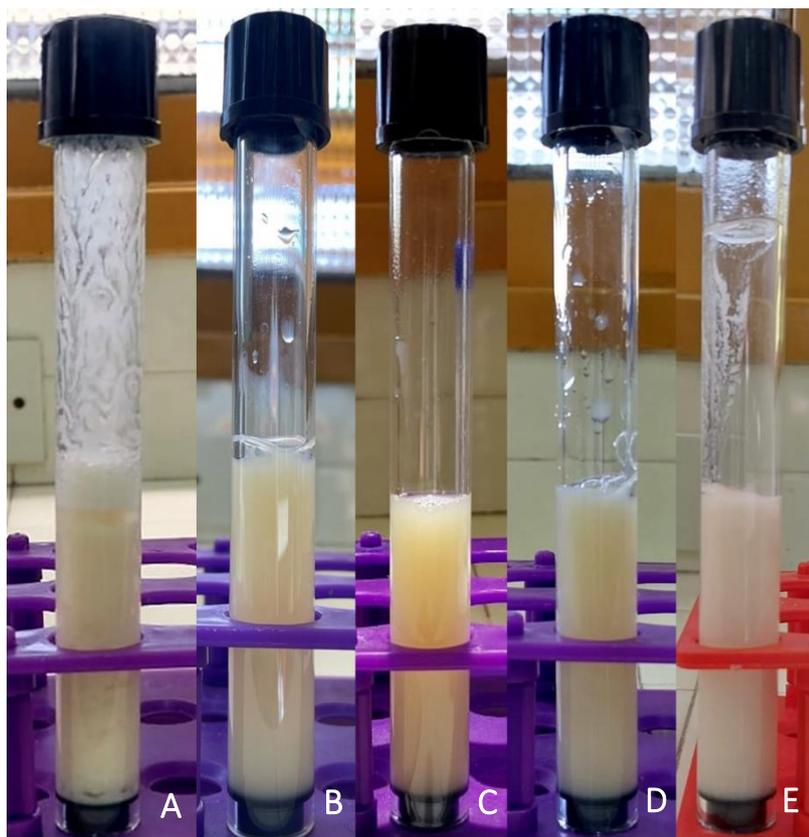


Imagen III.3. B pasteurizada. **A.** Conservada a 4 °C durante 7 días, abierta al inicio del almacenamiento. **B.** Conservada a 4 °C durante 7 días, envase cerrado. **C.** Conservada a 4 °C durante 14 días, envase cerrado. **D.** Conservada a 4 °C durante 21 días, envase cerrado. **E.** Conservada a 4 °C durante 60 días.

Cuando se analizaron las medidas realizadas a los 14 y 21 días de preparada **B** (conservada a 4 °C, en envase cerrado) se observó que los valores obtenidos tanto en la zona baja como en la zona alta del tubo no se modificaron con respecto a los tiempos de almacenamiento anteriores (**Figura III.7 A y B**). Finalmente, se realizó una medida de estabilidad a la bebida luego de pasados 60 días de la preparación y se observó que el % de BS inicial resultó ser mayor a los obtenidos previamente, alrededor de 39 % en ambas zonas del tubo de medida. Además, luego de 20 min de medida comenzó a aumentar el % BS en la zona inferior del tubo, evidenciando un proceso de sedimentación (**Figura III.8**). Como puede observarse en la **Imagen III.3.E**, luego de los 60 días de conservación en heladera, **B** mostró un cambio tanto en la fluidez como en el color pasando de tener un tono amarillento a uno rosado.

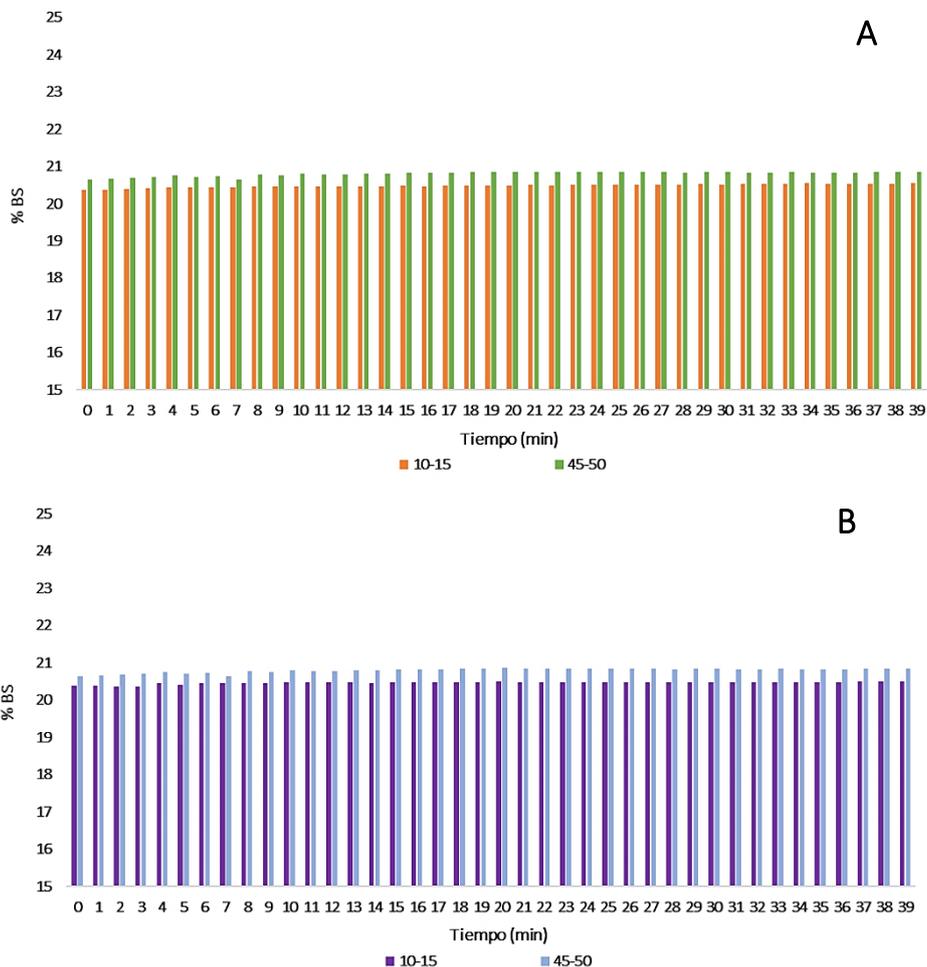


Figura III.7. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Cinética (medida cada 1 min) para **Bp**: **A**. luego de 14 días de almacenamiento a 4 °C (envase cerrado); **B**. luego de 21 días de almacenamiento a 4 °C (envase cerrado).

La bebida a base de la fracción proteica de harina de arveja pasteurizada, si bien presenta sedimentación cuando es almacenada, puede ser reconstituida adecuadamente con una simple agitación manual, asegurando facilidad de uso y mantenimiento de la calidad del producto tras su apertura. Esta bebida mantuvo su estabilidad física durante al menos 21 días de almacenamiento en refrigeración y tras ser reconstituida mediante agitación manual (**Figura III.9**).

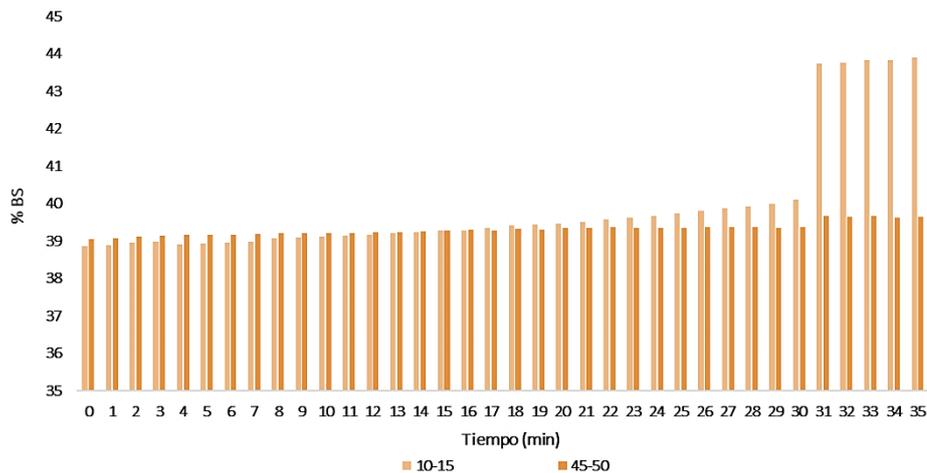


Figura III.8. % BS en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Cinética (medida cada 1 min) de **Bp** luego de 60 días de almacenamiento a 4 °C en recipiente cerrado.

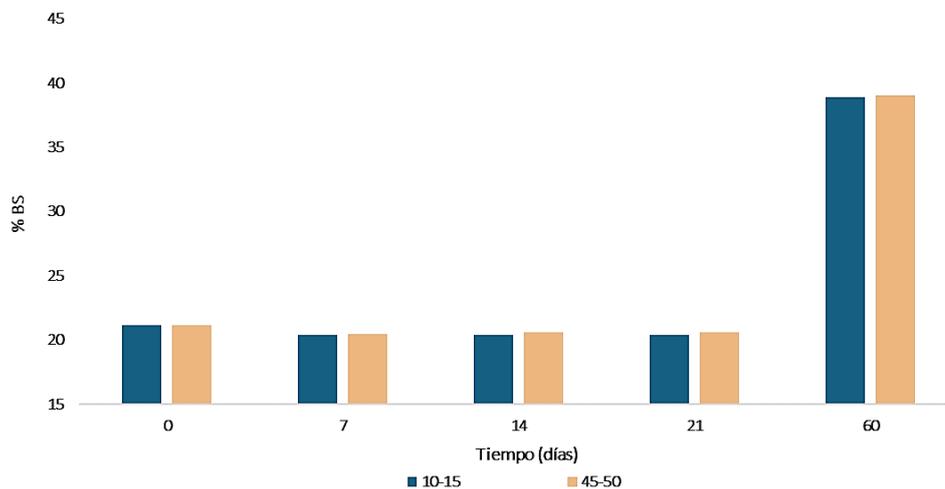


Figura III.9. % BS en la parte inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida. Valores inmediatamente después de la homogenización en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

III.4.A.4. Estabilidad microbiológica.

Para evaluar el comportamiento microbiológico se realizó el análisis mediante tres medios de cultivo diferentes: un medio general agar nutritivo (AN) para mesófilos totales, el medio MRS usando factor de selección (anaerobiosis) para bacterias ácido-lácticas (BAL) y el medio YGC para hongos y levaduras.

En primera instancia, se evaluó la bebida no pasteurizada. A pesar de no haber sido sometida a un tratamiento térmico, no fue posible observar colonias en ninguno de los tres medios evaluados para la muestra directa y las diluciones -1 y -2, al hacer estos ensayos en la bebida recién preparada. La dispersión inicial de harina presenta una microbiota propia, que para el caso de las arvejas utilizadas en esta parte del estudio, consistió principalmente en mesófilos en orden de $2,5 \times 10^3$ UFC/g con BAL no detectables, y hongos/levaduras en el orden de $2,3 \times 10^1$ UFC/g tal como se discutirá con mayor profundidad en la PARTE B de este Capítulo. Una posible causa del nivel no detectable de microorganismos en **B** podría estar relacionada con el tratamiento alcalino (pH = 9,5) realizado para su preparación. Un ambiente alcalino, al igual que un ambiente ácido, es estresante para las bacterias. Las bacterias deben mantener un pH citoplasmático que sea compatible con la integridad funcional y estructural óptima de las proteínas citoplasmáticas, y tienen capacidad de implementar diversos sistemas de adaptación frente al medio alcalino. En ese sentido, muchas bacterias no extremófilas crecen en un amplio rango de valores de pH externo, de 5,5 a 9,0, y mantienen un pH citoplasmático que se encuentra dentro del estrecho rango de 7,4 a 7,8. Una respuesta frente al álcali es la supervivencia, la cual implica frecuentemente una pérdida de viabilidad (O'Sullivan y Condon, 1997; Padán et al., 2005). Asimismo, no puede descartarse la sedimentación de microorganismos durante la centrifugación y su posterior retención en la filtración, procesos realizados durante la preparación de **B**.

Cuando se analizó la microbiología de la bebida pasteurizada no pudo detectarse crecimiento en ninguno de los tres medios hasta los 14 días de almacenamiento refrigerado (**Tabla III.4**). La ausencia de crecimiento microbiano durante este período sugiere que las condiciones de almacenamiento (4 °C y envase cerrado) mantendrían la bebida pasteurizada en un estado seguro para el consumo.

Luego de los 21 días de almacenamiento refrigerado, si bien no hubo crecimiento de hongos ni levaduras, se encontró que en el medio general hubo un aumento significativo de

bacterias mesófilas, las cuales presentaban morfologías diferentes (cocos y bacilos Gram positivos y negativos), que no serían BAL, alcanzando valores de $1,4 \times 10^6$ ufc/g. Este aumento estuvo acompañado de un descenso moderado pero significativo ($p < 0,05$) en el pH (Tabla III.4). A pesar de este aumento microbiano y el cambio de pH, no hubo modificaciones evidentes en la estabilidad física como se mencionó en la sección III.4.1.2.

Tabla III.4. Valores de pH y recuentos microbianos de la bebida pasteurizada

Tiempo (días)	pH	Recuento microbiano (log ufc/g B)		
		MRS	AN	YGC
0	7,31 ± 0,02 ^b	-	-	-
7	7,27 ± 0,01 ^b	-	-	-
14	7,29 ± 0,01 ^b	-	-	-
21	6,53 ± 0,02 ^a	-	6,15 ± 0,08	-

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Analizando la normativa de nuestro país, el Código Alimentario Argentino incorporó en el año 2024 el subtítulo “PREPARADO VEGETAL BEBIBLE” en el Capítulo XII: “Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificadas”, en el cual el Artículo 1010 enuncia que se entiende por Preparado vegetal bebible al producto elaborado a partir de la(s) parte(s) comestible(s) de las legumbres y/o frutas secas y/o coco y/o semillas y/o quinoa y/o amaranto y/o alforfón y/o cereales y/o el equivalente a sus harinas, pastas y concentrados proteicos derivados de los anteriores con el agregado de agua y con la adición o no de otras sustancias alimenticias, en el cual se acepta el agregado de goma guar y goma xántica en cantidades adecuadas. Asimismo, no hay especificación acerca de recuento de microorganismos aceptado para dichas bebidas.

Para poder analizar la magnitud de la carga microbiana de **B**, se comparó con el Capítulo VIII del Código Alimentario Argentino (“Alimentos lácteos”) en el que se especifica que la leche entera pasteurizada (Artículo 558) debe estar libre de microorganismos patógenos y cumplir con que el recuento de microorganismos aerobios mesófilos (UFC/ml) no sea superior a 10^3 - 10^4 . En nuestro sistema, el recuento de aerobios mesófilos registrado fue menor al límite detectable por el medio de recuento en placa hasta los 14 días de conservación a 4°C y superior a los 21 días. Restaría a futuro corroborar la ausencia de patógenos en la bebida formulada utilizando las normas indicadas para estos procedimientos son la ISO 4833-1:2013 para

mesófilos (recuento por vertido en placa) y la ISO 21528-1:2017 (número más probable) o ISO 21528-2:2017 (recuento en placa) para enterobacterias

Se ha visto que las bebidas vegetales son propicias para el desarrollo de microorganismos desde el principio, lo que pone de relieve el valor de un tratamiento térmico para alargar su vida útil (Munekata et al., 2020). Jemaa et al. (2021) prepararon “leches” vegetales de almendra, avena, cáñamo y quinoa (el procedimiento incluyó un remojo durante 12 h en agua de la canilla, luego 5 min de *mixer* con agua mineral en una proporción 1:5 y finalmente, filtración). Informaron para la leche de cáñamo un desarrollo microbiológico rápido ya que, después de cuatro días de almacenamiento a 4 °C, el número de bacterias había superado las 200×10^4 UFC/ml. Sin embargo, la tasa de crecimiento bacteriano en la leche de almendras y de avena fue más lenta y el recuento no alcanzó 200×10^4 UFC/ml hasta después de 8 días de almacenamiento a 4 °C. Estos autores señalaron que la leche de quinoa tuvo la mejor estabilidad bacteriana, con un recuento de 56×10^4 UFC/ml durante los primeros 8 días de almacenamiento. Sin embargo, hacia el final del estudio (12 días) observaron un aumento sustancial en esta carga (300×10^4 UFC/ml). Estos resultados indicaron la importancia de la realización de un tratamiento térmico para disminuir la carga microbiana y lograr una mayor estabilidad microbiológica como observamos en nuestro trabajo. En nuestro caso, como se discutió antes, es posible también que los procesos realizados para la preparación de la bebida hayan contribuido a disminuir la carga microbiana inicial.

En función de estos estudios pudo concluirse que la bebida de arvejas pasteurizada a 63 °C durante 30 min presentó estabilidad física y microbiológica durante 14 días de almacenamiento a 4 °C; posteriormente comenzaría un crecimiento de microorganismos que lleva a una moderada disminución de pH y finalmente a la desestabilización física del sistema.

III.4.A.5. Caracterización de la fracción proteica. Efecto de la DGIS

Con el fin de analizar la composición polipeptídica de **B**, se decidió realizar una comparación con la composición polipeptídica de la harina (**H**) así como también del aislado proteico (**A**) de arveja teniendo en cuenta cómo fue su elaboración (solubilización de las proteínas a pH: 9,5 y posterior centrifugación), ambas presentadas en el *Capítulo I*.

Analizando el perfil electroforético (SDS-PAGE) de **B** frente al de **H** y **A** (**Figura III.10**), se observó en **B** una disminución de varias de las bandas, siendo las más notables las bandas 1, 3,

4, 5, 6, 9, 10; las bandas 12 y 14 presentaron un aumento en su intensidad. Cabe remarcar que las muestras se prepararon y sembraron de manera tal de tener la misma masa de proteína considerando una solubilización completa en el buffer muestra. Por lo tanto, la disminución observada en la intensidad de las bandas podría correlacionarse con: 1) pérdida de proteínas durante la preparación de **B** (solubilización alcalina y filtración), este podría ser el caso por ejemplo de la banda 10 (< 30 kDa) que también se ve disminuida en **A**; 2) la formación de agregados solubles en el buffer muestra de electroforesis como se observa en el perfil de **B** (círculo verde) y no puede descartarse la formación de agregados insolubles que no aparecen en el gel. Rodríguez y Tironi (2023) informaron una disminución parcial o total de bandas en los perfiles electroforéticos de glicina-SDS-PAGE de una bebida preparada a base de semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) cuando fueron comparados con los perfiles de harina y aislado de la misma semilla. Manassero et al. (2020) también analizaron perfiles electroforéticos de una bebida de amaranto, pero utilizando otra variedad (*Amaranthus hypochondriacus*). Estos autores concluyeron que el tratamiento térmico podría inducir una redistribución de polipéptidos en diferentes agregados atribuida a la desestabilización por la temperatura de las interacciones no covalentes como los enlaces de hidrógeno seguido de la formación de nuevos enlaces generando nuevos agregados, algunos de los cuales podrían ser solubles en el buffer muestra y otros no. Además, dichos autores observaron que el agregado de las gomas produjo una disminución de la intensidad de las bandas entre 30 y 66 kDa, atribuyéndolo a que estos polipéptidos podrían estar interactuando entre ellos y con las gomas, formando complejos de alto PM. En este caso, polipéptidos de arveja de 97 kDa (banda 1), y entre 30 y 66 kDa (bandas 3, 4, 6, y 9) podrán estar formando parte de los agregados.

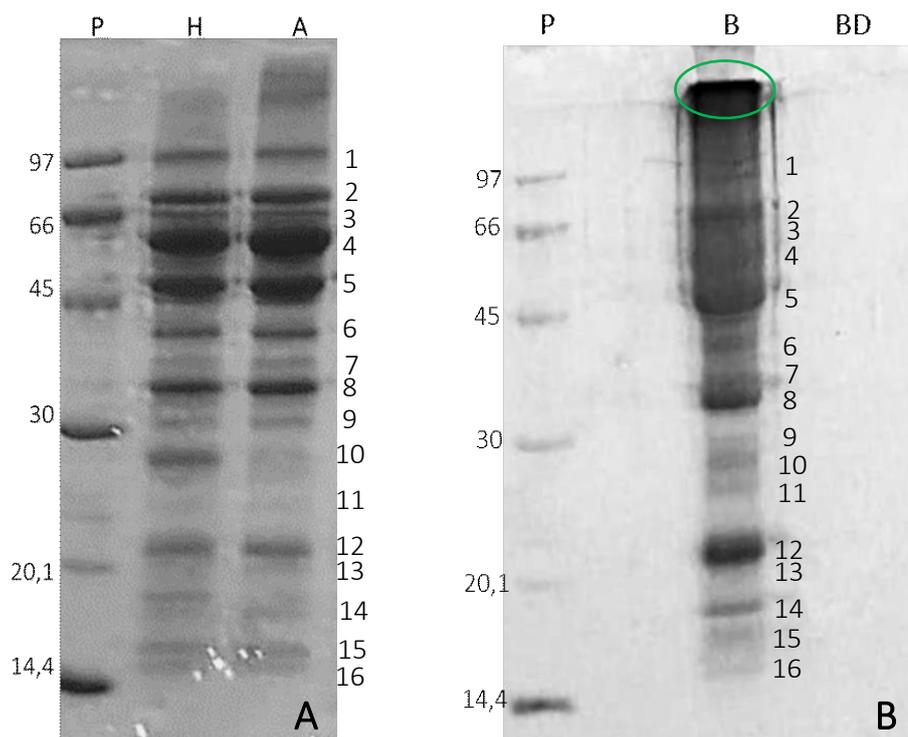


Figura III.10. Electroforesis SDS-PAGE (A) harina H y aislado A, (B) B y BD. (P) patrón de bajo peso

La bebida sometida al proceso de DGIS también fue analizada mediante electroforesis. El perfil de **BD** en glicina-SDS-PAGE presentó la ausencia total de bandas (con la tinción con coomassie blue) incluidos los agregados formados en la preparación de **B**. Esto indica que las proteínas y péptidos presentes en la bebida fueron hidrolizados en gran medida por las enzimas digestivas en el sistema gastrointestinal simulado. La ausencia total de bandas en el perfil glicina-SDS-PAGE después de la digestión gastrointestinal sugeriría que las proteínas de la bebida son altamente digestibles, lo que, abordándolo desde una perspectiva nutricional, resultaría beneficioso. Como se analizó previamente en la *sección 1.4.2.1 del Capítulo I*, en el caso de la DGIS por el protocolo de consenso COST-INFOGEST de la harina de arveja se registró la desaparición de la mayoría de los polipéptidos, quedando algunas bandas remanentes indicando que algunos polipéptidos presentes en la harina resistieron la digestión gastrointestinal. Por otro lado, en el caso del aislado proteico digerido, aparecieron solo dos bandas remanentes, con menor intensidad. Estos resultados se condicen con el elevado grado de proteólisis obtenido para **BD** (**Tabla III.5**), el cual fue superior a los obtenidos para **HD₂** y **AD₂** (36 y 37 % respectivamente, *Capítulo I*). Por lo tanto, el procesamiento realizado para la obtención de **B** (extracción alcalina con eliminación de componentes fundamentalmente

glucídicos y lipídicos y tratamiento térmico) contribuyeron para aumentar la digestibilidad de las proteínas de arvejas, aún en presencia de la formación de agregados en **B**.

