

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en  
Ciencias Biológicas**

**“APROVECHAMIENTO INTEGRAL DEL ALGA  
*PHORPHYRA COLUMBINA*. PROCESOS DE  
EXTRACCIÓN DE FICOCOMPONENTES (PROTEÍNAS Y  
POLISACÁRIDOS). ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES  
BIO Y TECNO-FUNCIONALES”**

**Lic. Raúl E. Cian**

**Director: Ing. Rolando J. González**

**Co-director: Dra. Silvina R. Drago**

**Área Cereales y Oleaginosas**

**Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería  
Química**

**2013**

*Empieza haciendo lo necesario, continúa haciendo lo posible;  
y de repente estarás haciendo lo imposible.*

**San Francisco de Asís**

A mi familia querida.

En memoria de Lara Mavi Chemes

---

**La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:**

✓ **Publicaciones en revistas científicas**

Cian, R.E.; López-Posadas, R.; Drago, S.R.; Sánchez de Medina, F. y Martínez-Augustin, O. (2012). *A Porphyra columbina hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF-kB, and p38 and JNK dependent mechanism*. Food Chem. 134, 1982-1990.

Cian, R.E.; Martínez-Augustin, O y Drago, S.R. (2012). *Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of Porphyra columbina*. Food Res. Int. 49, 364–372.

Cian, R.E.; López-Posadas, R.; Drago, S.R.; Sánchez de Medina, F. y Martínez-Augustin, O. (2012). *Immunomodulatory properties of the protein fraction from Phorphyra columbina*. J. Agric. Food Chem. 60, 8146–8154.

Cian, R.E.; Alaíz, M.; Vioque, J. y Drago, S.R (2013). *Enzyme proteolysis enhanced extraction of ACE inhibitory and antioxidant compounds (peptides and polyphenols) from Porphyra columbina residual cake*. J. Appl. Phycol. 25, 1197-1206.

✓ **Trabajos completos presentados en reuniones científicas**

Cian, R.E.; Zarzuelo, A.; Suárez, M.; Sánchez de Medina, F.; Martínez-Augustin, O.; Drago, S. y González, R. (2011). *Actividad inmunomoduladora sobre esplenocitos de rata de hidrolizados proteicos del alga Porphyra columbina*. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA). 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de Alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. ISBN: 978-987-22165-4-2.

Cian, R.E.; Drago, S. y González, R. (2011). *Mecanismos de actividad antioxidante de hidrolizados proteicos del alga Porphyra columbina*. . XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA). 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de Alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. ISBN: 978-987-22165-4-2.

---

✓ **Resúmenes presentados en reuniones científicas**

Cian, R.E.; Fajardo, M.; Drago, S.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Salsi, S.; Jiménez S. y González, R. *Propiedades bioactivas de fracciones proteicas de Porphyra columbina*. II Jornadas internacionales sobre avances en la tecnología de películas y coberturas funcionales en alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 17 al 18 de Mayo de 2010. Póster.

Cian, R.E.; Zarzuelo, A.; Suárez, M.; Sánchez de Medina, F.; Martínez-Augustin, O.; Drago, S. y González, R. *Propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes de extractos proteicos de Porphyra columbina*. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, España. 14 al 17 de Septiembre de 2010. Póster.

Cian, R.E.; Zarzuelo, A.; Suárez, M.; Sánchez de Medina, F.; Martínez-Augustin, O.; Drago, S. y González, R. *Péptidos del alga Porphyra columbina con funciones inmunomoduladoras evaluadas en esplenocitos de rata*. VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios - JIPCA. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 6 al 8 de Julio de 2011. Póster.

Tittarelli, M.; Cian, R.E.; Alaiz, M.; Vioque J. y Drago, S. Bioactividad de péptidos obtenidos a partir de hidrolizados del alga *Porphyra columbina*. VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios - JIPCA. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 6 al 8 de Julio de 2011. Exposición oral.

Cian, R.E.; Zarzuelo, A.; Suárez, M.; Sánchez de Medina, F.; Martínez-Augustin, O.; Drago, S. y González, R. *Actividad inmunomoduladora sobre esplenocitos de rata de hidrolizados proteicos del alga Porphyra columbina*. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA). 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de Alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. Exposición oral.

Cian, R.E.; Drago, S. y González, R. *Mecanismos de actividad antioxidante de hidrolizados proteicos del alga Porphyra columbina*. . XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA). 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de

- 
- Alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. Póster.
- Cian, R.E.; Drago, S.; Vioque, J.; Alaiz, M. y González, R. *Caracterización de fracciones proteicas obtenidas a partir del alga *Porphyra columbina**. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA). 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de Alimentos. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de Octubre de 2011. Póster.
- Cian, R.E.; Salgado, P.; Drago, S.; González, J. y Mauri, A. *Propiedades antioxidantes de películas obtenidas a partir de extractos del alga *Porphyra columbina**. Agrobioenvases - IV Jornadas Internacionais sobre avanços na Tecnologia de Filmes e Coberturas Funcionais em Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 25-26 de Septiembre de 2012. Póster.
- Garzón, A.; Cian, R.E.; De Greef, D.; Torres, R.; González, R. y Drago, S. *Propiedades antioxidantes de expandidos de maíz con adición del alga *Porphyra columbina**. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Córdoba 2012 (CICYTAC 2012). “Desafíos para una producción sustentable y competitiva”. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de Noviembre de 2012. Póster.
- Cian, R.; Caballero, M.; Salgado, P.; Drago, S.; Sabbag, N. y González, R. *Evaluación sensorial de expandidos de maíz con adición del alga *Porphyra columbina**. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Córdoba 2012 (CICYTAC 2012). “Desafíos para una producción sustentable y competitiva”. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de Noviembre de 2012. Póster.
- Cian, R.E.; Salgado, P.; Drago, S.; González, J. y Mauri, A. *Efecto del agregado de glicerol y  $Ca^{2+}$  sobre las propiedades fisicoquímicas de películas de biopolímeros extraídos del alga *Porphyra columbina**. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Córdoba 2012 (CICYTAC 2012). “Desafíos para una producción sustentable y competitiva”. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de Noviembre de 2012. Póster.
- Cian, R.E.; Drago, S. y González, R. *Macroalga *Porphyra columbina* como fuente de compuestos antioxidantes*. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos - Córdoba 2012 (CICYTAC 2012). “Desafíos para una
-

---

producción sustentable y competitiva”. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de Noviembre de 2012. Póster.

Cian, R.E.; Salgado, P.; Drago, S.; González, J. y Mauri, A. *Películas comestibles basadas en biopolímeros extraídos del alga roja Porphyra columbina*. X Simposio argentino de Polímeros. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 28 al 30 de Agosto de 2013.

Cian, R.E.; Salgado, P.; Drago, S.; González, J. y Mauri, A. *Empleo de biopolímeros extraídos del alga roja Porphyra columbina para la obtención de películas comestibles con propiedades antioxidantes*. XIV Congreso Argentino de Ciencia y tecnología de Alimentos (CyTAL 2013). Rosario, Argentina. 23 al 25 de Octubre de 2013.

---

---

## Agradecimientos

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

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

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

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

A Sol, por acompañarme en este momento de mi vida, por ser una verdadera compañera, y por sobre todo, mi amor.

A Franco y Elena, por ser mis grandes y queridos hermanos de la vida, con quienes compartí excelentes momentos sin importar donde. Por las grandes experiencias vividas y por escucharme y acompañarme en momentos muy difíciles. A los dos, por enseñarme lo que es una verdadera amistad.

A todos mis amigos, aquellos que de uno u otro modo siempre están, por ser fundamentales en mi vida.

A mis directores de tesis: el Ing. Rolando González y la Dra. Sivina Drago, por darme siempre la oportunidad y posibilidad de crecer no sólo intelectualmente sino también a nivel personal. Por brindarme su tiempo y predisposición. Por confiar en mí. Por esas charlas en confianza, las cuales sirvieron para tomar numerosas decisiones. A los dos muchas gracias.

A todos mis compañeros del Instituto de Tecnología de Alimentos, por sus colaboraciones en el trabajo de tesis y por estar siempre dispuestos a ayudar. Agradezco especialmente a los grupos de Microbiología de Alimentos y Evaluación Sensorial.

A la Educación Pública y Gratuita, particularmente a la Universidad Nacional del Litoral, la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y el Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química por la calidad de la enseñanza recibida y por la posibilidad de continuar formándome.

---

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet), por las becas internas Tipo 1 y 2 recibidas, con las cuales pude realizar la presente tesis.

A la Dra. Ma Angélica Fajardo por proveerme del alga *Porphyra columbina*, recolectándola y enviándomela a Santa Fé en reiteradas oportunidades a lo largo de estos cuatro años.

A la Comisión Europea a través de su programa de intercambio EADIC, por la beca de doctorado sándwich otorgada, con la cual pude viajar a España y fortalecer mi trabajo doctoral. A la Dra. Olga Martínez-Augustí y el Dr. Fermín-Sanchez de Medina de la Universidad de Granada, los cuales me abrieron las puertas de sus laboratorios, por su confianza y el gran apoyo y dedicación brindada durante los 6 meses de trabajo compartido. A la Dra. Rocío López-Posadas con la cual aprendí lo que era trabajar en inmunología celular, por su tiempo y predisposición.

Al Centro de Investigacion y Desarrollo en Criotecnologia de Alimentos (UNLP-CIC-CONICET), particularmente a la Dra. Adriana Mauri y el Dr. Pablo Salgado por recibirme en dicha institución con gran amabilidad y predisposición al trabajo. A ellos, por contribuir significativamente con la riqueza intelectual de mi tesis.

**A todos, MUCHAS GRACIAS!**

---



---

## Índice de contenidos

Índice de contenidos .....	x
Abreviaturas y Símbolos .....	xiv
Resumen .....	xvii
Abstract .....	xxiii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1 ALGAS ROJAS.....</b>	<b>2</b>
I.1.1 Consideraciones generales.....	2
I.1.2 Principales componentes celulares .....	4
I.1.3 Género <i>Porphyra</i> .....	24
<b>I.2 PROPIEDADES BIO-FUNCIONALES.....</b>	<b>25</b>
I.2.1 Actividad antioxidante.....	28
I.2.2 Actividad antihipertensiva .....	33
I.2.3 Actividad inmunomoduladora .....	37
<b>I.3 PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES .....</b>	<b>42</b>
I.3.1 Consideraciones generales.....	42
I.3.2 Envases alimentarios.....	44
I.3.3 Envases activos .....	45
<b>I.4 ALIMENTOS FUNCIONALES .....</b>	<b>46</b>
I.4.1 Consideraciones generales.....	46
I.4.2 Extrusión.....	47
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>II.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>III.1 Obtención de la materia prima.....</b>	<b>53</b>
<b>III.2 Estudio de la composición de la materia prima .....</b>	<b>54</b>
III.2.1 Composición elemental .....	54
III.2.2 Composición centesimal.....	54
III.2.3 Perfil de ácidos grasos .....	54
III.2.4 Perfil de aminoácidos .....	55
III.2.5 Contenido de minerales.....	56
III.2.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE) .....	56
<b>III.3 Estudio de las propiedades nutricionales de la materia prima.....</b>	<b>57</b>

---

III.3.1	Bioaccesibilidad de minerales (DM) .....	57
III.3.2	Digestibilidad proteica (DP) .....	57
III.3.3	Puntaje químico .....	58
III.3.4	Puntaje químico corregido por la digestibilidad proteica (PDCAAS)58	
III.4	Definición de las condiciones de extracción para la obtención de las distintas fracciones (proteínas y polisacáridos), a partir de la materia prima ...	58
III.4.1	Etapa I: Extracción de las proteínas solubles en agua a 25°C .....	59
III.4.2	Etapa II: Extracción de los <i>ficocoloides</i> (carragenanos y agaranos) .	60
III.4.3	Proceso de extracción definitivo para la obtención de las distintas fracciones ( <i>proteínas y polisacáridos</i> ), a partir de la materia prima.....	61
III.5	Caracterización de las fracciones obtenidas.....	64
III.5.1	Caracterización de la fracción proteica (FP), sus hidrolizados (HFP) y la fracción ficocoloide (FF) .....	64
III.5.2	Caracterización del residuo insoluble (R) y su hidrolizado (HR) .....	68
III.6	Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las fracciones: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas .....	69
III.6.1	Propiedades de hidratación .....	69
III.6.2	Propiedades reológicas .....	70
III.6.3	Propiedades filmogénicas.....	71
III.7	Evaluación de las propiedades bio-funcionales de los hidrolizados obtenidos a partir de FP y R .....	77
III.7.1	Propiedades antioxidantes .....	78
III.7.2	Actividad inhibidora de ECA I. Propiedades antihipertensivas .....	80
III.7.3	Propiedades inmunomoduladoras .....	80
III.8	Elaboración de un alimento con algas. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bioaccesibilidad de compuestos activos .....	85
III.8.1	Elaboración de los productos expandidos .....	85
III.8.2	Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos .....	86
III.8.3	Evaluación del color y de las características sensoriales de los productos expandidos .....	87
III.8.4	Evaluación de las propiedades nutricionales y antioxidantes de los productos expandidos .....	88
III.8.5	Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos activos .....	90

---

III.9 Análisis estadísticos .....	91
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>94</b>
<b>Capítulo IV.1. Estudio de la composición y las propiedades nutricionales de la materia prima.....</b>	<b>94</b>
IV.1.1 Composición elemental .....	94
IV.1.2 Contenido proteico, perfil de aminoácidos, PQ, DP y PDCAAS.....	94
IV.1.3 Contenido de fibra dietaria total.....	97
IV.1.4 Contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos .....	97
IV.1.5 Contenido de cenizas, minerales y DM.....	98
IV.1.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE) .....	101
IV.1.7 Conclusiones parciales .....	102
<b>Capítulo IV.2. Proceso de extracción y caracterización de las fracciones obtenidas .....</b>	<b>104</b>
IV.2.1 Definición de las condiciones de extracción para la obtención de las distintas fracciones ( <i>proteínas y polisacáridos</i> ), a partir de la materia prima	104
IV.2.2 Caracterización de las fracciones obtenidas a partir de la materia prima (FP, FF y R) y sus hidrolizados (HFP y HR) .....	112
IV.2.3 Conclusiones parciales.....	135
<b>Capítulo IV.3 Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las fracciones: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas .....</b>	<b>139</b>
IV.3.1 Propiedades de hidratación .....	139
IV.3.2 Propiedades reológicas de FP y FF .....	141
IV.3.3 Propiedades filmogénicas.....	142
IV.3.4 Conclusiones parciales.....	159
<b>Capítulo IV.4 Evaluación de las propiedades bio-funcionales de los hidrolizados obtenidos a partir de FP y R .....</b>	<b>162</b>
IV.4.1 Propiedades bio-funcionales de FP y sus hidrolizados (HFP) .....	162
IV.4.2 Propiedades bio-funcionales de HR.....	184
IV.4.3 Conclusiones parciales.....	198
<b>Capítulo IV.5 Elaboración de un alimento con el alga. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bio-accesibilidad de compuestos activos.....</b>	<b>201</b>
IV.5.1 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos .....	201

---

<b>IV.5.2 Evaluación del color y de las características sensoriales de los productos expandidos .....</b>	<b>202</b>
<b>IV.5.3 Evaluación de las propiedades nutricionales y antioxidantes de los productos expandidos .....</b>	<b>205</b>
<b>IV.5.4 Evaluación de la bio-accesibilidad de compuestos activos .....</b>	<b>211</b>
<b>IV.5.5 Conclusiones parciales.....</b>	<b>215</b>
<b>V. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>218</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>225</b>

---

## Abreviaturas y Símbolos

**A:** hidrolizado obtenido con Alcalasa a partir de la fracción proteica

**AA:** acetona / agua

**AAA:** acetona / agua / ácido acético

**AAM:** aminoácidos tipo micosporina

**AT:** hidrolizado obtenido secuencialmente con Alcalasa y Tripsina a partir de la fracción proteica

**CEEM:** consumo específico de energía mecánica

**CFE:** compuestos fenólicos extractables

**ConA:** concanavalina A

**CQ:** capacidad quelante

**DM:** disponibilidad de minerales

**DP:** digestibilidad proteica

**E:** expansión

**ECA I:** enzima convertidora de angiotensina I

**F:** Flavourzyme

**FC:** fungal protease concentrate

**FF:** fracción ficocoloide

**FP:** fracción proteica

**FP<sub>0</sub>:** dispersión filmogénica o película formada por 100% de la fracción ficocoloide

**FP<sub>100</sub>:** dispersión filmogénica o película formada por 100% de la fracción proteica

**FP<sub>25</sub>:** dispersión filmogénica o película formada por 25% de la fracción proteica y 75% de la fracción ficocoloide

**FP<sub>50</sub>:** dispersión filmogénica o película formada por 50% de la fracción proteica y 50% de la fracción ficocoloide

**FP<sub>75</sub>:** dispersión filmogénica o película formada por 75% de la fracción proteica y 25% de la fracción ficocoloide

---

**GH:** grado de hidrólisis

**HFP:** hidrolizados de la fracción proteica

**HR:** hidrolizado obtenido a partir del residuo insoluble

**IFN $\gamma$ :** interferón gama

**IL10:** interleuquina diez

**IL1 $\beta$ :** interleuquina uno beta

**IL6:** interleuquina seis

**LDH:** enzima lactato deshidrogenasa

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano.

**M:** metanol

**Ma:** producto expandido a base de sémola de maíz sin adición de *P. columbina*

**MaD:** dializado del producto expandido a base de sémola de maíz sin adición de *P. columbina*

**MaPc<sub>1</sub>:** producto expandido a base de sémola de maíz con 1,7% de *P. columbina*

**MaPc<sub>2</sub>:** producto expandido a base de sémola de maíz con 3,5% de *P. columbina*

**MaPc<sub>2D</sub>:** dializado del producto expandido a base de sémola de maíz con 3,5% de *P. columbina*

**MaPc<sub>3</sub>:** producto expandido a base de sémola de maíz con 5,3% de *P. columbina*

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear kappa B

**ORAC:** capacidad de absorción de radicales de oxígeno

**PDCAAS:** puntaje químico corregido por la digestibilidad proteica.

**PQ:** puntaje químico

**PVA:** permeabilidad al vapor de agua

**R:** residuo insoluble en agua a 4°C y 95°C

**SEM:** microscopia electrónica de barrido

**T:** hidrolizado obtenido con Tripsina a partir de la fracción proteica

**TA:** hidrolizado obtenido secuencialmente con Tripsina y Alcalasa a partir de la fracción proteica

**TEAC:** capacidad antioxidante Trolox equivalente.

**Tg:** temperatura de transición vítrea

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**VE:** volumen específico

---

## Resumen

Los océanos cubren más del 70% de la superficie de la Tierra y son el hábitat natural de una gran diversidad de plantas, animales y microorganismos. Las algas marinas representan una parte considerable de esta biomasa y su uso como alimento data del año 2700 a.C en China. Esta práctica actualmente sigue siendo muy difundida en los países orientales tales como China, Japón, Corea, etc. Sin embargo, en los países occidentales el consumo directo no es habitual debido a razones culturales y hábitos de consumo. En este sentido, el uso más importante de las algas en occidente es la obtención de hidrocoloides y su empleo como agentes espesantes y gelificantes en la industria alimentaria. Otra aplicación muy importante es la obtención de compuestos bioactivos a partir de esta fuente vegetal y su introducción en el mercado ya sea a través de la industria farmacéutica y/o cosmética, con más de 15000 compuesto químicos identificados en la actualidad.

Recientemente se ha demostrado que el consumo directo de algas en los países asiáticos está asociado con una baja incidencia en distintos tipos de cáncer respecto a los países europeos y norteamericanos. Además, se han identificados otros efectos beneficiosos para la salud tales como: disminución de la presión arterial y glucemia en sangre, efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y neuroprotectores, etc. Todas estas propiedades se han atribuido a distintos compuestos bioactivos tales como: polisacáridos sulfatados, polifenoles, carotenoides, aminoácidos, proteínas/péptidos y lípidos. Cabe mencionar que las algas marinas también son una muy buena fuente fibra, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales.

En busca de nuevas fuentes naturales de nutrientes y compuestos bioactivos, las algas marinas por su gran diversidad y composición, constituyen un tema de estudio de gran interés no sólo para la industria alimentaria, sino también para la farmacéutica.

El objetivo general de la presente tesis fue obtener extractos de *fico-componentes* (proteínas y polisacáridos) a partir del alga *P. columbina* y evaluar sus propiedades bio y tecno-funcionales.

En primer lugar, se estudió la composición y las propiedades nutricionales de *P. columbina*. Para ello, se utilizaron las técnicas propuestas por la A.O.A.C. Además, se determinó el perfil de aminoácidos y ácidos grasos, el puntaje químico, la dializabilidad

---

de minerales *in vitro*, la digestibilidad proteica *in vitro*, el PDCAAS y el contenido de compuestos fenólicos extractables en diferentes sistemas de extracción

Luego se definieron las condiciones de extracción que permitieron obtener las distintas fracciones del alga *P. columbina* (proteínas y polisacáridos). En este sentido, se buscó diseñar un proceso que permitiera, por un lado extraer las *ficobiliproteínas* y proteínas solubles a temperatura ambiente y por otro, los *ficocoloides* (*carragenanos* y *porfiranos*) libres de las proteínas anteriores. Para ello, se hizo un estudio de la solubilidad proteica del alga y se variaron las condiciones de extracción tales como: tiempo de centrifugación (30 – 150 minutos), tiempo de extracción (60 – 180 minutos) y pH de extracción (2,0; 7,0 y 12,0). Además, se estudió el efecto de un agente reductor sobre el proceso extractivo (0,1% P/P de sulfito de sodio), así como también la acción de celulasas y xilanasas. A partir de estos resultados, se obtuvo el proceso definitivo que consistió en una primera etapa de extracción en agua a temperatura ambiente y pH 7,0 durante 2 horas (**Etapa I**), seguida de una segunda etapa extractiva en agua a 95°C y pH 7,0 durante el mismo período de tiempo (**Etapa II**). El sobrenadante de la **Etapa I** se ultrafiltró (cut-off 10 kDa), obteniéndose así la fracción rica en *ficobiliproteínas* o fracción proteica (**FP**). Esta fracción fue hidrolizada con distintos sistemas enzimáticos (alcalasa, tripsina, alcalasa + tripsina y tripsina + alcalasa), obteniéndose así los hidrolizados correspondientes (**HFP: A, T, AT y TA**). Al sobrenadante de la **Etapa II** se lo denominó **FF** (fracción *ficocoloides*). Por último, al residuo insoluble en agua fría y caliente obtenido tras esta última centrifugación (**R**), se lo sometió a una hidrólisis enzimática secuencial utilizando para ello dos proteasas (Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme). De esta manera se obtuvo un hidrolizado al que se denominó **HR**.

Posteriormente se llevó a cabo la caracterización de las fracciones (**FP, FF y R**) y sus hidrolizados (**HFP y HR**). Las fracciones obtenidas **FP** y **FF** fueron caracterizadas según su composición centesimal siguiendo las técnicas de la A.O.A.C. Además, se determinó el contenido de hidratos de carbono, sulfatos y *R-ficoeritrina*. Se midió el contenido de compuestos fenólicos solubles en agua y se obtuvieron los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) y de FTIR de las fracciones. Por último, a la fracción **FP** se le determinó el perfil de pesos moleculares (PM) menores a 12,5 kDa por FPLC, el perfil de aminoácidos y el de polifenoles. Los hidrolizados fueron caracterizados según el perfil de pesos moleculares (PM) menores a 12,5 kDa por

---

FPLC, perfil de aminoácidos y contenido de compuestos fenólicos extractables en distintos sistemas de extracción.

La evaluación de las propiedades *tecnofuncionales* de las fracciones obtenidas se realizó midiendo las propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas de las mismas. Al respecto, se evaluó la solubilidad proteica de **FP**, **R** y **HR**, se determinó la viscosidad intrínseca y se estudiaron las propiedades reológicas de las dispersiones de **FP** y **FF**. Luego se estudió el efecto del agregado de **FP** sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de películas formadas por la fracción **FF**. Para esto se formaron películas por *casting* a partir de dispersiones al 1% (P/P) de mezclas de **FP** y **FF**, en las siguientes proporciones: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0, sin el agregado de plastificante. Las películas obtenidas fueron caracterizadas de acuerdo a su espesor, contenido de humedad, color (CIE-Lab), opacidad, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, propiedades mecánicas (tensión máxima, modulo elástico y elongación a la rotura), microscopia electrónica de barrido (SEM) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Cabe señalar que tanto a las dispersiones filmogénicas como a las películas se les determinó la actividad antioxidante mediante la técnica del radical catión ABTS.

La evaluación de las propiedades *biofuncionales* se realizó sobre los hidrolizados obtenidos a partir de **FP** y **R** (**HFP** y **HR**). Se estudiaron las propiedades antioxidantes (inhibición de los radicales ABTS y DPPH, capacidad quelante ligada al  $\text{Cu}^{2+}$  y ORAC), antihipertensivas (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I o ECA I), e inmunomoduladoras (producción de citoquinas: IL10, IL6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , en el sobrenadante del cultivo de células linfoides obtenidas a partir del bazo de rata: esplenocitos, macrófagos y linfocitos T).

Por último, se elaboró un alimento con el agregado del alga *P. columbina* y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bio-accesibilidad de compuestos activos. Para tal fin, se elaboraron productos expandidos con sémola de maíz con un reemplazo del 0%; 1,7%; 3,5% y 5,2% de *P. columbina* (P/P en base seca), utilizando un extrusor monotornillo Brabender 20 DN. Se evaluó el consumo específico de energía mecánica (CEEM) y a los productos obtenidos se les evaluó: la expansión, el volumen específico, la solubilidad y la absorción de agua. Además, se midió la actividad antioxidante utilizando el radical ABTS y DPPH y el poder reductor. El análisis de color de los productos se realizó en base al espacio de color definido por la norma CIE-Lab. La evaluación sensorial se realizó mediante un panel de evaluadores

---

entrenados y los atributos analizados fueron: olor, color, flavor y la textura bucal (crujienticidad y pegajosidad), para lo que se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en los extremos (1 – 9). La evaluación sensorial de los productos determinó que el más apropiado en cuanto al aspecto y flavor era el que poseía un reemplazo del 3,5% (P/P) de alga (**MaPc<sub>2</sub>**). Este producto fue caracterizado según: su composición, perfil de aminoácidos, digestibilidad proteica *in vitro*, dializabilidad de minerales y contenido de compuestos fenólicos extractables. Además, se evaluó la bio-accesibilidad de compuestos activos midiendo las propiedades antioxidantes (ABTS, DPPH, capacidad quelante y poder reductor) y antihipertensivas (inhibición de ECA I), las cuales fueron comparadas con el control (maíz 100%: **Ma**).

Los resultados obtenidos mostraron que los dos componentes mayoritarios en *P. columbina* fueron la fibra dietaria total y las proteínas. Además, presentó un mejor puntaje químico que las proteínas de los cereales, siendo su digestibilidad proteica *in vitro* similar a las proteínas de origen vegetal. Los ácidos grasos saturados e insaturados fueron el ácido palmítico y ácido eicosapentaenóico, respectivamente. Con respecto al contenido de minerales y dializabilidad, se pudo observar una muy buena relación Na/K, mientras que se obtuvieron valores medios de dializabilidad para P, Ca y Zn.

El contenido de proteínas (*R-ficoeritrina*, etc.) y compuestos fenólicos de **FP** fue significativamente superior al de **FF**. Sin embargo, la proporción de hidratos de carbono totales y sulfatos en **FF** fue mayor a la hallada en **FP**. Esto fue corroborado con el FTIR de ambas fracciones, donde se observaron marcadas diferencias entre los espectros.

La degradación efectiva de las proteínas presentes en **FP**, se manifestó en el perfil de pesos moleculares y en la cuarta derivada espectral de sus hidrolizados (**HFP**). Además, se pudo ver que el proceso de hidrólisis favoreció principalmente la generación de péptidos pequeños cuyo tamaño molecular fue de 340 Da (*dipéptidos*). Con respecto a **HR** se pudo ver que el proceso de hidrólisis no sólo favoreció la generación de péptidos pequeños cuyo tamaño molecular fue de 523 Da (*tetra-péptidos*), sino que también liberó los compuestos fenólicos retenidos en el sustrato (**R**).

En relación a las propiedades *tecnofuncionales*, la dispersión acuosa de **FP** exhibió un comportamiento del tipo *newtoniano*, mientras que **FF** mostró un comportamiento del tipo *pseudo-plástico*. En concordancia con esto, los valores de

---

viscosidad aparente e índice de consistencia (**K**) para **FF** fueron significativamente superiores a los hallados para **FP**.

El contenido de proteínas (*ficobiliproteínas*) y compuestos fenólicos extractables aumentó con el incremento de **FP** en la dispersión filmogénica. Sin embargo, el nivel de hidratos de carbonos totales disminuyó. A su vez, al aumentar la proporción de **FP** se evidenció un cambio en el comportamiento de flujo de *pseudo-plástico* a *newtoniano*. Por último, hubo un incremento significativo de la capacidad antioxidante conforme aumentó el nivel de **FP** en la formulación.

El agregado de **FP** a las películas cambió el color de los films de *verde oscuro* a *rojo claro* (incremento de  $a^*$  y  $L^*$ ), disminuyendo su opacidad; redujo el espesor; ejerció un efecto plastificante en la matriz de **FF**, manifestándose en el contenido de humedad, la solubilidad en agua y las propiedades mecánicas de las películas resultantes, pero no en su permeabilidad al vapor de agua y produjo un aumento en la capacidad antioxidante, que se correlacionó linealmente con el contenido de compuestos fenólicos y *R-ficoeritrina*.

En relación a las propiedades *bio-funcionales*, la capacidad antioxidante de los hidrolizados de **FP** fue significativamente superior a la del sustrato debido a la generación de péptidos antioxidantes con bajo e intermedio tamaño molecular. La potencia antioxidante fue la misma para todos los hidrolizados, no viéndose afectada la solubilidad peptídica por el tipo de solvente utilizado en el ensayo (igual  $IC_{50}$ ). Para el caso de la inhibición de ECA I, todos los hidrolizados de **FP** fueron capaces de inhibir a la enzima, siendo dicho efecto asociado a *dipéptidos* con elevada proporción de Ala, Pro y Leu en su secuencia peptídica. Por último, tanto **FP** como sus hidrolizados (**TA** y **AT**), exhibieron un efecto *in vitro* del tipo anti-inflamatorio mediado principalmente por la secreción de IL10.

Para el **HR** se obtuvieron muy buenas propiedades antioxidantes e inhibitorias de ECA I, atribuibles a los péptidos bioactivos (*tetra-péptidos*) y compuestos fenólicos liberados durante la hidrólisis de **R**. Además, el proceso de hidrólisis de **R** permitió obtener *tetra-péptidos* con interesantes propiedades mitogénicas, los cuales favorecerían globalmente un aumento en la producción de IL10, obteniéndose así un efecto anti-inflamatorio *in vitro*.

---

En relación al alimento desarrollado, el agregado de niveles crecientes de *P. columbina* a la sémola de maíz produjo un descenso en el nivel de fricción, disminuyendo el consumo de energía mecánica, la expansión y el grado de cocción estimado a través del volumen específico. Además, se observó un descenso en los parámetros  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E^*$  y  $C^*$ , variando el color de *amarillo claro* a un *amarillo verdoso* más oscuro. La evaluación sensorial de los productos determinó que el más apropiado en cuanto al aspecto y flavor era el que poseía un reemplazo del 3,5% (P/P) de alga (**MaPc<sub>2</sub>**). El contenido de proteínas, fibra dietaria total e insoluble y cenizas en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al hallado para el control (Ma). Este incremento estuvo relacionado con la composición del alga. Además, no se observaron diferencias significativas entre los valores de digestibilidad proteica *in vitro*, puntaje químico y **PDCAAS** de ambos productos expandidos (Ma y MaPc<sub>2</sub>). Por otro lado, el nivel de compuestos fenólicos extractables en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma para todos los sistemas estudiados, debido a los compuestos fenólicos aportados por el alga, lo que proporcionó una mayor capacidad antioxidante al producto expandido.

Por último, la capacidad antioxidante y el efecto inhibitorio sobre **ECA I** de Ma y MaPc<sub>2</sub> persistieron luego del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y fue superior para el dializado de MaPc<sub>2</sub> debido a los compuestos fenólicos y péptidos generados por hidrólisis a partir del alga, los cuales serían potencialmente bio-accesibles.

En conclusión, *P. columbina* resultó ser una buena fuente natural de nutrientes (fibra dietaria y proteínas) y compuestos bioactivos (antioxidantes, antihipertensivos e inmunomoduladores). Además, la tecnología de formación de películas por casting permitió obtener films biodegradables con interesantes propiedades antioxidantes, mecánicas y de barrera, los cuales pueden ser utilizados para el *packaging* de diferentes productos alimenticios sensibles a la oxidación. Por último, el proceso de extrusión resultó ser una buena alternativa para obtener un alimento bio-funcional a base de sémola de maíz con agregado de *P. columbina*, el cual exhibió interesantes propiedades bioactivas *in vitro*.