Tabla III.5. Proteína soluble (método de Lowry), solubilidad y GH de **B** y **BD**

Muestra	Proteína soluble (PS) (mg/ml)	Solubilidad proteica (g PS/100 g PT)	Grado de hidrólisis GH %
B_s	1,7 ± 0,2 ^a	18,06 ± 0,01 ^a	-
BD_s	3,2 ± 0,8 ^b	83 ± 13 ^b	49 ± 4

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se estudió la solubilidad en buffer PBS (pH = 7,4) de las proteínas presentes en **B** y **BD**. El muy bajo valor obtenido en el caso de **B** (Tabla III.5) -para **H** y **A** la solubilidad proteica en el mismo buffer fue alrededor del 70 %, *Capítulo I*- podría estar relacionado a la previamente mencionada formación de agregados entre polipéptidos o con las gomas que quedarían en dispersión y se insolubilizarían al centrifugar durante la preparación de la fracción soluble en PBS. La DGIS (**BD**) produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) tanto del valor de proteína soluble como en la solubilidad proteica. Este comportamiento no se había observado para los digeridos de la harina ya que no se encontraron diferencias significativas entre los solubles de los digeridos y el soluble de la harina sin digerir, pero en las muestras del aislado si se encontró que hubo diferencias significativas entre el soluble de **A** y el de **AD₂** (*Capítulo I*, Tabla I.8). Rodríguez y Tironi (2023) informaron un comportamiento similar para fracciones solubles en buffer fosfato (pH = 7,8) de una bebida a base de semillas de amaranto en los cuales la solubilidad fue baja (alrededor de 35%) y luego del proceso de DGIS, el aumento de la solubilidad fue significativo.

Las fracciones solubles en buffer PBS fueron analizadas mediante FPLC de exclusión molecular (columna *Superdex 30*). Cuando el cromatograma de **B_s** fue analizado frente al de **H_s** (normalizados por concentración de proteína soluble, **Figura III.11**), se observó una fuerte disminución en el pico correspondiente al volumen de elución (> 10 kDa) de **B_s** respecto al presente en **H_s**, y que los picos 2, 3 y 4 también disminuyeron, mostrando nuevamente una reducción de moléculas solubles en el proceso de elaboración de **B**. Finalmente, apareció en **B_s** un pico correspondiente a moléculas de muy bajo PM (pico 5). Al comparar con el cromatograma de la fracción soluble del aislado **A_s** también se observó que **B_s** presentó un menor ancho de base del pico correspondiente al volumen de exclusión (pico 1, PM > 10 kDa)

lo que indicaría menor dispersión del rango de PM de las moléculas eluidas en ese volumen, y una mayor presencia de moléculas de bajo PM (picos 3, 4 y 5).

La fracción soluble del digerido **BD_s** también fue analizada mediante cromatografía de exclusión molecular usando la columna *Superdex 30* (**Figura III.12**). Con respecto al cromatograma de **B**, la fracción soluble del digerido **BD_s** muestra una clara evidencia de la acción enzimática durante la digestión, al observarse disminución en el pico correspondiente al V_0 y la consecuente aparición de nuevos picos de PM < 6,5 kDa relacionada con la ruptura de proteínas en péptidos de menor tamaño, que se tradujo en un aumento significativo de la solubilidad (**Tabla III.5**). Estos resultados son consistentes con un alto grado de hidrólisis, lo que sugiere una gran digestibilidad y potencialmente una mayor biodisponibilidad de los componentes de la bebida. Este comportamiento en el cual disminuye la proporción de moléculas mayores a 10 kDa y aumentan las moléculas con PM menores a 6,5 kDa también fue observado para las muestras de **H** y **HD** y para las de **A** y **AD** (*Capítulo I*, sección I.4.2.1).

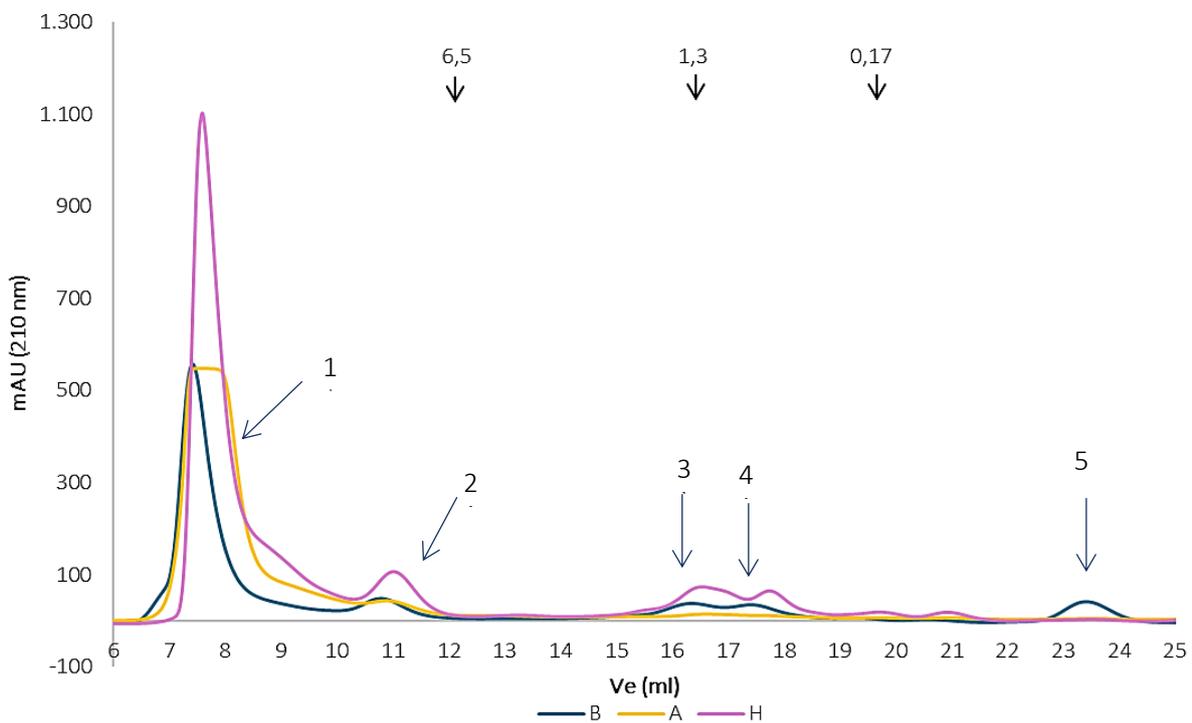


Figura III.11. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna *Superdex 30*) de **B**, **H** y **A** (normalizados 1 mg/ml). Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

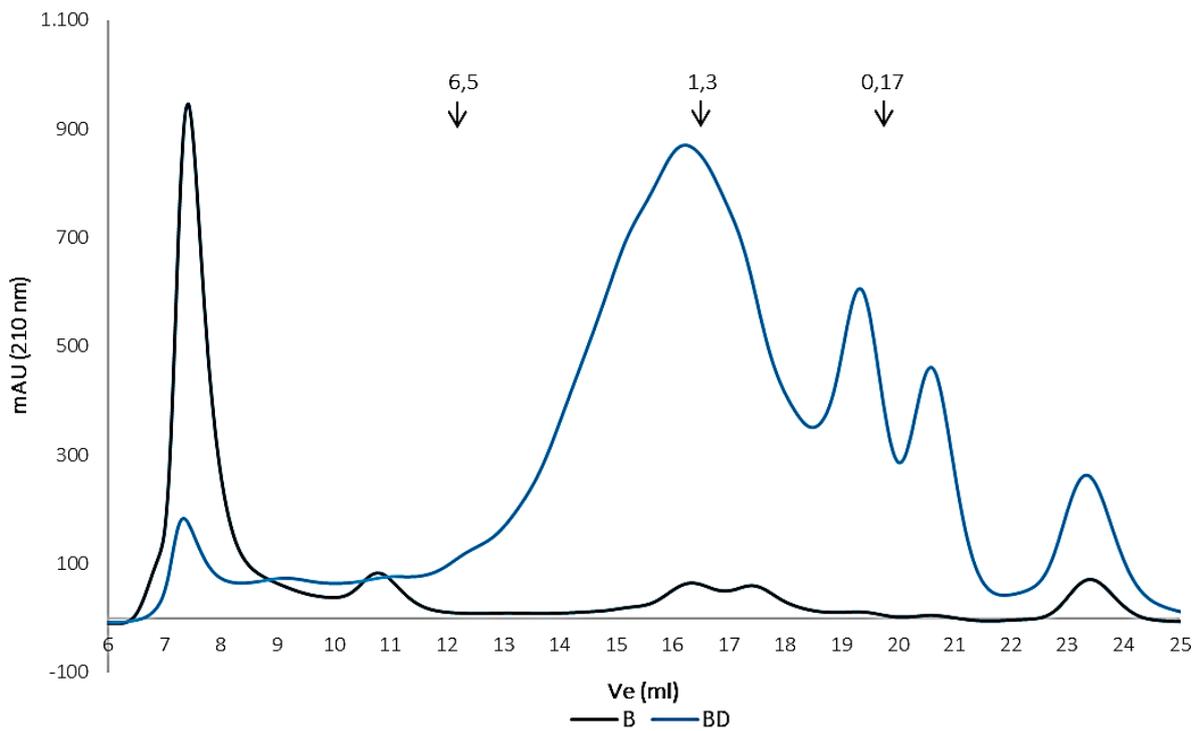


Figura III.12. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **B_s** y **BD_s**. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Se analizaron la fracción soluble directa (**BD_{sd}**) preparada por centrifugación directa del digerido y la fracción bioaccesible (**BD_{sb}**) de la bebida digerida. La **Tabla III.6** muestra la concentración de proteína en estos solubles en comparación con los solubles obtenidos por resuspensión del digerido liofilizado en PBS analizados anteriormente (**s**).

Tabla III.6. Concentración de proteína soluble de **B**, **BD**, **BD_{sd}** y **BD_{sb}**.

Muestra	Proteína soluble (mg/ml)
B_s	1,7 ± 0,2 ^a
BD_s	3,2 ± 0,8 ^{ab}
BD_{sd}	3,7 ± 0,8 ^b
BD_{sb}	2,0 ± 0,2 ^a

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

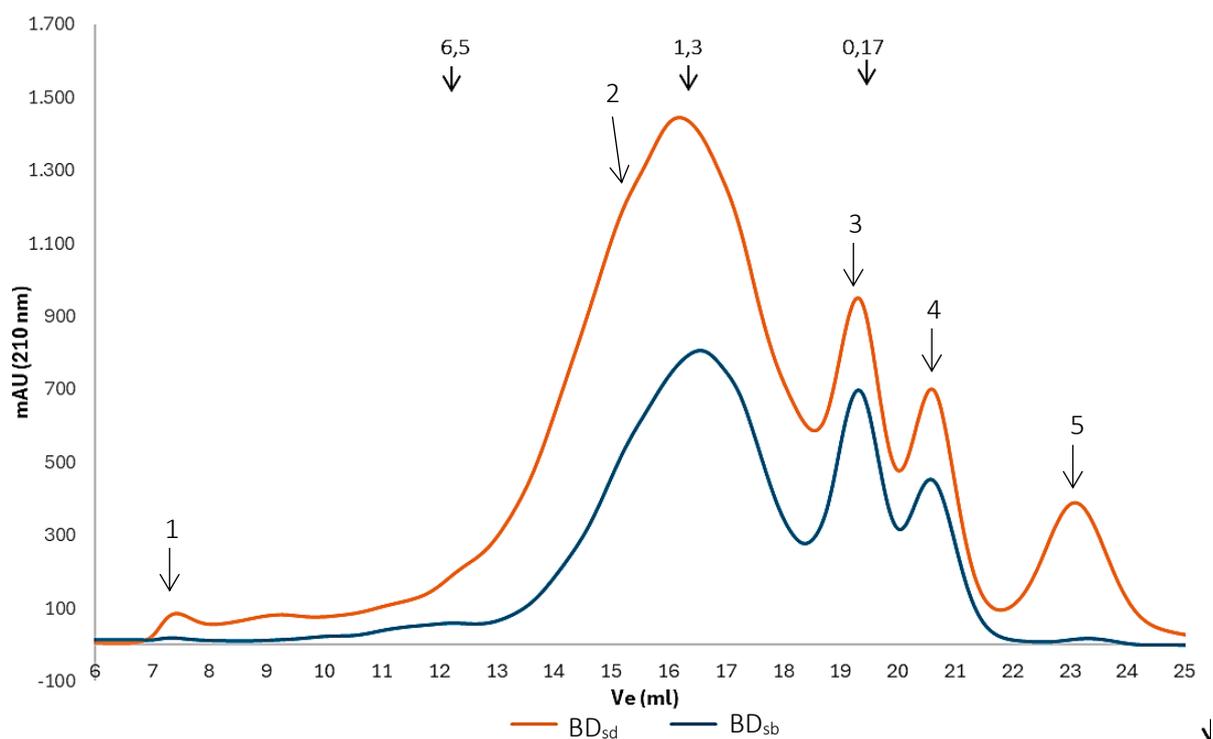


Figura III.13. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **BD_{sd}** y **BD_{sb}**. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Cuando se compararon los perfiles FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **BD_{sd}** y **BD_{sb}** (**Figura III.13**), se observó que el pico correspondiente a V_0 (pico 1) que era relativamente pequeño en el caso de **BD_{sd}**, no apareció en **BD_{sb}** lo cual era esperable dado el proceso utilizado para la eliminación de las sales biliares. La disminución en el pico correspondiente a V_0 también se había observado para las fracciones bioaccesibles de **HD** y **AD** (*Capítulo I*, sección 1.4.2.2). También se observó una menor proporción de las moléculas con $PM < 6,5$ kDa y una desaparición de moléculas menores a 0,1 kDa (pico 5) en **BD_{sb}**. La pérdida de proteína soluble en la fracción bioaccesible con respecto al soluble directo de **BD** fue del 46 % y al observar los cromatogramas se observó que hubo una pérdida de compuestos en todo el rango de PM en la fracción bioaccesible. Este comportamiento fue similar al informado en el *Capítulo I* (*Tabla I.9*) para la fracción bioaccesible de **AD** (**AD_{sb}**).

III.4.A.6 Actividad antioxidante de la fracción peptídica.

III.4.A.6.1. Actividad *in vitro* acelular.

Se llevó a cabo una primera aproximación a la evaluación de la actividad antioxidante de la fracción soluble en buffer PBS de **B** (**B_s**) y su digerido gastrointestinal (**BD_s**), así como del soluble directo **BD_{sd}** y de la fracción bioaccesible **BD_{sb}**, aplicando dos metodologías: método ORAC y secuestro del radical ABTS. Para ambas metodologías se ensayaron diferentes diluciones de cada muestra a fin de obtener curvas dosis-respuesta, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de IC₅₀ para cada muestra (**Tabla III.7**).

Los resultados obtenidos en el ensayo ORAC mostraron para **B_s** un valor de IC₅₀ similar a los obtenidos para **H_s** y **A_s** (*Capítulo I*) indicando que los cambios en la composición polipeptídica descritos previamente no llevaron a modificaciones en esta actividad.

Tabla III.7. Actividad ORAC y ABTS de las fracciones solubles en PBS de **B**, **BD**, **BD_{sd}** y **BD_{sb}**.

Muestra	Proteína soluble (mg/ml)	ORAC IC ₅₀ (mg/ml)	ABTS IC ₅₀ (mg/ml)
B_s	1,7 ± 0,2 ^a	0,27 ± 0,07 ^b	1,8 ± 0,1 ^c
BD_s	3,2 ± 0,8 ^{ab}	0,025 ± 0,004 ^{aA}	0,19 ± 0,02 ^{aA}
BD_{sd}	3,7 ± 0,8 ^b	0,025 ± 0,003 ^{aA}	0,4 ± 0,1 ^{abAB}
BD_{sb}	2,0 ± 0,2 ^a	0,048 ± 0,006 ^{aB}	0,7 ± 0,1 ^{bB}

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas estadística realizada sobre todas las muestras, letras mayúsculas, estadística realizada sobre las fracciones digeridas.

Por otro lado, el valor de IC₅₀ fue aproximadamente la décima parte del valor obtenido para **B_s**, indicando que se produjo la liberación de compuestos activos tales como péptidos que se encontraban inactivos en la bebida. Este aumento en la potencia antioxidante fue mayor a los obtenidos para **HD_s** (3 veces con respecto a **H_s**) y para **AD_s** (4,5 veces con respecto a **A_s**) (*Capítulo I, Sección 1.4.3.1*) lo que sugiere que el proceso de elaboración de la bebida, principalmente el tratamiento térmico (puede desnaturalizar proteínas aumentando su digestibilidad como fue mencionado anteriormente) potenció la capacidad de neutralizar radicales peroxilos de los productos de digestión en comparación con los ingredientes de partida. No se observaron diferencias significativas entre los valores de IC₅₀ de **BD_s** y **BD_{sd}** (**Tabla III.7**), mientras que se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de casi un 50 % de la potencia ORAC cuando el soluble directo fue tratado con colestiramina para obtener la fracción **BD_{sb}**. Un comportamiento similar luego del tratamiento con colestiramina fue observado para

los digeridos del aislado proteico (AD_{sb}) y de harina (HD_{sb}) (Tabla I.12, Capítulo I). Sin embargo, los valores de IC_{50} por el método ORAC de las todas las fracciones solubles de los diferentes digeridos fueron diferentes; en todos los casos los valores presentados por **BD** fueron más pequeños, por ejemplo, el valor correspondiente a BD_{sb} fue casi 6 veces menor al obtenido para HD_{sb} y 2,5 veces menor con respecto a AD_{sb} . Estos resultados muestran una mayor potencia antioxidante de la fracción soluble acuosa del digerido de **BD**, posiblemente debido al procesamiento realizado para la obtención y pasteurización de la bebida. Este comportamiento también fue observado por Rodríguez y Tironi (2023) al analizar la capacidad antioxidante por el método de ORAC del digerido de una bebida a base de semillas de amaranto frente a la harina y al aislado proteico de amaranto, informando un aumento de entre 2 y 3 veces para BD_s y BD_{sd} frente a sus análogos de la harina y entre 1,5 y 3 veces para las fracciones digeridas del aislado.

Cuando la actividad antioxidante fue analizada por el método de neutralización del $ABTS^+$ también se encontró que las fracciones digeridas tuvieron un aumento de la potencia antioxidante con respecto a **B**. En este caso, BD_s también presentó un valor de IC_{50} de alrededor de un décimo con respecto a B_s . Además, si bien se observó una tendencia a una disminución de la potencia luego del tratamiento con colestiramina, la diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Estos resultados indicaron que el proceso de elaboración de la bebida, principalmente el tratamiento térmico, sumado al proceso de DGIS potenciaron la capacidad de neutralizar radicales $ROO\cdot$ y $ABTS^+$ en todas las fracciones solubles acuosas del digerido de la bebida.

III.4.A.6.2 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales.

Con el fin de lograr una mayor aproximación a la potencial actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos presentes en **BD**, se estudió la actividad en un modelo celular determinando el contenido de ROS intracelulares.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad sobre cultivos de células Caco2-TC7 de la fracción soluble bioaccesible de **BD** (BD_{sb}) así como la correspondiente al blanco de reactivo (**BR**). Como se comentó previamente en la Sección 1.4.3.2 del Capítulo I, las sales biliares presentes en los digeridos pueden producir citotoxicidad y favorecer la oxidación celular. En el caso de BD_{sb} , la muestra sin dilución generó un mayor nivel de citotoxicidad frente a las muestras diluidas, aunque ninguna de las concentraciones evaluadas produjo una liberación

muy importante de LDH indicando un bajo nivel de daño en la integridad celular (**Tabla III.8**). Como se discutió en el *Capítulo I, Sección 1.4.3.2* en el caso de **BR**, la citotoxicidad fue dependiente de la dilución realizada, alcanzándose valores de liberación de LDH bajos y similares a los de las muestras digeridas recién cuando la dilución fue de 1/20.

Tabla III.8. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (**BD_{sb}** y **BR_{sb}**) en diferentes concentraciones.

Muestra	Dilución	C prot (mg/ml)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
BD_{sb}	-	2	27,9 ± 0,1 ^d	72,1	76 ± 2 ^d
	1/5	0,4	1,0 ± 0,1 ^a	99	64 ± 1 ^c
	1/10	0,2	6 ± 1 ^b	94	38 ± 2 ^b
	1/20	0,1	14 ± 3 ^c	86	19 ± 6 ^a
BR_{sb}	-	0,4	62 ± 1 ^d	38	-
	1/5	0,08	43 ± 1 ^c	57	-
	1/10	0,04	31 ± 4 ^b	69	-
	1/20	0,02	16 ± 2 ^a	84	-

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Valores de % inhibición de ROS calculados teniendo en cuenta los % de viabilidad de la muestra y de la dilución correspondiente de BR

Se analizó el contenido de ROS intracelulares luego de la exposición de las células a las distintas fracciones solubles, empleando H₂O₂ como inductor de la oxidación. Al igual que en los casos de **HD_{sb}** y **AD_{sb}** (*Capítulo I, Sección 1.4.3.2*), **BD_{sb}** mostró un efecto de inhibición de las ROS, presentando una dependencia con la concentración de polipéptidos/péptidos solubles en el rango ensayado al disminuir los valores de inhibición en las muestras más diluidas (**Tabla III.8**). Si bien se observó el mismo comportamiento, cabe destacar que los valores de inhibición alcanzados en la muestra sin diluir de **BD_{sb}** (76 ± 2 %) fue menor a los obtenidos para **HD_{sb}** y **AD_{sb}** (92 %). Esto podría relacionarse con la menor concentración de proteína soluble cuantificada en **BD_{sb}** respecto a **HD_{sb}** (20 mg/ml) y a **AD_{sb}** (8,3 mg/ml). Al estimar a partir de la curva dosis-respuesta un IC₅₀, se obtuvo un valor de 0,3 mg proteína/ml, similar al obtenido previamente para **AD_{sb}** (*Capítulo 1*), indicando una similar potencia para la neutralización de ROS intracelulares que el aislado proteico.

III.4.A.7 Caracterización de la fracción fenólica

El contenido de CFT del extracto etanólico de **B** obtenido por EAU (15 min, 40 % de amplitud) (**B_e**) fue de 2,4 mg AGE/g b.s. (Tabla III.9). Este valor resultó ser superior a los obtenidos para **H_e** y para **A_e** (0,68 y 0,98 mg AGE/g b.s., respectivamente). Rodríguez (2022) informó una situación similar en la cuantificación de polifenoles totales de un extracto metanólico 70% de una bebida a base de semillas de amaranto, el cual fue superior a los obtenidos para harina de amaranto y aislado proteico. El análisis de los perfiles HPLC-DAD-FL (Tabla III.10) mostró también un aumento de los CF detectados y algunas diferencias en la composición de CF de **B_e** respecto a los de **H_e** y **A_e** (Tabla 1.11, Capítulo I). Comparando con **H_e**, se registró un mayor contenido de OH-tirosol, ácidos fenólicos y estilbenos y una concentración similar de flavonoides. Cuando se analizó frente a **A_e**, el resultado fue algo diferente: **B_e** mostró un mayor contenido de OH-tirosol, de ácidos fenólicos y de flavonoides, pero un menor contenido total de estilbenos con pérdida total de la polidatina. En particular, los CF que fueron detectados en **H_e** o **A_e** y también en **B_e** (OH-tirosol, procianidina B1, (+)-catequina, *trans*-reveratrol, genisteína, ácido gálico, ácido *p*-cumárico y ácido siríngico), mostraron mayor concentración en el extracto de la bebida que en los extractos de la harina y del aislado. Además, en **B_e** fue posible detectar nuevos compuestos que no habían sido cuantificados en **H_e** o **A_e** (el ácido sinapínico, y los flavonoides fisetina, quercetina, quercetina-3-galactosido, procianidina B2, genistina y (-)-epigallocatequina galato) (Tabla III.10). Por lo tanto, los resultados obtenidos por el método de Folin y por HPLC muestran que el procesamiento realizado en la obtención y el tratamiento térmico de **B** estarían induciendo el aumento de compuestos cuantificables por Folin por concentración, y/o liberación, y/o una mayor extractabilidad de los mismos.

Tabla III.9. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos¹

Muestra		CFT (mg AGE/ml)	CFT (mg AGE/g b.s.)
Sin digerir	B_e	0,11 ± 0,01 ^a	2,4 ± 0,2 ^a
Después de DGIS	BD_e	0,324 ± 0,004 ^c	18 ± 2 ^c
Después de colestiramina (bioaccesible)	BD_{esb}	0,163 ± 0,004 ^b	9,5 ± 0,2 ^b

¹ EAU: EtOH 60 %, 15 min, 40 % amplitud. En el caso de **BD**, CFT se refirió a la masa original de **B** usadas en la DGIS. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Después del proceso de DGIS, **BD_e** presentó un aumento significativo ($p < 0,05$) y notable en el contenido de CFT del extracto etanólico en comparación con **B_e** (**Tabla III.9**), siendo este valor mayor a los obtenidos para **HD_e** y **AD_e** (5,04 y 13,5 mg AGE/g b.s. respectivamente, *Capítulo I*, Tabla I.10).

La composición fenólica de **BD_e** también fue estudiada por HPLC-DAD-FLD. En este caso, el contenido de CF cuantificados fue superior al de **B_e**. Esto no se había observado para **HD_e** dado que el valor de CF había disminuido frente al de **H_e**, pero si para **AD_e** (*Capítulo I*, sección I.4.2.2).

En el análisis de **BD_e** frente a **B_e** se encontró que varios compuestos fenólicos que se encontraban en **B_e** no se detectaron en **BD_e**. En particular, los ácidos fenólicos se perdieron todos luego de la DGIS con excepción al ácido *p*-cumárico el cual se detectó pero en menor concentración. El ácido *p*-cumárico, también conocido como ácido 4-hidroxicinámico, es un ácido fenilpropanoico sintetizado a partir de la vía metabólica del shikimato; se deriva de los aminoácidos aromáticos precursores tirosina y fenilalanina y tiene un grupo fenil hidroxilo que es responsable de su actividad antioxidante (Ferreira et al., 2018). Konishi et al. (2004) investigaron la absorción intestinal del ácido *p*-cumárico *in vivo* mediante administración oral en ratas, observando que su absorción era extremadamente rápida. Con respecto a los flavonoides, quercetin-3-galactósido, genisteína, gínestina, quercetina y fisetina (presentes en **B_e**) no se detectaron en **BD_e**; sin embargo, en contraparte, kaempferol-3-glucósido, naringenina, hesperetina y miricetina fueron detectados en **BD_e** pero no en **B_e**. Los flavonoides naringenina y hesperetina pertenecen a la subfamilia de las flavanonas mientras que kaempferol-3-glucósido y miricetina forman parte de los flavonoles. Los flavonoles dietéticos son moléculas biodisponibles con beneficios para la salud humana (por ejemplo, actividades antioxidante, cardioprotectora, antibacteriana, antiviral y anticancerígena) (Shen et al., 2022). Por ejemplo, utilizando hepatocitos porcinos y humanos *in vitro* e *in vivo*, Cui et al. (2019) encontraron que la miricetina podría mantener las funciones hepáticas involucradas en la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos.

Tabla III.10. Composición de CF de extractos etanólicos de **B** y **BD**.

Compuesto fenólico	Muestra	
	B _e	BD _e
OH-tirosol	145 ± 1	99,9 ± 0,4
Ácidos fenólicos		
Ácido gálico	23,1 ± 0,4	nd
Ácido siríngico	36 ± 2	nd
Ácido sinapínico	24 ± 3	nd
Ácido <i>p</i> -coumárico	10,67 ± 0,01	2,39 ± 0,08
Ácido ferúlico	0,39 ± 0,01	nd
Total ácido fenólicos	93 ± 1	2,39 ± 0,08
Estilbenos		
<i>trans</i> -resveratrol	38,6 ± 0,4	125 ± 3
Total estilbenos	38,6 ± 0,4	125 ± 3
Flavonoides		
Procianidina B1	22,0 ± 0,3	22,6 ± 0,9
Procianidina B2	6,9 ± 0,4	8,4 ± 0,9
Quercetin-3-galactósido	5,3 ± 0,2	nd
Kaempferol-3-glucosido	nd	55 ± 5
Genisteina	5,53 ± 0,01	nd
Ginestina	1,67 ± 0,03	nd
(+)-catequina	6,5 ± 0,2	14 ± 2
(-)-epigallocatequina galato	9,28 ± 0,01	63,3 ± 0,2
Naringenina	nd	28 ± 1
Hesperetina	nd	23 ± 4
Miricetina	nd	18,23 ± 0,01
Quercetina	24,6 ± 0,2	nd
Fisetina	0,81 ± 0,01	nd
Total flavonoides	82,7 ± 0,5	233 ± 11
Total	360 ± 1	461 ± 8

nd: no detectable

De acuerdo con los presentes resultados, los compuestos fenólicos mayoritarios en el digerido gastrointestinal de **B** serían el *trans*-resveratrol, el OH-tirosol, la (-)-epigallocatequina galato, y el kaempferol-3-glucósido, los cuales presentan importantes bioactividades según la literatura. El estilbeno *trans*-resveratrol se encontró en mayor concentración. Numerosos estudios *in vitro* describen diferentes efectos biológicos del resveratrol. Los principales impactos son los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y estrogénicos, así como las actividades anticancerígenas y quimiopreventivas (Wenzel y Somoza, 2005). Las mismas autoras informaron que en diferentes especies de roedores, así como en humanos, el resveratrol se absorbe bien, se distribuye en varios órganos y se metaboliza en conjugados de

glucurónido y sulfato. En plasma, el resveratrol alcanza concentraciones máximas después de 30 minutos. Por otra parte, se ha planteado la hipótesis de que el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol, OH-tirosol), ejerce una amplia gama de efectos biológicos, cardioprotectores, anticancerígenos, neuroprotectores, antimicrobianos y otros. Aunque se ha estudiado ampliamente, los mecanismos moleculares exactos que subyacen a muchas de estas acciones aún no se han aclarado por completo. Inicialmente, la amplia variedad de actividades biológicas de OH-tirosol se asoció con su fuerte actividad antioxidante ya que actúa como eliminador de radicales libres y quelante de metales. Actúa principalmente donando un átomo de hidrógeno a radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). De esta manera, el $\text{ROO}\cdot$ bastante reactivo se reemplaza por el radical OH-tirosol, no reactivo debido a la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en el radical fenoxi. Sin embargo, se ha propuesto que OH-tirosol puede conferir protección antioxidante adicional al aumentar los sistemas de defensa endógenos contra el estrés oxidativo, activando diferentes vías de señalización celular (Karković Marković et al., 2019). En cuanto al flavonoide kaempferol-3-glucósido (astragalina), se ha informado que exhibe múltiples propiedades, incluidas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, neuroprotectoras y cardioprotectoras. Como ejemplos de su actividad *in vivo*, se ha reportado que es capaz de inhibir el estrés oxidativo inducido por endotoxinas a través de la modulación de señales celulares, modular vías relacionadas con la apoptosis y el alivio del estrés oxidativo provocando la supresión de la neurotoxicidad estimulada por 6-hidroxidopamina en *Caenorhabditis elegans*, y mejorar la función neuronal en un modelo de lesión cerebral por isquemia de ratas (Rashed, 2020). El flavonoide (-)-epigallocatequina galato, un éster de epigallocatequina y ácido gálico, ejerce varias actividades biológicas incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiangiogénicas, antiproliferativas, proapoptóticas y antimetastásicas. En varios estudios *in vitro* con diferentes líneas celulares de cáncer, así como en investigaciones *in vivo* con animales, se han demostrado los efectos inhibidores en la iniciación, promoción y progresión de diversos tipos de tumores. Es un destacado antioxidante natural, que posee actividad de neutralización de ROS (peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo). Se ha propuesto ejerce estas propiedades antioxidantes a través de varios mecanismos, como la transferencia de átomos de hidrógeno, la transferencia de electrones y la quelación de metales catalíticos (Aggarwal et al., 2022).

Por lo tanto, **B** presenta una interesante composición de compuestos fenólicos potencialmente bioaccesibles, al menos hasta donde se evaluó mediante metodologías *in vitro*. De acuerdo con los presentes resultados, parecería haber un mayor contenido inicial y una mayor protección de los CF frente a la DGIS en la matriz de esta bebida respecto a los ingredientes como **A** y más aún **H**. Es probable que estas observaciones sean el resultado de la combinación de tratamiento alcalino (que aumenta la solubilidad de algunos CF), la presencia de los hidrocoloides, y el tratamiento térmico de pasteurización que podría favorecer por ejemplo la interacción hidrofóbica entre CF y proteínas para formar complejos más resistentes a la DGIS. Sin embargo, este aspecto requerirá un estudio más profundo para confirmar estas hipótesis.

Cuando el CFT de la fracción etanólica bioaccesible (**BD_{esb}**) fue analizado, se encontró que fue significativamente menor ($p < 0,05$) al del extracto de la bebida digerida antes del tratamiento con colestiramina (**Tabla III.9**). Este mismo comportamiento se había observado para las fracciones etanólicas de la harina y aislado proteico (Sección I.4.2.2, *Capítulo I*).

III.4.A.8 Actividad antioxidante de la fracción fenólica.

III.4.A.8.1. Actividad *in vitro* acelular.

Se estudió también la actividad antioxidante de los extractos etanólicos **B_e**, **BD_e** y **BD_{esb}** por el método ORAC y por el ensayo de neutralización del radical ABTS*⁺.

Tabla III.11. Actividad ORAC y ABTS de las fracciones etanólicas de **B** y **BD**.

Muestra	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	ORAC IC ₅₀ ($\mu\text{g AGE/ml}$)	ABTS IC ₅₀ ($\mu\text{g AGE/ml}$)
B_e	110 \pm 1 ^a	1,0 \pm 0,2 ^a	19 \pm 2 ^b
BD_e	324 \pm 4 ^c	1,9 \pm 0,4 ^a	6 \pm 3 ^a
BD_{esb}	163 \pm 4 ^b	1,2 \pm 0,2 ^a	7 \pm 2 ^a

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se observó que la DGIS no produjo cambios en la potencia ORAC de **B_e**, ya que no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de IC₅₀ de **B_e** y **BD_e**. Este comportamiento también se había observado para **H_e** y **HD_e**, en los que, a pesar que el digerido tuvo un aumento de CFT, la actividad antioxidante medida por el método de ORAC no tuvo diferencia significativa entre ambos extractos. Analizando la actividad antioxidante de la

fracción bioaccesible, se encontró que tampoco presentó diferencias significativas. Las fracciones bioaccesibles de **HD** y **AD**, no habían presentado este comportamiento ya que, en ambas muestras, la potencia antioxidante medida por el método de ORAC había presentado diferencias con las fracciones directas, obteniéndose valores de IC₅₀ menores (Tabla I.15, *Capítulo I*).

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos también fue evaluada por el método de secuestro del radical ABTS⁺. En este caso, a diferencia de lo obtenido por el método de ORAC, se registró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la potencia antioxidante luego de la DGIS, la cual no fue modificada por el tratamiento con colestiramina (**Tabla III.11**). Este comportamiento había sido observado parcialmente en las fracciones del aislado proteico ya que, **AD_e** había aumentado la actividad antioxidante con respecto a **A_e**, pero entre **A_e** y **AD_{esb}** no se habían encontrado diferencias significativas.

Aydar et al. (2023) prepararon “leche” de dos variedades de porotos realizando una secuencia de pasos que incluía: escaldar, descascarar, moler en húmedo, filtrar y al sobrenadante llevarlo a hervor durante 2-3 min. Estas bebidas fueron sometidas a un proceso de digestión (utilizando el protocolo de consenso de Minekus et al., 2014) y se analizó el contenido de fenoles totales (en un extracto obtenido por EAU (300 W, 30 min) usando una relación 1 g/5 ml de MeOH 80%) y su actividad antioxidante mediante DPPH y CUPRAC (Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica, se basa en la medición de la absorbancia del quelato de Cu(I)-neocuproína (Nc) formado como resultado de la reacción redox de antioxidantes con el reactivo CUPRAC, Cu(II)-Nc). Estos autores informaron para ambas bebidas un aumento del contenido de polifenoles en la fase intestinal de la digestión. Cuando analizaron la actividad antioxidante de los digeridos informaron que por el método de CUPRAC una de las bebidas aumentó su potencia antioxidante en la fase intestinal, pero la otra no presentó diferencia entre la digerida y la sin digerir. Además, la bebida que no había tenido diferencia significativa por CUPRAC tampoco la tuvo por DPPH; sin embargo, la que había mostrado un aumento por CUPRAC, presentó una disminución por DPPH. Como se indicó previamente, en nuestro trabajo también hubo un aumento en el contenido de polifenoles totales luego de la digestión, y cuando fueron analizadas las actividades antioxidantes *in vitro*, por una de ellas (ORAC) no se encontró diferencias significativas entre el extracto sin digerir y los digeridos, mientras que por ABTS se registró un aumento de la actividad luego de la digestión. Cabe

remarcar que, como se ha mencionado anteriormente, las diferencias en la sensibilidad y en los mecanismos de acción de los compuestos entre los diferentes métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante podrían explicar diferencias de comportamientos en los compuestos antioxidantes luego de la digestión gastrointestinal.

III.4.A.8.2 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales.

La citotoxicidad de **BD_{esb}** y **BR_{esb}** se evaluó en términos del % de liberación de LDH como indicador de daño celular. La **Tabla III.12** muestra la actividad LDH del sobrenadante de células Caco2-TC7 tratadas con diferentes diluciones de las muestras. Como ya ha sido informado, al igual que en el caso de la fracción soluble en agua, aún después del tratamiento con colestiramina, **BR_{esb}** presentó una alta citotoxicidad (74 %), la cual disminuyó con la dilución de esta muestra. Su contenido de CFT no fue detectable. **BD_{esb}** presentó un valor de citotoxicidad alto pero menor (47 %) al de **BR_{esb}**, que también disminuyó a medida que se diluyó la muestra. Nuevamente, la presencia de CF (u otros compuestos) presentes en **BD_e** disminuyeron la citotoxicidad de los reactivos de digestión remanentes, tal como se describió en el *Capítulo I*, sección I.4.3.2 para **HD_e** y **AD_e**.

Tabla III.12. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones etanólicas bioaccesibles (**BD_{esb}** y **BR_{esb}**) en diferentes concentraciones.

Muestra	Dilución	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
BD_{esb}	-	163 \pm 4	47 \pm 7 ^c	53	73 \pm 4 ^d
	1/5	32,6	23 \pm 2 ^b	77	55 \pm 3 ^c
	1/10	16,3	7,3 \pm 0,1 ^a	92,7	47 \pm 2 ^b
	1/20	8,15	11 \pm 2 ^a	89	21 \pm 1 ^a
BR_{esb}	-	nd	74 \pm 2 ^c	26	-
	1/5	nd	55 \pm 8 ^b	45	-
	1/10	nd	31 \pm 2 ^a	69	-
	1/20	nd	23 \pm 4 ^a	77	-

nd: no detectable

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Valores de % inhibición de ROS calculados teniendo en cuenta los % de viabilidad de la muestra y de la dilución correspondiente respecto al BR

La fracción **BD_{esb}** (163 µg AGE/ml) fue capaz de producir una importante inhibición (73 %) de las ROS intracelulares, aunque con un importante nivel de citotoxicidad de 47 %. Estos valores fueron algo menores a los obtenidos para **HD_{esb}** ya que con una concentración de CF un poco menor (141 µg AGE/ml) registró un % de citotoxicidad del 56 % y un porcentaje de inhibición de las ROS del 66%. Sin embargo, para **AD_{esb}** se informó una concentración de CF superior (356 µg AGE/ml) con un porcentaje de citotoxicidad menor (33 %) y un elevado valor de inhibición de las ROS intracelulares alcanzando un 83% (*Capítulo I, Tabla I.18*). Con el fin de poder estimar mejor esa comparación, se calcularon valores de IC₅₀ mediante curvas dosis-respuesta siendo de 30,1 µg AGE/ml para **BD_{esb}**, mientras que como se informó en el *Capítulo I, sección I.4.3.2* dichos valores fueron de 42 y 17 µg AGE/ml para **HD_{esb}** y **AD_{esb}** respectivamente, por lo que la potencia antioxidante de la fracción bioaccesible de **B** mejoró con respecto a la de **H**, pero disminuyó con respecto a la de **A**.

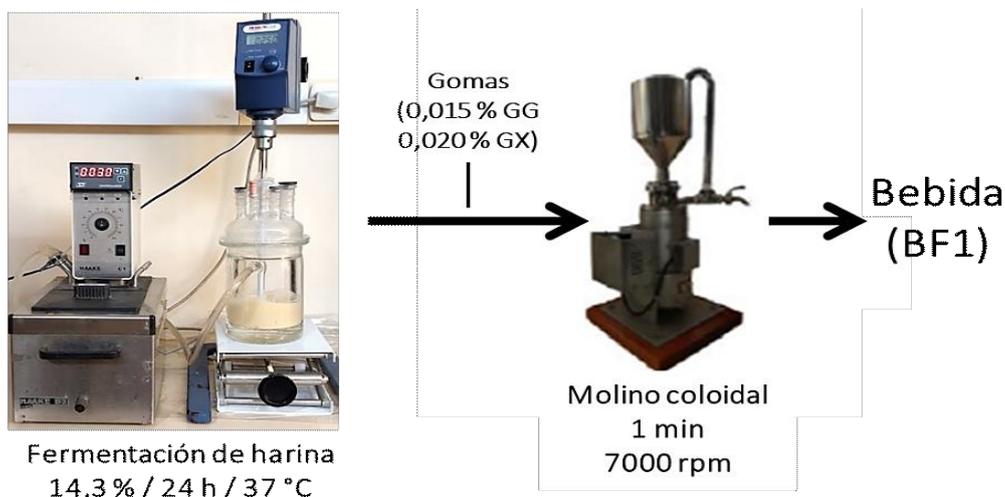
PARTE B. Bebida a base de harina de arvejas fermentada (BF)

En esta segunda formulación se partió de la harina previamente fermentada en las condiciones mostradas en el *Capítulo 2* (24 h, 37 °C) y se buscó preparar una bebida que contuviera todos los componentes de este ingrediente.