---

---

## Abstract

The ocean covers more than 70% of the Earth's surface, and is the natural habitat of a vast diversity of plants, animals and micro-organisms. Seaweeds represent a considerable part of the coastal biomass and its use as food dates back to 2700 BC in China. This practice is widespread, especially in Japan and South Eastern Asia, where seaweeds represent an important economic resource and are largely used in human nutrition. However, in Western countries direct consumption of them is not common due to cultural reasons. In this way, the most important use of algae in the Western countries is getting hydrocolloids and their use as thickeners and gelling agents in food industry. Another very important application is obtaining bioactive compounds and their introduction in the market, either via the pharmaceutical and / or cosmetic, with over 15,000 chemical identified compounds.

Recently, it has been shown that the direct consumption of seaweed in Asian countries is associated with a low incidence in cancers compared to European and North American countries. In addition, other beneficial health effects such as decreased blood pressure and blood glucose, anti-inflammatory, immunomodulatory and neuroprotective, etc. have been identified. All these properties have been attributed to different bioactive compounds such as sulfated polysaccharides, polyphenols, carotenoids, amino acids, proteins / peptides and lipids. It is noteworthy that seaweeds are also a very good source of fiber, protein, polyunsaturated fatty acids, vitamins and minerals.

Looking for new natural sources of nutrients and bioactive compounds, due to the great diversity and composition, seaweeds are a subject of study, not only to the food industry, but also for the pharmaceutical.

The general aim of this thesis was to obtain extracts of phyco-components (proteins and polysaccharides) from *P. columbina* and to evaluate their bio- and techno-functional properties.

Composition and nutritional properties of *P. columbina* were studied. For this, A.O.A.C techniques were used. Also, amino acid and fatty acids profile, chemical score, mineral dializability, protein digestibility, PDCAAS and content of phenolics compounds extracted in different systems were determined.

---

Then, the extraction conditions for obtaining different fractions from *P. columbina* (proteins and polysaccharides) were defined. In this regard, a process that allows extracting phycobiliproteins and other proteins soluble at room temperature and the phycocolloids (carrageenan and porphyrans) was studied. For this, algae protein solubility and extraction conditions such as: centrifugation time (30-150 minutes), extraction time (60-180 minutes) and extraction pH (2.0; 7.0 and 12.0) were investigated. Furthermore, the effects of a reducing agent on the extractive process as well as, the use of cellulase and xylanase were studied. Definitive process was carried out as follow: *P. columbina* algae powder was dispersed at 50 g kg<sup>-1</sup> in distilled water (at 25°C) for 2 hours and filtered. The residue of the filtration (particle size > 0.297 mm) was subjected to two washings with distilled water at 25°C, was dispersed at 50 g kg<sup>-1</sup> in hot distilled water (at 95°C) for 2 hours and then, centrifuged at 3000xg for 45 minutes at 45°C. The supernatant obtained from hot distilled water extraction was namely phycocolloids fraction (FF). On the other hand, the filtrated obtained from cold distilled water extraction was centrifuged at 3000xg for 30 minutes at 20°C and the resulting supernatant was ultra-filtered using 10 kDa cut-off membrane. The fraction with molecular weight >10 kDa was namely protein fraction (FP). Also, FP was hydrolyzed with various hydrolysis systems (Alcalase, Trypsin, Alcalase + trypsin, and trypsin + alcalase), thus obtaining the corresponding hydrolyzates (HFP: A, T, AT and TA). Finally, the residue insoluble in hot and cold water obtained after the last centrifugation (R), was subjected to sequential enzymatic hydrolysis using two proteases (Fungal Protease Concentrate + Flavourzyme). In this way, a hydrolyzate was obtained, which was called HR.

Subsequently, the fractions and its hydrolysates were characterized. FP and FF were characterized by chemical composition and carbohydrate, sulphates and R-phycoerythrin content. Also, soluble phenolic compound content, electrophoretic profiles (SDS-PAGE) and FTIR spectrum were measured. Finally, in FP fraction the molecular weight profile (PM) lower than 12.5 kDa (by FPLC) and amino acids and polyphenols profile were determined. The hydrolysates were characterized by molecular weight profile (PM) lower than 12.5 kDa, amino acid profile and phenolic compounds soluble in different solvent systems.

The techno-functional properties of the fractions were evaluated, being hydration, rheological and filmogenic properties measured. Regarding that, FP, R and

---

HR protein solubility, intrinsic viscosity and rheological properties of FP and FF dispersions were assessed. Then, the effect of adding FP on physicochemical and antioxidant properties of films formed fraction obtained with FF was studied. The films were formed by casting FF and FP fractions in the following proportions: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 and 100:0, without the addition of plasticizer. The obtained films were characterized according to their thickness, moisture content, color (CIE-Lab), opacity, water vapor permeability, solubility, mechanical properties (maximum stress, elastic modulus and elongation at break), electron microscopy (SEM) and differential scanning calorimetry (DSC). It should be noted that antioxidant activity by ABTS assay was measured in both, dispersions and films.

Bio-functional properties were evaluated in hydrolysates obtained from FP and R (HFP and HR). In this sense, antioxidant (ABTS and DPPH radical inhibition, chelating ability  $\text{Cu}^{2+}$  linked and ORAC), antihypertensive (ACE I inhibition), and immunomodulatory properties (cytokine production: IL10, IL6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , in the culture supernatant of lymphoid cells derived from rat spleen: spleen, macrophages and T-lymphocytes), were evaluated.

Finally, a functional food with the addition of seaweed was prepared and characterized by its physicochemical and nutritional properties and active compounds bio-accessibility. The products were obtained using commercial maize grits and red seaweed *P. columbina* blended in different ratios (100:0 (M); 98.3:1.7 (MPc1); 96.5:3.5 (MPc2) and 94.8:5.2 (MPc3)). The extrusion was carried out using a Brabender 20 DN single screw extruder. The specific consumption of mechanical energy (CEEM) and expansion, specific volume, solubility and water absorption of expanded products were evaluated. Besides that, the antioxidant activity was measured using ABTS and DPPH radical and reducing power. The color analysis of products was performed by CIE-Lab analysis. Sensory evaluation was performed by a trained panel. Odor, color, flavor, and oral texture (crispiness and stickiness) were evaluated using 10 cm non structured scales anchored at extremes (1 and 9). Sensory evaluation of products determined that the most appropriate in appearance and flavor was MaPc2. This product was characterized by its composition, amino acid profile, protein digestibility, mineral dializability and soluble phenolic content. Moreover, the bio-accessibility of active compound was evaluated by measuring the antioxidant (ABTS, DPPH, chelating ability

---

and reducing power) and antihypertensive (ACE inhibition I) properties and compared with the control (100% corn: Ma).

The results showed that the two major components in *P. columbina* were total dietary fiber and protein. Also, this seed presented better chemical score than cereal proteins, and its protein digestibility was similar to vegetable proteins. The main saturated and unsaturated fatty acids were palmitic and eicosapentaenoic acids, respectively. Regarding the mineral content and dializability, a very good relationship Na / K and medium dializability values for P, Ca and Zn were observed.

The protein (R-phycoerythrin, etc) and phenolic content from FP was significantly higher than FF. However, the proportion of total carbohydrates and sulfates in FF was higher than that found in FP. This was corroborated with FTIR spectrum from both fractions.

An effective degradation of FP proteins was observed by the molecular weight profile and the fourth derivative spectrum from HFP. Moreover, it was seen that the hydrolysis process primarily favored the generation of small peptides whose molecular size was 340 Da (dipeptides). Regarding HR, it was seen that hydrolysis process not only favored the generation of small peptides whose molecular size was 523 Da (tetrapeptides), but also liberated phenolic compounds retained in the substrate (R).

In relation with techno-functional properties, a Newtonian behavior was observed for FP dispersion. However, FF dispersion showed a pseudoplastic behavior. These results were consistent with apparent viscosity values and consistency index (K) from both fractions.

The protein (phycobiliproteins) and phenolic compounds content increased with the increase of FP in filmogenic dispersion. However, the level of total carbohydrates decreased. Also, increasing FP ratio showed a change in the flow behavior from Newtonian to pseudo-plastic. Finally, also there was a significant increase in antioxidant capacity increasing FP level in the formulation.

FF films had excellent mechanical properties (tensile strength, elongation at break and elastic modulus). The addition of FP to formulations exerted a plasticizing effect on FF matrix, which was manifested in moisture content, water solubility and mechanical properties of the resulting films but not in its water vapor permeability. The antioxidant capacity of FF films was significantly increased by the addition of PF and a

---

direct relationship between TEAC and total phenolic compounds and R-phycoerythrin was observed.

In relation with bio-functional properties, the antioxidant capacity of the hydrolysates was significantly higher than that of FP. This was due to the presence of antioxidant peptides with low and intermediate molecular weight. The antioxidant potency was the same for all hydrolysates and peptide solubility was not affected by the solvent used in the assay (same IC<sub>50</sub>). In the case of ACE I inhibition, all FP hydrolysates were able to inhibit the enzyme, this effect being associated to the high proportion of di-peptides with Ala, Pro and Leu residues in its sequence. Finally, both FP and their hydrolysates (TA and TA) exhibited an *in vitro* anti-inflammatory effect mediated by IL10 secretion.

HR showed very good antioxidant and ACE inhibitory properties, attributable to bioactive peptides (tetra-peptides) and phenolic compounds released during R hydrolysis. Furthermore, the hydrolysis process gives tetra-peptides with interesting mitogenic properties, which would favor an *in vitro* IL10 mediated anti-inflammatory effect.

Regarding the development of a functional food with the addition of seaweed, CEEM, expansion, and degree of cooking estimated by specific volume decreased with addition of *P. columbina*. Also, there was a decreases in L\*, b\*, ΔE\* and C\* parameter, varying the color from light yellow to a darker greenish yellow. Sensory evaluation of products determined that the most appropriate in appearance and flavor was the Extrudate with 3.5% of seaweed (MaPc2). Protein, total dietary fiber, and ash content of MaPc2 were significantly higher than that found in the control (Ma). This increase was related to algae composition. Furthermore, no significant differences were observed between protein digestibility, PDCAAS and chemical score from both expanded products (Ma and MaPc2). MaPc2 had higher soluble phenolic compound content than that found in Ma. This increase was attributed to phenolic compounds provided by algae, which give higher antioxidant capacity to expanded product.

The antioxidant capacity and ACE inhibitory effect of Ma and MaPc2 persisted after *in vitro* gastrointestinal digestion and was higher for the dialysate of MaPc<sub>2</sub> due to phenolic compounds and bioactive peptides generated by hydrolysis from the seaweed, which would be potentially bio-accessible.

In conclusion, *P. columbina* is a good natural source of nutrients (dietary fiber and protein) and bioactive compounds (antioxidants, antihypertensive and immunomodulatory). In addition, the formation of films by casting technology allowed obtaining biodegradable films with interesting antioxidant properties, mechanical and barrier, which can be used for packaging from various food products sensitive to oxidation. Finally, the extrusion process is a good alternative to obtain a functional food based in corn and added with *P. columbina*, which exhibited interesting *in vitro* bioactive properties.

# I. Introducción

---

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los océanos cubren más del 70% de la superficie de la Tierra y son el hábitat natural de una gran diversidad de plantas, animales y microorganismos (Gressler y col., 2010). Las algas marinas representan una parte considerable de esta biomasa y su uso como alimento data del año 2700 a.C en China (Pérez y col., 2010). Esta práctica actualmente sigue siendo muy difundida en los países orientales tales como China, Japón, Corea, etc. (Gressler y col., 2010). Sin embargo, en los países occidentales el consumo directo no es habitual debido a razones culturales y hábitos de consumo. En este sentido, el uso más importante de las algas en occidente es la obtención de hidrocoloides y su empleo como agentes espesantes y gelificantes en la industria alimentaria (Souza y col., 2012). Otra aplicación muy importante es la obtención de compuestos bioactivos a partir de esta fuente vegetal y su introducción en el mercado, ya sea a través de la industria farmacéutica y/o cosmética (Rao y col., 2007), con más de 15.000 compuesto químicos identificados en la actualidad (Souza y col., 2012).

Recientemente, se ha demostrado que el consumo directo de algas en los países asiáticos está asociado con una baja incidencia en distintos tipos de cáncer respecto a los países europeos y norteamericanos (Kumar y col., 2011). Además, se han identificado otros efectos beneficiosos para la salud, tales como: disminución de la presión arterial y glucemia, efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores, neuroprotectores, etc. Todas estas propiedades se han atribuido a distintos compuestos bioactivos: *polisacáridos sulfatados*, *polifenoles*, *carotenoides*, *aminoácidos*, *proteínas/péptidos* y *lípidos* (Mohamed y col., 2012). Cabe mencionar que las algas marinas son una muy buena fuente fibra (Plaza y col., 2008), proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales (Perez y col., 2010).

En busca de nuevas fuentes naturales de nutrientes y compuestos bioactivos, las algas marinas por su gran diversidad y composición constituyen un tema de estudio de gran interés, no sólo para la industria alimentaria sino también para la farmacéutica.

### **I.1 ALGAS ROJAS**

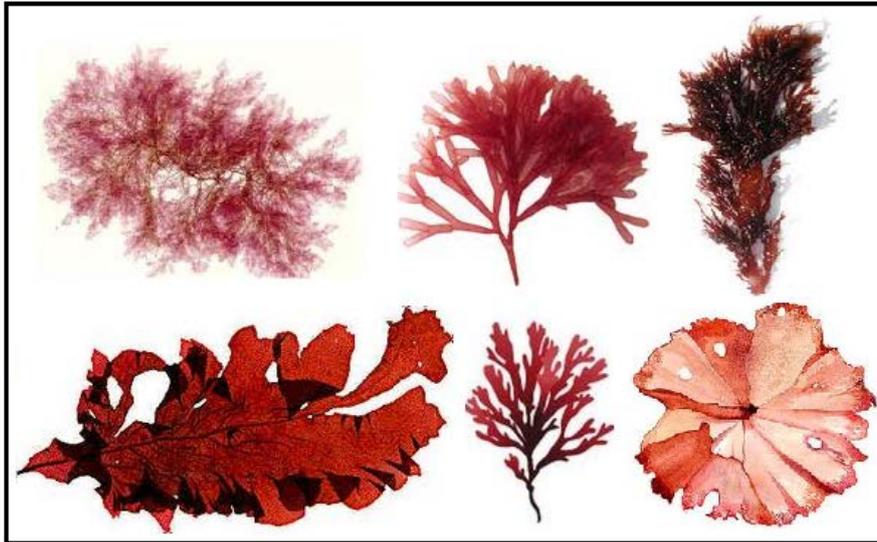
#### **I.1.1 Consideraciones generales**

Las algas son plantas fotolitoautótrofas, monovasculares, de estructuras reproductivas simples. Su composición depende del género y especie, así como también de la porción de la planta, estado de crecimiento y de una serie de factores geográficos y

climáticos: época del año, profundidad, temperatura, salinidad, exposición con respecto al oleaje, latitud geográfica, etc. (Sánchez-Machado y col., 2004).

La clasificación más completa es la que considera en conjunto: organización celular, pigmentación, composición química de la pared celular, productos de reserva y número de flagelos. Teniendo en cuenta todas estas características, se las divide en: *Cyanophyta*, *Clorophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Prochlorophyta*, *Charophyta*, *Euglenophyta*, *Crysoophyta*, *Pyrrophyta* y *Cryptophyta* (Risso y col., 2003).

Las **algas rojas**, correspondientes al filo ***Rhodophyta*** (del griego *rodo*: "rosa" y *fita*: "alga"), se clasifican como plantas no vasculares del clado ***Primoplantae***. Constituyen un grupo de aproximadamente 6.100 especies con una gran diversidad de formas y tamaños (Guiry y Guiry, 2010), siendo uno de los grupos más antiguos entre las algas eucariotas (**Figura I.1**). Son fotosintéticas, carecen de células flageladas y contienen clorofila *a* y *d*, además de pigmentos accesorios como ***ficobiliproteínas*** y ***carotenoides***. Cabe destacar que no poseen almidón en los cloroplastos, sino que usan como material de reserva el ***almidón florideo***, ubicado en el citoplasma celular al igual que el glucógeno en las células animales (Yu y col., 2002).



**Figura I.1** – Algas rojas.

Aunque las algas rojas se encuentran en todas las latitudes, hay una marcada abundancia en las regiones ecuatoriales. Existen pocas especies en las regiones polares y subpolares, donde predominan las algas marrones y verdes. Las especies más grandes de **algas rojas** de talos masivos aparecen en las áreas frías y templadas, mientras que en los mares tropicales son principalmente pequeñas plantas filamentosas (con la

excepción de las formas masivas calcáreas). Las *Rhodophytas* poseen mayor habilidad para vivir a grandes profundidades que los miembros de otros grupos. Pueden alcanzar hasta los 200 metros de profundidad, una habilidad relacionada con la función de los pigmentos accesorios en la fotosíntesis (Lee, 2008). Los pigmentos fotosintéticos accesorios o *ficobliproteínas* son *ficoeritrina*, *ficocianina* y *aloficocianina* (Van den Hoek y col., 1989).

A pesar de que las *Rhodophytas* presentan con frecuencia una coloración rojiza, debido a la presencia de *ficoeritrina* en el exterior de los cloroplastos, también pueden exhibir coloración violeta, marrón, negra o incluso azul. Estas variaciones en la pigmentación son atribuidas a *ficocianina* y *aloficocianina* (Van den Hoek y col., 1989). Cabe destacar que las *algas rojas* que crecen en regiones con incidencia directa de la luz solar pueden presentar coloración marrón amarillenta o hasta incluso verdosa. Este fenómeno se debe a que la clorofila y los carotenos presentes en el alga enmascaran a las *ficobliproteínas* (Van den Hoek y col., 1989). Cuando mueren, tienden a tornarse verdes ya que las *ficobiliproteínas*, al contrario de la clorofila, se solubilizan y se eliminan al medio.

La mayoría de las *algas rojas* presentan una estructura filamentosa que crece a partir de una única célula apical la cual se divide secuencialmente en segmentos originando un eje, que a su vez forma verticilos de ramas laterales. Pocos géneros, como el *Porphyra*, poseen células yuxtapuestas formando láminas de apenas una o dos capas (Raven y col., 1996).

Las *Rhodophytas* poseen un importante papel económico en países como Japón, China y Filipinas, entre otros, donde muchos géneros tales como *Porphyra*, *Euclima* y *Gracilaria* son recolectados directamente en las costas o de áreas de cultivo, y son destinadas ya sea para alimentación o para la extracción de componentes tecno-funcionales como los *ficocoloides* (Fleurence, 1999).

## **I.1.2 Principales componentes celulares**

### **I.1.2.1 Componentes de la pared celular**

La pared celular de las *algas rojas* representa del 30 al 65 % del peso seco del alga y consta de tres dominios:



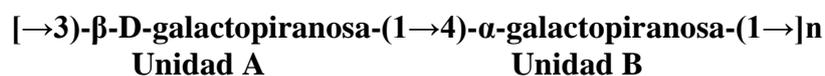
#### a) Pared fibrilar y dominio glicoproteico

Los *polisacáridos fibrilares* junto con el *dominio glicoproteico* forman el reticulado de la pared celular donde se encuentra embebida la matriz amorfa. Estos polisacáridos constituyen la parte más inerte y resistente de la pared celular. El más común y conocido de estos compuestos esqueléticos es la *celulosa*, un polímero formado por unidades de  $\beta$ -D-glucosa unidas mediante enlaces (1 $\rightarrow$ 4). En ciertos casos, ésta puede ser reemplazada por polímeros que contienen unidades de  $\beta$ -D-manosa unidas mediante enlaces (1-4) o por unidades de  $\beta$ -D-xilosa unidas por enlaces (1 $\rightarrow$ 3) (Parker, 1964). Los xilanos estructurales son insolubles y presentan una cadena enteramente formada ya sea por uniones  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) o  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Miller, 1997).

El *dominio glicoproteico* es poco conocido en la actualidad, pero de gran importancia cuali y cuantitativa. Las glicoproteínas que forman parte de esta estructura poseen dominios de aminoácidos denominados "*dominios de unión a celulosa*" ("*cellulose binding domains*"), que complejan las fibrillas de éste u otros polisacáridos fibrilares facilitando el entrecruzamiento.

#### b) Matriz amorfa

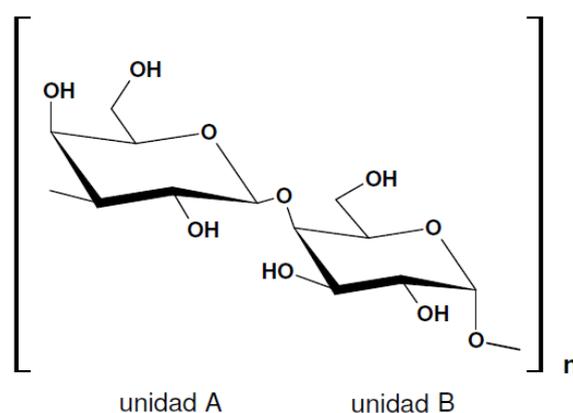
La *matriz amorfa* usualmente se extiende a los espacios intercelulares o áreas de contacto entre células adyacentes. Esta matriz no se encuentra simplemente depositada sobre el reticulado de polisacáridos fibrilares y glicoproteínas, sino que interacciona con él. Está formada por *galactanos sulfatados* del tipo de los carragenanos, agaranos y "DL-híbridos"; también han sido hallados xilanos (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Estos polisacáridos son denominados *ficocoloides* por su capacidad de formar geles en medios acuosos (Al-Alawi y col., 2010). La matriz está formada por cadenas lineales de *galactanos*, compuestas por unidades alternantes de  $\beta$ -*galactopiranososa* enlazada por la posición 3 (unidad A) y  $\alpha$ -*galactopiranososa* unida por la posición 4 (unidad B):



Las unidades A siempre presentan la configuración enantiomérica **D**, mientras que la unidad B puede presentar configuración **D** o **L**. En ocasiones esta unidad aparece como **3,6-anhidrogalactopiranososa**. Basándose en la estereoquímica de la unidad B, los galactanos pueden clasificarse en **carragenanos** cuando esta unidad pertenece a la serie **D** o **agaranos** cuando pertenece a la **serie L** (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). La variabilidad de estos galactanos está dada por el grado de sustitución que poseen los distintos grupos hidroxilos de la unidad [A-B] ya sea por grupos sulfatos o, en menor medida, por cetales del ácido pirúvico, éteres metílicos o por distintos tipos de ramificación (Usov, 1998).

### ✓ Carragenanos

Los **carragenanos** son biosintetizados mayoritariamente por **algas rojas** del orden **Gigartinales** (Campo y col., 2009), aunque aparecen en **algas rojas** de otros órdenes. Como se mencionó anteriormente poseen una estructura básica repetitiva de  $\beta$ -D-galactopiranososa (unidad A) y  $\alpha$ -D-galactopiranososa (unidad B) (**Figura I.2**), cuyo grado de sulfatación supera al de los **agaranos** (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011).

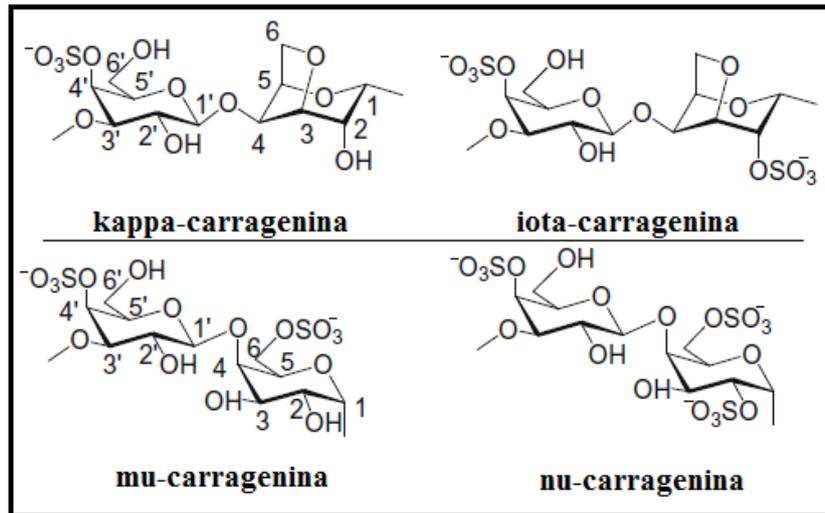


**Figura I.2** – Estructura básica de los carragenanos (Campo y col., 2009).

La clasificación de los **carragenanos** se hace de acuerdo al grado de sulfatación y con la presencia o ausencia de 3,6-anhidro-D-galactosa en la unidad B (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). De acuerdo al grado de sulfatación en la unidad A, los carragenanos se pueden dividir en cuatro familias: **kappa ( $\kappa$ )**, **lambda ( $\lambda$ )**, **beta ( $\beta$ )** y **omega ( $\omega$ )**.

La familia **kappa ( $\kappa$ )**, posee un grupo sulfato en la posición 4 (C-4) de la unidad A y la unidad B puede ser 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa (**kappa-carragenina**), 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa 2-sulfato (**iota-carragenina**),  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato (**mu-**

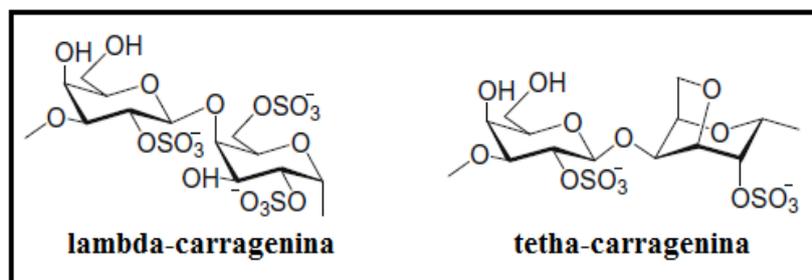
*carragenina*) o galactosa 2,6-disulfato (*nu-carragenina*) (Campo y col., 2009) (Figura I.3).



**Figura I.3** – Estructura idealizada de los  $\kappa$ -carragenanos (Campo y col., 2009).

Es importante resaltar que las *algas rojas* pueden sintetizar carragenanos con una o más sustituciones en la misma molécula en diferentes proporciones, lo que origina nuevos tipos de *carragenanos* denominados “*carragenanos híbridos*” (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011), tales como el híbrido **kappa/iota (kappa-2)** que está formado por la mezcla de los carragenos kappa e iota (Campo y col., 2009).

La familia **lambda** ( $\lambda$ ), posee un grupo sulfato en la posición 2 (C-2) de la unidad A y la unidad B puede ser  $\alpha$ -D-galactosa 2,6-disulfato (**lambda-carragenina**),  $\alpha$ -D-galactosa 2-sulfato (**xi-carragenina**) o 3,6-anhidro- $\alpha$ -Dgalactosa 2-sulfato (**theta-carragenina**) (Figura I.4).



**Figura I.4** – Estructura idealizada de los  $\lambda$ -carragenanos (Campo y col., 2009).

Cabe mencionar que la **pi-carragenina** ( $[\rightarrow 3\text{-}4,6\text{-O-(1\text{-}carboxietilidieno)\text{-}\beta\text{-D-galactosa-2-sulfato-(1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-galactosa 2-sulfato-(1}\rightarrow ]$ ) también pertenece a esta familia (Campo y col., 2009).

En la **Tabla I.1** se resumen los distintos tipos de carragenos de acuerdo al patrón de sulfatación de la unidad A (Knutsen y col., 1994).

**Tabla I.1** Distintos tipos de carragenanos de acuerdo al patrón de sulfatación de la unidad A (Knutsen y col., 1994).

Familia	Subgrupo	Unidad A	Unidad B <sup>1</sup>
Kappa	κ (kappa)		3,6-AG
	ι (iota)	4-sulfato	3,6-AG-2-sulfato
	μ (mu)		6-sulfato
	ν (nu)		2,6-disulfato
Lambda	λ (lambda)	2-sulfato	2,6-disulfato
	π (pi)	2-sulfato; 4,6-(1-carboxietilidieno)	2-sulfato
	ξ (xi)	2-sulfato	2-sulfato
	θ (theta)	2-sulfato	3,6-AG
Beta	β (beta)		3,6-AG
	α (alfa)	-----	3,6-AG-2-sulfato
	γ (gama)		6-sulfato
	δ (delta)		2,6-disulfato
Omega	ω (omega)		3,6-anhidrogalactosa
	ψ (psi)	6-sulfato	6-sulfato

<sup>1</sup>3,6-AG: 3,6-anhidrogalactosa

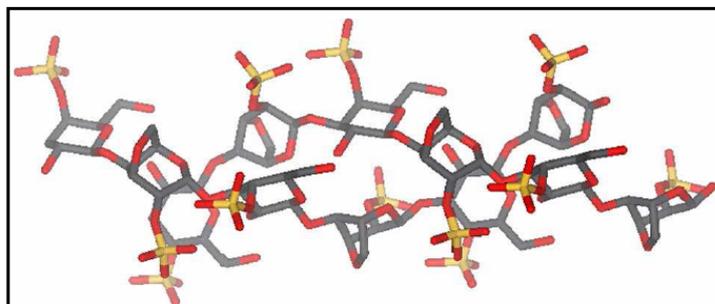
La familia **beta (β)**, comprende *galactanos* en los cuales la unidad A no está sulfatada y la unidad B puede ser 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa (*beta-carragenina*), 3,6-anhidro  $\alpha$ -D-galactosa 2-sulfato (*alfa-carragenina*),  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato (*gama-carragenina*) o  $\alpha$ -D-galactosa 2,6-disulfato (*delta-carragenina*) (Campo y col., 2009).

La familia **omega** ( $\omega$ ), posee la unidad A y B sulfatada en la posición 6 (C-6). A su vez, la unidad B puede ser  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato (*psi-carragenina*) o 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa (*omega-carragenina*) (Campo y col., 2009).

Cabe destacar que los tres *carragenanos* con mayor interés comercial son:  $\kappa$  (**kappa**),  $\iota$  (**iota**) y  $\lambda$  (**lambda**) (Al-Alawi y col., 2011), que poseen distintos grados de sulfatación, cuyos valores son: 20%, 33% y 44% ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ), respectivamente (Campo y col., 2009).

Todos los *carragenanos* son solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos, aceites o grasas. La solubilidad acuosa depende principalmente del grado de sulfatación del polisacárido, ya que estos grupos otorgan hidrofiliidad a la molécula, y de los cationes asociados. Los principales cationes asociados a los *carragenanos* son:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Cabe destacar que el grado de sulfatación de los *carragenanos* y los cationes asociados a la molécula determinan la viscosidad de las soluciones acuosas resultantes y la fuerza de los geles formados (Campo y col., 2009). Estas dos variables han sido las más explotadas por la industria alimentaria y farmacéutica, ya sea para usarlos como agentes espesantes, gelificantes o estabilizantes de emulsiones (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Tanto  $\kappa$  como  $\iota$  carragenina tienen la capacidad de formar geles, mientras que  $\lambda$  carragenina sólo actúa como espesante (Prado y col., 2003).

El proceso de gelificación de los *carragenanos* ( $\kappa$  carragenina), comprende dos etapas sucesivas: **1**) formación de una hélice a partir de una estructura desordenada y **2**) asociación entre las hélices mediante enlaces puente de hidrógeno, formando una red tridimensional estable. Cabe señalar que la asociación entre las hélices depende de los cationes presentes en el medio (**Figura I.5**).



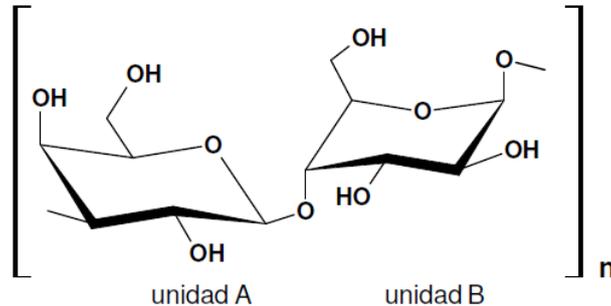
**Figura I.5** – Modelo de la doble hélice de  $\iota$ -carragenina (Campo y col., 2009).

Los cationes se pueden clasificar en tres categorías de acuerdo a la eficiencia con que promueven el proceso de gelificación: **a**) cationes monovalentes no específicos ( $\text{Li}^+$

y Na<sup>+</sup>), **b**) cationes divalentes (Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) y **c**) cationes monovalentes específicos (K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>). Este último grupo se considera el más eficiente para inducir la gelificación de los *carragenanos*, siendo los cationes más efectivos K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> (Funami y col., 2007). El K<sup>+</sup> tiene la capacidad de introducirse entre las dobles hélices y neutralizar las cargas negativas de los iones sulfatos. Esto último no sólo favorece el acercamiento entre las macromoléculas, sino que también incrementa la estabilidad de la estructura (Campo y col., 2009).