III.4.B.1 Ensayos de optimización de la preparación de BF. Viscosidad y estabilidad.

Se analizaron varios protocolos tomando como base una formulación similar a la utilizada para la preparación de **B** (PARTE A) con el objetivo de encontrar el procedimiento más adecuado para la preparación de la bebida a base de harina fermentada teniendo en cuenta que el pH final de la fermentación de la harina estaba entre 4,3 y 4,6.

Ensayo 1. En una primera prueba, se analizó el producto resultante de realizar directamente un tratamiento en molino coloidal de la harina fermentada en presencia de las gomas (**BF1**) (**Esquema III.6**). Esta formulación se probó ya que, además de ser la más sencilla, se conservaban las propiedades características de la fermentación tales como el pH. Sin embargo, este producto presentó una alta inestabilidad a pesar del agregado de gomas. Como se observa en la **Imagen III.4**, a los 10 min ya fue notorio un proceso de sedimentación, el cual se fue acentuando con el correr del tiempo.



Esquema III.6. Preparación de BF1

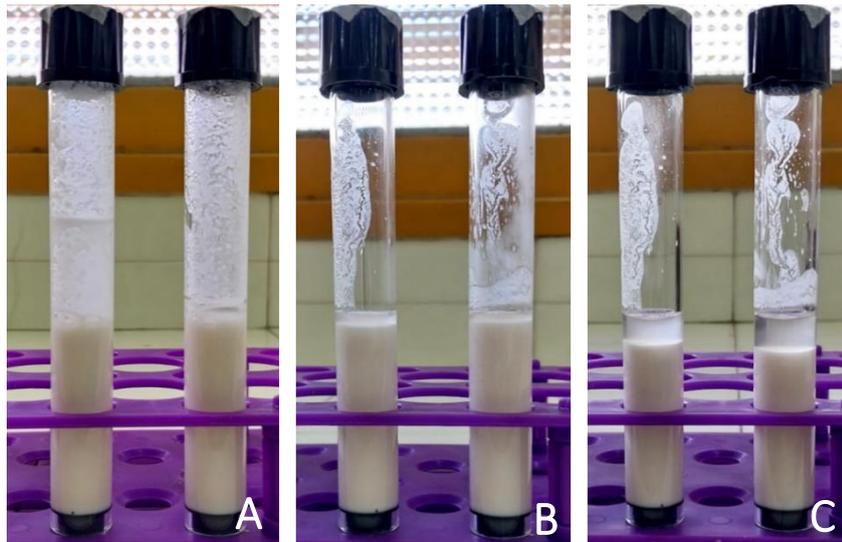


Imagen III.4. Bebida a base de harina fermentada (**BF₁**) sin pasteurizar (izq) y pasteurizada (der).
A. Recién preparada; **B.** Luego de 10 min; **C.** Luego de 100 min

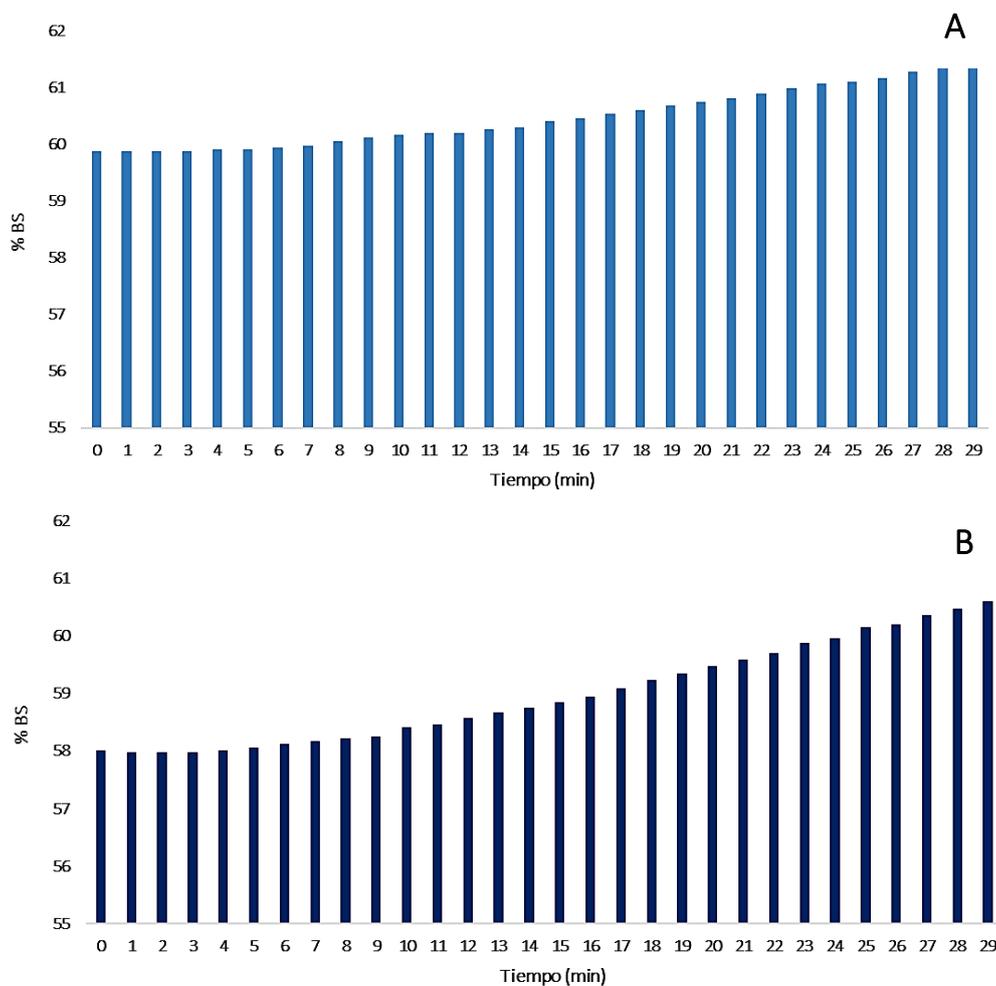
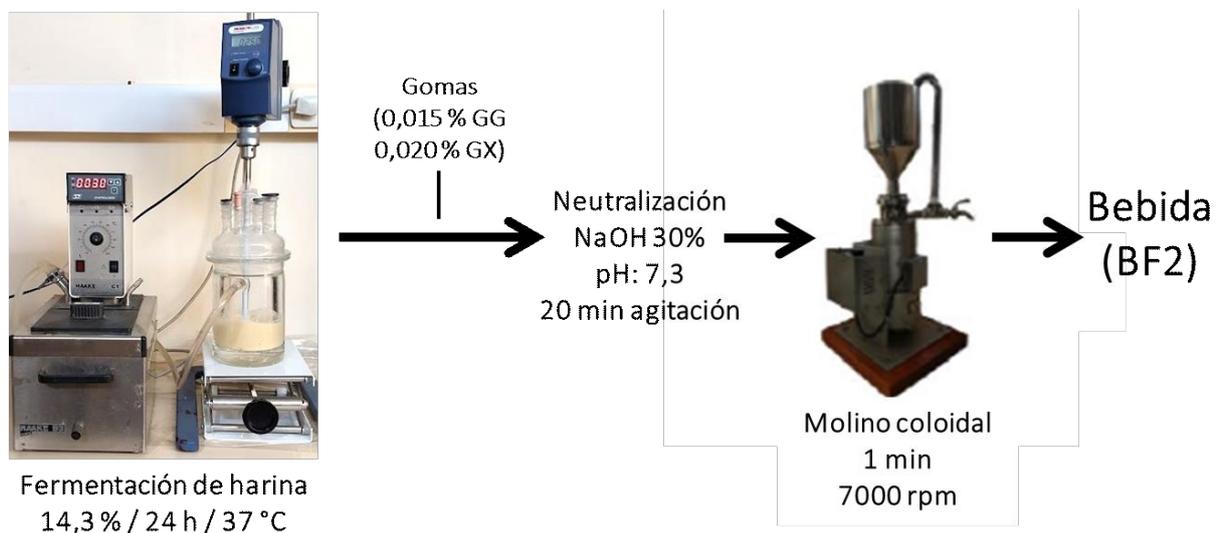


Figura III.14. % BS en la parte inferior del tubo de medida (10-15 mm) de la bebida **BF₁**. Cinética (medida cada 1 min durante 30 min) realizada inmediatamente después de la preparación y con una homogenización manual previa. **A.** sin pasteurizar. **B.** pasteurizada.

BF₁ sin pasteurizar presentó una tendencia a la desestabilización; el % BS fue en aumento desde 60 a 61,5 % luego de 30 min de preparada (**Figura III.14.A**). La **BF₁** pasteurizada resultó algo más inestable ya que sus valores de % BS comenzaron en 58 % y alcanzaron un 60,6 % luego de la media hora de ensayo (**Figura III.14.B**). Esta inestabilidad podría deberse al pH de la bebida que se mantuvo entre 4 y 5, valor cercano al punto isoeléctrico de las proteínas de arveja.

Ensayo 2. Con el fin de mejorar la estabilidad, se ensayó una neutralización llevando a pH = 7,3 (similar a **B**) luego del agregado de las gomas (**Esquema III.4**), obteniéndose la bebida a base de harina fermentada **BF₂**.



Esquema III.7. Preparación de BF₂

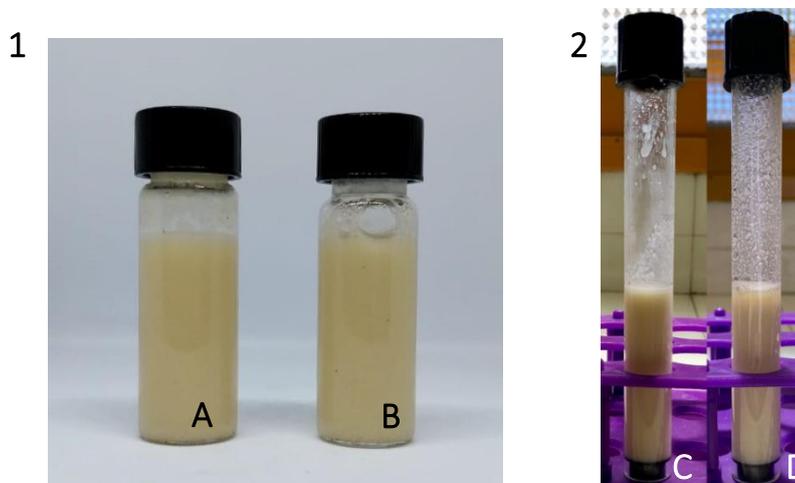


Imagen III.5. 1. Bebida a base de harina fermentada neutralizada (**BF₂**) A. sin pasteurizar; B. pasteurizada. 2. Bebida pasteurizada C. sistema inicial; D. luego de 60 min.

En el análisis visual se observó una mayor estabilidad de **BF₂** en comparación con **BF₁**, ya que recién a los 60 min comenzó a ser evidente una leve sedimentación (**Imagen III.5.2**). La estabilidad de **BF₂** fue evaluada mediante % de BS. Se observó que hasta los 5 min la bebida permaneció estable (los % BS en ambas zonas del tubo fueron similares) pero luego, el sistema comenzó a perder estabilidad ya que los valores obtenidos en la parte superior del tubo empezaron a disminuir y los de la parte inferior a aumentar (**Figura III.15**). Esto indicó un aumento en la decantación de partículas presentes en la bebida a medida que transcurrió el tiempo de ensayo.

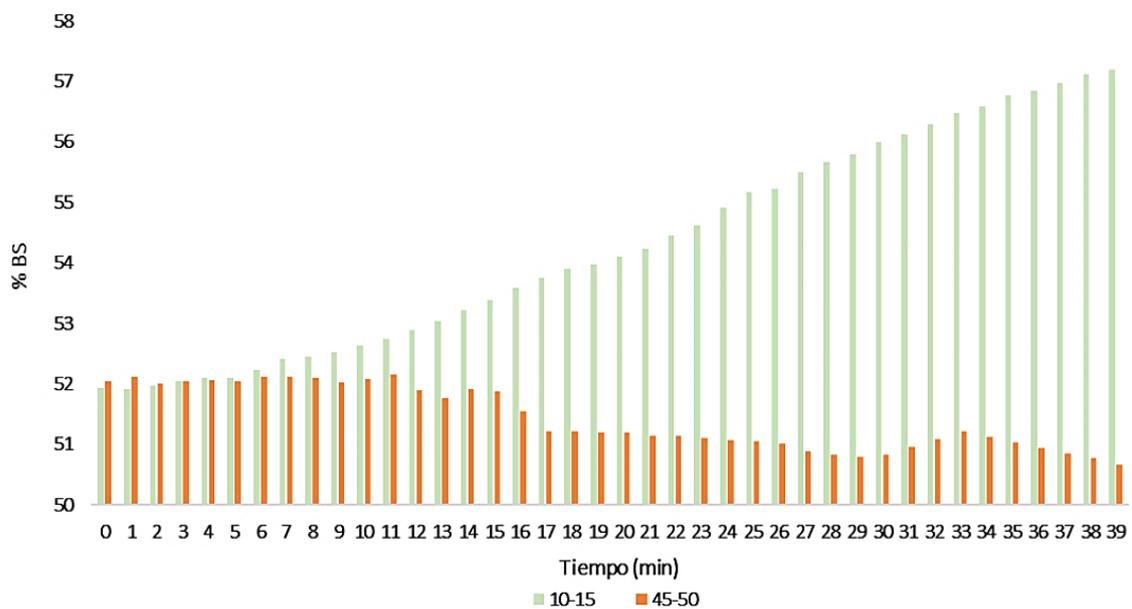


Figura III.15. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de la bebida **BF₂**. Cinética medida cada 1 min durante 40 min.

Ensayo 3. El siguiente paso para mejorar la estabilidad de la formulación fue realizar una neutralización (pH = 7,3) antes del agregado de las gomas (**Esquema III.8**) obteniéndose **BF₃**. En el análisis visual se observó un ligero cambio de color respecto a **BF₁** y **BF₂** y aceptable estabilidad ya que la separación de fases fue pequeña luego de 60 min (**Imagen III.6.2.D**). La estabilidad de **BF₃** también fue evaluada mediante % BS. En este caso se observó una mayor estabilidad en comparación con **BF₂**, con menos de 2 % de diferencia en el % BS inicial de ambas secciones del tubo de medida y sin cambios evidentes a lo largo de 40 min (**Figura III.16**). Esto indicó que era necesario neutralizar el medio antes del agregado de las gomas, posiblemente tanto para impedir la agregación proteína-proteína como para reducir la agregación dada por

interacción entre las proteínas y las gomas ya que a pH de 7,3 tanto las proteínas como la goma xántica ($pK_a \sim 3$) se encontrarían negativamente cargadas.

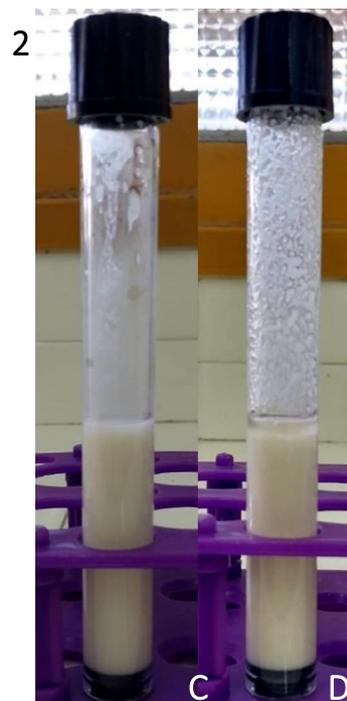
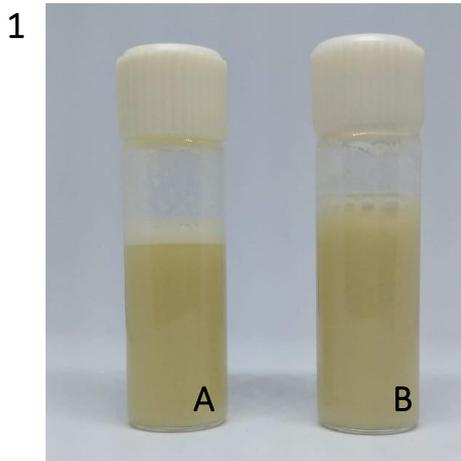
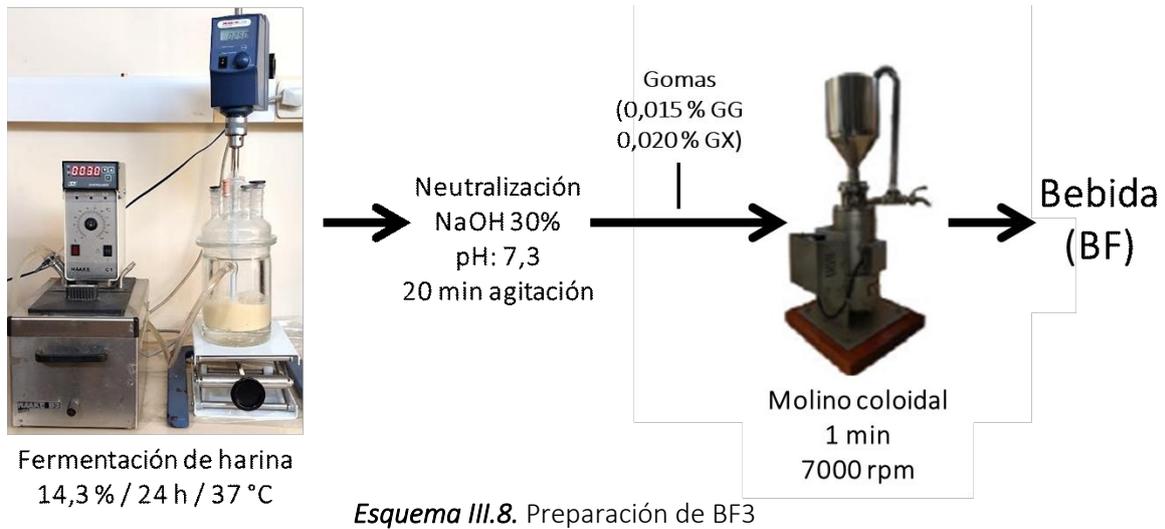


Imagen III.6. 1. Bebidas a base de harina fermentada neutralizada antes del agregado de las gomas (BF₃) A. sin pasteurizar; B. pasteurizada; 2. Bebida pasteurizada C. sistema inicial; D. luego de 60 min.

Cortez Trejo et al. (2021) estudiaron el comportamiento de compatibilidad de cuatro aislados proteicos (aislado proteico de amaranto, aislado proteico rico en globulina de amaranto, aislado proteico de poroto y aislado proteico rico en faseolina de poroto) con goma xantano en medio acuoso bajo diferentes condiciones de pH (2–12). Estos autores confirmaron la presencia de interacciones asociativas entre las proteínas y la goma. En las condiciones de

pH donde la proteína y la goma xantano tienen cargas opuestas, se han demostrado comportamientos de agregación, mientras que a $pH > pI$ donde ambos biopolímeros tienen carga negativa ocurrirían otras interacciones intermoleculares como los enlaces de hidrógeno. Según nuestras observaciones, estas últimas interacciones no llevarían a agregación con insolubilización.

A partir de los resultados obtenidos, para la preparación de la bebida a base de harina de arveja fermentada, se decidió utilizar el protocolo 3 y la nomenclatura a usar para la misma a partir de este momento será **BF**.

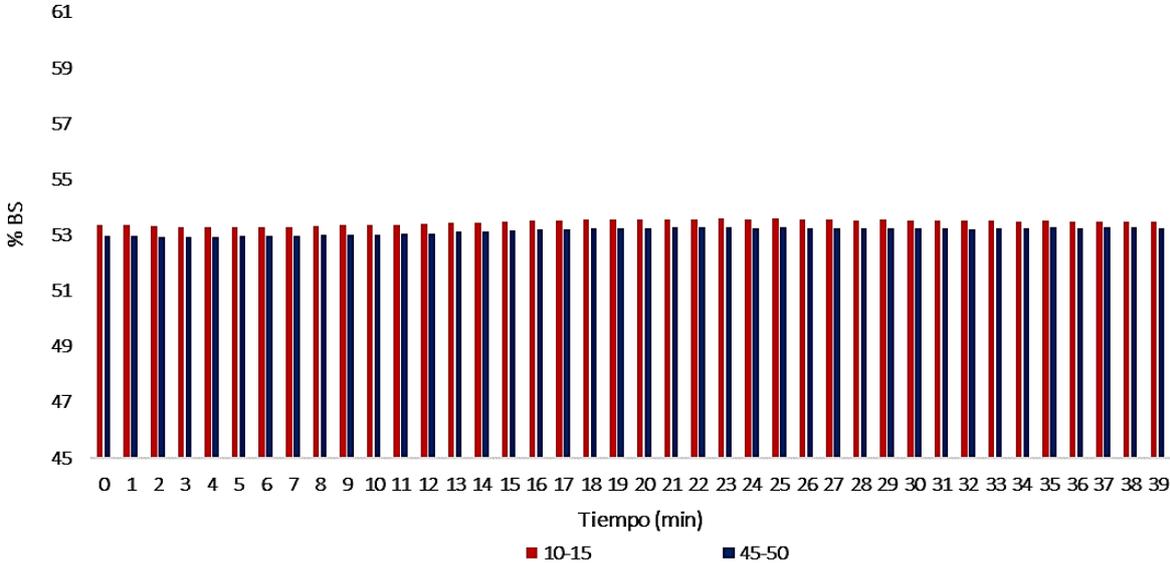


Figura III.16. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de la bebida BF₃. Cinética medida cada 1 min durante 40 min.