#### ✓ *Agaranos*

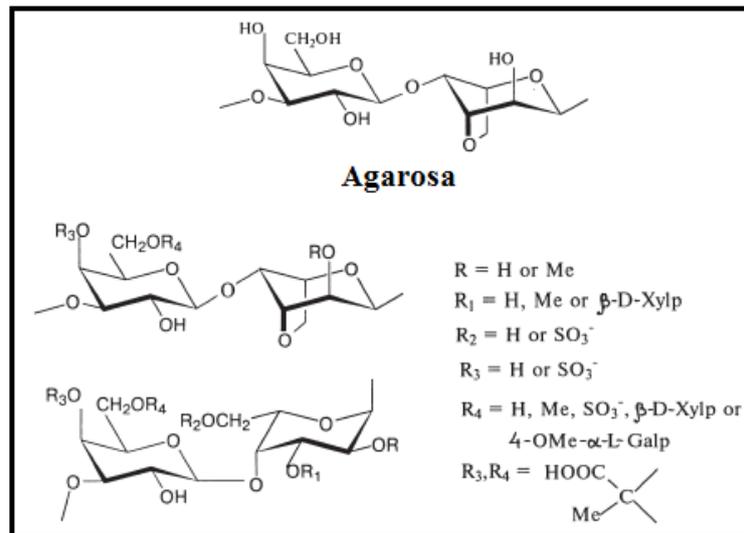
Los *agaranos* son biosintetizados mayoritariamente por *algas rojas* pertenecientes a los géneros *Porphyra*, *Gelidium*, *Pterocladia* y *Gracilaria* (Souza y col., 2012). En el caso de los *agaranos*, la variabilidad estructural está dada por la presencia de grupos sustituyentes sulfato, metoxilo y piruvilo, estos dos últimos son más comunes que en los *carragenanos* (Melo y col., 2002). La estructura básica repetitiva de los *agaranos* está constituida por β-D-galactopiranososa (unidad A) y α-L-galactopiranososa (unidad B) (Figura I.6). Además, la unidad B puede estar total o parcialmente ciclada en la forma de 3,6-anhidro-L-galactopiranososa.



**Figura I.6** – Estructura básica de los agaranos (Campo y col., 2009).

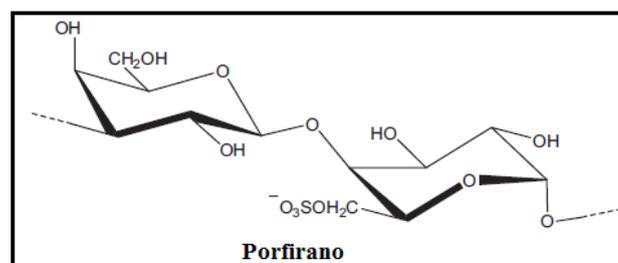
Los *agaranos* no poseen una clasificación tan bien definida como la de los *carragenanos*. Una alternativa es clasificarlos según el patrón de sustitución de la molécula y la fuerza del gel que forman (Miller, 1997). En base a estos dos parámetros podemos hablar de *agarosa*, *ágar* y *agaroides*. La *agarosa* está constituida por unidades alternantes de (1→3) β-D-galactosa (unidad A) y (1→4) 3,6-anhidro-α-L-galactosa (unidad B) y forma geles de elevada fuerza. El *ágar* está formado por polímeros cuyo grado de sulfatación y sustitución por grupos acetales provenientes del ácido pirúvico es bajo. Además posee altos niveles de ésteres metílicos y 3,6-anhidrogalactosa. Estos dos sustituyentes hacen que los geles obtenidos con estos polímeros sean de menor dureza

respecto a la *agarosa*. Se consideran *agaroides* a aquellos polímeros cuya complejidad estructural es mayor que la de la *agarosa* y el *ágar*. En este sentido, los *agaroides* pueden presentar una sustitución simultánea de grupos sulfatos, grupos acetales y grupos metilos. No forman geles o si lo hacen son muy débiles (Miller, 1997). En la **Figura I.7** se muestran las principales características estructurales de los *agaranos* (Melo y col., 2002).



**Figura I.7** – Características estructurales de los *agaranos* (Melo y col., 2002).

Los *agaranos* biosintetizados por los géneros *Porphyra* y *Bangia* reciben el nombre genérico de *porfiranos* (Noseda y col., 2000). Su estructura básica se asemeja a la *agarosa*, en donde la unidad A puede estar formada por  $\beta$ -D-galactosa o 6-O-metil- $\beta$ -D-galactosa, mientras que la unidad B puede ser  $\alpha$ -L-galactosa,  $\alpha$ -L-galactosa-6-sulfato o 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa (**Figura I.8**) (Venkatpurwar y col., 2011). Es así que los *porfiranos* se caracterizan por un alto patrón de sustitución en las unidades A y por lo menos un 50% de sustitución de las Unidades B (Zhang y col., 2005).



**Figura I.8** – Características estructurales de los *porfiranos* (Usov., 1998).

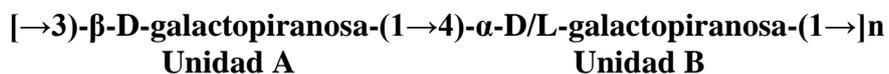
Cabe mencionar que la presencia de L-galactosa-6-sulfato en los *porfiranos* disminuye la capacidad de gelificación de este ficocoloide (Estevez y col., 2003).

Además, los *porfiranos* son los componentes más importantes de la pared celular y constituyen la principal fracción soluble en agua caliente de las algas rojas (Venkatpurwar y col., 2011).

Dentro del grupo de los *agaranos* también se pueden mencionar los *xilogalactanos*. Estos polisacáridos poseen una estructura central muy parecida a la de los *agaranos* pero su patrón de sustitución es mucho más complejo. En estos polímeros la unidad A de D-galactosa puede estar total o parcialmente metilada en el carbono 6, sulfatadas en el carbono 2, 4 y/o 6 y glicosilada en el carbono 4 o 6 por unidades de β-D-xilosa, α-L-galactosa o 4-O-metil-α-L-galactosa. Además, la unidad B puede estar como 3,6-anhidrogalactosa o como α-galactosa-6-sulfato, que a su vez puede estar parcialmente metilada en el carbono 2 y/o sustituido en el carbono 6 (Usov y col., 1997).

#### ✓ *DL-Híbridos*

Este grupo de *galactanos* no presenta una estructura regular como la de los *carragenanos* y *agaranos* ya que en la misma molécula puede haber características de ambos polisacáridos. Es decir, la unidad B puede presentar tanto la configuración D como L, según se detalla a continuación:



#### ✓ *Xilanos*

Este tipo de *xilano* es diferente al estructural ya que puede exhibir tanto uniones β-(1→3) como β-(1→4) en una misma molécula. Además, está constituido por una cadena lineal neutra de β-D-xilosa cuya relación β-(1→3) / β-(1→4) es 1:4. Un punto muy interesante a destacar, a diferencia de los xilanos estructurales, es que son solubles. Resulta oportuno destacar que la pared celular de las *algas rojas* también posee otros componentes tales como mananos, xilomananos, etc. (Kolender, 1997).

### I.1.2.2 Componentes del citoplasma y los cloroplastos

#### a) Almidón florídeo

El almidón florídeo es un polímero de reserva específico de las *algas rojas* con uniones α-(1→4) glucosídicas y ramificaciones α-(1→6) que se sintetiza, a diferencia de las plantas superiores, en el citoplasma celular. En este sentido hasta un 80% del

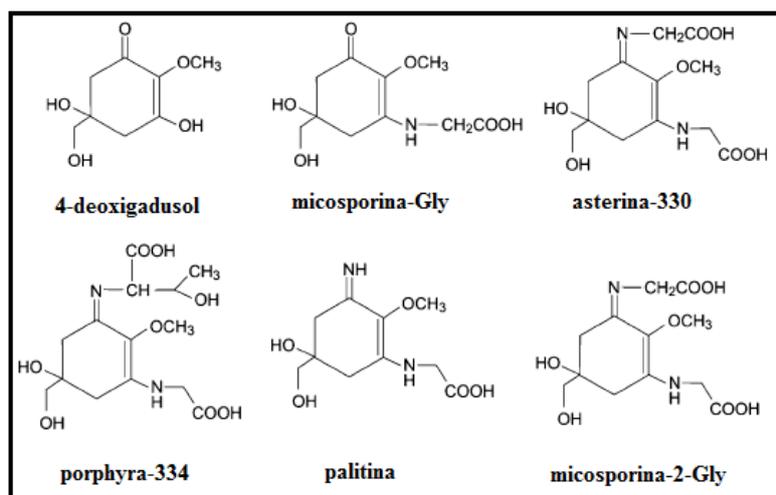
volumen citoplasmático de las algas rojas puede ser ocupado por gránulos de almidón florídeo. Este hidrato de carbono es utilizado como fuente de carbono y energía por las *Rhodophytas*. Además, posee una longitud de cadena media relativamente corta (18 unidades de glucosa), con elevada frecuencia de ramificación (4,8%) y bajo nivel de lípidos y proteínas asociadas (Yu y col., 2002).

## b) Aminoácidos tipo micosporina

### ✓ Características generales

Los *aminoácidos tipo micosporina (AAM)* son metabolitos secundarios de bajo peso molecular < 400 Da, con alta temperatura de desnaturalización y solubilidad en agua (anfólitos) (Llewellyn y Airs, 2010). Poseen una estructura básica formada por un anillo cromóforo de *ciclohexanona o ciclohexamina* con sustituyentes aminoacídicos o sus correspondientes iminoalcoholes (Sinha y col., 2007). Los máximos de absorbancia se encuentran en el intervalo de 310-360 nm y sus espectros se caracterizan por mostrar sólo un máximo de absorción con un ancho de banda de aproximadamente 20 nm. Cabe señalar que los corrimientos en el máximo de absorbancia se deben al tipo de sustituyente que posee el anillo (Llewellyn y Airs, 2010). Además, poseen alta fotoestabilidad y una baja emisión de fluorescencia (Korbe y col., 2006).

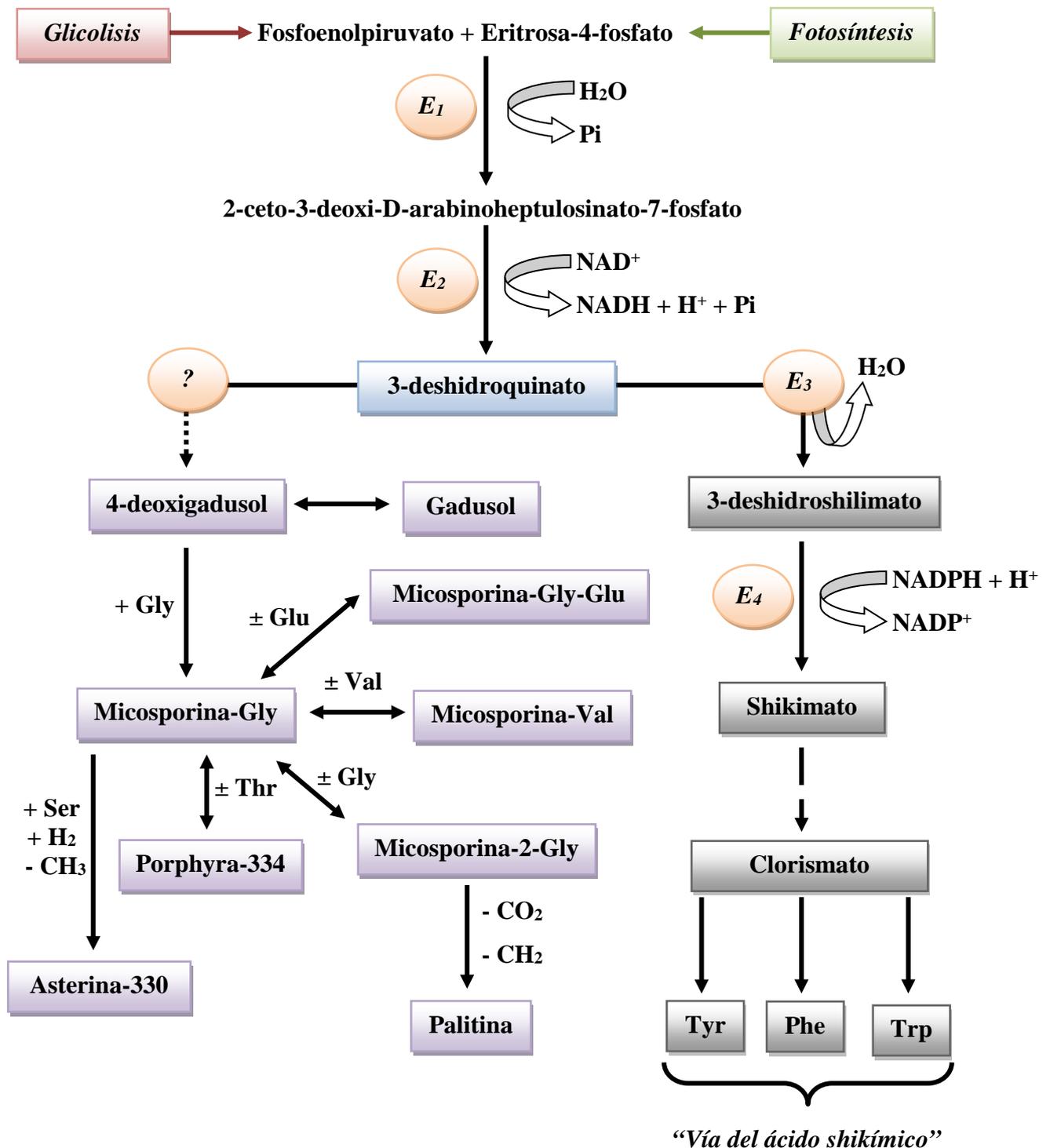
Se han descrito alrededor de 23 *AAM* provenientes de diferentes organismos marinos (Oren y Gunde-Cimerman, 2007; Hardy y Fitzgerald, 2011), algunos de estos se muestran en la **Figura I.9**.



**Figura I.9** – Características estructurales de algunos *aminoácidos tipo micosporina* (Oren y Gunde-Cimerman, 2007).

✓ *Biosíntesis*

Los AAM son sintetizados en las *algas rojas* a partir del 3-dehidroquinato, como se muestra en la **Figura I.10**.



**Figura I.10** – Ruta biosintética de los AAM a través de la vía del ácido shikímico (Sinha y col., 2007). E<sub>1</sub>, 3-deoxi-D-arabinoheptulosinato-7-fosfato sintasa; E<sub>2</sub>, deshidroquinato sintasa; E<sub>3</sub>, deshidroquinato deshidrogenasa; E<sub>4</sub>, shikimato deshidrogenasa; flechas punteadas indican posible vía de conexión metabólica.

El *3-dehidroquinato* es un metabolito intermedio producido en la vía biosintética de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) conocida como “*vía del ácido shikímico*”. Esta vía es vital para el metabolismo intermedio y está unida funcionalmente a la fotosíntesis (Cardozo y col., 2007). A partir del precursor *3-deshidroquinato* se genera un segundo intermediario denominado *4-deoxygadusol* que es conjugado con el aminoácido glicina para dar *micosporina-Gly*. Esta etapa se denomina **condensación** (Sinha y col., 2007). Luego de la condensación se van adicionando nuevos aminoácidos dando lugar a los distintos tipos de **AAM** (**Figura I.10**).

#### ✓ *Funciones fisiológicas*

La principal función de los **AAM** es de **fotoprotección**, especialmente por su capacidad para absorber a longitudes de onda corta. Esto unido a su alta fotoestabilidad los convierte en verdaderos agentes protectores frente a la radiación UV (Oren y Gunde-Cimerman, 2007). Resulta oportuno acotar que la función de fotoprotección es muy importante, ya que muchos componentes celulares pueden ser dañados por la radiación UV, entre los que se pueden citar: proteínas, ADN, ARN y membranas. Además, algunos procesos biológicos tales como la fotosíntesis y el crecimiento pueden sufrir alteraciones. En este sentido se ha podido observar que aquellas algas cuya exposición a la radiación solar es mayor presentan una concentración intracelular de **AAM** más alta. De este modo, las algas de las zonas templadas exhiben un mayor nivel de **AAM** que las que viven en aguas profundas (Korbe y col., 2007).

Otra función que cumplen los **AAM** es actuar como moléculas **antioxidantes** (Hardy y Fitzgerald, 2011). Se ha podido demostrar que la *micosporina-Gly* y su precursor (*4-deoxygadusol*), capturan los radicales de libres generados por estrés oxidativo y de esta manera protegen a los sistemas biológicos de la mutagénesis (de la Coba y col., 2009). Esta propiedad podría estar relacionada con la capacidad que tienen los **AAM** para bloquear la producción de fotodímeros de *timina* (Korbe y col., 2007). La actividad antioxidante de estas moléculas se ha asociado a la presencia de un grupo **ceto** en su estructura química (de la Coba y col., 2009).

Recientemente se ha demostrado que no sólo la calidad y cantidad de energía recibida por las algas influyen en la síntesis y acumulación de **AAM**, sino que también influye la disponibilidad de nitrógeno del medio (Korbe y col., 2007). En este sentido,

se ha podido observar que a niveles más elevados de amonio, mayor es la concentración de *AAM* en la célula, lo cual está en función a su vez de la radiación incidente (Korbee et al. 2004). Cabe destacar que este fenómeno se ha visto en distintas especies de algas rojas tales como *Porphyra columbina*, *Porphyra umbilicalis*, *Porphyra leucosticta* y *Grateloupia lanceola* (Korbe y col., 2007).

Por lo tanto, los *AAM* podrían actuar no sólo como sustancias fotoprotectoras y antioxidantes, sino también como reservorios de nitrógeno. Este posible rol podría ser análogo al sugerido para otros compuestos de las *algas rojas* tales como las *ficobiliproteínas* que no sólo actúan como pigmentos fotosintéticos accesorios, sino que también son proteínas de reserva (Korbe y col., 2007).

### c) **Ficobiliproteínas**

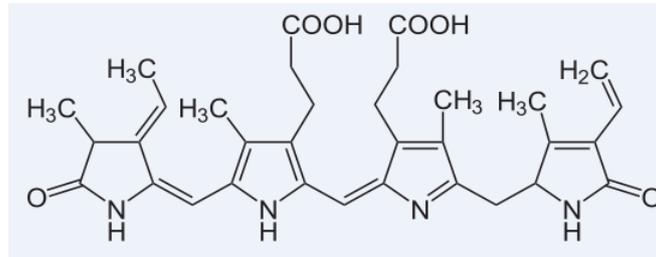
#### ✓ *Características generales*

Las *ficobiliproteínas* son una familia de pigmentos proteicos hidrofílicos que colaboran en el proceso fotosintético, captando la luz y transfiriéndosela a la *clorofila a* (Sekar y Chandramohan, 2008). Estas proteínas son uno de los mayores constituyentes proteicos de las *algas rojas* y cianobacterias, representando hasta un 50% del contenido proteico celular (Niu y col., 2007). En estos organismos las *ficobiliproteínas* actúan como verdaderas antenas ya que absorben energía en porciones del espectro visible donde la *clorofila* lo hace pobremente (Sekar y Chandramohan, 2008). A diferencia de los carotenoides y las clorofilas, las *ficobiliproteínas* no forman parte de los fotosistemas ubicados en la bicapa lipídica, sino que constituyen una estructura adherida a la superficie citoplasmática de las membranas tilacoides denominada *ficobilisomas*. Los *ficobilisomas* se asocian preferentemente al fotosistema II de las algas rojas cuyo centro fotosintético es la *clorofila a* (Fu y col., 2011).

#### ✓ *Estructura y clasificación*

Las *ficobiliproteínas* son proteínas oligoméricas fluorescentes constituidas por dos tipos de cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas covalentemente a un grupo prostético denominado *ficobilina* (Denis y col., 2009a). Las *ficobilinas* están formadas por cuatro anillos pirrólicos lineales que se encuentran unidos covalentemente a través del anillo A a residuos de cisteína específicos de la apoproteína (Sekar y Chandramohan, 2008). Entre las *ficobilinas* se pueden destacar: *ficocianobilina* de color azul, *ficoeritobilina*

de color rojo (**Figura I.11**), *ficourobilina* de color amarillo y *ficobiliviolina* de color púrpura.



**Figura I.11** – Estructura química de la *ficocerytrina*.

Basándose en las propiedades de absorción, las *ficobiliproteínas* se pueden dividir en tres grupos: *ficoeritrina*, *ficocianina* y *aloficocianina*. En **Tabla I.2** se resumen los rangos máximos de absorción para las distintas *ficobiliproteínas* (Fu y col., 2011).

**Tabla I.2** Rangos máximos de absorción para las distintas *ficobiliproteínas* (Fu y col., 2011).

<b>Ficobiliproteína</b>	<b><math>\lambda</math> máximo de absorción (nm)</b>
<i>Ficoeritrina</i>	480 – 580
<i>Ficocianina</i>	600 – 620
<i>Aloficocianina</i>	620 – 655

#### - *Ficoeritrina*

Dependiendo del origen y las propiedades de absorción, la *ficoeritrina* se puede clasificar en: *R-ficoeritrina*, *B-ficoeritrina*, *b-ficoeritrina* y *C-ficoeritrina* (Fu y col., 2011).

La *R-ficoeritrina* fue aislada de las *algas rojas* y no se ha encontrado en otro tipo taxonómico. Posee un pico primario de absorción a 565 nm con un hombro a 545 nm y un pico secundario a 499 nm (Denis y col., 2009a). Esta proteína está constituida por tres subunidades proteicas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; cuyos pesos moleculares aparentes son: 18, 20 y 30-33 kDa, respectivamente (Fu y col., 2011). Estas subunidades tienden a agregarse formando una unidad básica que puede tener distintos arreglos tales como:  $(\alpha \beta)_3 \gamma$  o  $(\alpha \beta)_6 \gamma$ , siendo este último el más común. El peso molecular aparente de la *R-ficoeritrina* es de aproximadamente 240 kDa. La subunidad  $\alpha$  sólo posee el cromóforo

*ficoeritrobilina*, mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  pueden contener tanto *ficoeritrobilina* como *ficourobilina*.

Esta *ficobiliproteína* se usa principalmente como marcador fluorescente en diferentes técnicas inmunológicas y de biología celular debido a las excelentes propiedades espectrales que exhibe (Rossano y col., 2003). Además, se ha podido observar su aplicación como agente anticarcinogénico e inmunomodulador (Bermejo Román y col., 2002). Otra aplicación es como colorante natural en la industria cosmética y alimentaria debido a su coloración fuertemente roja (Denis y col., 2009a). Su purificación a partir de las *algas rojas* se puede llevar a cabo usando distintas técnicas tales como: precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, etc. (Niu y col., 2007; Denis y col., 2009a).

La *B-ficoeritrina* es el mayor pigmento de las *microalgas* rojas, tales como *Porphyridium cruentum* (Bermejo y col., 2003). También está presente en cianobacterias. Posee un pico primario de absorción a 565 nm y un pico secundario a 545 nm con un hombro a 499 nm (Denis y col., 2009a). El pico primario de absorbancia es el mismo que el de la *R-ficoeritrina*, pero el pico secundario y el hombro espectral están invertidos. Esto se debe a que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  poseen *ficoeritrobilina*, mientras que la subunidad  $\gamma$  puede contener tanto *ficoeritrobilina* como *ficourobilina*, lo cual difiere de la *R-ficoeritrina*.

Al igual que la *R-ficoeritrina*, la *B-ficoeritrina* presenta muy buenas propiedades espectrales, por lo que se usa principalmente como sonda fluorescente y reactivo analítico, además de emplearse para el desarrollo de biosensores (Básaca-Loya y col., 2009). Su purificación se lleva a cabo principalmente a partir de *P. cruentum* mediante diversos métodos de extracción proteica que culminan en técnicas cromatográficas tales como cromatografía de exclusión molecular e intercambio aniónico (Básaca-Loya y col., 2009).

La *C-ficoeritrina* proviene principalmente de las cianobacterias y presenta un máximo de absorbancia a 565 nm (Básaca-Loya y col., 2009). A diferencia de la *R-ficoeritrina* esta ficobiliproteína posee un solo tipo de cromóforo (*ficoeritrobilina*). Generalmente adopta la conformación cuaternaria de hexámero cuyo arreglo es  $\alpha_6 \beta_6$  (MacColl, 1991).

### - *Ficocianina*

Según el origen y las propiedades de absorción, la *ficocianina* se puede clasificar en *C-ficocianina* y *R-ficocianina*.

La *C-ficocianina* es la ficobiliproteína más abundante en las cianobacterias y es un pigmento secundario en las *algas rojas* (Cherng y col., 2007). Posee un máximo de absorbancia a 620 nm y está constituida por dos subunidades proteicas:  $\alpha$  y  $\beta$ . Tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta$  poseen el cromóforo *ficocianobilina*. El peso molecular aparente de la *C-ficocianina* está en el rango de los 70 a 110 kDa (Romay y col., 1998).

Esta *ficobiliproteína* posee muy buenas propiedades bioactivas tales como: actividad antioxidante, antiinflamatoria, neuro y hepatoprotectora, etc. (Romay y col., 1998; Cherng y col., 2007). Además, se la suele utilizar como colorante natural en la industria alimentaria y cosmética (Sekar y Chandramohan, 2008). Una de las principales fuentes de la cual se extrae la *C-ficocianina* es la *Spirulina platensis*. Para poder aislar y purificar a la *C-ficocianina* a partir de esta cianobacteria se han desarrollado diferentes procesos de extracción que involucran digestión enzimática de la pared celular, cromatografías de exclusión molecular, etc. (Sekar y Chandramohan, 2008).

Al igual que la *C-ficocianina*, la *R-ficocianina* presenta un máximo de absorbancia a 615 nm, pero posee un pico secundario a 555 nm. Este pico se debe a la presencia de *ficoeritrobilina* en la subunidad  $\beta$ , además del cromóforo *ficocianobilina* presente en la subunidad  $\alpha$ . El peso molecular aparente de la *R-ficocianina* es de aproximadamente 110 kDa (Glazer y Hixon, 1975).

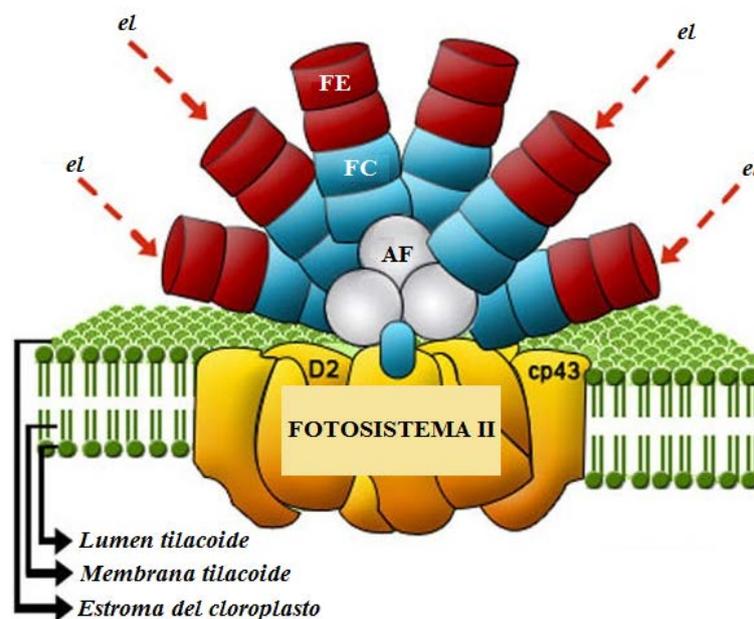
### - *Aloficocianina*

La *aloficocianina* es la *ficobiliproteína* que se encuentra en menor proporción tanto en las cianobacterias como en las *algas rojas*. La misma exhibe un máximo de absorbancia a 650 nm y un hombro a 620 nm. Su estructura básica es la de un trímero constituido por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha_2\beta$ ) (Su y col., 2010).

Esta *ficobiliproteína* se usa principalmente como marcador fluorescente en diferentes técnicas inmunológicas y de biología celular. Además se ha visto que posee interesantes propiedades antioxidantes (Ge y col., 2006).

✓ *Ficobilisomas*

Como se mencionó anteriormente, el *ficobilisoma* es una estructura macromolecular constituida por las *ficobiliproteínas* y se encuentra anclado sobre la superficie de la membrana tilacoide. Está formado por un núcleo del cual irradian estructuras en forma de varilla (Galland-Irmouli y col., 2000). El núcleo lo constituye la *aloficocianina* mientras que la ficoeritrina y ficocianina forman parte de la varilla. Cabe señalar que la *ficoeritrina* se encuentra en el extremo superior de la estructura y la *ficocianina* forma la base unida al núcleo (**Figura I.12**). Esta organización permite que la transferencia de energía hacia el interior del cloroplasto sea sumamente eficiente (alrededor del 100%). La *ficoeritrina* y la *ficocianina* tienen un estado de excitación menos energético (menores longitudes de onda de excitación) y por ello se localizan en la periferia del *ficobilisoma*; a diferencia de la *aloficocianina*, que se encuentra localizada próxima al fotosistema y cuyo estado de excitación es mayor (Sekar y Chandramohan, 2008).



**Figura I.12** – Estructura del *ficobilisoma*. FE, *ficoeritrina*; FC, *ficocianina*; AF, *aloficocianina*; *el*, energía lumínica.

El proceso de transferencia comienza con la captación de energía lumínica por parte de la *ficoeritrina* (“función de antena”), luego la energía absorbida se transfiere a la *ficocianina* y posteriormente a la *aloficocianina*. Por último, la *aloficocianina* transfiere la energía lumínica al **fotosistema II** (*clorofila a*) y en menor medida al I (Sekar y Chandramohan, 2008).

#### d) Compuestos fenólicos

##### ✓ *Características generales*

Los *compuestos fenólicos* comprenden una amplia variedad de moléculas formadas por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilos. Pueden existir en su forma simple o bien formando grandes estructuras macromoleculares (Hannum, 2004).

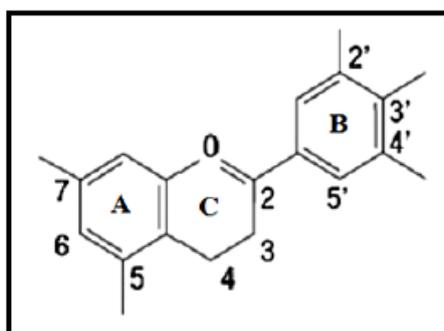
Al igual que las frutas y las hortalizas, las algas marinas son una buena fuente de *compuestos fenólicos* (Sabeena Farvin y Jacobsen, 2013). En este sentido, se han podido aislar *flavonoides*, *ácidos fenólicos* y *taninos condensados* a partir de diferentes especies de algas (Cox y col., 2010; Yoshie y col., 2000; Sabeena Farvin y Jacobsen, 2013). Las *algas marinas* contienen además *compuestos fenólicos* particulares que difieren en algunos aspectos de las plantas terrestres, tales como los *florotaninos* o los *halofenoles* producidos por las *algas marrones* y *rojas*, respectivamente (Ngo y col., 2011; Liu y col., 2011).

Un punto interesante a resaltar es que las *algas rojas* poseen menor concentración de *compuestos fenólicos* que las *algas marrones*. Además, los niveles varían según la época del año y la etapa de vida del alga (Holdt y Kraan, 2011).

##### ✓ *Estructura de los principales compuestos fenólicos*

###### - *Flavonoides*

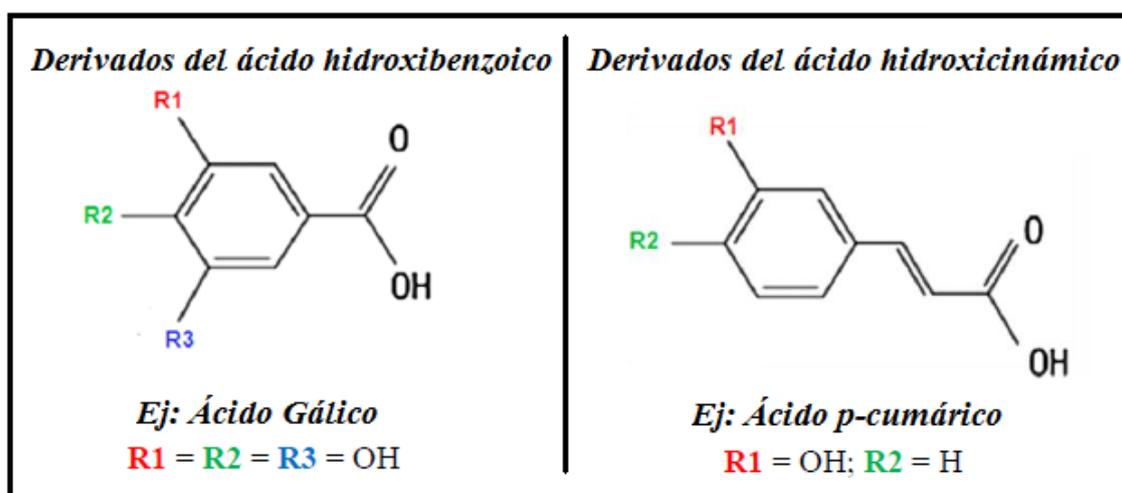
Los *flavonoides* son compuestos fenólicos de bajo peso molecular formados por dos anillos aromáticos (A y B), como estructura genérica, unidos por tres carbonos, generalmente formando parte de un anillo oxigenado heterocíclico, o anillo C, en configuración C6-C3-C6 (**Figura I.13**). Por las diferencias en la estructura general del anillo C se clasifican en *antocianidinas*, *flavonas*, *isoflavonas*, *flavanonas*, *flavanoles* y *flavonoles* (Ignat y col., 2011).



**Figura I.13** – Estructura química general de los flavonoides (Ignat y col., 2011).

✓ **Ácidos fenólicos**

Los **ácidos fenólicos** pueden estar en su forma libre o bien conjugados con varios componentes a través de enlaces éster, éter o acetal (Zadernowski y col., 2009). Se los puede dividir en dos grupos: derivados del **ácido hidroxibenzoico** y derivados del **ácido hidroxicinámico** (Ignat y col., 2011). La **Figura I.14** muestra la estructura básica de estos compuestos. Como se puede observar los derivados del **ácido hidroxicinámico** tienen la forma general C6-C3 del esqueleto de la fenilalanina. Sin embargo, para el caso de los derivados del **ácido hidroxibenzoico** no es posible distinguir la forma **fenilpropanoide** (C6-C3) debido a que en su síntesis pierden la cadena de tres carbonos.



**Figura I.14** – Estructura química general de los derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico (Van de Velde, 2012).

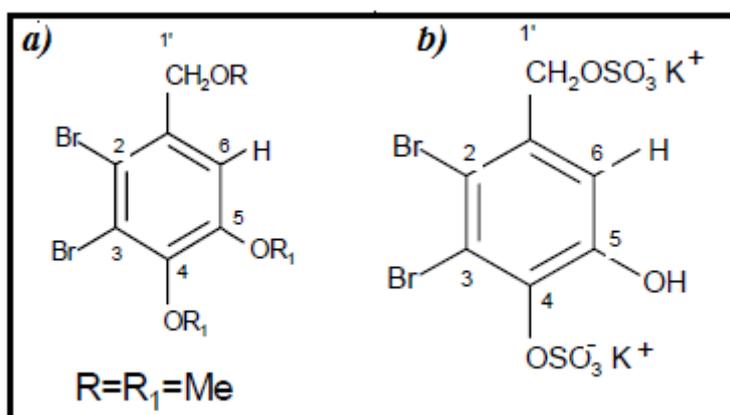
En la **Tabla I.3** se muestran algunos compuestos fenólicos aislados de las **algas rojas** y su sub-clasificación dentro del grupo.

**Tabla I.3** Algunos flavonoides y ácidos fenólicos aislados a partir de las **algas rojas** (Rodríguez-Bernaldo de Quirós y col., 2010)

Compuesto fenólico	Subclasificación	Ejemplo
Flavonoides	Flavanoles	Catequina
	Flavonoles	Quercentina
Ácidos Fenólicos	Ácido hidroxibenzoico	Ácido Gálico
	Ácido hidroxicinámico	Ácido Cumárico

✓ *Halofenoles*

Como se mencionó anteriormente, los *halofenoles* son sintetizados mayoritariamente por las *algas rojas* (Liu y col., 2011). Los halógenos más comunes incorporados al anillo aromático son: *cloro*, *yodo* y *bromo*. Cabe señalar que el *bromo* es el halógeno que se incorpora con mayor frecuencia al anillo, dando origen a los *bromofenoles* (Novoa y col., 2001). Los *bromofenoles* abarcan desde fenoles simples (C6) hasta polímero complejos. El *lanosol* (éter metílico del alcohol 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibensílico) constituye uno de los fenoles bromados más distribuidos entre las *micro* y *macroalgas*, siendo uno de los más documentados en la literatura (**Figura I.15a**) (Retz de Carvalho y Roque, 2000). Muchos de estos *bromofenoles* están sulfatados, tales como el *dipotasio 2,3 - dibromo - 5 - hidroxibensil 1',4 disulfato* (**Figura I.15b**).



**Figura I.15** – Estructura del *lanosol* a) (éter metílico del alcohol 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibensílico) y del *dipotasio 2,3 - dibromo - 5 - hidroxibensil 1',4 disulfato* b) (Retz de Carvalho y col., 2006).

Los *bromofenoles* cumplen funciones fisiológicas muy importantes en las algas marinas, ya que forman parte de los mecanismos de defensa frente a patógenos y diferentes condiciones de estrés tales como excesiva radiación UV, destrucción del tejido vegetal, etc. (Whitfield y col., 1999; Cox y col., 2010). Además, se les ha atribuido diferentes propiedades bioactivas *in vitro* e *in vivo*, tales como: capacidad antioxidante, anticancerígena, hipoglucemiante, antituberculosa, antimicrobiana, etc. (Liu y col., 2011).

### ✓ *Taninos*

Son compuestos de alto peso molecular que constituyen el tercer grupo en importancia de compuestos fenólicos. Los taninos pueden dividirse en taninos hidrolizables y condensados. Los primeros son derivados del **ácido gálico**. En su formación, el **ácido gálico** es esterificado a un núcleo poliol, al cual se van uniendo grupos **galoilos** por esterificación o por entrecruzamientos cruzados oxidativos, dando lugar a la formación de taninos hidrolizables complejos (Hagerman, 2002). Mientras que los segundos son flavonoides poliméricos, cuya vía de síntesis aún se desconoce. Los taninos condensados más ampliamente estudiados se basan en los flavanoles, (+)-catequina y (-)-epicatequina (Ignat y col., 2011).

### ✓ *Biosíntesis*

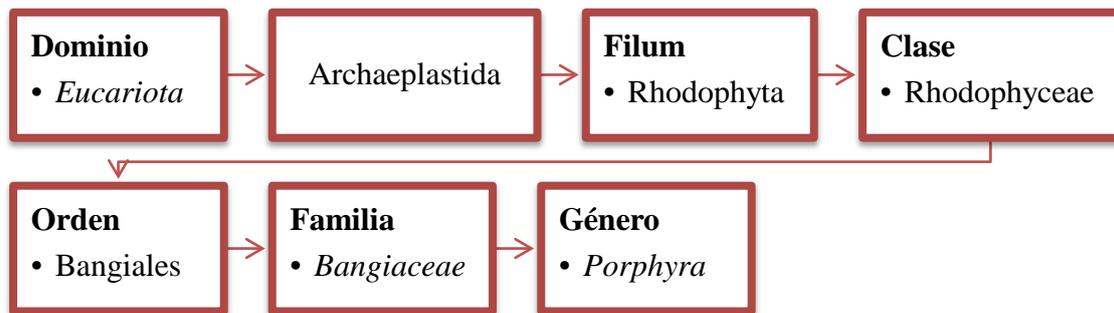
Según el patrón de hidroxilación que poseen los **compuestos fenólicos** presentes en las **algas rojas**, incluido los **bromofenoles**, se puede decir que su síntesis se da, al igual que ocurre en las plantas superiores (García, 2004), a partir de la vía biosintética de los aminoácidos aromáticos conocida como vía del **ácido shikímico (Figura I.10)** (Retz de Carvalho y Roque, 2000). De esta manera se obtienen fenoles p-hidroxilados y polifenoles di o tri-hidroxilados en la posición 1, 2 y 3. Estos compuestos se pueden asemejar al **catecol**, **hidroquinona** o bien al **pirogalol**, dependiendo del grado de hidroxilación (Retz de Carvalho y Roque, 2000).

Para el caso de los halofenoles, la bromación tiene lugar luego de la síntesis de los anillos aromáticos y está catalizada por unas enzimas denominadas **bromoperoxidasas**. La cuales pueden ser **hemo-bromoperoxidasas** o **vanadio-bromoperoxidasas**. Estas enzimas catalizan la oxidación del bromuro usando como cofactor el peróxido de hidrógeno, dando como resultado la halogenación del sustrato orgánico (Retz de Carvalho y Roque, 2000).

### **I.1.3 Género *Porphyra***

El género ***Porphyra*** tradicionalmente conocido como ***nori*** en Japón, ***kim*** en Corea y ***zicai*** en China comprende aproximadamente 70 especies (Rao y col., 2007). Este género, cuya clasificación se describe en la **Figura I.16**, crece en las costas rocosas del mundo incluyendo los trópicos y los polos. La mayor diversidad se puede encontrar en las regiones boreales o en zonas con clima frío a templado (Brodie y Irvine, 2003).

Este género soporta la desecación, por lo que puede vivir en las regiones más altas y secas de la zona intermareal. Los talos o tallos de este género aparecen en su estado natural como organismos libres y sus filamentos microscópicos cavan en sustratos de carbonato de calcio presentes en el medio. Las láminas del género *Porphyra* pueden ser circulares o lineales y medir de unos cuantos centímetros a más de un metro (FAO, 2013).



**Figura I.16** – Clasificación científica del género *Porphyra* (Yoon y col., 2006).

No se puede dejar de mencionar que recientemente Sutherland y col. (2011), han propuesto un cambio en la clasificación científica del género *Porphyra*, denominándose dicho género: *Pyropia*. Por lo tanto, *P. columbina* pasaría a denominarse *Pyropia columbina*. Como esto no ha sido ampliamente difundido ni validado por la comunidad científica, en la presente tesis se continuará utilizando la clasificación tradicional.

## I.2 PROPIEDADES BIO-FUNCIONALES

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los componentes celulares de las *algas rojas* exhiben propiedades bioactivas (**Tabla I.4**) (Holdt y Kraan, 2011).

**Tabla I.4** Propiedades bioactivas de algunos componentes celulares de las *algas rojas*

Componente celular	Bioactividad
<i>Polisacáridos sulfatados</i>	Capacidad antioxidante, hipocolesterolémica, etc.
<i>AMM</i>	Capacidad antioxidante
<i>Ficobiliproteínas</i>	Capacidad antioxidante e inmunomoduladora, etc.
<i>Compuestos fenólicos</i>	Capacidad antioxidante, antimicrobiana, etc.

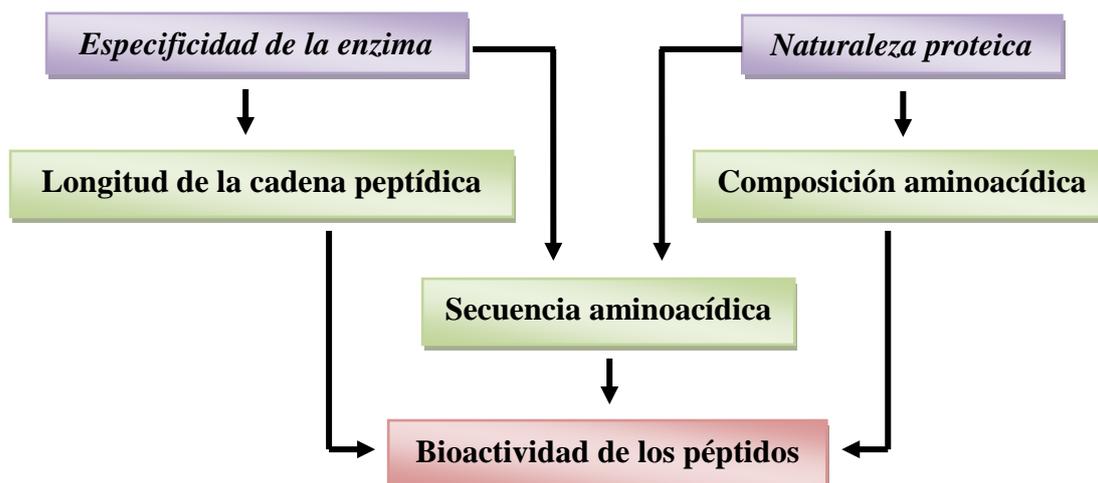
Sin embargo, hasta el momento, no se ha hecho mención a que las proteínas de las algas marinas son fuentes potenciales de *péptidos bioactivos*. Estos se pueden generar *in vivo* de manera espontánea durante la digestión gástrica de las proteínas (Martínez-Augustín y Martínez de Victoria Muñoz, 2006). No obstante, también se pueden obtener de manera *in vitro* a partir de las *algas rojas* por medio de hidrólisis enzimática o química, o bien mediante fermentación microbiana (Tierney y col., 2010).

En la actualidad, la hidrólisis enzimática constituye uno de los principales procesos tecnológicos para obtener péptidos bioactivos a partir de subproductos o productos de desecho proteicos, incluidos los de origen marino (Ngo y col., 2011). De esta manera, se puede incrementar el valor agregado de los subproductos de diferentes procesos industriales tales como la obtención de *ficocoloides* (Kim y Wijesekara, 2010). Cabe señalar que este tipo de hidrólisis presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, entre las que cabe mencionar: elevada selectividad, condiciones de uso moderadas (temperatura y pH), alta actividad catalítica, inactivación después de su uso por el subsecuente proceso, etc. (Guadix y col., 2000).

Por otra parte, las proteasas se pueden dividir en dos grandes grupos, según su actividad catalítica: *endopeptidasas* si rompen enlaces internos de la cadena proteica y *exopeptidasas* si hidrolizan los enlaces terminales de la cadena (Torruco-Uco y col., 2008).

Los *péptidos bioactivos* son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora (“*encriptados*”), que ejercen determinadas funciones biológicas tras su liberación mediante proteólisis (Fitzgerald y col., 2011). Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño (3 a 20 aminoácidos), que son liberados durante la digestión gastrointestinal o procesamiento de los alimentos (Tierney y col., 2010). Tras la administración oral, los *péptidos bioactivos* pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local (tracto gastrointestinal), y a nivel sistémico (Cánovas y col., 2011).

Se debe tener en cuenta que la bioactividad de los péptidos está estrechamente relacionada con la naturaleza de la proteína y de la enzima empleada en el proceso de hidrólisis, lo cual determina la secuencia peptídica y la longitud de los mismos (**Figura I.17**) (Ngo y col., 2011).



**Figura I.17** – Factores que determinan la bioactividad de los péptidos.

Las *lectinas* son un grupo de proteínas de origen no inmune cuya principal característica es la capacidad que poseen para interactuar específicamente con hidratos de carbono y con glicocomponentes de la superficie celular (Fitzgerald y col., 2011). Se han podido aislar diferentes *lectinas* con propiedades bioactivas a partir de las *Rhodophytas*, alguna de ellas constituidas por 91 aminoácidos y con dos puentes disulfuro en su estructura (Aneiros y Garateix, 2004). Tal es el caso de la *amasina*, que posee actividad mitótica. También se han extraído *lectinas* con propiedades antimicrobianas a partir del alga *Solieria filiformis* (Holanda y col., 2005). Otras propiedades bioactivas son: antibiótica, citotóxica, antiinflamatoria, antiadherencia y antiviral (Holdt y Kraan, 2011).

A partir de las proteínas de las *algas rojas* se han obtenido hidrolizados enzimáticos con diferentes propiedades bioactivas, las cuales se resumen en la **Tabla I.5** y en algunos casos, se han logrado aislar e identificar los péptidos responsables de dicha bioactividad (Harnedy y Fitzgerald, 2011).

**Tabla I.5** Propiedades bioactivas de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de *Pophyra*

<i>Género Pophyra</i>	<b>Bioactividad</b>
<i>Pophyra tenera</i>	Antihipertensiva, antioxidante y antitumoral
<i>Pophyra yezoensis</i>	Antihipertensiva, atimutagénica y antioxidante

## **I.2.1 Actividad antioxidante**

### **I.2.1.1 Radicales libres**

En el organismo se llevan a cabo numerosas reacciones químicas, entre las que se encuentran las reacciones de oxido-reducción (Crystal y Ramón, 1992). Estas reacciones implican la pérdida de electrones por parte de una especie química, que es de este modo oxidada, y la ganancia de electrones por otra especie, que es reducida. Entre las especies que se generan en nuestro organismo mediante reacciones *redox* se pueden mencionar los *radicales libres* (Sarmadi y Ismail, 2010). Éstos son átomos o moléculas que poseen uno o más pares de electrones desapareados, con una enorme reactividad química que los conduce a interactuar rápidamente con otras moléculas para estabilizarse (Ramón, 1993). Entre estas moléculas podemos destacar las especies reactivas del oxígeno (*ROS* del inglés) y las del nitrógeno (*RNS* del inglés) (Tierney y col., 2010).

Bajo condiciones fisiológicas normales, los *radicales libres* pueden ejercer diversas funciones en el organismo, tales como señalización o defensa frente a patógenos (Sarmadi y Ismail, 2010). Sin embargo, un exceso de *ROS/RNS* a nivel celular puede resultar en un daño a las principales macromoléculas constituyentes de las células (proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), fosfolípidos de membrana, etc.), lo que se denomina *estrés oxidativo*. Este desbalance conlleva a diversas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, artritis, así como también a enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (Kim y Wijesekara, 2010).

En adición a la producción fisiológica, hay otras fuentes de *radicales libres*: la radiación UV, los contaminantes ambientales (Christen, 2000), el consumo de alcohol, tabaco y alimentos grasos, etc. (Torres-Fuentes y col., 2011).

Cabe señalar que la oxidación lipídica causada por los *radicales libres* también tiene lugar en los alimentos. Esto afecta la calidad de estos productos, generándose gustos inaceptables (*off-flavor*) y disminuyendo su vida útil (Kim y Wijesekara, 2010).

Frente a los distintos efectos adversos que presentan los *radicales libres* sobre el organismo humano y la conservación de alimentos, surge la necesidad por parte de la industria farmacéutica y alimentaria de aislar o desarrollar compuestos antioxidantes.

### I.2.1.2 Antioxidantes

Un compuesto *antioxidante* es aquel que presente en baja concentración con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación del mismo, y por lo tanto previene los efectos adversos de especies reactivas (ROS/RNS) sobre las funciones fisiológicas normales en los seres humanos (Karadag y col., 2009).

Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno y exógeno (dieta y conservación de alimentos). Los primeros a su vez se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos. Mientras que los segundos pueden ser divididos en artificiales o naturales (Pihlanto, 2006). En la **Tabla I.6** se muestran algunos ejemplos de antioxidantes.

**Tabla I.6** Clasificación y ejemplos de antioxidantes (Karadag y col., 2009; Kim y Wijesekara, 2010).

Antioxidantes	Subclasificación	Ejemplos
Endógenos	Enzimáticos	Superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, etc.
	No enzimáticos	Albúmina, glutatión, ferritina, ceruloplasmina, etc.
Exógenos	Artificiales	Butilhidroxitolueno (BHT del inglés), butilhidroxianisol (BHA del inglés), η-propil galato, etc.
	Naturales	Compuestos fenólicos, tocoferoles, vitamina C y E, péptidos bioactivos, etc.

Los antioxidantes artificiales son más eficaces que los naturales frente a los *radicales libres* (Kim y Wijesekara, 2010). Sin embargo, su uso para la preservación de los alimentos debe ser estrictamente controlado, ya que su consumo excesivo está asociado con efectos tóxicos y cancerígenos en el organismo humano (Tierney y col., 2010). En base a esto último, la comunidad científica ha incrementado la búsqueda de antioxidantes naturales con elevada actividad, de manera de poder reemplazar a los sintéticos en la industria alimentaria en un mediano y largo plazo (Kim y Wijesekara,

2010). En este sentido, las algas marinas representan una interesante fuente natural de compuestos antioxidantes (Plaza y col., 2008).

Como se mencionó anteriormente, las algas rojas poseen una gran cantidad de componentes celulares con propiedades antioxidantes tales como: *polisacáridos sulfatados* (*porfiranos*), *compuestos fenólicos* (*bromofenoles*), *AMM* y *ficobiliproteínas* (*C-ficocianina*) (Tierney y col., 2010). Además, sus proteínas constituyen una fuente muy importante de *péptidos antioxidantes* (Sarmadi y Ismail, 2010).

Exceptuando los *polisacáridos sulfatados*, las *ficobiliproteínas* y los *péptidos*, los demás compuestos son metabolitos secundarios, cuya síntesis en el alga aumenta frente al *estrés oxidativo*, siendo una de sus principales funciones naturales la eliminación de los radicales libres (Tierney y col., 2010; Ngo y col., 2011). Las características antioxidantes de estos metabolitos secundarios se basan en la presencia de grupos *aromáticos* y *ketos* en su estructura química (de la Coba y col., 2009). Esto permite actuar como donadores de átomos de hidrógenos y ceder electrones a los radicales libres, estabilizando el radical formado (Rice-Evans y col., 1996). Además, los anillos aromáticos pueden actuar como agentes quelantes de metales de transición (catalizadores de los procesos oxidativos), disminuyendo la probabilidad de oxidación de los sustratos biológicos (Ngo y col., 2011).

La capacidad antioxidante de los *polisacáridos sulfatados* se atribuye principalmente a los grupos *sulfatos* presentes en la estructura química y al tamaño molecular del polisacárido. En este sentido, se ha podido observar que a menor peso molecular mayor es la capacidad antioxidante (Ngo y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, las *ficobiliproteínas* poseen *anillos tetrapirrólicos* como grupo prostético. La actividad antioxidante de estos pigmentos accesorios está asociada con la capacidad que poseen los pirroles para donar átomos de hidrógeno a partir de su carbono diez (Romay y col., 1998).

Hasta el momento, el mecanismo antioxidante de los *péptidos* no ha sido bien dilucidado. Sin embargo, hay varios estudios que han mostrado una acción a nivel de ADN. En este sentido, el péptido *Met-Tyr*, obtenido a partir del músculo de sardina, promueve la expresión de los genes de la hemooxigenasa I y ferritina en células endoteliales. Además, se ha visto que diversos péptidos aislados a partir de hojas de

alfalfa estimulan la expresión génica de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, disminuyendo la concentración de malondialdehído *in vivo*. Por último, péptidos obtenidos a partir de soja fermentada aumentan la expresión de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y disminuyen los niveles de TBARS en hígado y riñón de ratón (Sarmadi y Ismail, 2010).

No obstante, se ha reportado que las propiedades antioxidantes de los péptidos están muy relacionadas con su composición y secuencia aminoacídica (**Figura I.17**), así como también con su hidrofobicidad (Kim y Wijesekara, 2010). En referencia a esta característica, se ha visto que la hidrofobicidad peptídica es un factor muy importante, ya que aumenta la accesibilidad a compuestos “*targets*” hidrofóbicos, tales como los ácidos grasos (Erdmann y col., 2008). El proceso hidrolítico puede aumentar o disminuir la hidrofobicidad, lo cual depende principalmente de la naturaleza de la proteína precursora, así como también del peso molecular de los péptidos generados (Sarmadi & Ismail, 2010).

Cabe acotar que algunos aminoácidos, tales como: tirosina (Tyr), triptófano (Trp), Fenilalanina (Phe), metionina (Met), lisina (Lys), cisteína (Cys), histidina (His) y prolina (Pro) confieren actividad antioxidante a los péptidos que los contienen (Pihlanto, 2006; Sarmadi & Ismail, 2010). Los aminoácidos con anillos aromáticos pueden donar átomos de hidrógeno. Por su parte, el anillo *imidazólico* de la His desempeña un doble rol, ya que en primer lugar actúa como donante de átomos de hidrógeno y en segundo como agente quelante de metales de transición ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , etc.) (Torres-Fuentes y col., 2011). Además, se ha visto que el grupo *sulfidrilo* presente en los aminoácidos azufrados interacciona directamente con los radicales libres ejerciendo un efecto reductor (Sarmadi & Ismail, 2010).

### **I.2.1.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante de forma *in vitro***

Los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción en el que se encuentren. Además, pueden responder de diferentes formas hacia distintos radicales u otros agentes oxidantes. Debido a esta gran variabilidad, queda claro que un solo ensayo *in vitro* no permite dilucidar el mecanismo exacto por el cual los radicales libres son eliminados (Prior y col., 2005).

Por lo anteriormente mencionado, se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante. Estos difieren en términos de su

principio de ensayo y condiciones experimentales. Desde un punto de vista químico se los puede clasificar en tres grandes grupos: **a)** métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (**HAT** del inglés), **b)** métodos basados en la transferencia de electrones (**ET** del inglés) y **c)** métodos basados en la capacidad quelante de metales de transición (Karadag y col., 2009).

#### **a) Métodos HAT**

La mayoría de estos métodos aplica una reacción competitiva en donde el antioxidante y el sustrato compiten para reaccionar con el radical *peroxilo* generado térmicamente. Generalmente emplean un generador de radicales libres sintético, una molécula prueba oxidable y un antioxidante. Por último, la actividad antioxidante de la muestra en estudio se determina a partir de las curvas de cinética de reacción (Huang y col., 2005).

Entre estos métodos se pueden destacar: **ORAC** (del inglés: *Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*), **TRAP** (del inglés: *Total radical trapping antioxidant parameter*) y **ensayos de blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno** (Karadag y col., 2009).

#### **b) Métodos ET**

La mayoría de estos métodos mide la capacidad de un antioxidante de reducir a un oxidante (*reacción redox*). A su vez el oxidante es la molécula prueba que se utiliza para monitorear y ver el punto final de la reacción. Generalmente el oxidante es un radical sintético estable en el tiempo que difiere bastante de los radicales naturales (Huang y col., 2005).

Entre estos métodos se pueden destacar: **TEAC** (del inglés: *Trolox equivalent antioxidant capacity*), **FRAP** (del inglés: *Ferric ion reducing antioxidant power*) y **inhibición del radical DPPH** (del inglés: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Karadag y col., 2009). Cabe señalar que el método TEAC emplea como radical el catión ABTS<sup>+</sup> (Re y col., 1999).

#### **c) Métodos basados en la capacidad quelante de metales de transición**

Este tipo de métodos se basa en medir la capacidad de un antioxidante de quelar un metal de transición y evitar así la generación de un radical peroxilo a partir de un sustrato oxidable. Comúnmente se emplea al oxígeno del aire como oxidante y se usa una molécula prueba oxidable como el  **$\beta$ -caroteno** (Megías y col., 2008).

## I.2.2 Actividad antihipertensiva

### I.2.2.1 Hipertensión arterial

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35% de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales (Cánovas y col., 2011). Su tratamiento involucra diversos medicamentos, entre los que se pueden mencionar: inhibidores de la *enzima convertidora de angiotensina I (ECA I)*, *vasodilatadores*, *diuréticos*, *bloqueadores de canales de calcio*, etc. (Tierney y col., 2010). Una de las desventajas de estos productos de origen sintético es que pueden producir ciertas alteraciones secundarias, a corto y largo plazo, tales como: perturbación en el sabor, problemas en la piel, edemas, etc. (Kim & Wijesekara, 2010). Es por esto que en los últimos años se han buscado otras alternativas más saludables para combatir esta patología. Una de ellas es el consumo de alimentos con propiedades antihipertensivas tales como: *Evolus*® y *Biozate 1*®, ambos productos de origen lácteo. En este caso, lo que se busca es reducir el tratamiento medicamentoso complementándolo con la ingesta regular de un alimento funcional que posee *péptidos antihipertensivos*.

Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible encontrar en la naturaleza compuestos con propiedades antihipertensivas que reemplacen a los actuales medicamentos. En este sentido, la búsqueda de nuevos agentes antihipertensivos a partir de fuentes naturales no convencionales no ha cesado, constituyendo las algas marinas una alternativa muy promisoriosa (Mohamed y col., 2012).

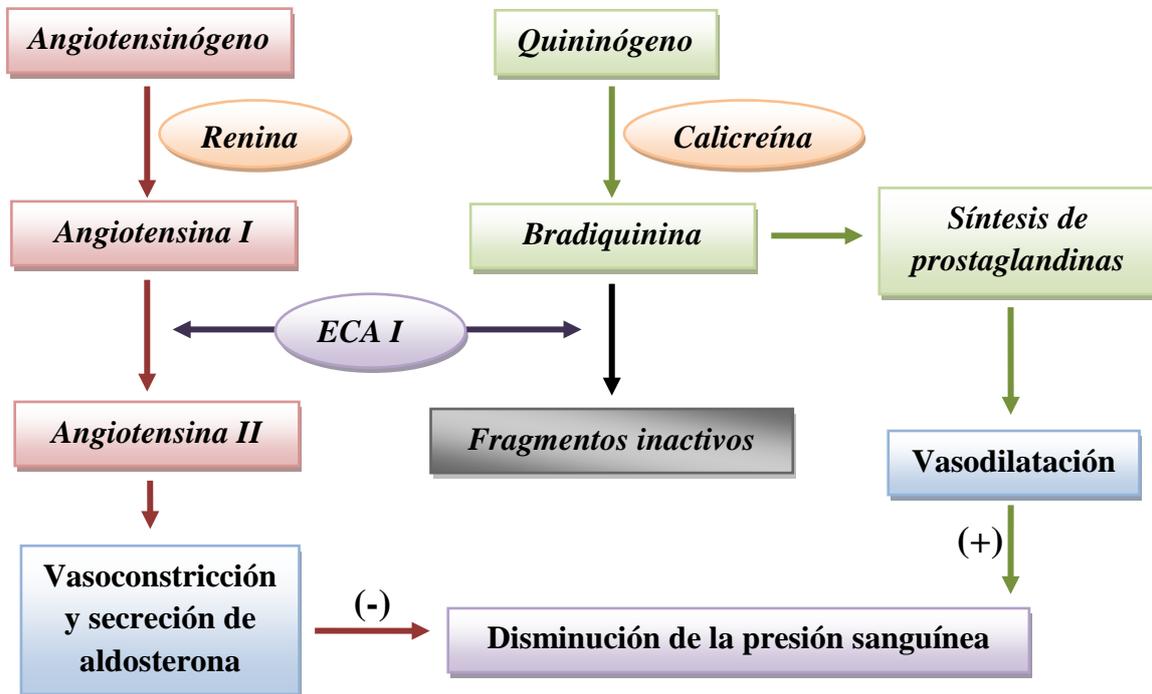
### I.2.2.2 Enzima convertidora de angiotensina I (ECA I)

La **ECA I** (EC 3.4.15.1) es una *dipeptidil carboxipeptidasa* perteneciente a la familia de las *Zn<sup>2+</sup> proteasas*, ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos (Fitzgerald y col., 2011). Esta *metaloproteasa* se expresa como una ectoenzima unida a membrana, fundamentalmente en las células endoteliales del pulmón y otros órganos tales como: cerebro, corazón, hígado, riñón, etc. (Wilson y col., 2011). La **ECA I** está fuertemente asociada con la regulación de la presión sanguínea mediante la modulación del sistema *renina-angiotensina (RAS)* del inglés) (Tierney y col., 2010). Tanto el extremo carboxilo como el amino terminal son activos catalíticamente, por lo que los inhibidores de la enzima pueden actuar en ambos sitios, aunque se ha observado que el

dominio C-terminal es necesario para la regulación de la presión sanguínea y es el sitio predominante para la conversión de la *angiotensina* (Jäkälä y Vapaatalo, 2010).

### ➤ *Sistema Renina - Angiotensina*

Como se mencionó anteriormente, **ECA I** cumple un rol fundamental en la regulación de la presión arterial. En este sentido, la enzima cataliza la conversión del decapeptido *angiotensina I* (Asp-Arg-Val-Try-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), generado por la *renina* e inactivo, en el octapeptido *angiotensina II* (Asp-Arg-Val-Try-Ile-His-Pro-Phe) (Wilson y col., 2011). La *angiotensina II* es un potente vasoconstrictor cuya acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de *aldosterona* por las glándulas suprarrenales. Esta hormona induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua, provocando el incremento del volumen extracelular y la neutralización de la producción de *renina* (Cánovas y col., 2011). Simultáneamente, la **ECA** degrada las *bradiquininas* (sistema *quinina-caliceína*), compuestos de potente acción vasodilatadora, en fragmentos inactivos. Esta acción de la enzima favorece el incremento de la presión arterial (Wilson y col., 2011) (**Figura I.18**).

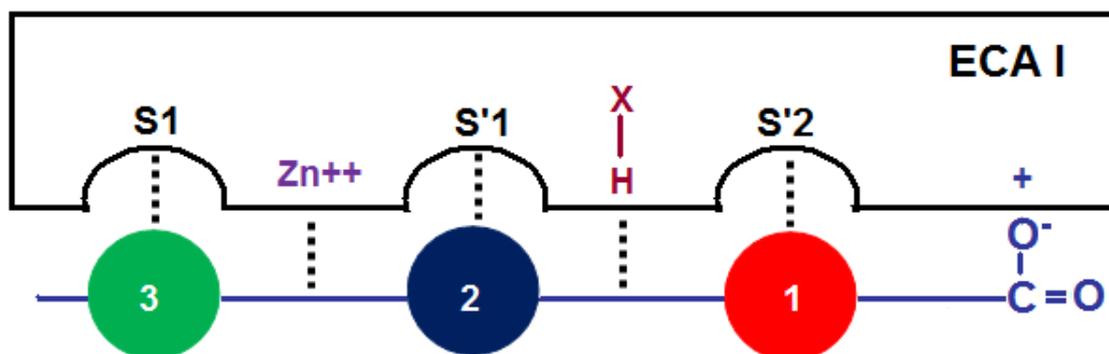


**Figura I.18** – Rol de la ECA I en la regulación de presión arterial sanguínea (Li y col., 2004).

### ➤ *Inhibición de ECA I*

Los *inhibidores competitivos* compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima. En este caso, el aumento en la concentración del sustrato da lugar a una disminución de la capacidad del inhibidor para competir con éste. Por otra parte, los *inhibidores no competitivos* se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo, deformándolo, de manera que impide el enlace con el sustrato, siendo este tipo de inhibición independiente de la concentración de sustrato (Cánovas y col., 2011). En este sentido, la mayoría de los péptidos inhibidores de **ECA I** son del tipo **competitivos** (Kim y Wijesekara, 2010).