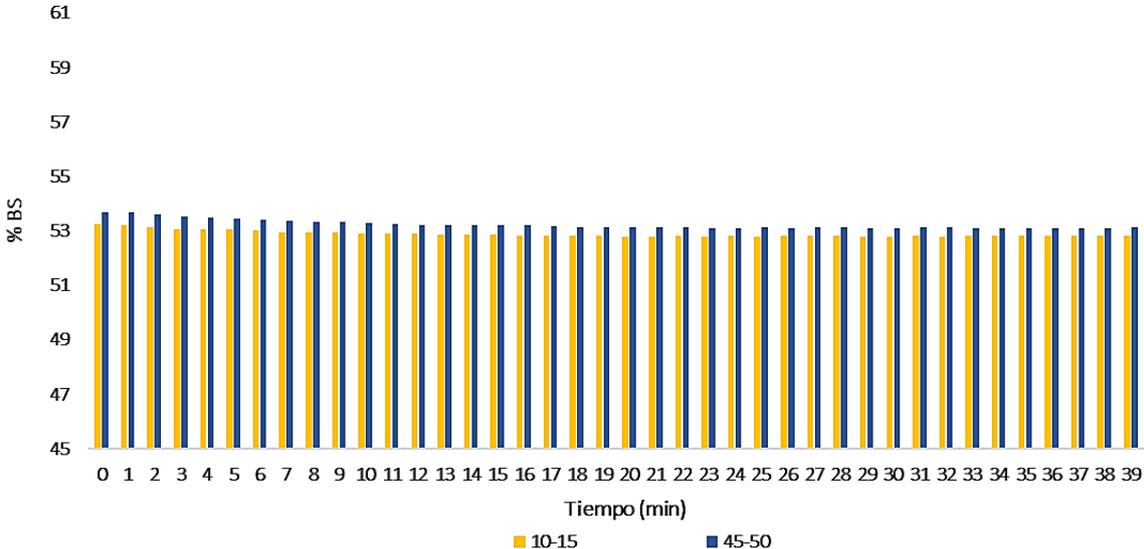


Figura III.17. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de BF. Cinética realizada a los 7 días de preparada la bebida (medida cada 1 min durante 40 min)

BF se mantuvo físicamente estable luego de 7 días (Figura III.17) y 21 días (Figura III.18) de almacenamiento a 4 °C, permaneciendo prácticamente constante el % BS tanto en la parte inferior como en la superior del tubo de medida realizando una agitación manual previa a la medida.

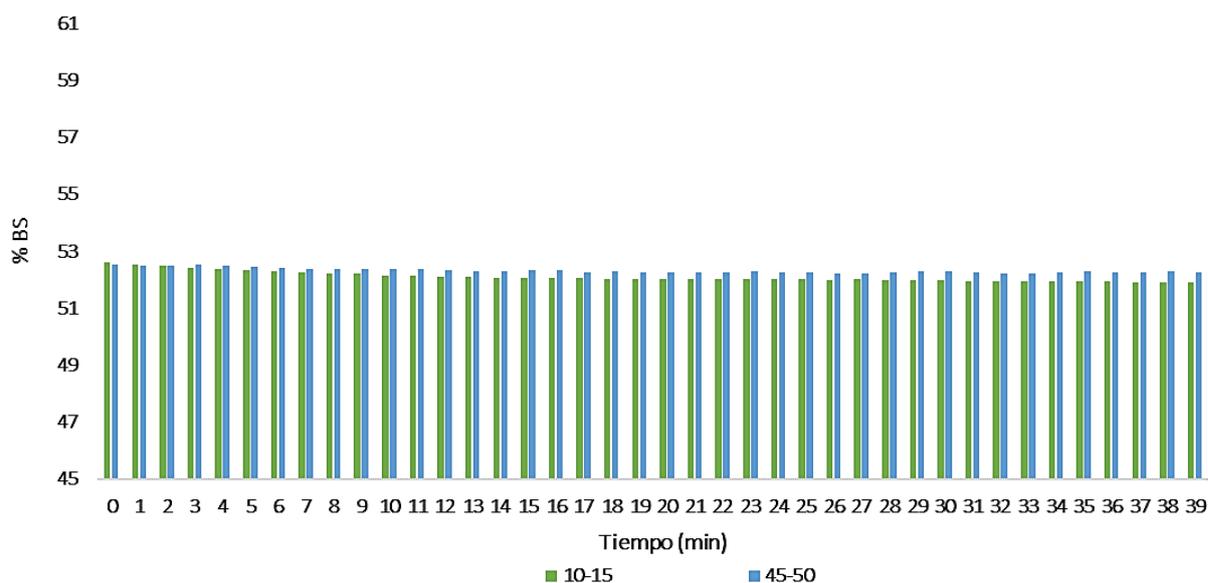


Figura III.18. % BS en las partes inferior (10-15 mm) y superior (45-50 mm) del tubo de medida de BF. Cinética realizada a los 21 días de almacenamiento a 4°C (medida cada 1 min durante 40 min)

III.4.B.2 Análisis microbiológico

Se evaluó el comportamiento microbiológico de BF utilizando agar nutritivo (AN) como medio general, medio MRS con factor de selección (anaerobiosis) para bacterias ácido-lácticas y medio YGC para crecimiento de hongos y levaduras. Para poder comparar los valores obtenidos, se tomaron como controles: la dispersión de la harina de arveja (mezcla de harina y agua destilada en la misma proporción que en la bebida), y la bebida preparada a partir de la harina fermentada, pero sin el proceso de pasteurización.

El recuento microbiano en AN correspondiente a la dispersión de harina dio valores menores (alrededor de 1 orden de magnitud) a los reportados para la harina en el *Capítulo II* (Tabla III.13), mientras que no se detectó crecimiento en el medio MRS. Otra diferencia hallada fue la presencia de hongos/levaduras que no se habían detectado en las harinas del *Capítulo II*. Esto podría deberse a que hubo un cambio en la partida de las semillas de arvejas, ya que para la obtención de BF se utilizaron semillas de arvejas de la misma variedad (Yams) cosechadas en

la localidad de Salto (provincia de Buenos Aires) en diciembre de 2023, conservadas en heladera en bolsa de arpillera plástica y utilizadas luego de 3 meses de almacenamiento. Por otro lado, como se detalló en el *Capítulo II (sección II.4.2.1)*, las arvejas usadas en aquel caso estuvieron conservadas entre 2 y 3 años. Las diferencias encontradas podrían estar relacionadas con factores ambientales y de cultivo y con el almacenamiento poscosecha como se discutió en el *Capítulo II*.

Así como los recuentos en AN de la dispersión fueron menores, los valores alcanzados luego de la fermentación (24 h, 37 °C) también fueron menores (casi 2 órdenes de magnitud) a los obtenidos en las harinas fermentadas del *Capítulo II*, tanto en el medio AN como MRS. En este caso también se pudieron detectar colonias en medio YGC con un valor duplicado respecto al inicial. En **B** (sin fermentación) estudiada en la sección anterior, para la bebida no pasteurizada recién preparada no se observaron colonias en ninguno de los tres medios evaluados.

Tabla III.13. Recuentos microbianos (log ufc/g) de la dispersión de harina no fermentada y la bebida fermentada sin pasteurizar.

Muestra	MRS	AN	YGC
Dispersión harina	nd	3,4 ± 0,1	1,37 ± 0,09
BF Sin Pasteurizar	7,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	2,9 ± 0,6

nd: no detectable

Luego de la pasteurización (63 °C, 30 min) se obtuvo una reducción del recuento microbiano de **BF**, que estuvo entre 2 y 3 órdenes de magnitud en los tres medios ensayados (BF tiempo 0 en la **Tabla III.14** respecto a BF sin pasteurizar en la **Tabla III.13**), haciéndose indetectables los hongos y levaduras.

Tabla III.14. Recuentos microbianos (log ufc/g) de la bebida fermentada pasteurizada y almacenada a 4 °C.

Tiempo (días)	pH	Recuento microbiano (log ufc/g)		
		MRS	AN	YGC
0	7,32 ± 0,02 ^b	4,1 ± 0,1 ^a	5,4 ± 0,1 ^a	-
7	7,2 ± 0,1 ^b	5,8 ± 0,1 ^b	7,2 ± 0,3 ^b	4,5 ± 0,1 ^a
21	6,84 ± 0,03 ^a	7,6 ± 0,3 ^c	8,3 ± 0,1 ^c	7,1 ± 0,1 ^b

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05)

El análisis microbiológico de **BF** en función del tiempo de almacenamiento mostró un aumento sostenido de la carga microbiana (**Tabla III.14**). Esto podría deberse a que, con el objetivo de mejorar la estabilidad física, el pH fue llevado cercano a la neutralidad (7,3) y esto podría haber contribuido al aumento de la carga microbiana, dado que es un pH favorable para el crecimiento de microorganismos. Como se observa en la **Tabla III.14** el aumento se dio en todos los medios evaluados, siendo más relevante para hongos y levaduras ya que el aumento en YGC fue de 7 órdenes de magnitud respecto al inicial (no detectable) luego de 21 días de almacenamiento, mientras que para AN y MRS fue de 3 órdenes en ambos medios. El proceso de pasteurización inactiva microorganismos patógenos no formadores de esporas, bacterias psicrotróficas de descomposición, por ejemplo, *Pseudomonas* y enterobacterias Gram negativas (no esporas ni bacterias termófilas, por ejemplo, *Streptococcus*, *Enterococcus*) (Lindsay et al., 2021). Como es sabido, extender la vida útil de una bebida es un equilibrio entre la calidad microbiológica, la aceptabilidad organoléptica y el daño químico que se le puede producir; a mayor temperatura y/o tiempo, mayor seguridad microbiológica tendrá el producto, pero habrá también mayores modificaciones químicas, pérdidas de nutrientes y bioactivos y resultará menos aceptable organolépticamente. Mayr et al. (2004) realizaron un estudio sobre los microorganismos que sobrevivían luego de un tratamiento térmico en la leche vacuna e informaron que cuando se produjo deterioro microbiológico en 191 muestras, encontraron que 76 de las muestras contenían formadores de esporas aeróbicas, mientras que 31 contenían bacterias Gram negativas.

Analizando la normativa de nuestro país, el capítulo XIII del Código Alimentario Argentino trata sobre bebidas fermentadas, pero no incluye bebidas vegetales fermentadas. El mismo sólo tiene reglamentación sobre cerveza y derivados, hidromiel, kombucha, sidra y vinos y afines.

Dezidero et al. (2023) prepararon bebidas fermentadas de diferentes fuentes naturales (avena, arroz, almendras nueces y soja) las cuales fueron fermentadas mediante un inóculo de bacterias lácticas durante 12 h a 37 °C alcanzando valores de pH final entre 3,82 y 4,37 y se almacenaron a 5 °C durante 28 días. La población bacteriana se mantuvo estable (entre 9 y 10 log ufc/ml) en los extractos vegetales fermentados, presentando únicamente una reducción al final del período de almacenamiento. Estos son ejemplos en los que se pretende obtener bebidas fermentadas y mantener su microbiota por lo que no se pasteurizó. Estos autores

tampoco evaluaron la estabilidad física de las bebidas. Muzira Mukisa et al. (2021) estudiaron la estabilización y conservación de una bebida fermentada a base de sorgo aplicando pasteurización, agregado de goma xantano y algunos estabilizantes como sorbato de potasio o benzoato de sodio. La primera parte del estudio incluyó la evaluación de los efectos de varios tratamientos sobre la estabilidad (prevención de la separación) de la bebida. En un principio mezclaron harina de malta de sorgo y miel en agua potable y calentaron a 90 °C durante 10 min. La suspensión se enfrió a 30 °C y se inoculó con casi 6 log ufc/ml de *L. plantarum* y 4 log ufc/ml de *S. cerevisiae*. Luego, la suspensión se incubó a temperatura ambiente (25–28 °C) durante 24 h. Se analizaron cuatro tratamientos para evaluar la estabilidad de la bebida que incluyeron pasteurización sola (90 °C, 10 min), y pasteurización con el agregado de gomas o conservantes. Estos autores informaron que la goma xantano (0,25 %) fue útil para mejorar la estabilidad y la aceptabilidad sensorial de la bebida fermentada. También informaron que luego del proceso de pasteurización no se detectó crecimiento microbiano en los productos durante el almacenamiento, mientras que el pH (3,7–4,0) y la acidez (0,5–0,6%) no cambió significativamente. Además, demostraron que la pasteurización sola sin conservantes puede utilizarse para extender la vida útil de esa bebida al menos a cuatro meses. Por lo tanto, concluyeron que se puede adoptar el uso de goma xantano y pasteurización para estabilizar bebidas de cereales fermentadas tradicionales sin necesidad de agregar estabilizantes. Sin embargo, este trabajo no evaluó la microbiología a lo largo del almacenamiento de la bebida.

En el presente trabajo, se analizó la estabilidad de la bebida fermentada por el agregado de dos gomas con posterior pasteurización (30 min, 63 °C) y se encontró que fue físicamente estable hasta los 21 días de almacenamiento aunque con un aumento continuo de las bacterias mesófilas, incluidas BAL, y de los hongos y levaduras. Será necesario a futuro estudiar en profundidad las poblaciones microbianas asociadas a este producto así como optimizar el tratamiento térmico de pasteurización.

III.4.B.3 Viscosidad

Se analizó la viscosidad de **BF** utilizando un reómetro en su modo de viscosímetro rotacional empleando la geometría plato-plato lisos. En una primera instancia se analizó el comportamiento de flujo de la bebida fermentada sin pasteurizar frente a la pasteurizada. Como se puede observar en la **Figura III.22**, ambas muestras presentaron un comportamiento

del tipo no-newtoniano pseudo-plástico al igual que sucedió con **B**. En las curvas obtenidas para estas bebidas fermentadas, también se observó que hubo histéresis. Bernat et al. (2014) informaron también un comportamiento tixotrópico para bebidas fermentadas a base de almendras.

Al analizar los valores de viscosidad (500 s^{-1}) (Tabla III.15), como era de esperar dada la composición de cada una, los valores obtenidos para **BF** fueron superiores a los de la bebida sin fermentar (**B**). Además, se encontró que la pasteurización aumentó casi al doble el valor de la viscosidad de **BF**. Este comportamiento no se observó en **B** ya que no se encontraron diferencias significativas entre **B** sin pasteurizar y pasteurizada (Tabla III.2). Este aumento de la viscosidad podría deberse a varios factores relacionados con los cambios estructurales y químicos que ocurren en los componentes de la bebida durante la fermentación y el tratamiento térmico posterior como podría ser la desnaturalización y agregación de proteínas, un comienzo del proceso de gelatinización del almidón, la interacción entre componentes como proteínas y polisacáridos y la posible liberación de exopolisacáridos y otros componentes celulares por microorganismos.

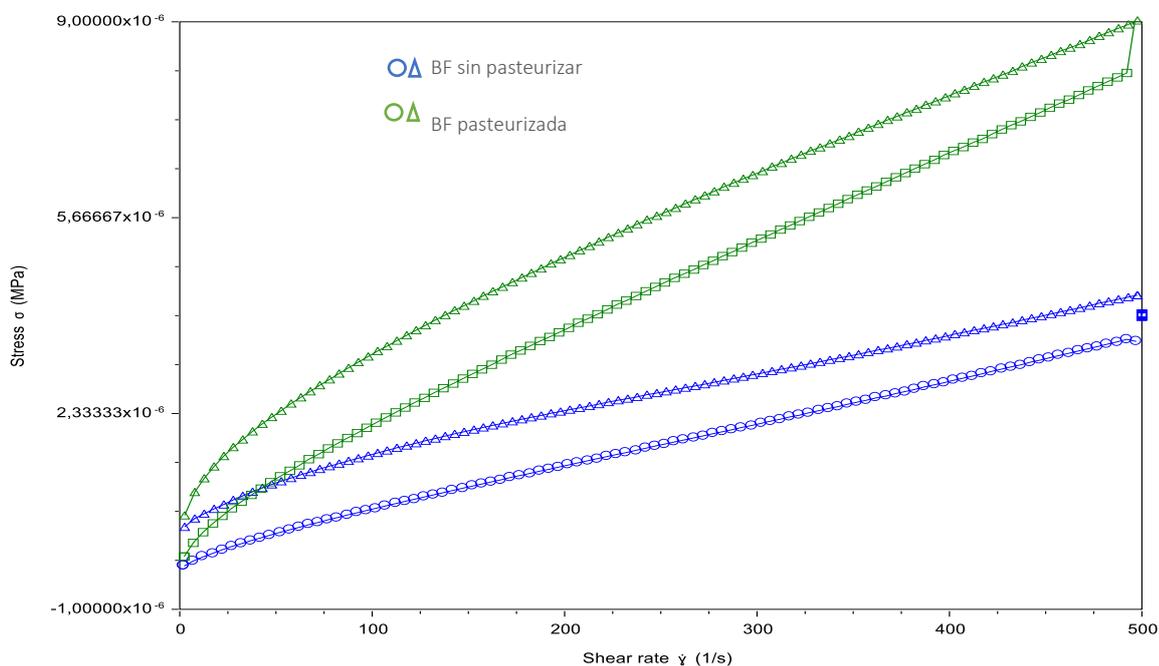


Figura III.22. Ensayos de viscosimetría rotacional de **BF** pasteurizada y sin pasteurizar. Las muestras se homogeneizaron manualmente antes de la medida. **A.** Comportamiento de flujo; Δ ida; \circ vuelta

Tabla III.15. Viscosidad aparente (500 s^{-1}) de BF sin pasteurizar y pasteurizada

Muestra	Viscosidad (mPa.s)
BF sin past	$8,02 \pm 0,03^a$
BF pasteurizada	$15,36 \pm 0,08^b$

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Al analizar los valores de la viscosidad de BF pasteurizada durante el tiempo de almacenamiento (**Tabla III.16**), se encontró que la viscosidad aumentó alcanzando un valor final 1,5 veces superior al inicial a los 21 días. Cabe destacar que en esta bebida no se realizaron medidas más allá de los 21 días ya que a ese tiempo ya se detectaron importantes cambios organolépticos (cambios en color y fundamentalmente olor) acompañados de los cambios microbiológicos antes descritos (*sección III.4.2.2*). Estos aumentos en los valores de viscosidad podrían estar relacionados con la modificación en la carga microbiana y la posible liberación de distintas macromoléculas al medio durante el período de almacenamiento. Por ejemplo, Iskakova et al. (2019) realizaron una fermentación de mosto de Bozo (cereal) triturado utilizando especies de levadura como *S. cerevisiae* y bacterias ácido lácticas como *L. plantarum*, *P. parvulus*, *L. casei* a 22-25 °C durante 24 h. Después de la fermentación filtraron el fermento y lo almacenaron a 4-6 °C. Evaluaron las características reológicas luego de los 7, 15 y 21 días de almacenamiento e informaron un aumento de la viscosidad efectiva de 1,3 veces tras 21 días. Los autores concluyeron que una posible razón del cambio en el comportamiento del flujo fue un aumento de la concentración de células de levadura en la muestra, ya que tienen una morfología celular (tamaño, forma y masa) mayor que las bacterias ácido lácticas.

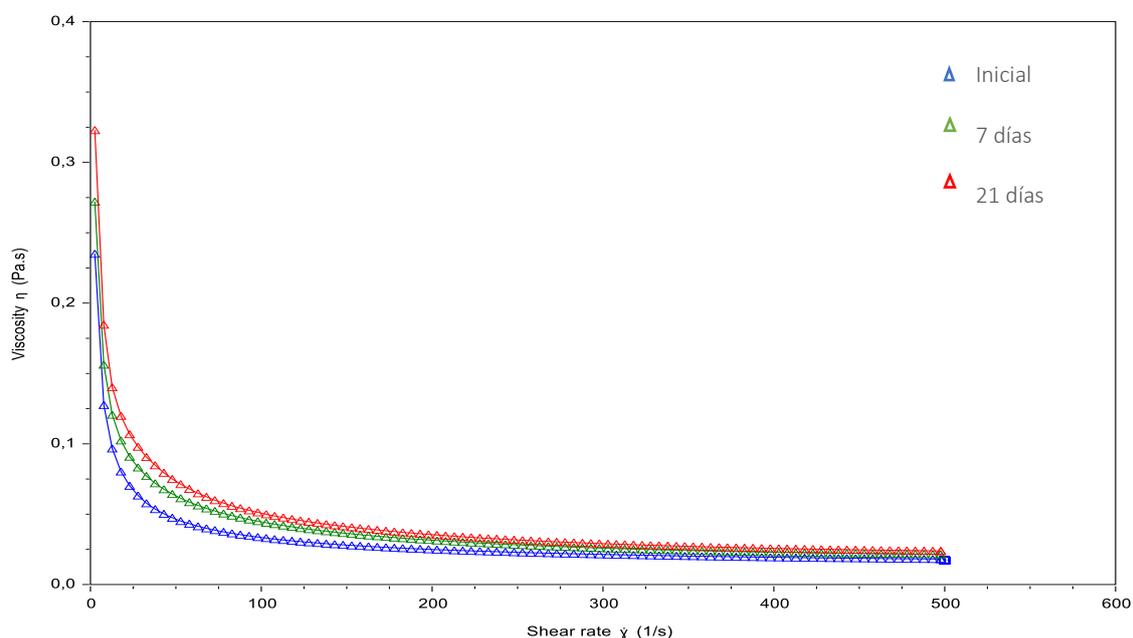


Figura III.23. Análisis de viscosidad de BF en función del tiempo de almacenamiento. Las muestras fueron homogeneizadas manualmente antes de la medida. 344

Tabla III.16. Viscosidad aparente (500 s^{-1}) de **BF** pasteurizada en función del tiempo del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	Viscosidad (mPa.s)
inicial	$15,36 \pm 0,08^a$
7	$20,7 \pm 0,1^b$
21	$23,0 \pm 0,2^c$

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

III.4.B.4 Composición centesimal

Se analizó la composición centesimal de la bebida preparada a base de harina fermentada (**Tabla III.17**). Como era de esperar por su formulación, **BF** presentó un mayor contenido de carbohidratos, de lípidos, y también un mayor contenido de FDT que **B** (ver **Tabla III.1**), pero el contenido proteico fue similar y se mantuvo en torno al de la mayoría de las bebidas de origen vegetal disponibles comercialmente.

Tabla III.17. Composición centesimal de **BF** liofilizada y **BF** fluida en base seca (b.s.) y base húmeda (b.h.).

Muestra	Lípidos	Proteína	Cenizas	Carbohidratos	FDT	Humedad
BF liof b.h.	$0,73 \pm 0,03$	$19,1 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,2$	55,93	$15,4 \pm 0,04$	$4,74 \pm 0,01$
BF fluida b.s.	0,80	21,1	4,51	59,16*	16,97	
BF fluida b.h.	0,09	2,34	0,50	6,56*	1,88	$88,9 \pm 0,1$

* Calculado por diferencia
FDT: Fibra dietaria total

La energía aportada cada 100 g de **BF** es de 36,41 kcal. Este valor fue superior al obtenido para **B** lo cual está relacionado con el mayor aporte de carbohidratos y lípidos presentes en **BF**. Como se mencionó en la *Sección III.4.1.1*, Chalupa-Krebdak et al. (2018) informaron valores entre 15 y 25 kcal para bebidas de origen vegetal, por lo tanto, el aporte energético de **BF** es un poco superior a lo presentado por esos autores.

Haciendo un análisis del aporte energético de cada macronutriente sobre el total se observó que los hidratos de carbono son la principal fuente de energía contribuyendo con el 72 % del total mientras que solo el 2,22% se debió al aporte de las grasas y el 25,7 % restante corresponde a las proteínas.

III.4.B.5 Composición polipeptídica, solubilidad. Efecto de la DGIS.

La composición peptídica/polipeptídica de **BF** fue analizada mediante electroforesis. Al igual que ocurrió en la electroforesis SDS-PAGE de **B**, **BF** también presentó agregados solubles en el buffer muestra de electroforesis (**Figura III.24**, círculo verde). En este caso, dichos agregados podrían estar relacionados con la presencia de las gomas y el tratamiento térmico aplicado para la pasteurización, pero también con el proceso de fermentación (como se analizó en el *Capítulo II*). Por otra parte, el perfil de **BF** presentó un menor número de bandas que el de **B** (**Figura III.13**) indicando una menor variedad de péptidos/polipéptidos solubles en el buffer muestra en **BF**.

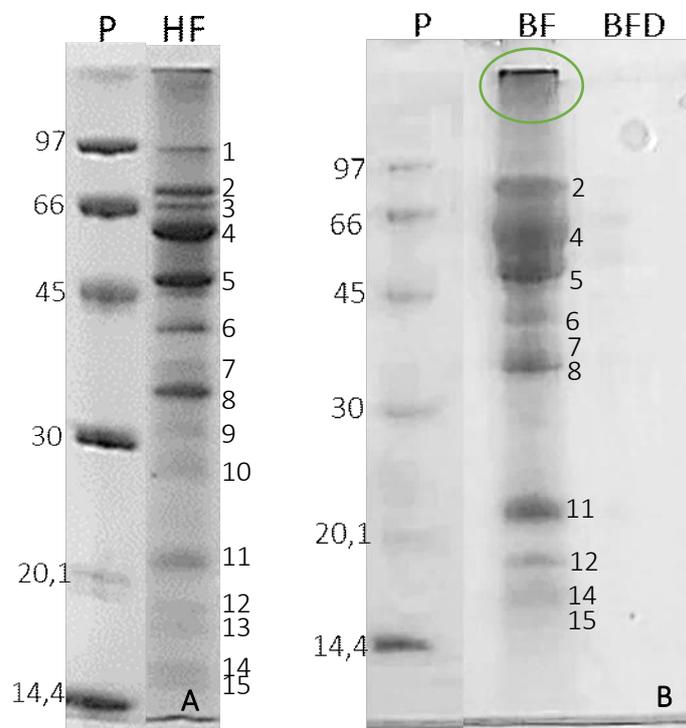


Figura III.24. Electroforesis SDS-PAGE (A) harina fermentada **HF** (B) de las muestras **BF** y **BFD**. (P) patrón de bajo peso molecular.

La electroforesis también fue comparada con el perfil obtenido para la harina de arveja fermentada (**HF2**) presentada en el *Capítulo II*. Como se muestra en la **Figura III.24**, se evidenciaron algunas diferencias entre los perfiles de **HF2** y **BF**. En primer lugar, en el perfil de **BF** no se encontraron o disminuyeron mucho su intensidad algunas bandas que sí aparecían en el perfil de **HF2** (bandas 1, 3, 9-10 y 13). Por otra parte, en **BF** se encontró que la intensidad de la banda que no entra en el gel correspondiente a los agregados, fue mayor que en **HF2** y esto podría deberse a las gomas presentes en **BF**. Aunque debe tenerse presente que las **HF2** y **BF**

fueron preparadas con dos partidas de arvejas diferentes, estos cambios en el perfil polipeptídico se corresponden con las modificaciones producidas por la presencia de gomas y el tratamiento térmico como se mencionó previamente para el caso de **B** (sección III.4.1.5). Finalmente, cabe remarcar que el GH de **BF** fue superior al de **HF2** (30 ± 2 y 20 ± 2 respectivamente)

Al analizar el perfil electroforético de **BFD** (Figura III.24), se observó, al igual que en el caso de **BD** (Figura III.13), una ausencia total de bandas incluidos los agregados que se presentaron en el perfil de **BF** (tinción Coomassie Blue). Este comportamiento no fue observado en el digerido de **HF2D** dado que en el perfil de ese digerido se encontraron bandas remanentes luego de la DGIS aunque al igual que en **BFD** tampoco se encontraron los agregados. Cabe aclarar que **BFD** presentó un elevado grado de proteólisis (67 %, Tabla III.18) que resultó mayor al de **HF2D** (53 %).

Tabla III.18. Concentración de PS, solubilidad y GH de **BF** y **BFD**

Muestra	Proteína soluble (PS) (mg/ml)	Solubilidad proteica (g PS/100 g PT)	Grado de hidrólisis GH %
BFs	$3,0 \pm 0,9^a$	90 ± 13	30 ± 2
BFDs	$3,2 \pm 0,5^a$	100 ± 10	67 ± 2

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Con respecto a la solubilidad, a diferencia de lo observado para **B** y **BD**, en la bebida fermentada no hubo diferencias de solubilidad luego del proceso de DGIS.

Las fracciones solubles en buffer PBS fueron analizadas mediante FPLC de exclusión molecular (columna *Superdex 30*). En los cromatogramas normalizados por concentración de proteína soluble (**Figura III.25**), el soluble de la bebida **BF** (3,0 mg proteína/ml) mostró algunas modificaciones en el perfil con respecto a la fracción soluble de la harina fermentada **HF** (2,1 mg proteína/ml) previamente mostrada en el *Capítulo II* (Sección II.4.1.2), obteniéndose un menor pico correspondiente al volumen de exclusión (pico 1, PM > 10 kDa) y presentando una menor resolución de todos los picos evidenciando una probable pérdida de esos compuestos durante la preparación de la bebida.

La fracción soluble del digerido **BFD** también fue analizada mediante cromatografía de exclusión molecular usando la columna *Superdex 30*. **BFD** presentó una notable disminución del pico correspondiente al volumen de exclusión y aumento de las moléculas con PM < 6,5 kDa con respecto al cromatograma de **BF** (**Figura III.26**) debido al ataque de las enzimas digestivas. Este comportamiento también se había observado en el cromatograma de **B** versus **BD** (**Figura III.15**). Cabe remarcar que ambas bebidas digeridas obtuvieron elevados grados de hidrólisis siendo 49% para **BD** y 67 % para **BFD** por lo que este aumento de compuestos menores a 6,5 kDa era lo esperable.

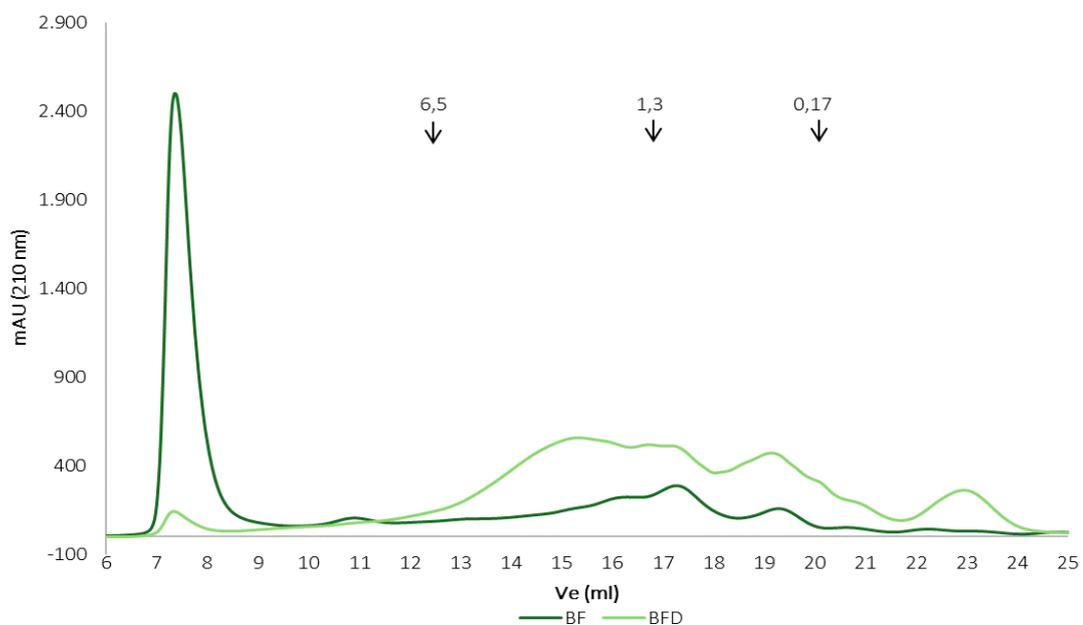


Figura III.26. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna *Superdex 30*) de **BF_s** y **BFD_s**. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

Cuando se compararon los perfiles FPLC de filtración en gel de **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}** (Figura III.27), se observó que, al igual que en **BD_{sd}** (Figura III.16), el pico correspondiente a V_0 (pico 1) fue muy pequeño para **BFD_{sd}** y no apareció en **BFD_{sb}** (como en **BD_{sb}**). Esto, como se mencionó previamente, puede atribuirse al proceso utilizado para la eliminación de las sales biliares, mientras que los perfiles fueron semejantes para $PM < 6,5$ kDa con una menor proporción de esas moléculas y una desaparición de moléculas menores a 0,1 kDa (pico 2) en **BFD_{sb}**. Como sucedió para **BD_{sd}** y **BD_{sb}**, hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la concentración de proteína de **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}** (Tabla III.19), lo cual es congruente con lo observado en los cromatogramas en los cuales se registró que en la fracción bioaccesible hubo una pérdida de compuestos en todo el rango de corrida.

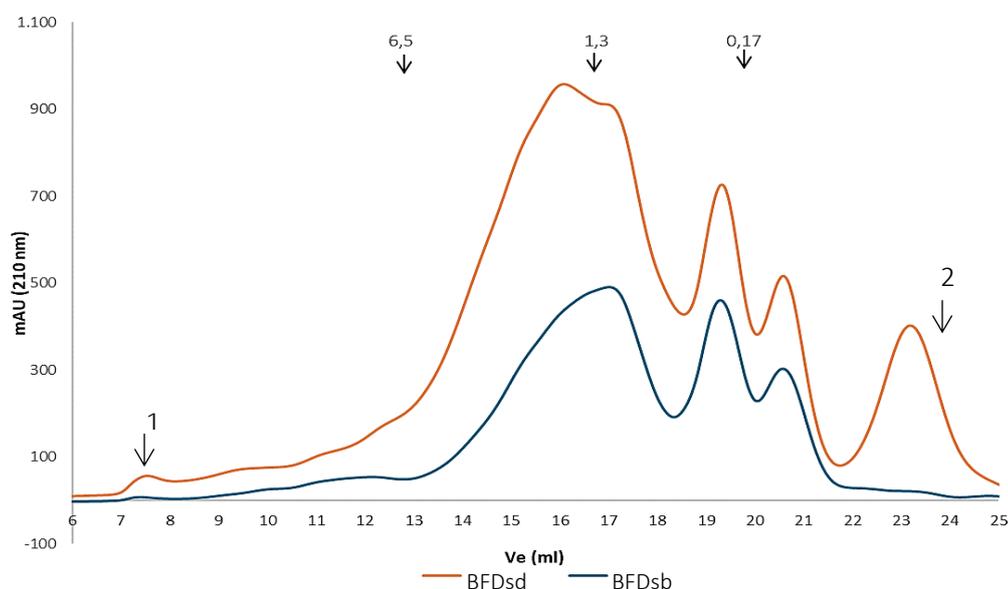


Figura III.27. Cromatogramas FPLC de filtración en gel (columna Superdex 30) de **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}**. Se indican los marcadores de PM en la parte superior.

III.4.B.6. Actividad antioxidante *in vitro* acelar de la fracción peptídica.

Se llevó a cabo una primera aproximación a la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones solubles en buffer PBS de **BF** (**BF_s**) y de su digerido gastrointestinal (**BFD_s**), así como del soluble directo (**BFD_{sd}**) y bioaccesible **BFD_{sb}** aplicando dos metodologías: método ORAC y secuestro del radical ABTS⁺.

Como se explicó anteriormente, por ambas metodologías se ensayaron las fracciones solubles en diferentes concentraciones a fin de obtener curvas dosis-respuesta y calcular los valores de IC₅₀ para cada muestra (**Tabla III.19**).

Analizando la actividad antioxidante medida por el método de ORAC se encontró que hubo un aumento significativo ($p < 0,05$, alrededor de 2 veces) de la potencia de todas las fracciones digeridas (incluida la bioaccesible), sin diferencias significativas entre ellas, con respecto a la bebida fermentada sin digerir. Este mismo comportamiento se observó en las fracciones acuosas de **B** cuando fueron evaluadas por el método de ORAC (**Tabla III.7**).

Tabla III.19. Actividad antioxidante acelular de las fracciones solubles acuosas.

Muestra	Proteína soluble (PS) (mg/ml)	ORAC IC ₅₀ (mg/ml)	ABTS IC ₅₀ (mg/ml)
BF _s	3,0 ± 0,9 ^{ab}	0,06 ± 0,01 ^b	1,0 ± 0,1 ^c
BFD _s	3,2 ± 0,5 ^{ab}	0,031 ± 0,005 ^{aA}	0,18 ± 0,02 ^{aA}
BFD _{sd}	3,5 ± 0,7 ^b	0,024 ± 0,003 ^{aA}	0,5 ± 0,1 ^{bB}
BFD _{sb}	1,5 ± 0,2 ^a	0,034 ± 0,003 ^{aA}	0,4 ± 0,1 ^{abAB}

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas, estadística realizada sobre todas las muestras, letras mayúsculas, estadística realizada entre los digeridos

Cuando la capacidad antioxidante fue evaluada por el método de secuestro del radical ABTS⁺ se registró un aumento de la potencia en las fracciones digeridas, pero en este caso con algunas diferencias entre ellas. La fracción soluble en PBS presentó el menor valor de IC₅₀ mientras que entre las fracciones soluble directa y bioaccesible no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). Similar comportamiento se registró para las fracciones de **B** analizadas por el método de ABTS (**Tabla III.7**).

Comparando los valores de IC₅₀ obtenidos para **B** (**Tabla III.7**) y **BF** (**Tabla III.19**) se observa una mayor potencia antioxidante de las fracciones solubles acuosas de **BF**. Durante la fermentación de materiales vegetales se genera un grupo diverso de compuestos y metabolitos bioactivos. En particular, los microorganismos utilizados para el proceso de fermentación hidrolizan oligosacáridos y proteínas presentes en plantas que comúnmente no se digieren en el intestino humano (Hidalgo-Fuentes et al., 2024). Según los resultados obtenidos, estas transformaciones, especialmente las ocurridas sobre las proteínas aunque no pueden descartarse otros componentes solubles en agua, liberarían compuestos con potencial actividad antioxidante que pudieron ser evaluados por ambos métodos. Sin embargo, luego del

proceso de DGIS no se registraron diferencias en la potencia antioxidante por estas dos metodologías.

III.4.B.7 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales de la fracción acuosa.

Así como se realizó previamente para HD, AD, HFD y BD, para lograr una mayor aproximación a la potencial actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos presentes en BFD se llevaron a cabo ensayos celulares. Para ello, se utilizó la fracción bioaccesible de los mismos.

Los resultados obtenidos indicaron que la fracción bioaccesible (BFD_{sb}) sin dilución mostró una muy baja citotoxicidad (Tabla III.20), aún menor que la obtenida para la misma dilución de BD_{sb} (Tabla III.8) con concentraciones proteicas comparables (1,5 y 2 mg/ml para BFD_{sb} y BD_{sb}, respectivamente).

Tabla III.20. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (BFD_{sb} y BR_{sb}) en diferentes concentraciones.

Muestra	Dilución	C _{prot} (mg/ml)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
BFD _{sb}	-	1,5	6 ± 2 ^a	94	86 ± 2 ^c
	1/5	0,3	6 ± 2 ^a	94	82 ± 1 ^c
	1/10	0,15	6 ± 1 ^a	94	67 ± 1 ^b
	1/20	0,075	10 ± 1 ^a	90	46 ± 2 ^a
BR _{sb}	-	0,4	62 ± 1 ^d	38	-
	1/5	0,08	43 ± 1 ^c	57	-
	1/10	0,04	31 ± 4 ^b	69	-
	1/20	0,02	16 ± 2 ^a	84	-

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05)

* Valores de % inhibición de ROS calculados teniendo en cuenta los % de viabilidad de la muestra y de la dilución correspondiente respecto al BR

Se analizó el contenido de ROS intracelulares luego de la exposición de las células a las distintas fracciones solubles, empleando H₂O₂ como inductor de la oxidación. Al igual que sucedió para todas las muestras previamente analizadas (HD_{sb}, AD_{sb}, HF_{sb} y BD_{sb}) se evidenció un efecto de inhibición de las ROS intracelulares dado por la existencia de compuestos solubles que derivaron del proceso de DGIS de la muestra original. En este caso, también se observó que hubo un efecto por la concentración de péptidos/polipéptidos solubles a partir de la dilución 1/10 al disminuir los valores de inhibición de las ROS.

Como sucedió para **BD_{sb}** con respecto a **HD_{sb}** y **AD_{sb}**, en esta muestra también se registró un menor valor de proteína soluble con respecto a **HFD_{sb}** y un % de inhibición también menor con respecto a esa muestra. Se calcularon valores de IC₅₀ a partir de curvas dosis-respuesta siendo de 0,08 mg proteína/ml para **BFD_{sb}**, el cual resultó un valor comparable con el de **HFD_{sb}** (0,11 mg proteína/ml).

III.4.B.8 Caracterización de la fracción fenólica

El contenido de CFT del extracto etanólico **BF_e** obtenido por EAU (15 min, 40 % de amplitud) fue de 2,9 mg AGE/g b.s. (**Tabla III.21**) el cual resultó ser un valor bastante cercano al obtenido para **HF2_e** (2,13 mg AGE/g b.s., *Capítulo II*) mostrando que este contenido se mantiene luego de los procesos realizados en la preparación y pasteurización de **BF** e incluso entre dos partidas de arvejas diferentes. Después del proceso de DGIS, **BFD_e** presentó un aumento significativo ($p < 0,05$) y notable en el contenido de CFT del extracto etanólico en comparación con **BF_e**, siendo este valor mayor al obtenido para **HF2D_e** (5,42 mg AGE/g b.s., *Capítulo II*).

Tabla III.21. Efecto de la DGIS sobre el CFT (Folin-Ciocalteu) de los extractos etanólicos¹

Muestra		CFT (mg AGE/ml)	CFT (mg AGE/g b.s.)
Sin digerir	BF_e	0,14 ± 0,01 ^a	2,9 ± 0,2 ^a
Después de DGIS	BFD_e	0,32 ± 0,02 ^b	12,7 ± 0,1 ^c
Después de colestiramina (bioaccesible)	BFD_{esb}	0,11 ± 0,01 ^a	4,1 ± 0,3 ^b

¹ EAU: EtOH 60 %, 15 min, 40 % amplitud. En el caso de **BFD**, CFT se refirió a la masa original de **BF** usadas en la DGIS. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuando se analizaron los perfiles HPLC-DAD-FL también se encontró un mayor contenido de CF y se detectaron algunas diferencias en el perfil de **BF_e** (**Tabla III.22**) respecto al de **HF2_e** (**Tabla II.13**, *Capítulo II*). En comparación con **HF2_e**, en **BF_e** se detectó OH-tirosol, y se cuantificó un mayor contenido de los estilbenos polidatina y *trans*-resveratrol. Con respecto a los ácidos fenólicos, **BF_e** presentó un aumento de ácido cafeico y una concentración similar de ácido *p*-coumárico, mientras que cuando se analizaron los flavonoides se encontró que en los 3 cuantificados (procianidina B1, (+) catequina y quercetina) hubo un aumento en la concentración con respecto a **HF_e**. En **BF_e** solo fue posible detectar algunos de los compuestos

presentes en **HF2_e**, mientras que otros que se hallaban en la harina fermentada no fueron detectados en **BF_e** (los ácidos elágico, ferúlico y rosmarínico, y los flavonoides rutina, quercetin-3-glucósido, kaempferol-3-glucósido (-) epigallocatequina y hesperetina).