Ondetti y col. (1977) propusieron un modelo de interacción entre el sustrato o los inhibidores y el sitio activo de **ECA I**. En este modelo se propone que los últimos tres aminoácidos del extremo *C-terminal* del sustrato o inhibidor son los que interactúan con el sitio activo de la enzima, el cual está formado a su vez por tres subsitios denominados **S<sub>1</sub>**, **S'<sub>1</sub>** y **S'<sub>2</sub>** (**Figura I.19**). Entre los subsitios **S<sub>1</sub>** y **S'<sub>1</sub>** se ubica el ion **Zn<sup>2+</sup>**, que participa en la hidrólisis del enlace peptídico entre el aminoácido antepenúltimo y anteúltimo (3 y 2, respectivamente), dando como resultado la liberación de un dipéptido. A su vez, entre los subsitios **S'<sub>1</sub>** y **S'<sub>2</sub>** hay un grupo donador de hidrógenos que interactúa con el enlace peptídico no escindido y luego del subsitio **S'<sub>2</sub>** hay un residuo cargado positivamente que forma una unión electrostática con el grupo carboxilo del aminoácido terminal (Li y col., 2004).



**Figura I.19** – Modelo de interacción entre el sustrato o los inhibidores y el sitio activo de ECA I (Li y col., 2004). **S<sub>1</sub>**, **S'<sub>1</sub>** y **S'<sub>2</sub>**, subsitios; **Zn<sup>2+</sup>**, ion metálico; y **X-H**, grupo donador de hidrógenos presente en el sitio activo de ECA I.

Se ha observado que esta enzima tiene una gran afinidad por sustratos o inhibidores cuyos últimos tres aminoácidos del extremo *C-terminal* son hidrofóbicos (Trp, Phe, Tyr y Pro). Además, se ha visto que la presencia de aminoácidos ramificados

en el extremo *N-terminal* potencia la interacción. Por lo tanto, la acción inhibitoria de los péptidos está gobernada principalmente por su secuencia aminoacídica, principalmente la del extremo C-terminal (Wijesekara y Kim, 2010).

Con respecto a los inhibidores, todos presentan de 2 a 30 aminoácidos y un residuo de *prolina* en la penúltima posición del extremo *C-terminal* de la molécula. Sin embargo, esto no es una regla general para establecer que los péptidos antihipertensivos deban su actividad a la presencia de dicho aminoácido, ya que se han aislado e identificado secuencias de aminoácidos de diferentes péptidos que provocan la inhibición de la **ECA I** y que no poseen este aminoácido en la estructura (Torruco-Uco y col., 2008). No obstante, se ha visto que aquellos péptidos pequeños que poseen Pro en el extremo *C-terminal*, generalmente resisten la degradación proteolítica de las enzimas digestivas. De esta manera, la actividad antihipertensiva del péptido perdura luego de la barrera digestiva, pudiendo ejercer su acción a nivel sistémico (Wilson y col., 2011). Este hecho es un punto muy importante a tener en cuenta, ya que no siempre los péptidos que inhiben la **ECA I** de manera *in vitro* lo hacen luego en modelos *in vivo* (Tierney y col., 2010).

A partir de las algas marinas se han obtenido diversos péptidos con propiedades antihipertensivas, alguno de ellos con actividad *in vitro* y otros *in vivo* (Sheih y col., 2009). En este sentido, se pueden destacar los péptidos aislados a partir de *Undaria pinnatifida*, *Polysiphonia urceolata* y *P. yezoensis*, los cuales exhiben un potente efecto hipotensor en *ratas espontáneamente hipertensas* (**SHR** del inglés) (Fitzgerald y col., 2011). Cabe mencionar que la **ECA I** también puede ser inhibida por los compuestos fenólicos presentes en las algas (Tierney y col., 2010; Mohamed y col., 2012). El posible mecanismo de inhibición sería la formación de un quelato entre el **Zn<sup>2+</sup>** y los anillos aromáticos. De esta manera se lograría inactivar el sitio catalítico de la enzima (Wijesekara y Kim, 2010).

### **I.2.2.2 Métodos para evaluar la actividad antihipertensiva**

#### **a) Inhibición *in vitro* de ECA I**

El método más utilizado para evaluar la actividad antihipertensiva *in vitro* es el ensayo de inhibición de la **ECA I** desarrollado por Hayakari y col. (1978). Este método emplea como sustrato el *N-hipuril-His-Leu* que es hidrolizado por la **ECA I** liberando el dipéptido *His-Leu* y *ácido hipúrico* (Tierney y col., 2010). Posteriormente, el *ácido*

*hipúrico* reacciona con *2,4,6 triclora-1,3,5 triazina* para dar un producto coloreado que es cuantificado a 382 nm. En presencia del inhibidor no se lleva a cabo la hidrólisis del *N-hipuril-His-Leu* y por lo tanto no se obtiene una lectura a dicha longitud de onda. Posteriormente, se calcula el porcentaje de inhibición de ECA I teniendo en cuenta distintos blancos.

#### **b) Ratas espontáneamente hipertensas**

Este método es el más utilizado para evaluar la actividad antihipertensiva *in vivo*. El mismo emplea ratas espontáneamente hipertensas (*SHR* del inglés). La cepa *SHR* fue obtenida en la década de los sesenta a partir de ratas *Wistar-Kyoto*. En estos animales, el desarrollo de la hipertensión comienza alrededor de las 5-6 semanas de edad, alcanzando presiones sistólicas entre 180 y 200 mmHg en la fase de la edad adulta. A partir de la semana 40 y 50, las ratas desarrollan todas las características de las enfermedades cardiovasculares tales como: hipertrofia vascular y cardíaca.

El procedimiento consiste en monitorear la presión sanguínea sistólica y diastólica con un esfigmomanómetro colocado en la cola del animal y luego se administra la muestra por vía oral. Posteriormente se miden ambas presiones para ver el efecto fisiológico del producto administrado. Conjuntamente se deben hacer controles positivos y negativos. Como control (+) se usa *captopril*® o algún otro inhibidor de ECA I y como negativo (-), solución fisiológica.

### **I.2.3 Actividad inmunomoduladora**

#### **I.2.3.1 Sistema inmune gastrointestinal**

##### **➤ *Mucosa intestinal***

La *mucosa intestinal* es la capa más externa de las cuatro que constituyen el tracto gastrointestinal y representa la mayor área corporal en contacto con el entorno externo (Kato y Owen, 1999). En este sentido, no sólo la digestión y la absorción tienen lugar, sino que funciona como una barrera contra agentes nocivos e infecciones (Chang y col., 1994). En su superficie apical, la mucosa intestinal está cubierta por moco y glicocálix: un gel constituido por esqueleto de proteínas, cadenas de oligosacáridos y mucinas (Kato y Owen, 1999). Debajo del glicocálix, la capa más externa de la mucosa está constituida por una monocapa de células (epitelio) que incluye células columnares (enterocitos), células caliciformes, células pluripotentes de las criptas, células de Paneth, células enteroendócrinas y los linfocitos intraepiteliales (IEL) (Kato y Owen, 1999).

---

Debajo del epitelio se encuentra el tejido conjuntivo y de apoyo llamado *lámina propia* que tiene también una función inmunológica, debido a la presencia de diferentes células inmunes. Finalmente, la *lámina propia* está rodeada por una capa de músculo liso denominada *muscularis mucosae*.

➤ ***Tejido linfoide asociado al intestino***

En los seres humanos, el tejido *linfoide asociado al intestino* está formado por: *las placas de Peyer, los folículos aislados del intestino delgado y colon, y el apéndice*. Además, se incluyen como parte de este tejido los *linfocitos aislados de las placas de Peyer y los linfocitos intraepiteliales* (Requena-Méndez, 2009).

➤ ***Sistema inmune innato asociado al intestino***

Entre las células más importantes del sistema innato gastrointestinal se pueden destacar: *los macrófagos, los eosinófilo, las células dendríticas y las células epiteliales del intestino*. Estas últimas desempeñan una función inmunológica activa y, por lo tanto, deben considerarse parte del sistema inmune innato gastrointestinal, aunque clásicamente no hayan sido clasificadas como células inmunológicas (Requena-Méndez, 2009).

Todas estas células pueden actuar en forma directa o bien por medio de mediadores tales como: *citoquinas* (factor de necrosis tumoral alfa o del inglés, TNF $\alpha$ ; interferón gama o del inglés, IFN $\gamma$ ; interleuquinas (IL): 1 $\beta$ , 10, 6, 8, 12, etc.), *eicosanoides* (prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos y tromboxanos), *óxido nítrico, radicales del oxígeno*, etc. (Requena-Méndez, 2009).

➤ ***Sistema inmune adaptativo asociado al intestino***

El objetivo de la inmunidad adaptativa es establecer una respuesta inmune de carácter específico. Los responsables de esta función son dos tipos de células: los linfocitos B y los linfocitos T. A menudo, un solo antígeno puede estimular tanto la producción de anticuerpos como una respuesta celular. Sin embargo, un tipo de inmunidad (humoral o celular) suele predominar sobre la otra, y esto dependerá del tipo de antígeno y el tejido de contacto, dado que la distribución de las células B y T no es igual en cada órgano linfoide. Estas células juegan un rol muy importante bajo condiciones fisiológicas normales debido a su participación en la denominada *“tolerancia oral”* (Requena-Méndez, 2009). Cabe añadir que la inmunoglobulina A

secretora (**IgAs**) y los linfocitos T intestinales son los principales ejecutores de la respuesta inmune adaptativa en el sistema inmune gastrointestinal.

➤ **Citoquinas**

Como se mencionó anteriormente, las citoquinas participan activamente en la respuesta inmune innata y adaptativa del *sistema inmune gastrointestinal*. Las mismas son *glicoproteínas* solubles de bajo peso molecular producidas por las células del sistema inmune. Su principal función es facilitar la comunicación entre células, estimular la proliferación de células efectoras y mediar las manifestaciones de inflamación, tanto a nivel local como sistémico, actuando de manera autócrina, parácrina y endócrina (Neuma, 2007).

El tipo de acción de las citoquinas es *pleitrópico* (una citoquina ejerce varios efectos) y *redundante* (varias citoquinas ejercen el mismo efecto), y lo hacen mediante la unión a receptores. La secreción de las mismas es breve y autolimitante, y generalmente está regulada por otras citoquinas o por ellas mismas. Como consecuencia de dicha secreción, se producen distintas respuestas celulares entre las que cabe mencionar: *expresión de genes de células diana, modificación de un fenotipo, etc.* (Requena-Méndez, 2009). A continuación se describen algunas citoquinas con gran interés en la inmunomodulación.

✓ **TNF $\alpha$**

Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda a infecciones y es responsable de muchas complicaciones sistémicas. Esta citoquina juega un papel fundamental en la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y el estímulo más potente para su secreción es el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

✓ **IL1 $\beta$**

Posee el mismo efecto biológico que el TNF $\alpha$ , trabajando conjuntamente con él en la inmunidad innata e inflamación. El estímulo más potente para su secreción es el LPS y el TNF $\alpha$ .

✓ **IL6**

La IL6 forma parte de la inmunidad innata y adaptativa. Se sintetiza en diferentes células tales como: fagocitos mononucleares, células endoteliales vasculares, etc. Esta citoquina se produce en respuesta a infecciones microbianas, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ .

Entre sus acciones se pueden destacar: aumento de las proteínas de fase aguda, diferenciación de neutrófilos y estimulación del crecimiento de células plasmáticas.

✓ ***IFN $\gamma$***

Es el principal activador de los macrófagos y cumple funciones críticas en la inmunidad innata y adaptativa frente a los microorganismos. Su principal efecto ***proinflamatorio*** está en la capacidad que posee de activar a los macrófagos para erradicar a los microorganismos.

✓ ***IL10***

La IL10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF *del inglés*), es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas ***proinflamatorias*** en los linfocitos T y los macrófagos.

➤ ***Señalización celular en la respuesta inmune***

A continuación se describen algunos factores de transcripción que juegan un rol fundamental en la secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias, y en lo que respecta a los procesos inmunes y de tolerancia oral.

✓ ***NF- $\kappa$ B***

El factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) es un regulador central de las respuestas inmunes e inflamatorias. Entre otros estímulos, la activación celular mediante IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y LPS conduce a la activación de este factor de transcripción (Barnes y Karin, 1997).

Tras la activación del NF- $\kappa$ B, luego de una serie de reacciones de fosforilación, ubiquitinación y degradación proteosómica del inhibidor, se da la translocación al núcleo celular donde se une a los promotores de los genes diana (más de 200). Al unirse puede mediar la activación o la represión transcripcional de los mismos. Los genes clásicamente regulados por NF- $\kappa$ B son: IL1, TNF, IL6 e IL12, lo que sugeriría un papel ***proinflamatorio*** por parte de este factor de transcripción. Sin embargo, se ha reportado que el NF- $\kappa$ B también promueve respuestas protectoras frente a la inflamación, dependiendo del tipo de célula y condición fisiopatológica (Shames y col., 1998; Wong y col., 2007).

### ✓ *Quinasas de proteínas activadas por mitógenos*

Un importante grupo de quinasas en las rutas de señalización inmunológicas son las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (**MAPK del inglés**). Existen 4 MAPK: JNK del inglés: *c-Jun N-terminal activated kinase*; p38-quinasa; Erk ½ del inglés: *extracelular signal regulated kinase*; y BMK1 del inglés: *big MAP-kinase* (Chi y col., 2006). Las MAPK se activan por la acción de estímulos moleculares como las citoquinas, los factores de crecimiento y las hormonas. Además, se activan en respuesta a estímulos físicos patológicos como la isquemia, rayos UV, daños neuronales, etc.

### **I.2.3.2 Inmunomodulación**

En los últimos años se ha debatido mucho sobre la composición de la dieta y como ésta puede condicionar la respuesta inflamatoria del organismo frente a distintas situaciones patológicas. En este contexto ha surgido el concepto de **inmunonutriente**, el cual se define como: *toda sustancia capaz de mejorar el sistema inmunitario manteniendo el balance normal del mismo, además de permitir al organismo obtener energía, construir y reparar tejidos y regular los procesos metabólicos* (Gómez-Ayala, 2006).

Hasta la fecha se han identificado numerosos **inmunonutrientes** presentes en la dieta que poseen acción **inmunomoduladora**. Entre ellos cabe destacar: péptidos bioactivos (derivados de la caseína, la soja y otras proteínas), aminoácidos (arginina y glutamina), ácidos nucleicos, vitaminas (A, C y E), minerales ( $Zn^{2+}$ ) y ácidos grasos poliinsaturados (Gómez-Ayala, 2006; Requena-Méndez y col., 2009).

Entre las proteínas y péptidos con actividad **inmunomoduladora** podemos mencionar: lisozima (estimula la fagocitosis), lactoferrina (inhibe la producción de  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  y la proliferación de macrófagos), glicromacropéptido bovino (actividad antiinflamatoria en modelos de ratas con colitis ulcerosa inducida con TNBS y DSS), la Lfcina (péptido aislado a partir de la lactoferrina que inhibe la producción de  $IL6$  y actúa como factor de transcripción celular), etc. (Requena-Méndez y col., 2010; Martínez-Augustín y Martínez de Victoria Muñoz, 2006).

Como se mencionó anteriormente, las **ficobiliproteínas** poseen propiedades **inmunomoduladoras**. Concretamente se ha reportado la acción antiinflamatoria de la **C-ficocianina** en animales de experimentación. Además, se ha visto que los **porfiranos** poseen una fuerte acción apoptótica, induciendo la muerte celular *in vitro* de células

cancerígenas (Mohamed y col., 2012; Romay y col., 1998). Cabe señalar que las lectinas provenientes de algas también han exhibido propiedades *inmunomoduladoras* tales como: actividad antiinflamatoria, mitogénica y citotóxica (Holdt y Kraan, 2011).

### **I.2.3.3 Métodos para evaluar la *inmunomodulación***

Existen numerosos métodos para evaluar el efecto de un agente *inmunomodulador* ya sea de forma *in vivo* y/o *in vitro*.

Uno de los métodos *in vitro* consiste en utilizar cultivos primarios de células linfoides obtenidas a partir del bazo de rata o ratón. En primer lugar se aíslan esplenocitos y luego a partir de éstos, se purifican linfocitos y macrófagos mediante diferentes técnicas inmunológicas. Posteriormente, se adiciona el agente inmunomodulador al medio de cultivo y se incuba durante un tiempo determinado dependiendo del estímulo utilizado (LPS o Concanavalina A). Luego se evalúa el efecto ejercido por la muestra mediante la cuantificación de citoquinas pro y antiinflamatorias producidas por las poblaciones celulares. Para cuantificar la producción de estas citoquinas se usa comúnmente la técnica de *ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA del inglés)*. Cabe señalar que también se puede indagar sobre la vía celular involucrada en la acción inmunomoduladora de un determinado compuesto. Para tal fin se suelen usar inhibidores de los principales factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y MAPK), relacionados con la producción o inhibición de una determinada citoquina (Requena-Méndez y col., 2010).

## **I.3 PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES**

### **I.3.1 Consideraciones generales**

Las *propiedades tecno-funcionales* comúnmente conocidas como *funcionales* se pueden definir como toda propiedad no nutricional que imparte a un alimento o ingrediente determinadas características sensoriales o determinado comportamiento físico, durante su preparación, procesamiento, almacenamiento o consumo (Kinsella, 1981).

Cabe destacar que lo que se evalúa son las *propiedades físicoquímicas* de un ingrediente, que incorporado a un alimento, le impartirá determinadas características, es decir que las *propiedades funcionales* se manifiestan en el alimento. Además, el rol funcional de un hidrocoloide que contribuye a la calidad sensorial del producto no proviene de una única propiedad físicoquímica, sino que es una manifestación de una

compleja interacción de múltiples propiedades (Damodaran, 1989) Así, las funciones básicas de los ingredientes pueden ser utilizadas como un indicativo de su comportamiento en el producto final, pero en muchos casos es inevitable un ensayo final bajo condiciones prácticas (Petruccelli, 1993).

Dentro de las propiedades funcionales de los *hidrocoloides* podemos destacar aquellas que se basan en la interacción *macromolécula – agua y macromolécula – macromolécula*. En el primer caso se pueden mencionar: adsorción, absorción y retención de agua, solubilidad, viscosidad, etc. En el segundo caso, se hace referencia a gelificación, viscosidad, etc. (Cheftel y col., 1993). Cabe señalar que ambos tipos de interacción no son independientes en un determinado evento. Por ejemplo, la gelificación no sólo implica interacciones *macromolécula – macromolécula* sino también *macromolécula – agua* (Drago, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, las *algas rojas* poseen *carragenanos* y *agaranos*. Estos *galactanos* son muy utilizados en la industria alimentaria debido a las excelentes *propiedades funcionales* que exhiben, entre las que se destacan las propiedades de *hidratación* y de *gelificación* (Campo y col., 2009).

El género *Gracilaria* es la mayor fuente agarófito, de la cual se extraen grandes cantidades de *agar* para diversas aplicaciones tecnológicas (Souza y col., 2012).

En el caso de los *carragenanos*, las principales fuentes son los géneros *Gigartina*, *Chondrus*, *Euclima* e *Hypnea* (Campo y col., 2009). Su gran uso radica en la capacidad que poseen para interactuar con otros polímeros presentes en los alimentos como proteínas y almidones. Esto permite su empleo en diferentes formulaciones alimentarias tales como las cárnicas, lácteas, etc. Además, debido a su poder viscosante y estabilizante de emulsiones, se los utiliza en las pastas dentales, champú y productos farmacéuticos (Al-Alawi y col., 2011).

A lo largo de los años, ha habido muchas investigaciones sobre las propiedades funcionales de estos *agaranos* obtenidos a partir de las algas rojas, y la aplicación de los mismos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Pereira-Pacheco y col., 2007). Sin embargo, no se ha avanzado mucho en el estudio de los mismos para elaborar *envases alimentarios biodegradables*.

### **I.3.2 Envases alimentarios**

Los envases alimentarios tienen como función principal la protección y preservación frente a las contaminaciones externas. Esta función tiene como finalidades el retraso del deterioro, la extensión de la vida útil, y el mantenimiento de la calidad e inocuidad de los alimentos. Protegen a los alimentos de las influencias ambientales, como el calor, la luz, la presencia o ausencia de humedad, oxígeno, presión, enzimas, falsos olores, microorganismos, insectos, la suciedad y las partículas de polvo, emisiones gaseosas, etc., que pueden provocar el deterioro de los alimentos.

Para lograr la prolongación de la vida útil se requiere el retraso de las reacciones enzimáticas, microbianas y bioquímicas mediante el control de la temperatura, la adición de productos químicos, la eliminación del oxígeno, o una combinación de éstos.

El material de envasado ideal es aquel que sea inerte y resistente a los riesgos y que no permita la transferencia molecular del o los materiales de envasado al alimento (Brody y col., 2008).

En las dos últimas décadas, debido a la necesidad de reemplazar los plásticos derivados del petróleo que han sido de preocupación en términos de contaminación y sustentabilidad, ha habido un renovado interés por los envases biodegradables, los cuales son obtenidos a partir de biopolímeros de origen agrícola, que son capaces de formar una matriz coherente y continúa.

Los primeros en ser empleados fueron la *celulosa* y el *almidón*, polisacáridos de gran interés por su disponibilidad y bajo costo, aunque los materiales que se obtienen a partir de los mismos poseen baja elasticidad, lo cual limita su uso (Rouilly y Rigal, 2002).

Las proteínas fueron las siguientes en ser evaluadas, ya que poseen la capacidad de formar redes y pueden actuar como barreras para controlar la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aceites, grasas y compuestos volátiles, con el fin de evitar el deterioro de la calidad y aumentar la vida útil de los alimentos. Estas características se deben a que las proteínas tienen estructuras específicas que les confieren una amplia gama de propiedades funcionales, especialmente de alto potencial de unión intermolecular, formando enlaces en diferentes posiciones. Poseen como limitante la falta de resistencia mecánica y la pobre barrera al vapor de agua debido a su

naturaleza hidrofílica, especialmente en lugares con alta humedad (Nuthong y col., 2009).

Las propiedades de las películas pueden mejorarse con la mezcla con otros polímeros biodegradables, o modificaciones químicas y enzimáticas. Por ejemplo, la adición de aldehídos (como glutaraldehído, glioxal o formaldehído) mejoran las propiedades mecánicas y de barrera de las películas biodegradables a partir de aislados de proteínas de girasol, de soja, colágeno y proteínas del suero lácteo (Ou y col., 2004; Nuthong y col., 2009). Otra alternativa para mejorar las propiedades mecánicas y de barrera es adicionar *ficocoloides* (Rhim, 2012).

### **I.3.3 Envases activos**

En los últimos años, ha aumentado la demanda de innovación en tecnología del acondicionamiento de alimentos frescos y mínimamente procesados, debido a los requisitos más estrictos en materia de salud y seguridad del consumidor. Por tal motivo, se están desarrollando investigaciones en los denominados envases activos. Estos se pueden definir como un modo de embalaje donde el envase, el producto, y el medio ambiente interactúan para prolongar la vida útil del alimento, mientras mantiene su calidad nutricional y mejora las propiedades sensoriales y de seguridad (Han, 2002; Suppakul y col., 2003).

Generalmente, los materiales utilizados en el envasado alimentario proveían sólo funciones de barrera y protección frente a la contaminación externa. Sin embargo, varias clases de sustancias activas son actualmente incorporadas en los materiales de envasado para mejorar su funcionalidad y darle funciones nuevas o extras tales como CAO, escape de oxígeno, de etileno o de etanol, inhibición del crecimiento microbiano, escape de humedad, etc. (Tapia y col., 2007).

La presencia de oxígeno en un envase alimentario suele ser un factor clave, que puede limitar la vida útil de un producto debido a que desencadena o acelera las reacciones oxidativas, que se traducen en deterioro de los alimentos. Como se mencionó anteriormente, la oxidación puede causar cambios en los alimentos provocando en ellos malos olores, sabores, cambios de color no deseados y puede facilitar el crecimiento de bacterias aerobias y hongos (Suppakul y col., 2003).

Siguiendo la tendencia actual de ir reemplazando los antioxidantes sintéticos por los naturales, se han utilizado extractos vegetales, aceites esenciales y compuestos

fenólicos aislados para la elaboración envases activos. Otra forma viable y económica para producir este tipo de antioxidantes es la obtención de extractos a partir de las algas rojas las cuales poseen, como se mencionó más arriba, una gran cantidad de compuestos antioxidantes. Esto último agrega valor a lo que puede ser el proceso tradicional de extracción de *ficocoloides* del alga.

## **I.4 ALIMENTOS FUNCIONALES**

### **I.4.1 Consideraciones generales**

El concepto de alimento funcional ha sido evaluado y discutido en profundidad y existen distintos trabajos de revisión de su definición (IFT, 2005). En líneas generales, se reconoce básicamente como funcionales a productos nuevos, que más allá de su capacidad de nutrir, poseen uno o más efectos beneficiosos demostrables en el organismo humano, mejorando así el estado de salud del individuo o bien reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad (Plaza y col., 2008). En base a esta definición se pueden destacar tres aspectos muy importantes: a) el efecto funcional es distinto del nutricional, b) este efecto debe ser demostrado, y c) el beneficio puede consistir en el mejoramiento de una función fisiológica o bien en la reducción del riesgo de desarrollar algún proceso patológico.

La definición del IFT (*Institute of Food Technologists*) es más amplia, tendiendo al concepto de alimentos saludables, considerando el posible efecto de la dieta en su conjunto. Este enfoque incluye a alimentos modificados, así como los fortificados y suplementos dietarios (Olivera Carrión, 2007).

La transformación de un alimento en funcional puede realizarse eliminando algún componente nocivo (alergeno, grasa saturada), fortificándolo con sustancias beneficiosas (cereales con minerales, pan con fibra, leche con calcio), mediante la adición de un elemento no presente de forma habitual en el mismo (aceite con antioxidantes), la sustitución de un compuesto perjudicial por otro deseable (grasas por inulina, leche desnatada con ácidos grasos  $\omega$ -3) o a nivel de optimización de la biodisponibilidad/estabilidad (Plaza y col., 2008). De esta manera, los *alimentos funcionales* ejercen su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico. Se comportan como potenciadores del desarrollo y la diferenciación celular, moduladores del metabolismo de nutrientes

(lípidos, hidratos de carbono, etc), reguladores de la expresión génica y reductores del estrés oxidativo (Rodríguez Silveira y col., 2003).

Como se mencionó en el punto **I.2**, las *algas marinas* poseen una gran cantidad de compuestos bioactivos que podrían ser usados como ingredientes funcionales (Kadam y Prabhasankar, 2010; Plaza y col., 2008). Sin embargo, en occidente son muy pocos los alimentos funcionales desarrollados con algas. En este sentido, Prabhasankar y col., (2009) han obtenido productos a base de harina de trigo (pastas), con agregado de *U. pinnatifida* . Por esto, el desarrollo de nuevos productos con agregado de algas o sus extractos adquiere gran importancia, sobre todo si se tiene en cuenta lo fácil que resulta cultivar las algas, lo rápido que crecen y la posibilidad de controlar la producción de algunos compuestos bioactivos (Plaza y col., 2008).

El proceso de extrusión se ha utilizado ampliamente para el desarrollo de numerosos alimentos a base de cereales precocidos (Moreira-Araújo y col., 2008) y también podría constituir un alternativa interesante para formular alimentos funcionales adicionados de *algas rojas*.

#### **I.4.2 Extrusión**

La extrusión es un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría (González et al, 2002). Puede asegurarse que este proceso es eficiente, no sólo desde el punto de vista de la versatilidad (ya que puede realizar simultáneamente operaciones de mezclado, cocción, texturización y secado parcial), sino también desde el punto de vista de la utilización de la energía, mano de obra y espacio requerido para la instalación (Singh y col., 2007).

Existe una variedad de diseños de extrusores, pero básicamente pueden clasificarse en dos grandes tipos: *monotornillo* (*single screw extruder*) y *doble tornillo* (*twin screw extruder*). El *extrusor monotornillo* domina la industria alimentaria pero la aplicación de extrusores de *doble tornillo* está creciendo por la gran flexibilidad en el control de los parámetros del proceso y características del producto extrudido. Los *extrusores monotornillo* presentan inestabilidad, ya que es un proceso manejado por la fricción, mientras que los de doble tornillo son más útiles para procesos por pasos (amasado, mezclado, etc.) y para trabajar con almidones modificados.

➤ **Factores que afectan al proceso de extrusión. Variables operativas y de diseño**

La **Tabla I.7** resume los principales factores que influyen en el proceso de extrusión y las variables operativas y de diseño involucradas.

**Tabla I.7** Factores, variables operativas y de diseño que afectan al proceso de extrusión (Kokini y col., 1992).

<b>Factores</b>	Niveles de humedad
	Tamaño de partícula del material de alimentación
	Otros ingredientes (aceites y emulsificantes)
<b>Variables operativas y de diseño</b>	Geometría del tornillo
	Velocidad del tornillo
	Temperatura del cilindro
	Diámetro de la boquilla

➤ **Transformaciones del material durante la extrusión**

Antes del proceso de extrusión se lleva a cabo la humectación de las harinas. Esta tiene por objetivo comenzar a humectar el almidón para facilitar su posterior gelificación. Posteriormente, durante el proceso de extrusión, el material introducido, es transportado a lo largo del extrusor y en segundos, es convertido en un fluido viscoelástico, que al salir por la boquilla, se transforma en un sólido expandido. La combinación de esfuerzos de corte, temperatura y presión provoca cambios estructurales, más o menos intensos, según sean las condiciones de extrusión (Mitchell y Areas, 1992). Es importante destacar que la transformación del flujo sólido en flujo viscoso es necesaria para que se produzcan estos cambios estructurales, particularmente en el almidón (**Figura I.20**). La expansión que se produce al salir por la boquilla, es consecuencia de la evaporación casi instantánea del agua contenida en el material, la cual se encuentra en estado líquido, a pesar de la alta  $T(^{\circ}\text{C})$ , ya que la presión es suficientemente alta ( $> 50 \text{ Kg cm}^{-2}$ ). El cambio de presión a la salida (presión atmosférica), ocasiona que el agua (a  $T \gg$  de  $100^{\circ}\text{C}$ ) se vaporice (“*flashing*”),

provocando el “*arrastre*” (expansión) del material viscoelástico. Las propiedades mecánicas del producto expandido, dependerán de la distribución y tamaño de los alvéolos y del espesor de pared de los mismos.



**Figura I.20** – Transformaciones del material durante la extrusión (extrusor monotornillo).

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

Por último, según cómo se lleve a cabo la extrusión, pueden obtenerse diferentes productos. Si el proceso de extrusión se lleva a cabo a baja humedad se obtienen productos de expansión directa como los “*snacks*”. Mientras que si la extrusión se realiza a alta humedad se obtienen productos tales como *cereales para desayuno* (González y col., 2002).

## II. Objetivos

---

## II. OBJETIVOS

Obtención de extractos de *ficocomponentes* (*proteínas y polisacáridos*) del alga *Phorphyra columbina* y evaluar sus propiedades bio y tecno-funcionales.

### II.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estudiar la composición y propiedades nutricionales del alga *Phorphyra columbina*
- b. Definir las condiciones de extracción para la obtención de las distintas fracciones de *ficocomponentes* del macroalga (*proteínas y polisacáridos*)
- c. Caracterización de las fracciones obtenidas.
- d. Evaluación de las propiedades *tecno-funcionales* de las fracciones de *ficocomponentes*: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas.
- e. Evaluación de propiedades *bio-funcionales* de hidrolizados de distintas fracciones proteicas (actividad inmunomoduladora, antioxidante, actividad antihipertensiva)
- f. Elaboración de un alimento con el alga. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bio-accesibilidad de compuestos activos.

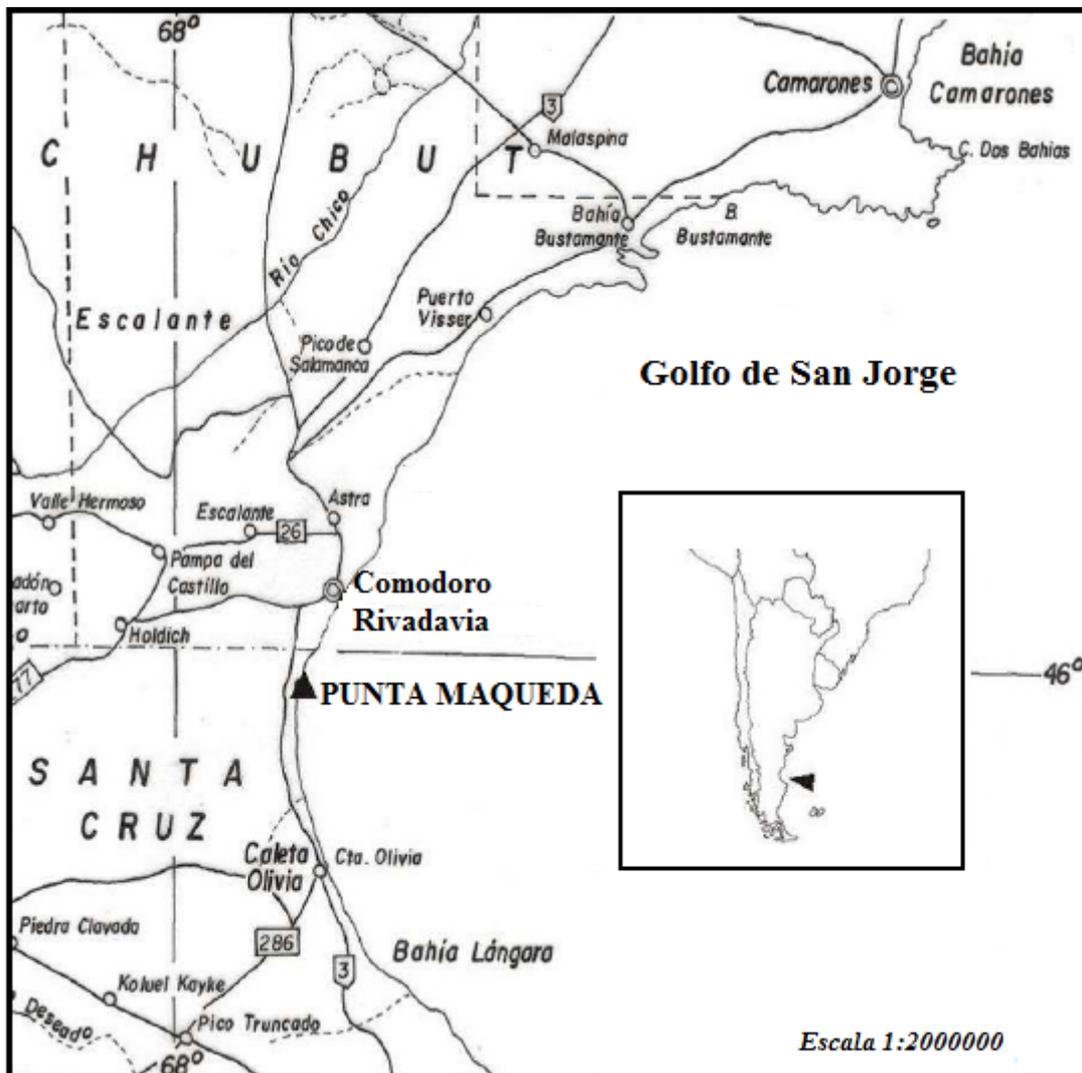
# III. Materiales y Métodos

---

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Obtención de la materia prima

El macroalga *P. columbina* fue recolectada en **Punta Maqueda**. Esta localidad se ubica a 30 km al sur de Comodoro Rivadavia, en la provincia de Santa Cruz (46° 01' L.S. y 67° 34' L.O.) y se caracteriza por estar alejada de la actividad antropogénica y por poseer una restinga rocosa con piletas de marea de poca extensión y profundidad (**Figura III.1**). La recolección se llevó a cabo en el período primaveral de los años: 2009, 2010, 2011 y 2012.



**Figura III.1** – Golfo de San Jorge zona de muestreo (Pérez y col., 2010).

Al realizar la colecta, el alga se lavó *in situ* con abundante agua de mar para eliminar cuerpos extraños y restos de otras algas. Posteriormente se guardó en bolsas de polietileno y se transportó refrigerada a 4 °C al laboratorio del Centro Regional de

Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Chubut.

Una vez en el laboratorio, el alga se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. El material seco se almacenó en bolsas plásticas herméticamente cerradas y se transportó al laboratorio de Extrusión del Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. El alga seca se molió con un molino de laboratorio (Molab, Decalab S.R.L, Argentina), y el producto obtenido se tamizó con un tamiz de 0,85 mm. Finalmente, el material tamizado se almacenó en envases plásticos a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

### **III.2 Estudio de la composición de la materia prima**

#### **III.2.1 Composición elemental**

La determinación de la composición elemental (C, H, N y S) del alga *P. columbina* fue realizada un con *microanalizador LECO, modelo CHNS-932* (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU). El equipo consta de cuatro detectores individuales, tres de ellos con un sistema de detección por infrarrojos (C, H y S) y uno por termoconductividad diferencial para N.

#### **III.2.2 Composición centesimal**

La determinación de la composición centesimal (humedad, fibra dietaria total, proteínas, extracto etéreo, ácido fítico y cenizas) del alga *P. columbina* fue realizada siguiendo las técnicas de la A.O.A.C. (1995).

#### **III.2.3 Perfil de ácidos grasos**

El perfil de ácidos grasos fue determinado siguiendo el método propuesto por Cert y col. (2000), con algunas modificaciones. El alga fue dispersada en agua al 5% (P/P) y homogeneizada. La dispersión resultante se extrajo tres veces con 1 mL de una mezcla cloroformo:metanol (2:1). La fase inferior fue concentrada hasta sequedad. Luego el residuo seco se disolvió en 2 mL de heptano y se trató con 0,2 mL de KOH (2 mol L<sup>-1</sup>), durante 30 min a temperatura ambiente. La fase heptano fue concentrada a 0,1 mL y analizada por cromatografía gaseosa. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases *5890 Series II* equipado con un detector de ionización de llama acoplado a un integrador *3390 A* y una columna *HP-23* (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Hewlett Packard; Palo

Alto, CA, EEUU). La temperatura del horno, inyector y detector fue de 180°C, 225°C y 250°C, respectivamente. Se usó una mezcla de soluciones patrón de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), que contenían los siguientes ácidos grasos: ácido esteárico (C18:0), ácido nonadecanoico (C19:0), ácido araquídico (C20:0), ácido heneicosanoico (C21:0), ácido behénico (C22:0) ácido tridecanoico (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecanoico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido heptadecanoico (C17:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1), ácido cis-11-eicosenoico (C20:1) y ácido erúcico (C22:1).

#### **III.2.4 Perfil de aminoácidos**

La determinación cuantitativa de aminoácidos totales y libres se llevó a cabo mediante el método propuesto por Alaiz y col. (1992). Para ello, se tomaron 2 mg de alga y se hidrolizaron con HCl (4 mol L<sup>-1</sup>), durante 24 horas a 110°C en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor y se redisolviéron en tampón borato sódico 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,0; llevándolas a un volumen final de 25 mL. La derivatización de los aminoácidos se hizo a 50° C, durante 50 min, con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo. La separación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC), empleando un cromatógrafo *Beckman-Coulter* (Brea, CA, EEUU) con detector 484 UV-visible (Waters, Milford, MA), y una columna de fase reversa *Nova-Pak C18* (60Å, 4 µm, 3.9 mm x 300 mm). Para la elución de los analitos se utilizó un gradiente binario constituido por dos buffers: a) acetato de sodio 25 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,0; y b) acetonitrilo. La elución se realizó a 0.9 mL min<sup>-1</sup> y 18°C de la siguiente manera: de 0 a 3 min, gradiente lineal desde 91% a 86% A; de 3 a 13 min, elución con 86% A; de 13 a 30 min, gradiente lineal desde 86% a 69% A y de 30 a 35 min, elución con 69% A. Los aminoácidos eluidos fueron detectados a 280 nm. Como patrón interno se utilizó ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico, calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de rectas de calibrado construidas para cada uno de ellos. Los aminoácidos utilizados para hacer las rectas de calibrado (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EEUU), se sometieron a las mismas condiciones que las muestras, para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrólisis ácida.

La determinación del triptófano se realizó por el método de Yust y col. (2004). Para ello, se tomaron 2 mg de alga y se hidrolizaron con 3 mL de NaOH (4 mol L<sup>-1</sup>), a 110° C durante 4 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis,

las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7,0 usando HCl (12 mol L<sup>-1</sup>). Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 25 mL con tampón borato sódico 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,0. El análisis se llevó a cabo mediante HPLC como se describió arriba. El contenido en triptófano se determinó a partir de una recta de calibrado preparada con L-triptófano (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EEUU).

### III.2.5 Contenido de minerales

La muestra fue mineralizada por vía seca y las cenizas se levantaron con HCl 20% (V/V). El contenido de sodio y potasio se determinó por fotometría de llama y el de calcio, magnesio, hierro, zinc y cobre por espectroscopía de absorción atómica. Para calcio y magnesio la dilución se efectuó empleando una solución de cloruro de lantano para eliminar interferencias. La medición se realizó utilizando un equipo Perkin Elmer IL 551, Instrumentation Laboratory (Norwood, Massachusetts, EEUU).

El contenido de P se determinó utilizando una técnica colorimétrica que utiliza el ácido fosfomolibdico (AOAC 1993).

### III.2.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE)

Para determinar el contenido de CFE del alga, se utilizaron diferentes sistemas extractivos, los cuales se describen en la siguiente tabla (**Tabla III.1**).

**Tabla III.1** Sistemas extractivos utilizados para determinar compuestos fenólicos extractables

Sistema	Agua destilada (%)	Metanol (%)	Acetona (%)	Ácido acético (%)
M	0	100	0	0
AA	20	0	80	0
AAA	15	0	80	5

Para tal fin, se hizo una dispersión del alga al 10% (P/V), la cual se agitó durante 30 min y posteriormente se centrifugó durante 15 min a una velocidad de 8000xg. Al sobrenadante obtenido se le determinó el contenido de CFE siguiendo la técnica descrita por Schanderl (1970), que utiliza el reactivo de Folin-Cicalteau. El resultado se expresó como mg Ácido Gálico g<sup>-1</sup> alga. Para ello se construyó una curva de calibrado empleando como patrón una solución de Ácido Gálico de 100 mg L<sup>-1</sup>.

### III.3 Estudio de las propiedades nutricionales de la materia prima

#### III.3.1 Bioaccesibilidad de minerales (DM)

La bioaccesibilidad de fósforo, hierro, zinc y calcio del alga se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Wolfgor y col. (2002). La muestra se preparó al 10% (P/V). Se llevó a pH 2,0 con HCl (4,5 mol L<sup>-1</sup>), se agregaron 0,8 ml de una solución de pepsina al 16% en HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para incrementar gradualmente el pH, se agregó una bolsita de diálisis de 24 cm de longitud con un diámetro de poro de 6 a 8 kDa (*Spectra/Pore*), conteniendo una solución de buffer PIPES (piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulfonic acid]), cuyo pH se calculó según Drago y col. (2005). Dicho buffer permitió llevar el pH del sistema a un valor final de 6,5 ± 0,2, luego de la doble digestión. Luego de 50 minutos se agregaron 6,25 ml de una solución de bilis – pancreatina (2,5% de bilis y 0,4% de pancreatina en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) y nuevamente se incubó durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la digestión, se retiraron las bolsitas, se enjuagaron con agua destilada y el dializado se trasvasó y pesó. Posteriormente, se midió el contenido de Fe, Zn y Ca por espectroscopia de absorción atómica y el contenido de P por técnica colorimétrica). Tanto las enzimas como el buffer PIPES fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

La bioaccesibilidad de cada mineral se calculó como la cantidad del mineral dializado expresada como porcentaje del contenido del mineral total en la muestra (**Ecuación 1**).

$$DM (\%) = [(mg M_D) / (mg M_M)] \times 100 \quad (1)$$

Dónde, DM (%): Porcentaje del mineral dializado, mg M<sub>D</sub>: mg del mineral dializado y mg M<sub>M</sub>: mg del mineral total en la muestra.

#### III.3.2 Digestibilidad proteica (DP)

La digestibilidad proteica del alga se midió siguiendo el método de Rudlof y Lönnnerdal (1992). La muestra se preparó al 2,5% (P/V). Se llevó a pH 4,5 con HCl (1 mol L<sup>-1</sup>), y se añadieron 11 mg de pepsina de modo tal que la relación enzima/sustrato fue de 1/20. La cantidad adicionada de enzima estuvo en función del contenido proteico del alga. La dispersión obtenida se agitó a 37°C durante 30 min. Luego, se aumentó el pH con NaHCO<sub>3</sub> (0,5 mol L<sup>-1</sup>), hasta llegar a 7,0. Posteriormente, se añadieron 2,5 mL de una solución de pancreatina (0,4 g 100 mL<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>), y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las muestras digeridas se colocaron inmediatamente en agua

hirviendo durante 4 min para inactivar las enzimas. Las enzimas empleadas fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

La digestibilidad proteica se definió como el aumento al finalizar la digestión enzimática del nitrógeno no proteico después de precipitar las proteínas post-hidrólisis con ácido tricloro-acético al 20%, en relación con el nitrógeno total (**Ecuación 2**).

$$DP (\%) = (NNP / N_{TOTAL}) \times 100 \quad (2)$$

Donde, NNP o nitrógeno no proteico: es el contenido de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) de la muestra (medido por Kjeldahl, A.O.A.C., 1995), luego de digerirla con pepsina y pancreatina y someterla a una precipitación con ácido tricloroacético 20%;  $N_{TOTAL}$ : es el contenido de nitrógeno de la muestra medido por Kjeldahl (A.O.A.C., 1995).

### **III.3.3 Puntaje químico**

El puntaje químico (PQ) de la proteína se calculó a partir del perfil de aminoácidos del alga y siguiendo el método de la FAO / OMS (1985), como se muestra a continuación (**Ecuación 3**).

$$PQ (\%) = [(mg \text{ AAI/g proteína}) / (mg \text{ AAIF/ g proteína patrón FAO})] \times 100 \quad (3)$$

Donde, AAI: son los mg de cada aminoácido indispensable por gramo de proteína del alga y mg AAIF/ g son los mg de cada aminoácido indispensable por gramo de proteína patrón FAO según los requerimientos nutricionales de un niño en edad preescolar (FAO/OMS, 1985).

### **III.3.4 Puntaje químico corregido por la digestibilidad proteica (PDCAAS)**

El puntaje químico corregido por la digestibilidad proteica (PDCAAS *del inglés*), fue calculado como se muestra abajo (**Ecuación 4**).

$$PDCAAS = PQ \times DP \quad (4)$$

## **III.4 Definición de las condiciones de extracción para la obtención de las distintas fracciones (proteínas y polisacáridos), a partir de la materia prima**

En base a la bibliografía disponible sobre los distintos procesos de obtención de *ficocoloides* (de S.F Tischer y col., 2006; Montolalu y col., 2008; Maciel y col., 2008; Denis y col., 2009b; Melo y col., 2002; Joubert y Fleurence, 2008), se hicieron diferentes ensayos previos para definir las condiciones óptimas del proceso de

extracción. En este sentido, se buscó diseñar un proceso que permitiera por un lado, extraer las *proteínas solubles* en agua a temperatura ambiente (entre ellas las *ficobiliproteínas*) y por otro, los *ficocoloides* (polisacáridos sulfatados: *carragenanos* y *agaranos*) libres de las proteínas anteriormente mencionadas.

### **III.4.1 Etapa I: Extracción de las proteínas solubles en agua a 25°C**

#### **III.4.1.1 Elección del pH de extracción**

Para seleccionar el pH de extracción de la primera etapa se evaluó la solubilidad proteica del alga a diferentes pHs (2,0 - 11,0), siguiendo la técnica de Drago y González (2001), con algunas modificaciones. Para ello se preparó una suspensión al 4% (P/V), se llevó al pH deseado y se agitó durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 3000xg durante 30 min. En el sobrenadante se determinó el contenido de proteínas (N x 6,25) utilizando la técnica de Kjeldahl (A.O.A.C., 1995). La solubilidad se calculó como el porcentaje de proteínas en la fracción soluble, respecto al contenido de proteínas de la muestra (**Ecuación 5**).

$$\text{Solubilidad (\%)} = [(\text{g proteínas solubles}) / (\text{g proteínas muestra})] \times 100 \quad (5)$$

#### **III.4.1.2 Elección del tiempo óptimo de extracción**

Una vez seleccionado el pH de extracción, para definir el tiempo de extracción que permitiera obtener la mayor concentración de sólidos solubles en agua a temperatura ambiente, se hicieron cuatro dispersiones del alga al 5% (P/V) y se las agitó a diferentes tiempos: 105 min, 120 min, 135 min y 150 min, respectivamente. Luego, cada dispersión fue filtrada (0,297 mm) y centrifugada a 3000xg durante 30 min y al sobrenadante obtenido se le determinó el contenido de sólidos solubles llevando a sequedad en estufa a 105°C durante 24 horas (**Ecuación 6**).

$$\text{Sólidos solubles (\%)} = [(\text{g sólidos solubles}) / (\text{g sólidos muestra})] \times 100 \quad (6)$$

#### **III.4.1.3 Elección del tiempo óptimo de centrifugación**

Para seleccionar el tiempo óptimo de centrifugación, se hicieron tres dispersiones del alga al 5% (P/V), se filtró (0,297 mm) y se las centrifugó a 3000xg durante: 30 min, 45 min y 60 min, respectivamente. A los sobrenadantes obtenidos, se les determinó el contenido de sólidos solubles como se describió anteriormente.

**III.4.2 Etapa II: Extracción de los *ficocoloides* (carragenanos y agaranos)**

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de extracción para la **Etapa I**, se evaluaron distintos parámetros de proceso con el objetivo de obtener la mayor proporción de *ficocoloides/sólidos solubles* con el menor nivel proteico. Para ello, se tomó como materia prima el residuo insoluble en agua a temperatura ambiente obtenido en la etapa anterior. En la **Tabla III.2** se muestran las seis experiencias realizadas para obtener la mayor proporción de ficocoloides/sólidos solubles.

**Tabla III.2** Condiciones de proceso evaluadas

<b>Experiencias</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (%)</b>	<b>Hidrólisis secuencial</b>
1	2	7,0	25	0	0
2	2	2,0	25	0	0
3	2	12,0	25	0	0
4	2	12,0	25	0,5	0
5	2	7,0	95	0	0
6	2	5,2	55	0	1) Celulasa (E/S: 1,4%)
	1,5		75		2) Xilanasa (E/S: 1,4%)

El residuo de la **Etapa I** fue dispersado en agua al 5 % (P/V), utilizando las condiciones de pH, T°C y tiempo, mencionadas en la **Tabla III.2** para cada experiencia. Luego, cada sistema se centrifugó a 3000xg, durante 45 min a la temperatura de cada experiencia, excepto para las experiencias 5 y 6, en donde la centrifugación se realizó a 45°C. A los sobrenadantes obtenidos, se les determinó el contenido de proteínas por Kjeldahl (A.O.A.C., 1995) y el de sólidos como se describió anteriormente.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la **experiencia 5**, ya que permitió obtener el mayor rendimiento de *ficocoloides* con la menor extracción de proteínas.

#### **III.4.2.1 Elección del tiempo óptimo de extracción de la condición 5**

Para seleccionar el tiempo de extracción que permitiera obtener la mayor concentración de sólidos solubles en agua a 95°C, se hicieron dos dispersiones del residuo insoluble en agua a 25°C al 5% (P/V), y se las agitó a 95°C durante: 120 min y 180 min. Luego, cada dispersión fue centrifugada a 3000xg durante 45 min a 45°C. A los sobrenadantes obtenidos, se les determinó el contenido de sólidos como se describió anteriormente.

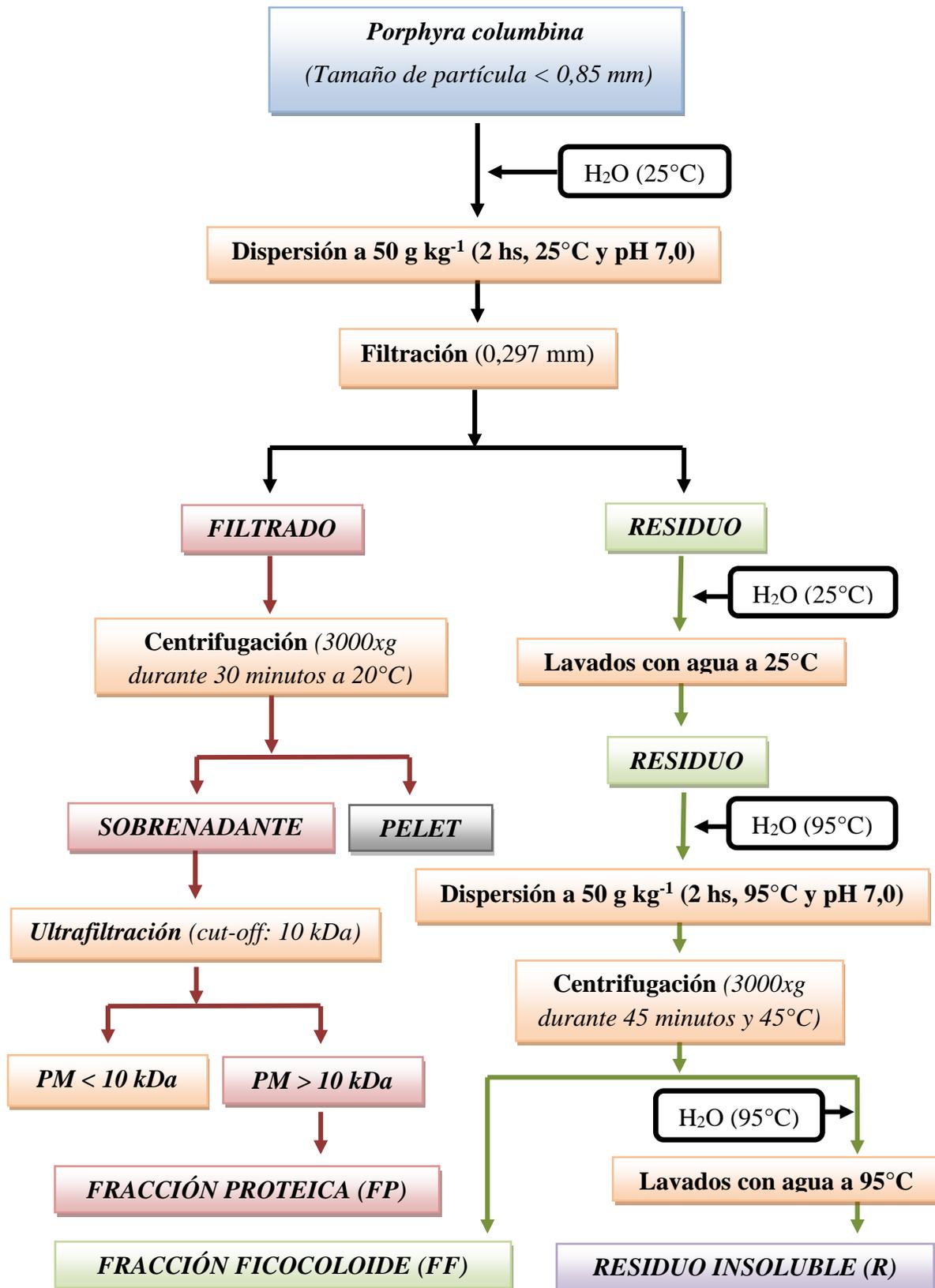
#### **III.4.2.2 Elección del tiempo óptimo de centrifugación de la condición 5**

Para seleccionar el tiempo óptimo de centrifugación, se hicieron tres dispersiones del residuo insoluble en agua a 25°C al 5% (P/V) y se las agitó a 95°C durante 120 min. Posteriormente, se las centrifugó a 3000xg durante: 30 min, 45 min y 60 min, respectivamente. A los sobrenadantes obtenidos, se les determinó el contenido de sólidos como se describió anteriormente.

#### **III.4.3 Proceso de extracción definitivo para la obtención de las distintas fracciones (*proteínas y polisacáridos*), a partir de la materia prima**

La muestra del alga *P. columbina* fue dispersada en agua destilada a 50 g kg<sup>-1</sup> y pH 7,0 (**Etapa I**). La dispersión obtenida, se agitó durante 2 horas a 25°C y luego se filtró con un filtro cuyo diámetro de poro fue 0,297 mm. El filtrado (partículas < 0,297 mm), se centrifugó a 3000xg durante 30 min a 20°C y el sobrenadante resultante se ultrafiltró. Para ello, se utilizó el equipo de ultrafiltración *Molecular/Por® Stirred Cell S-43-70* con una membrana *Molecular/Por® Cellulose Ester*, cuyo cut-off fue de 10kDa. El proceso de ultrafiltración se llevó a cabo durante 5 horas hasta obtener un factor de reducción de volumen igual a 2. La fracción retenida rica en *ficobiliproteínas* o fracción proteica (>10kDa), fue denominada **FP** (fracción proteica) (**Figura III.2**).

A partir del residuo de filtración de la **Etapa I** (partículas > 0,297 mm), se llevo a cabo la segunda etapa de extracción (**Etapa II**). Para ello, el residuo fue dispersado nuevamente en agua destilada a 50 g kg<sup>-1</sup> y pH 7,0. La dispersión obtenida, se agitó durante 2 horas a 95°C y luego se centrifugó a 3000xg durante 30 min a 45°C. El sobrenadante obtenido, rico en *ficocoloides*, se lo denominó **FF** (fracción ficocoloide). Por último, al residuo insoluble en agua a 4°C y 95°C obtenido tras esta última centrifugación se lo denominó **R**.



**Figura III.2** – Proceso de extracción definitivo para la obtención de las distintas fracciones a partir de *P. columbina*.

### III.4.3.1 Obtención de hidrolizados a partir de la fracción proteica (FP) y el residuo insoluble (R)

#### a) Hidrolizados obtenidos a partir de la fracción proteica (HFP)

Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostatzado de tipo batch de 25 mL de capacidad. El pH de reacción fue ajustado a 8,0 con buffer Tris 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Las enzimas empleadas para esta etapa experimental fueron: Alcalasa (A) y Tripsina (T) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España). La temperatura de hidrólisis en todos los sistemas fue 50°C. Se trabajó a una concentración de sustrato del 1% (P/P) y a una relación E/S de 0.5%. Se prepararon cuatro hidrolizados de **FP** como se describe a continuación:

- ✓ **Hidrólisis T:** Hidrólisis con Tripsina durante 2 horas. Tiempo total de reacción 2 horas. Hidrolizado **T**.
- ✓ **Hidrólisis A:** Hidrólisis con Alcalasa durante 2 horas. Tiempo total de reacción 2 horas. Hidrolizado **A**.
- ✓ **Hidrólisis TA:** Hidrólisis con Tripsina durante 2 horas + hidrólisis con Alcalasa durante 2 horas. Tiempo total de reacción 4 horas. Hidrolizado **TA**.
- ✓ **Hidrólisis AT:** Hidrólisis con Alcalasa durante 2 horas + hidrólisis con Tripsina durante 2 horas. Tiempo total de reacción 4 horas. Hidrolizado **AT**.

Una vez finalizada la reacción de hidrólisis, las enzimas fueron inactivadas por tratamiento térmico según indicaciones del fabricante y los hidrolizados fueron liofilizados.

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de hidrólisis (**GH**) a través de la medición de aminos libres utilizando la técnica del o-ftaldialdehído (OPA), según Nielsen y col. (2001) (**Ecuación 7**).

$$GH (\%) = [(h - h_0) / h_{tot}] \times 100 \quad (7)$$

Donde, h: es el número de uniones peptídicas hidrolizadas; h<sub>0</sub>: es el contenido de aminos libres en la proteína de partida y h<sub>tot</sub>: es el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (8,6 mEq/g proteína).

#### b) Hidrolizado obtenido a partir del residuo insoluble (HR)

El hidrolizado fue obtenido empleando un reactor termostatzado de tipo batch de 800 mL de capacidad. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando

un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de NaOH (2 mol L<sup>-1</sup>) o HCl (2 mol L<sup>-1</sup>). Las enzimas empleadas para esta etapa experimental fueron: Fungal Protease Concentrate (Genecor, Arroyito, Argentina) y Flavourzyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Se trabajó a una concentración de sustrato de 0,8% (P/P). Las condiciones de trabajo fueron: 55°C, pH 4,3 y E/S: 5% (P/P) para Fungal Protease Concentrate y 55°C, pH 7,0 y E/S: 2% (P/P) para Flavourzyme. El hidrolizado fue producido mediante un esquema del tipo secuencial: 3 horas con la enzima Fungal Protease Concentrate + 4 horas con la enzima Flavourzyme. El tiempo total de reacción fue: 7 horas. Una vez finalizada la reacción de hidrólisis, las enzimas fueron inactivadas por tratamiento térmico según indicaciones del fabricante. El hidrolizado obtenido fue centrifugado a 2000xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante liofilizado.

El GH fue calculado como se describió anteriormente (**Ecuación 7**), utilizando para ello un valor de  $h_{tot} = 8,47$  mEq/g proteína.

### **III.5 Caracterización de las fracciones obtenidas**

#### **III.5.1 Caracterización de la fracción proteica (FP), sus hidrolizados (HFP) y la fracción ficocoloide (FF)**

##### **III.5.1.1 Composición centesimal**

La determinación de la composición centesimal (humedad, proteínas y cenizas) de **FP** y **FF** fue realizada siguiendo las técnicas de la A.O.A.C. (1995). Además se determinó el contenido de hidratos de carbono y sulfatos siguiendo el método propuesto por Dubois y col. (1956) y Dodgson y Price (1962), respectivamente.

El contenido de compuestos fenólicos extractables en agua (**CFE**), se determinó como se mencionó en el puto **III.2.6**. Para ello se hizo una dispersión de la muestra al 5% (P/V). Los resultados obtenidos se expresaron como g de ácido gálico equivalente 100g<sup>-1</sup> de muestra.

##### **III.5.1.2 Barrido espectral y cuantificación de ficobiliproteínas**

Para obtener el barrido espectral de **FP**, **HFP** y los estándares **R-ficoeritrina** y **C-ficocianina** (Sigma-Aldrich, Barcelona, España), se hizo una dispersión al 0,1% (P/V) en buffer fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. El espectro de absorción fue registrado con un espectrofotómetro UV-visible *Milton Roy Genesys 5* (Ivylund, EEUU), en un rango

de longitudes de onda de 400 a 800 nm. Las absorbancias obtenidas fueron corregidas contra blanco de reactivos (buffer fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8).

A partir de los barridos espectrales se obtuvo la *cuarta derivada espectral* (d<sup>4</sup>Abs/dλ<sup>4</sup>), siguiendo el método propuesto por Sampath-Wiley y Neffus (2007). Este artilugio matemático permite, entre otras cosas, resolver el solapamiento de picos de un espectro.

Además se cuantificó el contenido de *ficoeritrina* y *ficocianina* presente en **FP**, **HFP** y **FF**. Para ello, se construyeron dos curvas de calibrado con los estándares antes mencionados a una concentración de 0,1g L<sup>-1</sup> de proteínas en buffer fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. Los valores de absorbancia fueron registrados a 566 nm y 620 nm para **R-ficoeritrina** y **C-ficocianina**, respectivamente. El resultado obtenido se expresó en mg de *ficobiliproteína* 100g<sup>-1</sup> de proteínas.

### **III.5.1.3 Perfil de aminoácidos**

La determinación cuantitativa de aminoácidos de **FP** y **HFP** se llevó a cabo mediante el método propuesto por Alaiz y col. (1992) y Yust y col. (2004), como se describió en el punto **III.2.4**.

### **III.5.1.4 Cromatografía de filtración en gel (FPLC)**

El perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de **FP** y **HFP**, se realizó mediante cromatografía de filtración en gel. Para ello, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC) *Akta purifier* (GE Healthcare, Nueva York, EEUU), equipado con una columna *Superdex Peptide 10/300* (GE Healthcare, Nueva York, EEUU). El volumen de inyección de las muestras fue 200 μL a una concentración proteica de 10 mg mL<sup>-1</sup>. La elución se realizó con bicarbonato de amonio 0,75 mol L<sup>-1</sup> a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> y se monitoreó a 214 nm.

Los pesos moleculares de **FP** y **HFP** fueron estimados mediante el empleo de los siguientes estándares de peso molecular: azul de dextrano (2000 kDa), citocromo C (12,5 kDa), aprotinina (6512 Da), bacitracina (1450 Da), citidina (246 Da) y glicina (75 Da) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Nueva York, EEUU). Con el logaritmo de los pesos moleculares y los volúmenes de elución de los estándares se construyó una curva de calibrado.

### **III.5.1.5 Perfil de compuestos fenólicos de FP**

#### **a) Extracción de los compuestos fenólicos e hidrólisis**

La determinación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Tarola y col. (2012). Para tal fin, se pesaron 0,2 g de **FP**, se extrajeron los compuestos fenólicos con 5 mL de metanol grado HPLC a temperatura ambiente, homogenizando y sonicando durante 15 min. Luego, se centrifugaron a 3000xg durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue colectado, mientras que el precipitado fue re-extraído tres veces con 5 mL de metanol grado HPLC. Los extractos colectados se juntaron y concentraron a 5 mL en flujo de nitrógeno, a temperatura ambiente. Antes de ser inyectados en el sistema HPLC se filtraron a través de una membrana Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ . El extracto se usó para el análisis de compuestos fenólicos libres (agliconas libres o compuestos fenólicos no conjugados o no condensados).

Posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis ácida sobre el extracto metanólico obtenido, cuyo objetivo fue liberar las agliconas de los compuestos fenólicos glicosilados e hidrolizar los compuestos fenólicos conjugados o condensados. Para ello, a 2 mL de extracto se le adicionó 1 mL de HCl (12 mol L<sup>-1</sup>), y la mezcla resultante se llevó a estufa a 90°C durante 50 min. Luego de la hidrólisis, el extracto fue analizado por HPLC.

#### **b) Soluciones estándar y condiciones cromatográficas**

Se prepararon distintas soluciones estándar de compuestos fenólicos en metanol grado HPLC, en las siguientes concentraciones: ácido gálico (1000 mg L<sup>-1</sup>), catequina (400 mg L<sup>-1</sup>), epicatequina (400 mg L<sup>-1</sup>), ácido p-cumárico (1000 mg L<sup>-1</sup>), ácido ferúlico (2000 mg L<sup>-1</sup>), rutina (640 mg L<sup>-1</sup>), ácido cinámico (1000 mg L<sup>-1</sup>), ácido elágico (200 mg L<sup>-1</sup>), quercitina (620 mg L<sup>-1</sup>), kaempferol (135 mg L<sup>-1</sup>), cianidina (2000 mg L<sup>-1</sup>), y pelargonidina (1300 mg L<sup>-1</sup>). Estas soluciones, estables por 2 meses, se protegieron de la luz y se almacenaron a -20°C.

Los compuestos fenólicos fueron separados con un equipo de cromatografía líquida *Shimadzu LC-10AT* (Shimadzu Scientific Instruments, Japón), equipado con una columna de fase reversa *Supelcosil LC-ABZ* (150 x 4,6 mm), de 5  $\mu\text{m}$ , unida a un guardacolumna *Alltech C18* 5 $\mu\text{m}$ . La fase móvil fue un gradiente preparado a partir de una solución acuosa de ácido fórmico al 2% (P/V), pH 3,0 (Solvente A) y una solución

de ácido fórmico en metanol al 2% (P/V), pH 3,0 (solvente B). El programa de gradiente fue: 0,01-8,00 min 15% B isocrático, 8,01-25,00 min 15-50% B, 25,01-40,00 min 50% B isocrático, 40,01-50,00 min 50-90% B, y 50,01-55,00 min 90-15% B. Para equilibrar la columna se requirieron 10 minutos antes de cada inyección. El flujo fue de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , y los análisis fueron realizados a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).

El detector se ajustó a 280, 320, 360 y 520 nm para realizar la detección simultánea de los diferentes grupos de compuestos fenólicos. La identificación de los picos se realizó comparando los tiempos de retención y las características espectrales aportadas por el detector DAD, con compuestos fenólicos estándares.

### **III.5.1.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE - SDS)**

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de **FP**, **FF** y **R-ficoeritrina** se realizó de acuerdo a Laemmli (1970), empleando para ello un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del 12%. Se utilizó un equipo *Mini-Protean II. Electrophoresis cell-Bio-Rad* con una fuente Modelo 200/2.0 *Bio-Rad*. Las placas de gel se fijaron y tiñeron con una solución de 0.125% de Coomassie Blue R-250, 50% metanol y 10% ácido acético en agua. Los pesos moleculares de las fracciones fueron estimados mediante el uso de un kit de calibración cuyos pesos moleculares proteicos son: 94 kDa (fosforilasa b), 67 kDa (albúmina), 43 kDa (ovoalbúmina), 30 kDa (anhidrasa carbónica), 21,5 kDa (inhibidor de tripsina) y 14,4 kDa (lisozima) (Bio-Rad catálogo N°161-0304).

Las muestras fueron diluidas con el buffer de muestra (0,5 M tris-Cl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 5% Azul de Bromofenol), y calentadas en baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  durante 90 segundos. Posteriormente, se sembraron 10 - 25  $\mu\text{l}$  en cada vial, dependiendo de la concentración de proteínas.

### **III.5.1.7 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de **FP** y **FF** fue obtenida con un espectrofotómetro de infrarrojos *Nicolet iS 10 Infrared Spectrometer* (Thermo Scientific, Madison, EEUU). Para ello, se hizo una dispersión acuosa de las fracciones al 1% (P/V), se secó a  $60^\circ\text{C}$  en estufa durante 5 horas y posteriormente se colocó en porta muestras (Arvizu y col., 2007). Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente. Los espectros se obtuvieron en el rango de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , haciendo 60 lecturas cada  $4 \text{ cm}^{-1}$ . La adquisición de los datos se llevó a cabo con el

programa OMNIC versión 7.3 (Thermo Electron Corporation, EEUU). Todas las lecturas fueron corregidas y normalizadas contra línea de base a  $1812\text{ cm}^{-1}$ .

### **III.5.2 Caracterización del residuo insoluble (R) y su hidrolizado (HR)**

#### **III.5.2.1 Composición elemental**

La determinación de la composición elemental (C, H, N y S) de **R** y **HR** se realizó como se describió en el punto **III.2.1**.

#### **III.5.2.2 Composición centesimal**

La composición centesimal de **R** y **HR** (proteínas, humedad y cenizas), se realizó siguiendo la metodología de la AOAC (1995).

#### **III.5.2.3 Contenido de minerales**

El contenido de hierro, zinc y calcio de **R** fue determinado por espectroscopia de absorción atómica, previa mineralización por vía seca como se describió anteriormente (**III.2.5**).

#### **III.5.2.4 Estudio de las propiedades nutricionales de R**

##### **a) Bioaccesibilidad de minerales (DM)**

La disponibilidad potencial de hierro, zinc y calcio del **R** se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Wolfgor y col. (2002), modificada por Drago y col. (2005) descrita en el punto **III.3.1**. La disponibilidad potencial de cada mineral se calculó según la **Ecuación 1**.

##### **b) Digestibilidad proteica (DP)**

La digestibilidad proteica del **R** se midió siguiendo el método de Rudlof y Lönnerdal (1992), como se describió en el punto **III.3.2**. La misma se calculó según la **Ecuación 2**.

#### **III.5.2.5 Perfil de aminoácidos**

La determinación cuantitativa de aminoácidos de **R** y **HR** se llevó a cabo mediante el método propuesto por Alaiz y col. (1992) y Yust y col. (2004), como se describió en el punto **III.2.4**. Además se cuantifico el contenido de aminoácidos libres presentes en **HR**.

A partir del perfil de aminoácidos de **R** y **HR** se calculó la proporción de aminoácidos, como se muestra en la **Ecuación 8**.

$$\text{Proporción de aminoácidos (\%)} = (A_{HR} / A_R) \times 100 \quad (8)$$

Donde:  $A_{HR}$ : es el contenido de aminoácidos en **HR** y  $A_R$ : es el contenido de aminoácidos en **R**.

Además, se calculó la proporción de cada aminoácido en la fracción peptídica de **HR**, como se describe en la **Ecuación 9**.

$$\text{Proporción de aminoácidos peptídicos (\%)} = A_{HR} - A_{LHR} \quad (9)$$

Donde:  $A_{HR}$ : es el contenido de aminoácidos en **HR** y  $A_{LHR}$ : es el contenido de aminoácidos libres en **HR**.

#### **III.5.2.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE)**

Para determinar el contenido de **CFE** de **R** y **HR**, se utilizaron diferentes sistemas extractivos según el protocolo descrito en el punto **III.2.6**. Para tal fin, el **R** fue dispersado al 20% (P/V), mientras que el **HR** fue dispersado al 5% (P/V). Los resultados se expresaron como g de ácido gálico equivalente  $\text{g}^{-1}$  de muestra.

#### **III.5.2.7 Cromatografía de filtración en gel (FPLC)**

El perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de **R** y **HR**, se realizó mediante cromatografía de filtración en gel, como se describió en el punto **III.5.1.4**.

#### **III.5.2.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE - SDS)**

El perfil electroforético de **R** (Sigma-Aldrich, Barcelona, España), se realizó de acuerdo a Laemmli (1970), siguiendo el protocolo descrito en el punto **III.5.1.6**. Conjuntamente con **R** se procesó la muestra del alga *P. columbina*.

### **III.6 Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las fracciones: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas**

#### **III.6.1 Propiedades de hidratación**

La solubilidad proteica de **FP**, **R** y **HR** a diferentes pHs (2,0 - 11,0), se evaluó siguiendo la técnica de Drago y González (2001), como se describió en el punto **III.4.1.1**. La solubilidad a los distintos pHs se calculó según la **Ecuación 5**.

### III.6.2 Propiedades reológicas

#### III.6.2.1 Viscosidad intrínseca

Para determinar la viscosidad intrínseca de **FP** y **FF**, se hicieron dispersiones de las fracciones en el rango de 0,716 a 2,559 g sólidos dL<sup>-1</sup> y 0,002 a 0.013 g sólidos dL<sup>-1</sup> para **FP** y **FF**, respectivamente. Luego se tomaron 10 mL de cada dispersión y se estimó el tiempo de flujo a 20°C (± 0,1°C), con un viscosímetro capilar *Cannon-Fenske* (Schott Geräte GmbH, Hofheim, Alemania) (Series 100, ASTM D2857-95, 2004). La viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ ), la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) y la viscosidad inherente ( $\eta_{inh}$ ), fueron calculadas según las **Ecuaciones 10a, 10b y 10c**.

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 = (t / t_0) \times (\rho / \rho_0) \quad (10a)$$

$$\eta_{red} = (\eta_{rel} - 1) / C = [\eta] + [\eta]^2 \times k_H \times C \quad (10b)$$

$$\eta_{inh} = \ln(\eta_{rel}) / C = [\eta] + [\eta]^2 \times k_K \times C \quad (10c)$$

Donde,  $[\eta]$ : es la viscosidad intrínseca;  $t$  y  $t_0$  son los tiempos de flujo de las dispersiones y el agua, respectivamente;  $\rho$  y  $\rho_0$  son las densidades de las dispersiones y el agua, respectivamente;  $k_H$ : es el coeficiente de Huggin;  $k_K$ : es el coeficiente de Kramer; y  $C$ : es la concentración de las dispersiones de **FP** y **FF** en g de sólidos dL<sup>-1</sup>.

La viscosidad intrínseca se obtuvo a partir de la **Ecuación 10b y 10c** (Huggin y Kramer, respectivamente), haciendo  $C$  igual a cero.

#### III.6.2.2 Evaluación del comportamiento reológico

Para la evaluación se utilizó un reómetro *Rheostress 600* (Haake, Alemania) en su modo rotacional, empleando la geometría compuesta de plato-plato rugoso. Se tomó un volumen de las dispersiones de **FP** y **FF** al 1% (P/V), y colocó en el plato inferior del reómetro descendiendo luego el superior hasta alcanzar la separación preestablecida de 1mm. Se termostatózó la muestra a 25°C utilizando un baño termostático anexo (Termohaake DC50). Se utilizó una aceleración de 167 s<sup>-2</sup> para alcanzar en 2 min un gradiente de velocidad de deformación de 500 s<sup>-1</sup>, se mantuvo el mismo durante 1 min y luego se descendió hasta 0 s<sup>-1</sup> utilizando una aceleración igual a la antes mencionada pero de signo negativo. Se registró el esfuerzo de corte ( $\tau$ ), en función del gradiente de velocidad de deformación ( $D$ ). A partir de las curvas ascendentes, correspondientes al comportamiento de flujo, se determinó la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) para los siguientes gradientes de velocidad: 60 s<sup>-1</sup>, 300 s<sup>-1</sup> y 500 s<sup>-1</sup>.

Los índices de flujo ( $n$ ) y de consistencia ( $K$ ), se determinaron mediante el ajuste de los resultados experimentales al modelo de Ostwald de Waele (**Ecuación 11**).

$$\tau = K \cdot D^n \quad (11)$$

Donde,  $\tau$ : es el esfuerzo de corte (Pa);  $K$ : es el índice de consistencia (Pa s<sup>n</sup>);  $D$ : es el gradiente de velocidad (s<sup>-1</sup>); y  $n$ : es el índice de flujo (adimensional).

### III.6.3 Propiedades filmogénicas

El objetivo de esta etapa experimental fue estudiar el efecto del agregado de **FP** sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de películas formadas por la fracción **FF**.

#### III.6.3.1 Elaboración de las dispersiones filmogénicas

Las películas se formaron por *casting* a partir de dispersiones acuosas con diferentes proporciones de **FP** y **FF** al 1% (P/P), como se muestra en la **Tabla III.3**.

**Tabla III.3** Formulaciones filmogénicas **FP:FF**

Formulación	FP (g 100g <sup>-1</sup> )	FF (g 100g <sup>-1</sup> )
FP <sub>0</sub>	0	100
FP <sub>25</sub>	25	75
FP <sub>50</sub>	50	50
FP <sub>75</sub>	75	25
FP <sub>100</sub>	100	0

Las cinco dispersiones filmogénicas fueron agitadas durante 1 hora a temperatura ambiente y pH 7,0. Posteriormente, se tomaron 10 ml de cada dispersión y se colocaron en placas de Petri de poliestireno (64 cm<sup>2</sup>). Luego, las dispersiones fueron secadas en estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, EEUU) a 60°C durante 5 horas. Las películas así formadas se acondicionaron a 20°C y 58% de humedad relativa (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

### **III.6.3.2 Contenido de compuestos fenólicos extractables de las dispersiones filmogénicas**

El contenido de compuestos fenólicos extractables (**CFE**), se determinó según el protocolo descrito en el punto **III.2.6**. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente  $100\text{g}^{-1}$  de dispersión.

### **III.6.3.3 Propiedades reológicas de las dispersiones filmogénicas**

El comportamiento reológico de las cinco dispersiones filmogénicas se evaluó como se describió en el punto **III.6.2.2**.

### **III.6.3.4 Propiedades antioxidantes de las dispersiones filmogénicas**

La capacidad antioxidante de las dispersiones filmogénicas fue medida con el radical catión  $\text{ABTS}^+$  siguiendo el método propuesto por Re y col. (1999). Para estimar la capacidad antioxidante Trolox equivalente (**TEAC**), se utilizó como estándar al Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Para esto, se construyó una curva de inhibición vs. concentración de Trolox en PBS  $0,01\text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. El rango de concentración de estándar fue de 0 a  $2,5\text{ mmol L}^{-1}$ . Los valores de absorbancia a 734 nm, fueron registrados a los 6 minutos de iniciada la reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **III.6.3.5 Caracterización de las películas**

#### **III.6.3.5.1 Contenido de humedad**

Se determinó luego de secar la película en una estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las películas fueron cortadas en pequeños especímenes y se colocaron en placas de Petri, se pesaron antes y después del secado en la estufa. El contenido de humedad se calculó como el porcentaje de pérdida de peso, respecto del peso original (ASTM D644-99, 2004). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.6.3.5.2 Espesor**

Se utilizó un medidor de espesor digital (Check Line DCN-900, EEUU) para materiales no conductores ni ferrosos. Sobre cada uno de los especímenes que se emplearon para determinar propiedades mecánicas y de barrera, se realizaron 9 determinaciones, una en el centro y ocho sobre el perímetro; informando el valor promedio.

### III.6.3.5.3 Color (CIE-Lab)

Las determinaciones de color de las películas se hicieron empleando un colorímetro *Konica Minolta Chroma Meter CR-400* (Konica Minolta Chroma Co., Osaka, Japan), con ángulo de observador: 2°; iluminante: C. El análisis de color de las películas se realizó en base al espacio de color definido por la norma CIE-Lab: plano cromático de coordenadas  $a^*$  (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes) y plano cromático de coordenadas  $b^*$  (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), situándose perpendicular a ellos el eje  $L^*$  (luminosidad). El colorímetro fue calibrado con una superficie estándar blanca provisto por *Minolta*, cuyas coordenadas fueron:  $L^*_{estándar} = 97,55$ ,  $a^*_{estándar} = -0,03$  y  $b^*_{estándar} = 1,73$ . Los parámetros de color de las películas se determinaron sobre la superficie estándar antes mencionada. La diferencia total de color se calculó como se describe en la **Ecuación 12a**.

$$\Delta E^* = [(L^*_P - L^*_{estándar})^2 + (a^*_P - a^*_{estándar})^2 + (b^*_P - b^*_{estándar})^2]^{0,5} \quad (12a)$$

Donde:  $L^*_P$ ,  $a^*_P$  y  $b^*_P$  son los diferentes parámetros CIE-Lab estimados para cada película.

El color también se expresó usando el sistema de coordenadas cilíndricas:  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ . Donde,  $L^*$ : es la luminosidad,  $C^*$ : es el croma o índice de saturación y  $h^*$ : es el ángulo *hue*. El cálculo de  $C^*$  y  $h^*$  fue realizado como se describe en la **Ecuación 12b** y **12c**.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5} \quad (13b)$$

$$h^* = \arctan (b^*/a^*) \quad (13c)$$

Los valores informados son la media de nueve determinaciones sobre cada una de las muestras.

### III.6.3.5.4 Opacidad

Se analizó el espectro de absorbancia de las películas en función de la longitud de onda, entre 400 y 800 nm. Para ello, se cortaron porciones de las películas con las dimensiones internas de la cubeta y se colocaron cuidadosamente dentro de la misma. La lectura de absorbancia se efectuó en un espectrofotómetro *Beckman DU650* (Beckman, Alemania) utilizando una cubeta vacía como referencia. La opacidad se calculó a partir del área bajo la curva espectral (400 - 800 nm), dividiendo dicho valor

por el espesor de la película (expresado en cm) (Cao y col., 2007). Los resultados fueron expresados en UA cm<sup>-1</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

### III.6.3.5.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método ASTM E96-00 (2004) con algunas modificaciones. Las películas se colocaron en una celda de permeación con una abertura circular de 0,00185 m<sup>2</sup>. La determinación se efectuó a 20°C, colocando las celdas en un desecador (**Figura III.3**).



**Figura III.3** – Dispositivo de medida de la permeabilidad al vapor de agua, en donde se puede observar la película colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, HR<sub>c</sub> = 0) dentro de una cámara con humedad relativa controlada (solución saturada de NaCl, HR<sub>d</sub> = 0,75).

La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de 1753,35 Pa. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra (HR<sub>c</sub> = 0) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl (HR<sub>d</sub> = 0,75) en el desecador. La humedad relativa dentro de la celda fue siempre menor que la del desecador, por lo que la permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 hora), se realizaron ocho determinaciones de peso de la celda de permeación, durante 5 horas. Los cambios en el

peso de la celda fueron registrados y graficados en función del tiempo. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal ( $\Delta m/\Delta t$ , g H<sub>2</sub>O s<sup>-1</sup>), siendo ésta la velocidad de permeación del vapor de agua. La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la **Ecuación 14**. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$PVA = [(\Delta m/\Delta t) \times e] / [P_v^{H_2O} \times (HR_d - HR_c) \times A] \quad (14)$$

Donde, PVA: permeabilidad al vapor de agua (g H<sub>2</sub>O Pa<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>);  $\Delta m/\Delta t$ : velocidad de permeación del vapor de agua (g H<sub>2</sub>O s<sup>-1</sup>); e: espesor de la película;  $P_v^{H_2O}$ : presión de vapor de agua (Pa); HR<sub>c</sub>: humedad relativa en la celda de permeación; HR<sub>d</sub>: humedad relativa en el desecador; A: área de permeación (m<sup>2</sup>).

### III.6.3.5.6 Solubilidad

La solubilidad en agua de las películas se midió siguiendo el método propuesto por Gontard y col. (1994), con algunas modificaciones. Para ello, se cortaron porciones de 2 cm de diámetro de las películas, se pesaron ( $P_0 \sim 0,03 - 0,05$ g), y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL. Luego se adicionaron 50 mL de agua destilada (con 0,02% (P/V) de ázida sódica), y se agitó a 100 rpm durante 24 horas a 20°C. Las dispersiones obtenidas fueron filtradas con papel de filtro Whatman N°1 (previamente secado y pesado). El material insoluble, retenido en el papel de filtro, fue secado en estufa a 105°C durante 24 horas ( $P_f$ ). La solubilidad acuosa de las películas se calculó según la **Ecuación 15**. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Solubilidad} = [(P_0 \times (100 - CH)) - P_f] \times 100 / [P_0 \times (100 - CH)] \quad (15)$$

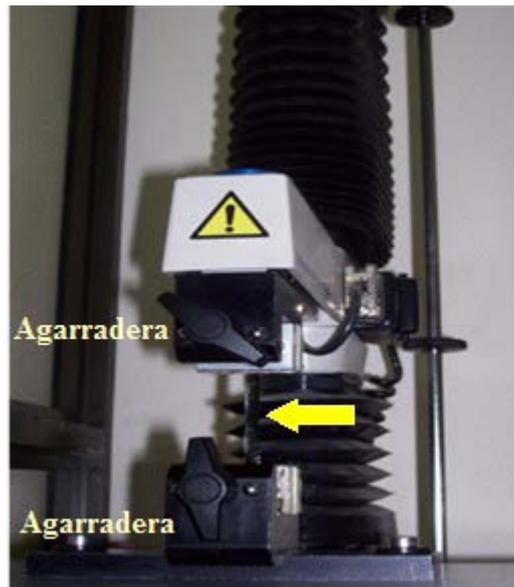
Donde,  $P_0$ : es el peso inicial de las películas (g);  $P_f$ : peso final de las películas secas (g); y CH: es el contenido de humedad (%).

### III.6.3.5.7 Propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas en ensayos de tracción, de acuerdo al método ASTM D882-02 (2004), empleando un texturómetro *TA.XT2i* (Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG (**Figura III.4**).

Las mediciones fueron realizadas a 20°C y 65% de humedad relativa. Se ensayaron probetas rectangulares de 70 mm de largo por 6 mm de ancho, utilizando una separación inicial de mordazas de 50 mm y una velocidad de separación de las mismas de 0,5 mm s<sup>-1</sup>. Se registró la curva fuerza (N) vs. distancia (mm), la cual se transformó

en tensión ( $\sigma$  = fuerza / área transversal de la película) vs. deformación ( $\epsilon$  = porcentaje de elongación respecto de la separación inicial de las mordazas). De las mismas se obtuvieron la resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura ( $\sigma_{\max}$ ), el porcentaje máximo de elongación ( $\epsilon_{\max}$ ) y el módulo elástico (**E**) como la pendiente de la recta tangente a la curva tensión-deformación, en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones). Se realizaron doce determinaciones por cada película evaluada, empleando al menos dos películas por formulación.



**Figura III.4-** Analizador de textura TA.XT2i, entre sus agarraderas una tira de película.

#### **III.6.3.5.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La temperatura de transición vítrea (**T<sub>g</sub>**) de las películas fueron determinados usando un calorímetro *DSC TA 2010 Q100 V9.8 Build 296* (TA Instrument, New Castel, USA) controlado por un módulo TA 5000 con un accesorio para enfriamiento. La calibración de la temperatura y el flujo de calor del equipo se llevó a cabo de acuerdo a los estándares ASTM, usando ácidos láurico, esteárico e Indio como estándares. Se pesaron 5 mg de película y se colocaron en cápsulas de aluminio, las cuales fueron selladas herméticamente. Las medidas se realizaron de la siguiente manera: equilibrado de las muestras durante 1 min a 20°C, enfriamiento hasta -80°C a 10°C min<sup>-1</sup>, isoterma a 5 min y calentamiento hasta 150°C a 10°C min<sup>-1</sup>. La **T<sub>g</sub>** se consideró como el punto de inflexión de la línea base, causado por la discontinuidad del calor específico de las muestras (ASTM D3418-03, 2004). Este parámetro fue calculado con la ayuda del

software *Universal Analysis V4.2E* (TA Instruments, New Castel, Del., EEUU). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### **III.6.3.5.9 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La microscopia electrónica de barrido de la superficie y sección transversal (obtenida por crio-fracturación en nitrógeno líquido), de las películas fue determinada con un microscopio electrónico de barrido *XL-20 Philips* (Philips, Países Bajos), usando un voltaje de aceleración de 20 kV para todos los casos. Para ello, las piezas de las películas fueron montadas en trozos de aluminio utilizando una cinta doble cara y se recubrieron con una capa delgada de oro con un sistema de pulverización catódica fría (SCD 005, BAL-TEC, Suiza).

### **III.6.3.5.10 Contenido de compuestos fenólicos extractables de las películas**

El contenido de compuestos fenólicos extractables (**CFE**), se determinó según el protocolo descrito en el puto **III.2.6**. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente  $\text{g}^{-1}$  de película.

### **III.6.3.5.11 Propiedades antioxidantes de las películas**

La capacidad antioxidante de las películas se evaluó como se mencionó en el punto **III.6.3.4**. Para ello, se obtuvo una dispersión acuosa de cada película al 1% (P/V) y se realizó el ensayo de actividad antioxidante.

## **III.7 Evaluación de las propiedades bio-funcionales de los hidrolizados obtenidos a partir de FP y R**

Los hidrolizados de **FP** y **R** (**HFP** y **HR**, respectivamente) fueron evaluados respecto a las propiedades antioxidantes (*in vitro*), antihipertensivas (*in vitro*) e inmunomoduladoras (*ex vivo*). Para todos los casos, el contenido proteico de las muestras se estimó siguiendo la técnica propuesta por Lowry (1951), con la excepción de los ensayos de inmunomodulación en donde se utilizó el método del ácido bicinónico (Smith y col., 1985).

El contenido de compuestos fenólicos solubles en el medio de reacción se determinó según el protocolo descrito en el puto **III.2.6**. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente  $\text{L}^{-1}$ .

**III.7.1 Propiedades antioxidantes****III.7.1.1 Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)**

La TEAC de **FP**, **HFP** y **HR** se evaluó como se mencionó en el punto **III.6.3.4**. Para el caso de **FP** y **HFP** la capacidad antioxidante se evaluó a 4 g L<sup>-1</sup> de proteínas, mientras que para **HR** dicha concentración fue de 1,8 g L<sup>-1</sup>. Para determinar la concentración de **FP**, **HFP** y **HR** que produce una inhibición del 50% del radical catión ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub>), se hicieron diluciones seriadas de las muestras (**FP** y **HFP** = 0 - 9 g L<sup>-1</sup> y **HR** = 0 - 2,37 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyeron curvas cuyas regresiones matemáticas (software OriginPro® 8.0), ajustaron con el siguiente modelo (**Ecuación 16a**):

$$y = a - (bc^x) \quad (16a)$$

Donde,  $y$ : es la inhibición (%);  $a$ ,  $b$  y  $c$ : son parámetros de la regresión; y  $x$ : es la concentración proteica en g L<sup>-1</sup>.

A partir de la **Ecuación 16a** y haciendo:  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de **IC<sub>50</sub>** de **FP**, **HFP** y **HR** (**Ecuación 16b**).

$$IC_{50} = \ln [(a-50\%) / b] / \ln c \quad (16b)$$

**III.7.1.2 Inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

La inhibición del radical DPPH por **FP**, **HFP** y **HR** fue medida siguiendo el método propuesto por Brand-Williams y col. (1995), con algunas modificaciones. Para esto, se tomaron 10 µL de muestra y se mezclaron con 190 µL de radical DPPH (0,08 mmol L<sup>-1</sup> en metanol). La muestra se mantuvo en oscuridad durante 30 min y luego se registró la absorbancia a 571 nm. La diferencia entre el blanco (DPPH en metanol) y la muestra se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición. Para el caso de **FP** y **HFP** la inhibición del radical se evaluó a 4 g L<sup>-1</sup> de proteínas, mientras que para **HR** dicha concentración fue de 0,9 g L<sup>-1</sup>. Para determinar la IC<sub>50</sub>, se hicieron diluciones seriadas de las muestras (**FP** y **HFP** = 0 - 4 g L<sup>-1</sup> y **HR** = 0 - 0,9 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyeron curvas cuyas regresiones matemáticas (software OriginPro® 8.0), ajustaron con el modelo de regresión lineal por cuadrados mínimos (**Ecuación 16c**).

$$y = a - bx \quad (16c)$$

Donde,  $y$ : es la inhibición (%);  $a$  y  $b$ : son parámetros de la regresión;  $x$ : es la concentración proteica en  $\text{g L}^{-1}$ .

A partir de la **Ecuación 16c** y haciendo:  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de **IC<sub>50</sub>** de **FP**, **HFP** y **HR** (**Ecuación 16d**).

$$\text{IC}_{50} = (a - 50\%) / b \quad (16d)$$

### III.7.1.3 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno de **FP** y **HFP** fue medida siguiendo el método propuesto por Cao y col. (1993), con algunas modificaciones. Para esto, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra y se mezclaron con 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (96  $\text{nmol L}^{-1}$ , en buffer fosfato 75  $\text{mmol L}^{-1}$  y pH 7,4). Esta mezcla se pre-incubó a 37°C durante 5 min y luego se inició la reacción mediante el agregado de 30  $\mu\text{L}$  de 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) 320  $\text{mmol L}^{-1}$ . La capacidad antioxidante se evaluó a 9  $\text{g L}^{-1}$  de proteínas, usando como estándar una solución de Trolox 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . Se registró la curva de cinética de decaimiento de la fluoresceína en buffer fosfato (485 nm excitación y 525 nm emisión), y se calculó el área bajo la curva ( $\text{ABC}_{\text{blanco}}$ ). Luego se registraron las curvas de cinética de decaimiento de la fluoresceína + las muestras a las mismas longitudes de onda y se calculó el área bajo la curva ( $\text{ABC}_{\text{muestra}}$ ). Por último, se hizo la diferencia entre  $\text{ABC}_{\text{muestra}}$  y  $\text{ABC}_{\text{blanco}}$  y se ingresó en la curva de calibrado construida con Trolox ( $\text{ABC}_{\text{Trolox}}$  vs. concentración de Trolox). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes  $\text{g}^{-1}$  proteínas.

### III.7.1.4 Capacidad quelante ligada al $\text{Cu}^{2+}$ frente a la oxidación del $\beta$ -caroteno (CQ)

La capacidad quelante ligada al  $\text{Cu}^{2+}$  se determinó de acuerdo con Megías y col. (2008), con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución de  $\beta$ -caroteno en cloroformo cuya concentración fue de 10  $\text{g L}^{-1}$ . Posteriormente se adicionó 1 mL de Tween 20 y se evaporó el cloroformo en corriente de nitrógeno y baño de agua tibia. Luego se agregó un volumen de buffer fosfato de sodio (0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de pH 7,0), hasta lograr una absorbancia de  $0,800 \pm 0,030$ . Las muestras fueron evaluadas a una concentración proteica de 1  $\text{g L}^{-1}$ . Además, se realizaron dos controles: uno en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$  50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) denominado: control (+) y otro en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  denominado: control (-). La degradación (oxidación) del  $\beta$ -caroteno, tanto en presencia de la muestra como de los controles, se registró a 470 nm. La absorbancia fue medida a

los 0, 30, 90, 180 y 240 min. La capacidad quelante (CQ) de **FP**, **HFP** y **HR** se calculó en función del control negativo y positivo a los 240 min de reacción (**Ecuación 16e**).

$$CQ (\%) = 100 - [(A_{\text{control} (-)} - A_{\text{muestra}}) / (A_{\text{control} (-)} - A_{\text{control} (+)}) \times 100] \quad (16e)$$

Donde:  $A_{\text{control} (-)}$ , es la absorbancia del control negativo;  $A_{\text{control} (+)}$ , es la absorbancia del control positivo; y  $A_{\text{muestra}}$ , es la absorbancia de la muestra.

### III.7.2 Actividad inhibidora de ECA I. Propiedades antihipertensivas

Se determinó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (**ECA I**), siguiendo la técnica propuesta por Hayakari y col. (1978) con algunas modificaciones. Este método se basa en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con 2,4,6 tricloro 1,3,5 triazina (TT). Esto se llevó a cabo en un volumen total de 1995 mL conteniendo: 175  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfato de potasio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 8,3, 15  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio ( $5 \text{ mol L}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  del sustrato sintético N-Hippuryl-His-Leu (HHL) ( $3,3 \text{ g L}^{-1}$ ) y 20  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. Se incubó a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 min. La reacción fue terminada por la adición de 665  $\mu\text{L}$  de TT ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) en dioxano seguido por 1,1 mL de buffer fosfato de potasio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 8,3. Se esperó 5 min para la formación de color y se centrifugó a  $10000 \times g$  durante 10 min. Luego se midió la absorbancia a 382 nm. **FP** y **HFP** fueron evaluados a una concentración proteica de  $4 \text{ g L}^{-1}$  mientras que **HRP** fue evaluado a  $2,37 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas. La inhibición de la ECA I se calculó como se detalla en la **Ecuación 17**.

$$\text{Inhibición de ECA I (\%)} = 100 - [(A_{\text{MES}} - A_{\text{BME}}) / (A_{\text{ES}} - A_{\text{BES}})] \times 100 \quad (17)$$

Donde,  $A_{\text{MES}}$ : es la absorbancia de ECA I con la muestra y el sustrato;  $A_{\text{BME}}$ : es la absorbancia de ECA I y la muestra (Blanco de muestra);  $A_{\text{ES}}$ : es la absorbancia de ECA I con el sustrato y  $A_{\text{BES}}$ : es la absorbancia del sustrato sin la muestra o enzima (Blanco).