Como se discutió para **B_e** y **BD_e**, esto indicaría que, el procesamiento realizado para la obtención de las bebidas llevó a un aumento de los CF y a un cambio en la composición de los mismos (extraíbles con etanol/agua).

BFD_e también fue estudiada por HPLC-DAD-FLD. En este caso, el contenido de CF cuantificados fue menor al de **BF_e**. Esto también se había observado para **HFD_e** con respecto a **HF_e** (*Capítulo II, sección 1.4.2.4*). En el análisis de **BFD_e** frente a **BF_e** se encontró que varios compuestos fenólicos que se encontraban en **BF_e** no se detectaron en **BFD_e**. En particular, los ácidos fenólicos se perdieron todos luego de la DGIS con excepción al ácido cafeico el cual se detectó pero en menor concentración. El tirosol tampoco se detectó en **BFD_e** a diferencia del OH-tirosol el cual se detectó pero en menor concentración. En cuanto a los estilbenos, polidatina no fue detectada pero el *trans*-resveratrol se encontró en mayor concentración. En cuanto a los flavonoides, quercetin-3-galactósido, genisteína, gínestina, (-)-epicatequina, quercetina y fisetina no se detectaron en **BFD_e**. Los mismos flavonoides con excepción de (-)-epicatequina tampoco se detectaron en **BD_e**. Por otra parte, los flavonoides kaempferol-3-glucósido, (-)-epigallocatequina galato, naringenina, hesperetina y astilbina se detectaron en **BFD_e** pero no en **BF_e**. Una situación similar sucedió para **BD_e** donde kaempferol-3-glucósido, naringenina, hesperetina también se encontraron en el extracto de la bebida digerida pero no habían sido detectados en **B_e**.

Tabla III.22. Perfil de CF en los extractos etanólicos de BF y BFD ($\mu\text{g/g}$ muestra).

Compuesto fenólico	Muestra	
	BFe	BFDe
OH-Tirosol	8,3 \pm 0,5	4,2 \pm 0,4
Tirosol	5,1 \pm 0,2	nd
Ácidos fenólicos		
Ácido cafeico	63 \pm 8	2,5 \pm 0,1
Ácido sinapínico	13,5 \pm 0,9	nd
Ácido <i>p</i> -coumárico	0,27 \pm 0,01	nd
Total ácido fenólicos	76 \pm 9	2,5 \pm 0,1
Estilbenos		
Polidatina	92 \pm 13	nd
<i>trans</i> -resveratrol	15,7 \pm 0,7	33 \pm 3
Total estilbenos	108 \pm 12	33 \pm 3
Flavonoides		
Procianidina B1	55 \pm 4	6,4 \pm 0,4
Procianidina B2	6,6 \pm 0,3	5,68 \pm 0,01
Quercetin-3-galactósido	1,8 \pm 0,2	nd
Kaempferol-3-gluco­sido	nd	9 \pm 3
Genisteina	0,58 \pm 0,03	nd
Ginestina	6,6 \pm 0,2	nd
(+)-catequina	6,28 \pm 0,08	2,25 \pm 0,02
(-)-epigallocatequina		
galato	nd	23,8 \pm 0,1
(-)-epicatequina	5,5 \pm 0,3	nd
Naringenina	nd	2,0 \pm 0,7
Hesperetina	nd	5,72 \pm 0,08
Miricetina	15,57 \pm 0,08	6,77 \pm 0,04
Quercetina	22,69 \pm 0,01	nd
Fisetina	2,5 \pm 0,1	nd
Astilbina	nd	4,9 \pm 0,9
Total flavonoides	123 \pm 4	67 \pm 3
Total	321 \pm 26	107 \pm 1

nd: no detectado

III.4.B.9 Actividad antioxidante *in vitro* acelular de la fracción fenólica.

Se estudió también la actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos por EAU de **BF_e**, su digerido **BFD_e** y la fracción bioaccesible **BFD_{esb}** en este caso por el método ORAC y por el ensayo de neutralización del radical ABTS^{•+} (Tabla III.23).

Tabla III.23. Actividad ORAC y ABTS de las fracciones etanólicas de **BF**, **BFD** y **BFD_{esb}**.

Muestra	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	ORAC IC ₅₀ ($\mu\text{g AGE/ml}$)	ABTS IC ₅₀ ($\mu\text{g AGE/ml}$)
BF_e	140 \pm 1 ^a	2,0 \pm 0,4 ^a	40 \pm 2 ^b
BFD_e	320 \pm 20 ^b	1,2 \pm 0,1 ^a	9 \pm 3 ^a
BFD_{esb}	111 \pm 8 ^a	1,6 \pm 0,2 ^a	10 \pm 3 ^a

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observó que la DGIS no produjo cambios en la potencia ORAC de **BF_e**, ya que no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de IC₅₀ de **BF_e** y **BFD_e**. Este comportamiento también se había observado para **B_e** y **BD_e**, en los que, a pesar que el digerido tuvo un aumento de CFT, la actividad antioxidante medida por el método de ORAC no tuvo diferencia significativa entre ambos extractos. Cuando los extractos fueron evaluados por el método de ABTS, se observó que hubo un aumento en la potencia antioxidante tanto en la fracción digerida completa como en la bioaccesible. Este cambio también había sido registrado entre **B_e**, **BD_e** y **BD_{esb}**.

III.4.B.10 Actividad antioxidante frente a cultivos de células intestinales.

Como se mencionó en la Parte A, para lograr una mayor aproximación a la potencial actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos presentes en el extracto etanólico de **BFD**, se realizaron ensayos celulares para determinación de ROS intracelulares.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad sobre cultivos de células Caco2-TC7 de la fracción soluble bioaccesible de **BFD** (**BFD_{esb}**) así como la correspondiente al **BR**. Como se comentó previamente en la Sección III.4.1.3.3., las sales biliares presentes en los digeridos pueden producir citotoxicidad y favorecer la oxidación celular. En el caso de **BD_{esb}**, la muestra sin dilución generó una mayor citotoxicidad frente a las muestras diluidas, aunque ninguna de

las concentraciones evaluadas generó una liberación muy importante de LDH indicando que ninguna produjo daño en la integridad celular (**Tabla III.24**).

Tabla III.24. Citotoxicidad como actividad de LDH (%), su recíproco como viabilidad (%) y eliminación de ROS intracelulares de células Caco2-TC7 tratadas con fracciones bioaccesibles (**BFD_{esb}** y **BR_{esb}**) en diferentes concentraciones

Muestra	Dilución	CFT ($\mu\text{g AGE/ml}$)	LDH (% citotoxicidad)	LDH (% viabilidad)	% inhibición ROS*
BFD_{esb}	-	111 \pm 8	20 \pm 6 ^b	80	84 \pm 5 ^c
	1/5	22,2	20 \pm 4 ^b	80	56 \pm 2 ^b
	1/10	11,1	15 \pm 2 ^{ab}	85	36 \pm 8 ^a
	1/20	5,55	10 \pm 2 ^a	90	25 \pm 4 ^a
BR_{esb}	-	Nd	74 \pm 2 ^d	26	-
	1/5	Nd	55 \pm 8 ^c	45	-
	1/10	Nd	31 \pm 2 ^b	69	-
	1/20	nd	23 \pm 4 ^a	77	-

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Valores de % inhibición de ROS calculados teniendo en cuenta los % de viabilidad de la muestra y de la dilución correspondiente respecto al BR

Se analizó el contenido de ROS intracelulares luego de la exposición de las células a la fracción bioaccesible etanólica **BFD_{esb}**, empleando H₂O₂ como inductor de la oxidación. Al igual que en **BD_{sb}** (*Sección III.4.1.4.3*) los resultados mostraron un efecto de inhibición de las ROS dado por la presencia de los componentes solubles derivados de la extracción etanólica y presentó un efecto de la concentración de CFT en el rango ensayado al disminuir los valores de inhibición en las muestras más diluidas (**Tabla III.24**). Cabe destacar que los valores de CFT para **BFD_{esb}** fueron algo mayores que para **BD_{esb}** y que los valores de inhibición alcanzados en la muestra sin diluir de **BFD_{esb}** (84 \pm 5%) también fueron superiores al obtenido para **BD_{esb}** (73 \pm 4 %). A fin de comparar las potencias de esas dos fracciones, se calcularon valores de IC₅₀ a partir de dosis-respuesta obteniéndose valores de 19,1 y 30,1 $\mu\text{g AGE/ml}$ para **BFD_{esb}** y **BD_{esb}** respectivamente, evidenciando una mejora en la potencia de inhibición de ROS para la bebida fermentada.

III.5.Conclusiones

En esta parte del trabajo de Tesis se lograron encontrar formulaciones base y protocolos de obtención de dos productos bebibles a base de arvejas, con características de composición diferentes, a partir de los ingredientes estudiados en los capítulos anteriores.

En la parte A de este capítulo se llevó a cabo el análisis del desarrollo de una bebida vegetal a base de harina de arveja (**B**).

B se obtuvo a partir de harina por un proceso de solubilización alcalina seguida de separación que permite enriquecer la solución resultante en proteínas. Presentó un alto contenido proteico y bajo contenido lipídico con respecto a bebidas a base de arveja comerciales.

La estabilidad de **B** se evaluó física y microbiológicamente luego de la pasteurización:

- ✓ **B** resultó físicamente estable hasta al menos 21 días (conservada a 4 °C); si bien presentó sedimentación al estar almacenada se pudo reconstituir fácilmente mediante agitación manual.
- ✓ **B** fue microbiológicamente estable hasta al menos 14 días luego de preparada y almacenada a 4 °C.

El proceso de preparación de **B** llevó a cambios en la composición polipeptídica y polifenólica respecto a la materia prima:

Fracción peptídica:

- ✓ Se observó la pérdida de proteínas durante la preparación de **B** por la solubilización alcalina y posterior filtración, así como por la formación de agregados debido al tratamiento térmico utilizado para la pasteurización, lo cual pudo correlacionarse con el bajo valor de solubilidad proteica en buffer.

Fracción fenólica:

- ✓ **B_e** presentó diferencias en la composición de CF con respecto al de **H_e** y **A_e**. Los CF que fueron detectados en las tres muestras (OH-tirosol, procianidina B1, (+)-catequina, *trans*-reveratrol, genisteína, ácido gálico, ácido *p*-cumárico y ácido siríngico), mostraron mayor concentración en **B_e**. Además, en **B_e** fue posible detectar nuevos compuestos: ácido sinapínico, y los flavonoides fisetina, quercetina, quercetina-3-galactosido, procianidina B2, genistina y (-)-epigallocatequina galato.

*Los resultados obtenidos muestran que el procesamiento realizado en la obtención y el tratamiento térmico de **B** estarían generando cambios en la composición peptídica e induciendo el aumento de compuestos fenólicos ya sea por una mayor liberación, y/o una mayor extractabilidad de los mismos.*

B fue sometida al proceso de DGIS utilizando el protocolo de consenso internacional COST-INFOGEST.

Fracción peptídica:

- ✓ El GH de **BD** fue superior a los obtenidos en la digestión de **H** y **A**.
- ✓ En el análisis por *SDS-PAGE* se observó que en el digerido no se detectó ninguna banda, incluidos los agregados presentes en **B**.
- ✓ En los cromatogramas de filtración en gel, se evidenció el ataque enzimático ocurrido en **BD** ya que, con respecto a **B**, se observó la disminución del pico correspondiente al volumen de exclusión y la aparición de nuevos picos de PM < 6,5 kDa.

Fracción fenólica:

- ✓ **BD_e** presentó un aumento notable de CFT (cuantificables por Folin) con respecto a **B_e**.
- ✓ Los ácidos fenólicos se perdieron todos luego de la DGIS con excepción al ácido *p*-cumárico. Los flavonoides kaempferol-3-glucósido, naringenina, hesperetina y miricetina aparecieron luego de la DGIS.

*El procesamiento realizado para la obtención de **B** (extracción alcalina con eliminación de componentes fundamentalmente glucídicos y lipídicos y tratamiento térmico) contribuyeron para aumentar la digestibilidad de las proteínas de arvejas, aún en presencia de la formación de agregados en **B**. Hasta donde pudo estudiarse, los CF podrían tener una mayor protección frente a la DGIS en la matriz de la bebida que en la harina o el aislado proteico, probablemente por una combinación de factores como el tratamiento térmico y la presencia de hidrocoloides que podrían favorecer interacciones de los CF con las proteínas.*

La actividad antioxidante acelular *in vitro* se analizó para las fracciones acuosas (en PBS, directa y bioaccesible) y para la fracción etanólica (directa y bioaccesible) por los métodos de ORAC y ABTS:

Fracción acuosa:

- ✓ Luego de la DGIS, **BD_s**, **BD_{sd}** aumentaron la potencia ORAC y ABTS frente a **B_s**
- ✓ Luego del tratamiento con colestiramina, **BD_{sb}** presentó una potencia ORAC menor que **BD_s** y **BD_{sd}**, sin cambios en la potencia frente a la neutralización de ABTS

Fracción etanólica:

- ✓ **BD_e** y **BD_{esb}** no presentaron diferencias significativas en la potencia ORAC frente a **B_e**
- ✓ **BD_e** y **BD_{esb}** aumentaron la potencia ABTS con respecto a **B_e**, sin diferencias significativas entre las fracciones de los digeridos.

Las fracciones acuosas digeridas (directa y bioaccesible) presentaron un aumento en la actividad antioxidante acelular. Las fracciones etanólicas registraron comportamientos diferentes ya que por el método de ABTS se detectó un aumento de la actividad, pero por el método de ORAC, no hubo diferencias con la bebida sin digerir, por lo tanto, la DGIS no tuvo efecto sobre esta actividad de los CF.

Se realizaron ensayos de actividad antioxidante en cultivos de celulares intestinales (Caco-2 TC7), evaluando los niveles de citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles (acuosas y etanólicas) y el % de inhibición de ROS intracelulares.

Fracción acuosa:

- ✓ **BD_{sb}** presentó un nivel de citotoxicidad bajo en la fracción más concentrada, aunque algo superior al de **HD_{sb}** y al de **AD_{sb}** (9%).
- ✓ La potencia para la eliminación de ROS de **BD_{sb}** fue comparable a la obtenida para **AD_{sb}** y mayor que para **HD_{sb}**.

Fracción etanólica:

- ✓ La fracción sin diluir de **BD_{esb}** registró una citotoxicidad algo más elevada, la cual disminuyó al aumentar la dilución de la muestra.
- ✓ **BD_{esb}** presentó un valor de IC₅₀ menor al de **HD_e** pero algo mayor con respecto al de **AD_e**.

En la parte B de este capítulo se obtuvo y analizó una bebida vegetal a base de harina fermentada (**BF**). Se optimizó el protocolo de preparación a fin de lograr un producto físicamente estable.

BF presentó un mayor contenido de carbohidratos, de lípidos, y también un mayor contenido de FDT que **B**, pero el contenido proteico fue similar y se mantuvo en torno o mayor al de la mayoría de las bebidas de origen vegetal disponibles comercialmente.

La estabilidad de **BF** se evaluó física y microbiológicamente luego de la pasteurización:

- ✓ **BF** resultó físicamente estable hasta al menos 21 días (conservada a 4 °C), la cual, al igual que **B**, si bien presentó sedimentación al estar almacenada se pudo reconstituir fácilmente mediante agitación manual.
- ✓ **BF** presentó un aumento continuo de las bacterias mesófilas, incluidas BAL, y de los hongos y levaduras por lo que será necesario a futuro estudiar en profundidad las poblaciones microbianas asociadas a este producto así como optimizar el tratamiento térmico de pasteurización.

El proceso de preparación de **BF** llevó a cambios en la composición polipeptídica y polifenólica respecto a la materia prima:

Fracción peptídica:

- ✓ **BF** también registró la formación de agregados (al igual que **B**) pero el perfil electroforético presentó un menor número de bandas con respecto al de **B**.
- ✓ La fracción soluble de **BF** mostró algunas modificaciones con respecto al de **HF2**, presentando una menor resolución de todos los picos (FPLC) evidenciando una probable pérdida de esos compuestos durante la preparación de **BF**.

Fracción fenólica:

- ✓ **BF_e** presentó diferencias en la composición de CF con respecto al de **HF2_e**. En **BF_e** se detectó OH-tirosol, y se cuantificó un mayor contenido de los estilbenos polidatina y *trans*-resveratrol. Con respecto a los ácidos fenólicos, **BF_e** presentó un aumento de ácido cafeico y una concentración similar de ácido *p*-coumárico, mientras que cuando se analizaron los flavonoides se encontró que en los 3 cuantificados (procianidina B1, (+) catequina y quercetina) hubo un aumento en la concentración con respecto a **HF_e**.

Los resultados obtenidos muestran que el procesamiento realizado para la obtención de la bebida produjo una pérdida de algunos compuestos peptídicos pero llevó a un aumento de los CF y a un cambio en la composición de los mismos (extraíbles con etanol/agua).

BF también fue sometida al proceso de DGIS utilizando el protocolo de consenso internacional COST-INFOGEST.

Fracción peptídica:

- ✓ **BFD** presentó un elevado GH (67%) el cual fue superior al obtenido para **HF2D** (53%) y para **BD** (49 %)
- ✓ En el análisis por *SDS-PAGE* se observó que en el digerido no se detectó ninguna banda, incluidos los agregados presentes en **BF**.
- ✓ En los cromatogramas de filtración en gel, en **BFD** se observó la disminución de moléculas con PM > 10 kDa y la aparición de nuevos picos de PM < 6,5 kDa respecto

al perfil de **BF**. Este comportamiento evidencia el ataque enzimático producido en la DGIS.

Fracción fenólica:

- ✓ **BFD_e** presentó un aumento de CFT (cuantificados por el método de Folin) con respecto a **BF_e**
- ✓ En **BFD_e** los ácidos fenólicos se perdieron todos con excepción al ácido cafeico el cual se detectó pero en menor concentración. El tirosol tampoco se detectó en **BFD_e** a diferencia del OH-tirosol el cual se detectó pero en menor concentración. En cuanto a los estilbenos, polidatina no fue detectada pero el trans-resveratrol se encontró en mayor concentración. En cuanto a los flavonoides, quercetin-3-galactósido, genisteína, gínestina, (-)-epicatequina, quercetina y fisetina no se detectaron en **BFD_e** mientras que kaempferol-3-glucósido, (-)-epigallocatequina galato, naringenina, hesperetina y astilbina se detectaron en **BFD_e** pero no en **BF_e**.

*La fermentación previa y el procesamiento para la obtención de **BF** aumentaron la digestibilidad de las proteínas de arvejas y generaron una modificación/liberación de los CF luego de la DGIS.*

La actividad antioxidante acelular *in vitro* se analizó para las fracciones acuosas (en **BFD_s**, **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}**) y para la fracción etanólica (**BFD_e** y **BFD_{esb}**) por los métodos de ORAC y ABTS:

Fracción acuosa:

- ✓ **BFD_s**, **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}** aumentaron la potencia ORAC frente a **BF_s**
- ✓ No se encontraron diferencias significativas en la fracción bioaccesible frente a **BFD_s** y **BFD_{sd}**.
- ✓ **BFD_s**, **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}** también aumentaron la potencia ABTS con respecto a **BF_s**
- ✓ **BFD_{sd}** y **BFD_{sb}** no presentaron diferencias significativas entre ellas evaluados por el método de ABTS.

Fracción etanólica:

- ✓ **BFD_e** y **BFD_{esb}** no presentaron diferencias significativas en la potencia ORAC frente a **BF_e**
- ✓ **BFD_e** y **BFD_{esb}** aumentaron la potencia ABTS con respecto a **BF_e**, sin diferencias significativas entre los digeridos.

*Tanto las fracciones acuosas como las etanólicas presentaron un aumento en la actividad antioxidante acelular luego de la DGIS y, a diferencia de **BD** y también de **HD** y **AD**, esta actividad no disminuyó en la fracción bioaccesible. Para **HF** el comportamiento había sido bastante similar al de **BFD**, aunque en ese caso la fracción etanólica no modificó su actividad y la fracción acuosa la disminuyó en pequeña medida luego del tratamiento con colestiramina. Estos hallazgos sugieren que, para los digeridos provenientes de harina previamente fermentada, no se perderían compuestos activos por el tratamiento con colestiramina. Queda a futuro dilucidar las razones de estos resultados, que parecen constituir otra ventaja de la fermentación de la harina.*

Se realizaron ensayos de actividad antioxidante en cultivos de celulares intestinales (Caco-2 TC7), evaluando los niveles de citotoxicidad de las fracciones bioaccesibles (acuosa y etanólica) y el % de inhibición de ROS intracelulares.

Fracción acuosa:

- ✓ **BFD_{sb}** presentó un nivel de citotoxicidad bajo en todas las diluciones evaluadas similar al obtenido en **HF2D_{sb}** y algo menor con respecto al de **BD_{sb}**.
- ✓ La potencia para la eliminación de ROS de **BFD_{sb}** fue comparable con la obtenida para **HF2D_{sb}** y mayor que la de **BD_{sb}**.

Fracción etanólica:

- ✓ **BFD_{esb}** registró una citotoxicidad baja en todas las concentraciones ensayadas.
- ✓ **BFD_{esb}** presentó un valor de IC₅₀ apenas menor al de **HF2D_e** con diferencias respecto al obtenido para **BD_e**, evidenciando una mejora en la potencia de inhibición de ROS para la bebida fermentada.

Tanto la fracción bioaccesible acuosa como la etanólica de **BFD** presentaron capacidad para proteger a las células frente al daño producido por reactivos de digestión y de inhibir ROS intracelulares. Esta actividad antioxidante también mostró ser mayor debido a la fermentación previa de la harina.

En función de los resultados, se pudo concluir que estos productos muestran potencialidad para continuar su evaluación como alimentos funcionales.

Las formulaciones alcanzadas servirán como base para continuar el desarrollo de estos productos, para lo cual será necesario:

Desde el punto de vista tecnológico:

- Optimizar los tratamientos térmicos para cada bebida a fin de lograr la mayor extensión posible de la vida útil sin modificaciones que alteren la calidad organoléptica y biofuncional.
- Realizar evaluaciones sensoriales y analizar la necesidad del agregado de aditivos que mejoren la aceptabilidad (colorantes, saborizantes, enmascaradores de sabores/olores desagradables, etc).
- Profundizar los estudios de actividad antioxidante sumando ensayos *in vitro* que permitan evaluar distintos mecanismos de acción y ensayos *in vivo* en animales para finalmente realizar un ensayo en humanos donde se evalúen cambios en los bioamarcadores de estrés oxidativo. En paralelo, será interesante evaluar otros tipos de bioactividades ya que sería aún más interesante que estos productos fueran *alimentos funcionales multitarget*.
- En cuanto al producto a base de harina fermentada queda mucho por analizar en cuanto a los aspectos microbiológicos y otras potencialidades que pueden tener este tipo de productos (por ejemplo la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta, compuestos que puedan actuar como fibra y/o prebióticos, etc).

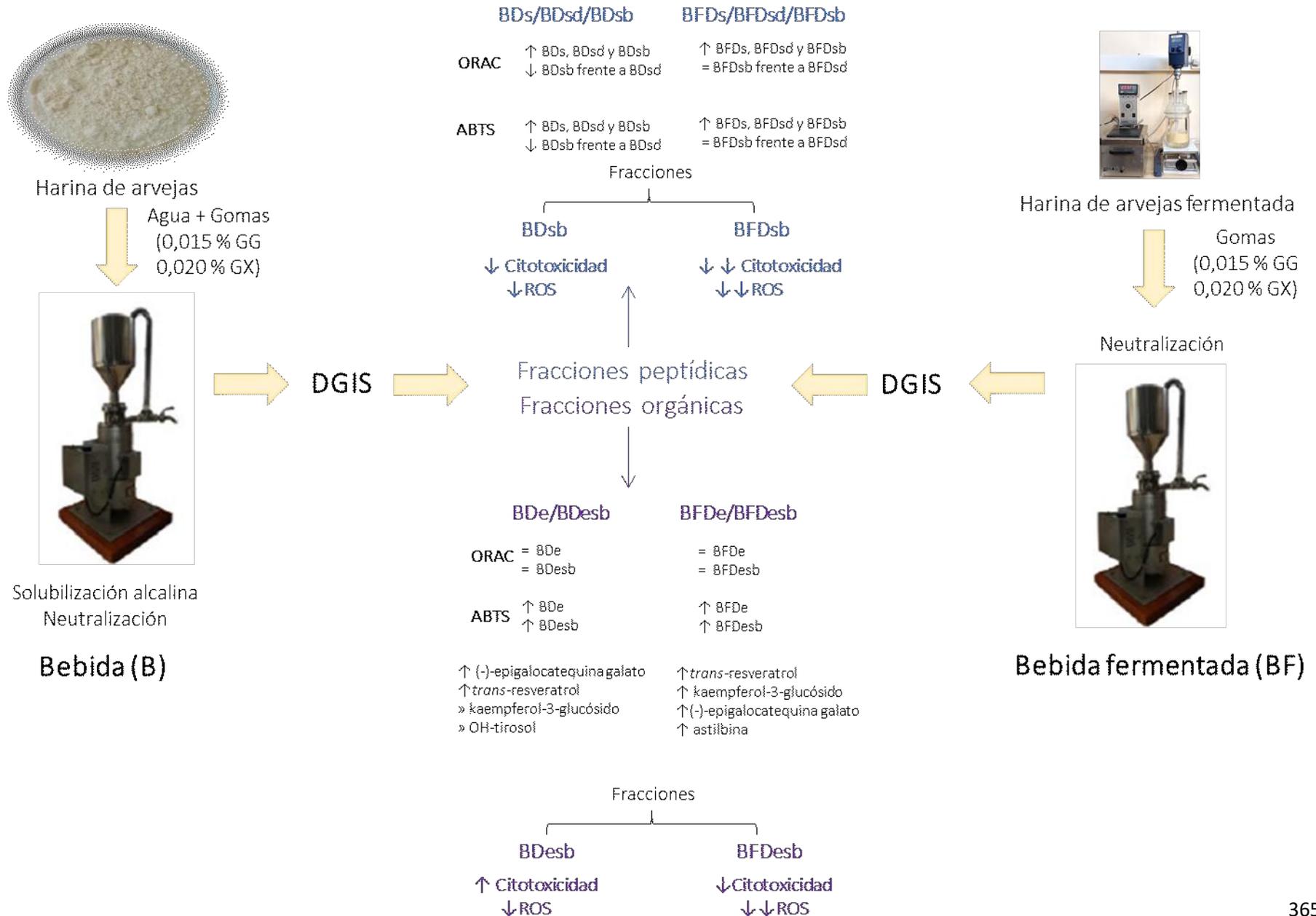


Figura III.28. Resumen de los resultados.

Ensayos *in vitro* acelulares: ↑ indica aumento de actividad; ↓ indica disminución de actividad; = indica que no hubo diferencias significativas. Todo el análisis realizado con respecto a la correspondiente fracción sin digerir.

III.6. Bibliografía

- Adebo J.A., Njobeh P.B., Gbashi S., Oyedeji A.B., Ogundele O.M., Oyeyinka, S.A., Adebo O.A. (2022). Fermentation of cereals and legumes: Impact on nutritional constituents and nutrient bioavailability. *Fermentation* 8, 63. doi.org/10.3390/fermentation8020063.
- Adler – Nissen, J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 27, 1256-1262
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Tania, M., Srivastava, S., Ritzer, E. E., Pandey, A., ... & Bishayee, A. (2022). Molecular mechanisms of action of epigallocatechin gallate in cancer: Recent trends and advancement. In *Seminars in cancer biology* (80, 256-275). Academic Press.
- Aydar, E. F., Mertdinç, Z., Demircan, E., Çetinkaya, S. K., & Özçelik, B. (2023). Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk substitute as a novel plant-based drink: Fatty acid profile, antioxidant activity, in-vitro phenolic bio-accessibility and sensory characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 83, 103254.
- Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J., Chiralt, A. (2015). Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Science Technology International* 21(2), 145-57. doi.org/10.1177/1082013213518936.
- Boukid, F., Rosell, C. M., Castellari, M. (2021). Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re) formulate innovative foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 729-742.
- Cabezas, D. M., Madoery, R., Diehl, B. W. K., Tomás, M. C. (2012). Emulsifying properties of hydrolyzed sunflower lecithins by phospholipases A2 of different sources. In *Food Industrial Processes-Methods and Equipment*. InTech.
- Chalupa-Krebzdak, S., Long, C. J., Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84–92. doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018.
- Chen, L., Wu, D., Schlundt, J., Conway, P.L., (2020). Development of a dairy-free fermented oat-based beverage with enhanced probiotic and bioactive properties. *Frontiers Microbiology* 11, 609734. doi.org/10.3389/fmicb.2020.609734.

- Cichońska, P., Ziarno, M. (2021). Legumes and legume-based beverages fermented with lactic acid bacteria as a potential carrier of probiotics and prebiotics. *Microorganisms*, 10(1), 91.
- Contreras, L., Mansilla, L., Pereyra, D. (2020). WAVEN. Bebida vegetal a base de avena. Proyecto final. Ingeniería Industrial, Universidad Tecnológica Nacional, Regional Avellaneda. <http://hdl.handle.net/20.500.12272/6041>
- Cortez-Trejo, M. C., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J. D. (2021). Physicochemical characterization of protein isolates of amaranth and common bean and a study of their compatibility with xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules* 166, 861-868. [doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.24](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.24)
- Cruz, N.; Capellas, M.; Hernández, M.; Trujillo, A.; Guamis, B.; Ferragut, V. (2007). Ultra-high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40, 725–732.
- Cui, C., Enosawa, S., Matsunari, H., Nagashima, H., & Umezawa, A. (2019). Natural flavonol, myricetin, enhances the function and survival of cryopreserved hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 6123. doi.org/10.3390/ijms20246123
- Deziderio, M. A., de Souza, H. F., Kamimura, E. S., Petrus, R. R. (2023). Plant-Based Fermented Beverages: Development and Characterization. *Foods*, 12(22), 4128.
- Fernandes, C. G., Sonawane, S. K., SS, A. (2021). Cereal based functional beverages: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 914-919.
- Ferreira, P. S., Victorelli, F. D., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2018). A review of analytical methods for p-coumaric acid in plant-based products, Beverages, and biological matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(1), 21–31. doi.org/10.1080/10408347.2018.1459173.
- Frühauf, V., Egea, M., Hernandez, T., Takeuchi, K. (2022). Relationship between physicochemical and sensory characteristics of commercial plant-based beverages. *Journal of Culinary Science & Technology*, 21(6), 886–902. doi.org/10.1080/15428052.2021.2024470.
- George, G. S., Fleming, C. J., Upadhyay, R. (2024). Perspective on oral processing of plant-based beverages. *Journal of Texture Studies*, 55(3), e12846.
- Hidalgo-Fuentes, B., de Jesús-José, E., Cabrera-Hidalgo, A. D. J., Sandoval-Castilla, O., Espinosa-Solares, T., González-Reza, R. M., ... & Aguilar-Toalá, J. E. (2024). Plant-based fermented

- beverages: nutritional composition, sensory properties, and health benefits. *Foods*, 13, 6, 844.
- Iskakova, J., Smanalieva, J., Methner, F. J. (2019). Investigation of changes in rheological properties during processing of fermented cereal beverages. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3980-3987.
- Jemaa, M. B., Gamra, R., Falleh, H., Ksourı, R., Beji, R. S. (2021). Plant-based milk alternative: nutritional profiling, physical characterization and sensorial assessment. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 4(2), 108-120.
- Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*, 24(10), 2001.
- Konishi, Y.; Hitomi, Y.; Yoshioka, E. (2004). Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52, 2527–2532. doi.org/10.1021/jf035366k.
- Lindsay, D., Robertson, R., Fraser, R., Engstrom, S., Jordan, K. (2021). Heat induced inactivation of microorganisms in milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121, 105096.
- Lopes, M., Pierrepont, C., Duarte, C. M., Filipe, A., Medronho, B., Sousa, I. (2020). Legume beverages from chickpea and lupin, as new milk alternatives. *Foods*, 9, 10, 1458.
- Ma, W., Zhang, C., Kong, X., Li, X., Chen, Y., Hua, Y. (2021). Effect of pea milk preparation on the quality of non-dairy yoghurts. *Food Bioscience*, 44, 101416.
- Manassero, C. A., Añón, M. C., Speroni, F. (2020). Development of a high protein beverage based on amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 599–607. doi.org/10.1007/s11130-020-00853-9.
- Mayr, R., Gutser, K., Busse, M., Seiler, H. (2004). Indigenous aerobic spore formers in high heat treated (127° C, 5 s) German ESL (extended shelf life) milk. *Milchwissenschaft*, 59(3/4), 143-146.
- McClements, D. J., Grossmann, L. (2021). A brief review of the science behind the design of healthy and sustainable plant-based foods. *Npj Science of Food*, 5(1), 17. doi.org/10.1038/s41538-021-00099-y.

- McClements, D. J., Newman, E., McClements, I. F. (2019). Plant-based milks: A review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(6), 2047-2067.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. doi.org/10.1039/C3FO60702J.
- Mishra, S., Singh, R., Upadhyay, A., Mishra, S., Shukla, S. (2023). Emerging Trends in Processing For Cereal and Legume-Based Beverages: A Review. *Future Foods*, 100257.
- Munekata, P. E., Domínguez, R., Budaraju, S., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Mallikarjunan, K., ... & Lorenzo, J. M. (2020). Effect of innovative food processing technologies on the physicochemical and nutritional properties and quality of non-dairy plant-based beverages. *Foods*, 9(3), 288.
- Muzira Mukisa, I., Ahimbisibwe, S., Byakika, S. (2021). Stabilization and preservation of a traditional sorghum-based fermented beverage. *Nutrition and Food Sciences Research*, 8(4), 45-52.
- Nawaz, M. A., Tan, M., Øiseth, S., Buckow, R. (2022). An emerging segment of functional legume-based beverages: A review. *Food Reviews International*, 38(5), 1064-1102.
- O’Sullivan, E., Condon, S. (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(11), 4210-4215.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., Krulwich, T. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta* 1717(2): 67–88. doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010.
- Perez E., Bahnassey Y.A., Breene W.M. (1993). A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch*, 45, 211–214. doi.org/10.1080/10408398.2013.862784.
- Rashed, K. (2020). Kaempferol-3-od-glucoside bioactivities: a review. *International Journal of Science Inventions Today*, 9(4), 213-217.
- Ratnayake, W. S., Hoover, R., Shahidi, F., Perera, C., Jane, J. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 74(2), 189-202.

- Rodríguez, M., Tironi, V. A. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International*, 173, 113410.
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.
- Trikusuma, M., Paravisini, L., Peterson, D. G. (2020). Identification of aroma compounds in pea protein UHT beverages. *Food Chemistry*, 312, 126082.
- Veber, A. L., Leonova, S. A., Simakova, I. V., Esmurzaeva, Z. B. (2021). The development of a beverage with a dispersion structure from pea grains of domestic selection. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 624(1), 012127.
- Wansutha, S.; Yuenyaow, L.; Jantama, K.; Jantama, S.S. (2018). Antioxidant activities of almond milk fermented with lactic acid bacteria. *Thaiphesatchasan*, 42, 115–119.
- Wenzel, E., Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 472-481.
- Yao, Y., He, W., Cai, X., Bekhit, A. E. D. A., Xu, B. (2022). Sensory, physicochemical and rheological properties of plant-based milk alternatives made from soybean, peanut, adlay, adzuki bean, oat and buckwheat. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(8), 4868-4878.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusiones finales

En el presente trabajo de tesis se han analizado y discutido la bioaccesibilidad y la potencial actividad antioxidante de componentes derivados de matrices obtenidas a partir de semillas de arvejas amarillas (*Pisum sativum*) (harina **H**, aislado proteico **A**, harina fermentada **HF** y productos bebibles **B** y **BF**).

Hasta donde se conoce, es el primer trabajo de este tipo en realizar una caracterización molecular y de potencialidad biofuncional de estos ingredientes y productos derivados de arvejas argentinas. Asimismo, estos estudios abordaron por primera vez el efecto de la fermentación natural sobre la composición y bioaccesibilidad de potenciales compuestos bioactivos.

En el Capítulo I se realizaron estudios preliminares para la extracción de componentes fenólicos y se demostró la influencia de las condiciones de extracción (tipo de extracción, temperatura, disolvente orgánico) en el tipo y la cantidad de fenoles extraídos de H y A, a partir de los cuales pudo seleccionarse un método de extracción asistida por ultrasonido que permite reducir los tiempos de extracción y utilizar solventes menos contaminantes y tóxicos.

A lo largo de los Capítulos I, II y III, se ha examinado la composición y actividad antioxidante de las fracciones solubles acuosas conteniendo péptidos-polipéptidos y otros compuestos, así como las fracciones solubles etanólicas conteniendo los compuestos fenólicos y otros compuestos solubles según las condiciones de extracción. La actividad antioxidante se analizó mediante ensayos *in vitro* acelulares y celulares.

Luego de verificar la presencia de compuestos potencialmente bioactivos en las matrices estudiadas, se realizaron ensayos de digestión gastrointestinal simulada (DGIS). Es sabido que proteínas y polifenoles luego de ser ingeridos experimentarán modificaciones durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal que alterarán su biofuncionalidad, así como su capacidad para ser absorbidos determinando si ejercerán un efecto sistémico (al ingresar al sistema circulatorio) o su impacto será local ejerciendo su actividad a nivel intestinal. Inicialmente, se

compararon y analizaron dos sistemas de digestión (en tubo y en bio-reactor) y no se encontraron diferencias en el grado de proteólisis de los digeridos. Entre las ventajas asociadas a la utilización del bio-reactor cabe destacar la mejora de la mezcla de todos los componentes y obtención de un mayor volumen de digerido. Por lo tanto, se consideró adecuado emplear el método consenso COST INGOGEST en escala bio-reactor en los estudios posteriores.

Las fracciones bioaccesibles (tanto las obtenidas en base acuosa como etanólica) de los ingredientes **H** y **A** mostraron actividad de neutralización de radicales libres en sistemas acelulares pero también fueron capaces de disminuir la citotoxicidad producida por los reactivos de digestión (sales biliares) e inhibir ROS en cultivos celulares epiteliales inducidos con H₂O₂. Estos hallazgos constituyen un mayor acercamiento a la actividad *in vivo* que podrían ejercer los compuestos derivados de la digestión gastrointestinal de **H** y **A**. Asimismo, los ensayos de absorción en monocapas de células Caco-2 TC7 sugirieron que diversos componentes de las fracciones acuosas bioaccesibles serían capaces de atravesar la barrera intestinal y absorberse, y que también existiría una modificación de compuestos a nivel de las células intestinales. Estos resultados son prometedores en función de la potencialidad de ejercer una acción en el interior del organismo. Sin embargo, constituye solo un primer indicio que deberá seguir estudiándose con mayor profundidad y sumando otras metodologías como la espectrometría masa/masa para la identificación de los compuestos.

La fermentación natural de la harina mejoró la digestibilidad proteica, modificó los perfiles de compuestos fenólicos y potenció algunas de las actividades antioxidantes, constituyéndose a nuestro criterio en una valiosa y económica herramienta para la mejora biofuncional de la harina de arvejas. Resta un gran trabajo a realizar para caracterizar la microbiota indígena y los procesos fermentativos para lograr productos con las características deseadas.

Se logró la formulación base de una bebida vegetal (**B**) a base de un enriquecimiento en proteínas de harina de arvejas, con un alto contenido proteico y bajo contenido lipídico y glucídico en comparación con bebidas vegetales de arveja comerciales, y una buena estabilidad física. Dado el proceso de preparación se generaron cambios tanto en la composición peptídica como en la polifenólica respecto a su materia prima, y un aumento de la digestibilidad proteica.

Este producto presentó una promisorio actividad antioxidante de sus componentes peptídicos y fenólicos bioaccesibles, en algún caso superior respecto a la harina y al aislado proteico de arveja.

Se logró la formulación base de una bebida vegetal (**BF**) a base de harina de arveja previamente fermentada con buena estabilidad física. Esta bebida también presentó un contenido proteico elevado, pero a su vez, tuvo un contenido superior de carbohidratos y fibra dietaria total dado que se mantuvieron todos los componentes de la harina fermentada. Al igual que sucedió en **B**, el proceso de preparación de **BF** también modificó la composición peptídica y fenólica con respecto a **HF**. La fermentación previa y el procesamiento para la obtención de **BF** aumentaron la digestibilidad de las proteínas de arvejas y generaron una modificación/liberación de los CF luego de la DGIS. Estas modificaciones contribuyeron en general a un aumento en la potencia antioxidante de los componentes peptídicos y fenólicos, mostrando un efecto positivo de la fermentación previa de la harina. Probablemente esta bebida contenga una variedad de compuestos potencialmente bioactivos derivados de la harina de arvejas y modificados por la fermentación, así como producidos por la microbiota propia de las semillas que pueden incluir, además de péptidos y compuestos fenólicos, ácidos orgánicos de cadena corta, componentes de la fibra dietaria y prebióticos, entre otros. Por lo tanto, este producto tiene una gran potencialidad bioactivo que deberá ser estudiada a futuro.

Para ambas bebidas, será necesario trabajar en optimizar los procesos de tratamiento térmico aplicando procesos que puedan ser escalables a nivel industrial para extender lo más posible la vida útil microbiológica y a la vez no alterar propiedades biofuncionales y organolépticas. Asimismo, se deberán realizar ensayos de evaluación sensorial y trabajar en la aplicación de aditivos para lograr productos con buena aceptabilidad por parte de los consumidores.

En este trabajo de Tesis se ha logrado realizar el estudio de bioaccesibilidad y actividad antioxidante in vitro de los componentes presentes en los digeridos gastrointestinales de harina de arveja, aislado proteico, harina fermentada y dos productos bebibles, tomando en consideración los efectos de la matriz y de los procesamientos realizados. Para continuar el

camino hacia la demostración fehaciente de la funcionalidad biológica de estas matrices, serán necesarios otros estudios. Los estudios hasta aquí realizados indican en todos los casos una potencialidad de acción antioxidante de los componentes presentes luego de la digestión gastrointestinal de las diferentes matrices sobre la pared intestinal, aunque es necesario ampliar la batería de ensayos antioxidantes a fin de elucidar posibles mecanismos de acción involucrados. Continuando con los estudios in vitro, fundamentalmente a realizar sobre las bebidas desarrolladas, se requerirá determinar el grado de absorción de los componentes activos y sus potenciales modificaciones por la pared intestinal y post-absorción, así como también, el efecto de la microbiota colónica sobre aquellos componentes que no sean absorbidos y la forma en que estos compuestos transformados pueden actuar, por ejemplo, sobre la salud intestinal, determinando la modificación en la composición y en la actividad antioxidante a lo largo de estos procesos. Para estos estudios será necesario identificar componentes y estudiar posibles interacciones y formación de complejos. Finalmente, será fundamental llegar a la realización de estudios in vivo, en los que se evalúen cambios en biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo (y otras patologías) en modelos animales y/o en humanos luego del consumo frecuente de las bebidas.