### III.7.3 Propiedades inmunomoduladoras

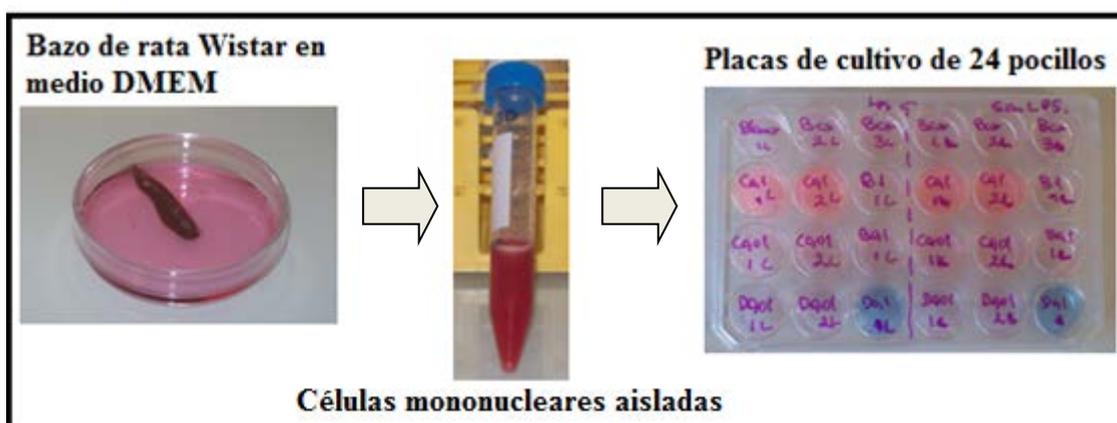
#### III.7.3.1 Animales de experimentación

Para los ensayos de inmunomodulación de manera *ex vivo*, se emplearon ratas Wistar hembras, con un peso medio comprendido entre los 175 y los 225 g, suministradas por Janvier S.A.S (Le Genest Saint Isle, Francia). Dichos animales fueron mantenidos en jaulas de acero inoxidable y sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Panlab A04, Panlab®, Barcelona, España), y agua *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a

cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

### III.7.3.2 Cultivos primarios de células mononucleares (esplenocitos, macrófagos y linfocitos)

Tras el sacrificio de los animales se extrajo el bazo que fue dispuesto en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado con antibacterianos (0,1 g L<sup>-1</sup> de estreptomicina, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina) y antifúngico (anfotericina B, 2,5 g L<sup>-1</sup>) (**Figura III.5**). Una vez que se eliminó la grasa adherida a dicho órgano, se presionó mecánicamente con ayuda de unas pinzas para la obtención de una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada durante 30 minutos a 4° C en solución de lizado (0.15 mol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA•2H<sub>2</sub>O, pH 7,3). Las células mononucleares aisladas (**esplenocitos**), se dispusieron en un medio de cultivo completo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) suplementado con suero bovino fetal (10 g 100g<sup>-1</sup>), L-glutamina (2 mmol L<sup>-1</sup>), antibacterianos (penicilina: 100 U mL<sup>-1</sup> y estreptomicina: 0,1 g L<sup>-1</sup>), anfotericina B (2,5 µg mL<sup>-1</sup>) y 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de β-mercaptoetanol. Tras el conteo celular, 0,5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 1 millón de células mL<sup>-1</sup>. El cultivo se realizó durante 24 o 48 horas (dependiendo del estímulo), en un ambiente controlado a 37°C y con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. La estimulación de las células obtenidas se realizó mediante la adición al cultivo de la lectina **concanavalina A** (ConA, 5 µg mL<sup>-1</sup>) o **lipopolisacárido bacteriano** (LPS, 1 µg mL<sup>-1</sup>). Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los cultivos fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

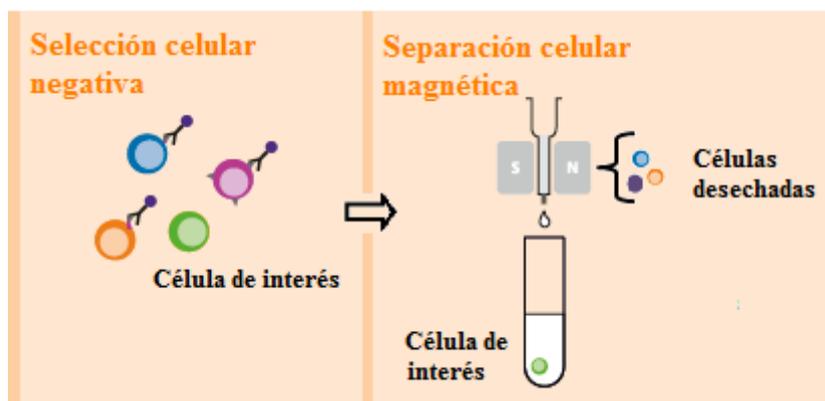


**Figura III.5** – Proceso de obtención de células mononucleares y cultivo celular

### ✓ Purificación de las poblaciones celulares

Para la purificación de linfocitos T y macrófagos, se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi) (**Figura III.6**).

Para los linfocitos T, se partió de la suspensión de esplenocitos. Dicha población celular fue lavada con buffer fosfato pH 7,2 (con 0,5 g 100g<sup>-1</sup> de albúmina sérica bovina y 2 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA). Luego se suspendió en RPMI y se llevó a cabo un proceso de filtración con un filtro *Cell strainer* de 70 µm (BD Falcon<sup>TM</sup>, Madrid, España). De esta manera, se obtuvo una suspensión mono-celular con la cual se procedió a la etapa de separación. La separación se llevó a cabo mediante selección negativa, utilizando anticuerpos adecuados específicos para las poblaciones celulares distintas de los linfocitos T (anti-CD11b, anti-CD161.a y CD45RA). Luego se adicionaron bolitas magnéticas marcadas correctamente para su unión a los anticuerpos utilizados en el paso anterior (MACS®, Miltenyi Biotec, Madrid, España). Tras el marcaje, se procedió a pasar la muestra a través de la columna magnética LD (capacidad de hasta 500 millones de células totales diseñada para la selección negativa). La población enriquecida en linfocitos T pasó a través de la columna sin ser retenida y fue recolectada, lavada y suspendida en medio RPMI (**Figura III.6**).



**Figura III.6** – Proceso de separación celular magnética mediante selección negativa

Para purificar los macrófagos, se empleó el mismo protocolo utilizado para los linfocitos T, con las siguientes excepciones: 1) la población de esplenocitos fue suspendida en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibacterianos y antifúngico (penicilina: 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina: 0,1 g L<sup>-1</sup> y anfotericina B: 2,5 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). 2) Los anticuerpos utilizados para la separación fueron los siguientes: anti-CD3 biotinilado, anti-CD161.a y anti-CD45RA.

### III.7.3.3 Toxicidad celular

La toxicidad celular de las distintas fracciones o hidrolizados fue estimada mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo. Para ello, se procedió a medir la actividad de la enzima siguiendo el método propuesto por Halprin y Ohkawara (1966). En este ensayo, se determinó la actividad enzimática siguiendo la desaparición espectrofotométrica del cofactor  $\beta$ -NADH a 340 nm. Como sustrato se usó ácido piruvico  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  en buffer fosfato de sodio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,5. El estándar empleado fue LDH de músculo de ternero. Por último, los datos fueron expresados como  $\text{mU ml}^{-1}$ .

La toxicidad celular de **FP**, **HFP**, **R-ficoeritrina**, **C-ficocianina** y **HR** fue evaluada en esplenocitos, macrófagos y linfocitos T a una concentración proteica de 1, 0,1 y  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ .

### III.7.3.4 Proliferación celular

La proliferación celular fue estimada mediante la incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina) a las células (Requena y col., 2010). La misma se evaluó en esplenocitos, macrófagos y linfocitos. Para tal fin, las células fueron dispuestas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de  $10^6$  células pocillo $^{-1}$ . Junto con la muestra (fracción o hidrolizados), se adicionó  $[^3\text{H}]$ -timidina ( $1 \mu\text{Ci pocillo}^{-1}$ ; GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), y se incubó durante 1 hora. Posteriormente, se agregó el estímulo conA ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) o LPS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), y se incubó durante 24 o 48 horas. Tras dicho período de incubación, las células fueron recolectadas y sometidas a varios lavados con una solución de ácido tricloroacético al 10% (V/V). Seguidamente, se realizó la lisis celular mediante el agregado de una solución  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH y SDS al 1% (V/V). La lisis se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron dispuestas en viales adecuados a los que se les añadió 3 mL de líquido de centelleo (Beckman Coulter, Madrid, España). La radioactividad contenida en el vial y debida a la incorporación de la timidina tritiada en las células fue cuantificada mediante un analizador de centelleo líquido Tri-Carb (Packard Instrument, Meriden, EEUU). Los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm).

El efecto de **FP** sobre la proliferación celular fue evaluado en esplenocitos y macrófagos a una concentración proteica de 1 y  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  (en presencia o ausencia de

LPS). Para el caso de **HR**, el estudio se realizó sobre esplenocitos y linfocitos T a una concentración proteica de  $1 \text{ g L}^{-1}$  (en presencia o ausencia de ConA).

### **III.7.3.5 Determinación de la secreción de citoquinas**

Para evaluar el efecto inmunomodulador de las fracciones o hidrolizados sobre las distintas poblaciones celulares, se procedió a cuantificar la producción de citoquinas en el sobrenadante del cultivo, mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o **ELISA**. Para ello,  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en medio RPMI o DMEM fueron cultivadas en presencia o ausencia de la muestra en estudio. Luego se estimuló el cultivo con conA o LPS, dependiendo del tipo de población celular.

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares (24 o 48 horas), el sobrenadante obtenido fue centrifugado para eliminar los restos celulares a  $3000 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$  y conservado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Para la cuantificación de las citoquinas por ELISA se utilizaron diversos *kit* comerciales y se siguió el protocolo de medida propuesto por el fabricante. Los *kit* empleados fueron suministrados por *Biosource Europe* (Nivelles, Bélgica) y *Becton Dickinson* (Franklin Lake, Nueva York, EEUU). Los resultados se expresan como  $\text{pg mL}^{-1}$  de citoquina.

Las propiedades inmunomoduladoras de **FP** y **HR** fueron evaluadas en esplenocitos, macrófagos y linfocitos T a una concentración proteica de 1, 0,1 y 0,01  $\text{g L}^{-1}$ . Cabe señalar que dicha fracción fue dispersada en el medio de cultivo correspondiente para cada población celular (RPMI: esplenocitos y linfocitos o DMEM: macrófagos), con su respectivo estímulo (LPS o ConA).

Conjuntamente con **FP**, se estudiaron las propiedades inmunomoduladoras de los estándares **R-ficoeritrina** y **C-ficocianina**. Este ensayo se realizó sobre las mismas poblaciones celulares que **FP** a una concentración proteica de  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ .

Además, se estudió el efecto inmunomodulador de los componente *no proteicos* presentes en **FP** sobre esplenocitos. Para ello, las proteínas presentes en **FP** fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA), y centrifugadas. El sobrenadante obtenido fue neutralizado ( $S_{\text{TCA}}$ ) y utilizado para los ensayos.

Las propiedades inmunomoduladoras de **HFP** fueron evaluadas en esplenocitos a una concentración proteica de 1, 0,1 y 0,01  $\text{g L}^{-1}$ . En el sobrenadante del cultivo se cuantificó el contenido de IL10,  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ . Cabe señalar que los hidrolizados fueron dispersados en medio RPMI.

### III.7.3.6 Determinación de la vía celular involucrada en la secreción de citoquinas

Para determinar la vía celular involucrada en la producción de citoquinas inducida por la muestra (**FP** o **HR**), se utilizaron inhibidores de los principales factores de transcripción celular (NF- $\kappa$ B y MAPK) (Requena y col., 2009). Los mismos fueron: PD98059 inhibidor de MAPK ERK 1/2, SB203580 inhibidor de p38 MAPK, SP600125 inhibidor de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y Bay 11-7082 inhibidor de NF- $\kappa$ B. Todos los inhibidores se adicionaron al medio de cultivo 30 min antes de agregar la muestra en estudio (fracción o hidrolizados). La concentración de los mismos en el medio de cultivo fue de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mientras que la concentración de **FP** y **HR** fue de 0,1 y 1 g  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Cabe señalar que este ensayo se realizó tanto en macrófagos como en linfocitos T.

### III.8 Elaboración de un alimento con algas. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bioaccesibilidad de compuestos activos

En primer lugar, se evaluó el efecto que tiene el agregado del alga *P. columbina*, en diferentes niveles, sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los productos expandidos obtenidos. Posteriormente, se seleccionó el nivel más apropiado de reemplazo para el consumo humano desde un punto de vista sensorial. A este producto, se le evaluó la capacidad antioxidante, disponibilidad de minerales y la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. Asimismo, se evaluó el producto extrudido sin adición de algas como control (maíz).

#### III.8.1 Elaboración de los productos expandidos

Los expandidos se elaboraron a base de sémola de maíz comercial con diferentes niveles de reemplazo del alga *P. columbina* (Tabla III.4).

**Tabla III.4** Niveles de reemplazo para la elaboración de los productos expandidos

Expandido	Sémola de maíz comercial (g 100 g <sup>-1</sup> )	<i>P. columbina</i> (g 100 g <sup>-1</sup> )
Ma	100	0
MaPc <sub>1</sub>	98,3	1,7
MaPc <sub>2</sub>	96,5	3,5
MaPc <sub>3</sub>	94,8	5,2

La obtención de los productos se hizo con un extrusor Brabender 20 DN con tornillo relación de compresión 4:1, 150 rpm, 16.5% de humedad, 175°C en el cañón y 160°C en la boquilla. La alimentación al extrusor se realizó de manera de llenar totalmente los canales del tornillo en la sección de alimentación (*full-capacity*) y las muestras fueron obtenidas una vez alcanzado el régimen estacionario (torque y caudal constantes). Las mezclas de sémola de maíz comercial y alga fueron acondicionadas a la humedad correspondiente al menos una hora antes de cada extrusión.

### **III.8.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos**

Todos los productos expandidos fueron secados en estufa a 50°C hasta alcanzar una humedad de 6 g 100g<sup>-1</sup> de producto. Cabe señalar que este nivel de humedad se considera adecuado para las evaluaciones correspondientes (González y col., 2004).

#### **III.8.2.1 Expansión (E)**

En todos los casos, se midió el diámetro de los trozos de expandidos con un calibre manual Vernier (*Stronger*) en 10 zonas distintas escogidas al azar. La expansión se calculó como la relación entre el diámetro promedio del extrudido y el diámetro de la boquilla (**Ecuación 18a**).

$$E = d / D \quad (18a)$$

Donde: D, es el diámetro de la boquilla (3 mm); y d, es el diámetro promedio del expandido (mm).

#### **III.8.2.2 Volumen específico (VE)**

El **VE** de las muestras expandidas se determinó según González y col. (2002), usando para ello la **Ecuación 18b**. Los resultados se expresaron en cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> de producto.

$$VE = V / P = (A \times L) / P = [(d^2 \times \pi) / 4] \times (L / P) \quad (18b)$$

Donde, V: es el volumen (cm<sup>3</sup>); P: es el peso (g); A: es el área (cm<sup>2</sup>); d: es el diámetro (cm); y L: es la longitud del expandido (≈15 cm). Los resultados fueron obtenidos con el promedio de 10 determinaciones.

#### **III.8.2.3 Consumo específico de energía mecánica (CEEM)**

La **CEEM** de las muestras expandidas se determinó según González y col. (2002), usando para ello la **Ecuación 18c**. Los resultados se expresaron en J g<sup>-1</sup> de producto.

$$CEEM = 61,3 \times 10^{-3} \times T_{OR} \times (150 \text{ rpm} / Q_a) \quad (18c)$$

Donde,  $T_{OR}$ : es el torque (UB);  $Q_a$ : es el caudal másico referido al contenido de humedad de alimentación (16,5%), expresado en  $\text{g min}^{-1}$ .

#### **III.8.2.4 Solubilidad**

Los productos expandidos se molieron en un molino (Ciclotec Sample Mill, EEUU) y se les evaluó la solubilidad mediante el método de Anderson y col. (1969) modificado por González y col. (2002). Para ello, se pesaron 1,25 g de muestra molida y se dispersaron en 25 mL de agua. Esta dispersión se colocó en tubos de centrifuga, se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. Al cabo de ese tiempo, se centrifugó a 2500xg durante 30 min a 25°C. Al sobrenadante obtenido se le determinó el contenido de sólidos solubles como se describió en el punto **III.4.1.2**. La solubilidad se calculó como se describe en la **Ecuación 18d** y se expresó en g de sólidos solubles  $100 \text{ g}^{-1}$  de muestra.

$$\text{Solubilidad (\%)} = (P_{SS} / P_{SOB}) \times (P_{AGUA} / P_{MBS}) \times 100 \quad (18d)$$

Donde,  $P_{SS}$ : es el peso de los sólidos solubles secos;  $P_{SOB}$ : es el peso del líquido del sobrenadante;  $P_{AGUA}$ : es el peso de los 25 mL de agua;  $P_{MBS}$ : es el peso de muestra en base seca.

#### **III.8.2.5 Absorción de agua**

Se usó el equipo de Baumann, utilizándose el método de Torgensen y Toledo (1977) modificado por González y col. (1995). Para ello, se pesaron 0,0500 g de muestra y se midió la cantidad de agua absorbida en función del tiempo. La absorción de agua fue expresada al punto de equilibrio (25-30 min) en  $\text{mL g}^{-1}$  de producto.

### **III.8.3 Evaluación del color y de las características sensoriales de los productos expandidos**

#### **III.8.3.1 Evaluación del color**

El análisis de color de los expandidos se realizó en base al espacio de color definido por la norma CIE-Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $\Delta E$ ), como se describió en el punto **III.6.3.4.3**. Los resultados también fueron expresados en el sistema de coordenadas cilíndricas ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ).

### **III.8.3.2 Evaluación sensorial**

La evaluación sensorial de los productos expandidos se realizó mediante un panel de evaluadores entrenados ( $n = 8$ ) del Instituto de Tecnología de Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral. La sala de evaluación sensorial dispone de 8 cabinas realizadas de madera recubierta con laminado plástico de color blanco. Cada cabina consiste de una mesada ubicada a 80 cm del suelo con 3 paredes (2 laterales y una frontal), que se elevan 60 cm por encima de la mesada. El panelista se ubica frente a la mesada sin posibilidad de ver a otros panelistas. La iluminación en la sala es con luz fluorescente, la ventilación adecuada y climatizada a 18°C.

Durante el entrenamiento específico, los panelistas acordaron y discutieron sobre el significado de cada uno de los atributos a evaluar (color, olor, *flavor* y gusto), dado que no hay información bibliográfica al respecto. Además, se evaluó la textura bucal (crujienticidad y pegajosidad). Para la evaluación, cada muestra se identificó con números de tres dígitos asignados al azar.

La metodología empleada para la evaluación fue la propuesta por Murray y col. (2001), la cual se basa en el análisis descriptivo cuantitativo de la intensidad percibida. Para ello, se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en los extremos (1 – 9). La intensidad de cada atributo se indicó colocando una marca sobre la escala lineal no estructurada. La cuantificación de las respuestas se hizo midiendo la distancia desde el extremo izquierdo hasta la marca señalada por el panelista, expresándose en cm. Los extremos para color, olor, *flavor* y gusto fueron los siguientes: “1 = sémola de maíz” y “9 = *P. columbina*”. El ancho de la escala para olor, crujienticidad y pegajosidad fue: “1 = casi nada y “9 = mucho”. Para color y *flavor*, 5 fue el valor deseable y 6 el límite de aceptabilidad.

### **III.8.4 Evaluación de las propiedades nutricionales y antioxidantes de los productos expandidos**

#### **III. 8.4.1 Composición centesimal**

La composición centesimal de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** (humedad, fibra dietaria total, fibra dietaria insoluble, fibra dietaria soluble, proteínas, extracto etéreo, ácido fítico y cenizas) se estimó siguiendo la metodología propuesta por la A.O.A.C (1995).

### **III. 8.4.2 Contenido de minerales**

El contenido de hierro, zinc, magnesio y calcio de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fue determinado por espectroscopia de absorción atómica, previa mineralización por vía seca como se describió anteriormente (**III.2.5**).

### **III. 8.4.3 Disponibilidad de minerales (DM)**

La disponibilidad potencial de hierro, zinc, magnesio y calcio de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Wolfgor y col. (2002), descrita en el punto **III.3.1**. La disponibilidad potencial de cada mineral se calculó según la **Ecuación 1**.

### **III. 8.4.4 Digestibilidad proteica (DP)**

La digestibilidad proteica de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** se midió siguiendo el método de Rudloff y Lönnerdal (1992), como se describió en el punto **III.3.2**. La misma se calculó según la **Ecuación 2**.

### **III. 8.4.5 Perfil de aminoácidos, puntaje químico (PQ) y PDCAAS**

La determinación cuantitativa de aminoácidos de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** se llevó a cabo mediante el método propuesto por Alaiz y col. (1992) y Yust y col. (2004), como se describió en el punto **III.2.4**.

El puntaje químico y el PDCAAS de **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>**, se calcularon con las **Ecuaciones 3 y 4**, respectivamente.

### **III. 8.4.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE)**

Para determinar el contenido de **CFE** de los productos expandidos **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>**, se utilizaron diferentes sistemas extractivos según el protocolo descrito en el punto **III.2.6**. Para tal fin, **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fueron dispersados al 10% (P/V). Los resultados se expresaron como g de ácido gálico equivalente g<sup>-1</sup> de expandido seco.

### **III. 8.4.7 Capacidad antioxidante**

Las propiedades antioxidantes de **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fueron determinadas en los sobrenadantes de los diferentes sistemas extractivos descritos en el punto **III. 8.4.6**.

#### **III. 8.4.7.1 Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)**

La TEAC de **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** se evaluó como se mencionó en el punto **III.6.3.3**.

### **III. 8.4.7.2 Inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

La inhibición del radical DPPH por **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fue medida siguiendo el método descrito en el punto **III.7.1.2**.

### **III. 8.4.7.3 Poder reductor**

El poder reductor de **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fue evaluado según el protocolo propuesto por Ahmadi y col. (2007), con algunas modificaciones. A 0,2 mL de cada extracto, obtenido en el punto **III. 8.4.6**, se le adicionó 0,2 mL de buffer fosfato pH 6,6 (0,2 mol L<sup>-1</sup>) y 0,2 mL de ferricianuro de potasio (1% P/V). La mezcla obtenida fue incubada a 50°C durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 0,2 mL de ácido tricloroacético (10% P/V). Luego a 0,2 mL se les adicionó 0,2 mL de agua destilada y 40 µL de cloruro férrico (0,1% P/V). Por último, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min y se leyó la absorbancia a 700 nm. Como blanco de reacción se utilizaron 0,2 mL de agua destilada en lugar de extracto. El poder reductor se expresó como un aumento de absorbancia a 700 nm.

### **III.8.5 Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos activos**

La dializabilidad de los compuestos bioactivos presentes en **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** fue evaluada simulando una digestión gástrica con pepsina y pancreatina. Los productos expandidos fueron molidos y luego dispersados al 10% (P/V) en agua destilada. Se tomó una alícuota de la dispersión (25 mL) y se llevó a pH 2,0 con HCl (4,5 mol L<sup>-1</sup>). Luego, se agregaron 0,8 ml de una solución de pepsina al 16% en HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para incrementar gradualmente el pH, se agregó una bolsita de diálisis de 24 cm de longitud con un diámetro de poro de 6 a 8 kDa (*Spectra/Pore*), conteniendo una solución de buffer PIPES (piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulfonic acid]), cuyo pH se calculó según Drago y col. (2005). Dicho buffer permitió llevar el pH del sistema a un valor final de 6,5 ± 0,2, luego de la doble digestión. Luego de los 50 minutos se agregaron 6,25 ml de una solución de pancreatina (0,4% P/V en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) y nuevamente se incubó durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la digestión, se retiraron las bolsitas, se enjuagaron con agua destilada y el dializado se trasvasó y pesó. Los dializados de **Ma** y **MaPc<sub>2</sub>** se denominaron **MaD** y **MaPc<sub>2</sub>D**, respectivamente.

El contenido de proteínas, aminos libres y compuestos fenólicos extractables (CFE) de **MaD** y **MaPc<sub>2</sub>D** se estimó de acuerdo a la técnica propuesta por Lowry (1951),

Nielsen y col. (2001) y siguiendo el protocolo descrito en el punto **III.2.6**, respectivamente. Cabe señalar que también se calculó la tasa de dializabilidad de aminos libres y CFE. Para esto se hizo el cociente entre el contenido total de aminos libres o CFE en el dializado y se dividió por el contenido inicial en el producto extrudido.

#### **III.8.5.1 Propiedades bioactivas**

##### **a) Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC)**

La TEAC de **MaD** y **MaPc2D** se evaluó como se mencionó en el punto **III.6.3.4**.

##### **b) Inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)**

La inhibición del radical DPPH por **MaD** y **MaPc2D** fue medida siguiendo el método descrito en el punto **III.7.1.2**.

##### **c) Poder reductor**

El poder reductor de **MaD** y **MaPc2D** se midió según se describió en el punto **III.8.4.7.3**.

##### **d) Capacidad quelante ligada al Cu<sup>2+</sup> frente a la oxidación del β-caroteno (CQ)**

La capacidad quelante ligada al Cu<sup>2+</sup> de **MaD** y **MaPc2D** se determinó según se describió en el punto **III.7.1.4** a los 120 min, y fue calculada según la **Ecuación 16e**.

##### **e) Actividad inhibidora de ECA I. Propiedades antihipertensivas**

Se determinó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I), siguiendo el método detallado en el punto **III.7.2**. Además, para **MaD** y **MaPc2D** se calculó la concentración proteica que produce el 50% de inhibición de ECA I (IC<sub>50</sub>). Para ello, se hicieron diluciones seriadas de las muestras (0 - 2 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyeron curvas cuyas regresiones matemáticas (software OriginPro® 8.0), ajustaron con el modelo de regresión lineal por cuadrados mínimos. El valor de IC<sub>50</sub> se calculó con la **Ecuación 16d**.

#### **III.9 Análisis estadísticos**

Todas las muestras se evaluaron por triplicado, con la excepción de algunos ensayos donde el número de replicas fue mayor y fue explicitado. Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ) y test de

LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Plus 3.0.

### III.10 Esquema de las actividades más relevantes realizadas

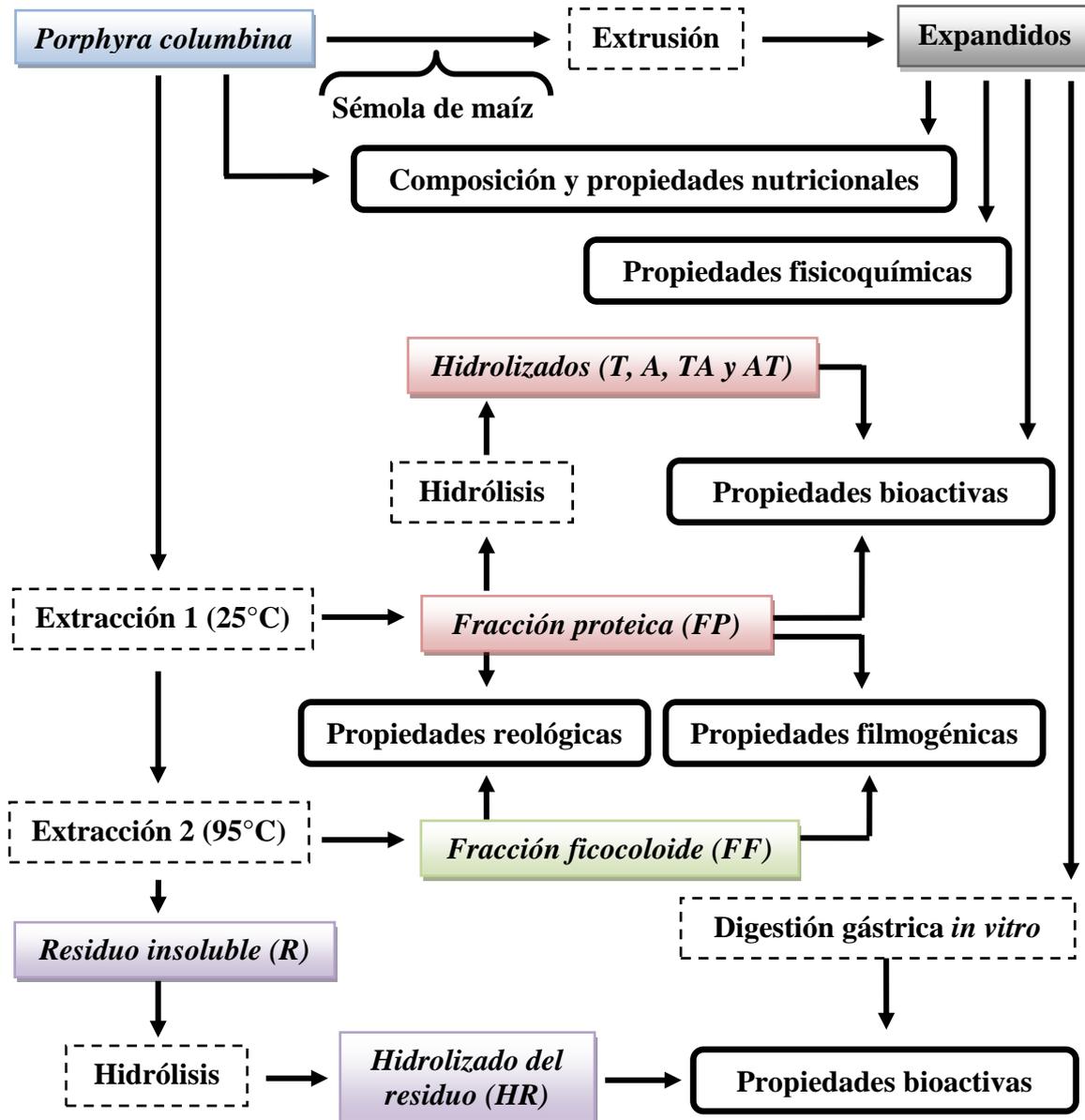


Figura III.7 – Esquema de las actividades más relevantes realizadas

## IV. Resultados y Discusión

**IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Capítulo IV.1. Estudio de la composición y las propiedades nutricionales de la materia prima****IV.1.1 Composición elemental**

El contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en g 100g<sup>-1</sup> de *P. columbina* fue de  $39,7 \pm 0,1$ ;  $6,7 \pm 0,1$ ;  $3,9 \pm 0,2$  y  $1,9 \pm 0,1$ ; respectivamente.

**IV.1.2 Contenido proteico, perfil de aminoácidos, PQ, DP y PDCAAS**

En la **Tabla IV.1** se muestra la composición centesimal del alga *P. columbina*. La muestra presentó un contenido de humedad de  $12,79 \pm 0,07$  g 100g<sup>-1</sup>. El contenido de proteínas del alga fue elevado y similar al hallado por Sánchez-Machado y col. (2004), para el género *Porphyra*. Este alto nivel proteico es característico de las algas rojas respecto de las algas verdes y marrones (Galland-Irmouli y col., 1999). En este sentido, se ha reportado que el género *Porphyra* presenta valores de proteínas similares a las leguminosas (Norziah y Ching 2000). Cabe destacar que el contenido proteico de las algas varía no sólo entre especies, sino también entre los períodos estacionales (Fleurence, 1999; Mishra y col., 1993), siendo la primavera el período de mayor nivel proteico para *P. columbina*.

**Tabla IV.1** Composición centesimal de *P. columbina*

Composición	<i>P. columbina</i> (g 100g <sup>-1</sup> bs)
Proteínas (N x 6,25)	$24,61 \pm 0,21$
Cenizas	$6,46 \pm 0,09$
Fibra dietaria total	$48,02 \pm 1,13$
Lípidos (extracto etéreo)	$0,25 \pm 0,06$

X  $\pm$  DE; bs: base seca.

Como se puede observar en el perfil de aminoácidos de *P. columbina* (**Tabla IV.2**), los aminoácidos más abundantes fueron: Ala, Asp y Glu. Cabe señalar que para la mayoría de las algas marinas la proporción de aminoácidos ácidos es muy elevada (Fleurence, 1999). En este sentido, la suma de Asp y Glu para *P. columbina* fue  $22,7$  g 100g<sup>-1</sup> de proteína. Este valor es similar al encontrado en otras algas rojas tales como: *P.*

---

## Resultados y Discusión

---

*acanthophora* (27 g 100g<sup>-1</sup> de proteína), *Hypnea charoides* (20,8 g 100 g<sup>-1</sup> de proteína), *Palmaria palmata* (24,8 g 100g<sup>-1</sup> de proteína) y *Laurencia* spp. (15,5 a 27,4 g 100 g<sup>-1</sup> de proteína) (Galland-Irmouli y col., 1999; Lewis, 1974). En concordancia con lo anterior, Munda (1977) reportó que la suma de ambos aminoácidos en las algas puede representar desde 22 hasta 44 g 100 g<sup>-1</sup> de proteína. Cabe destacar que la preponderancia de aminoácidos ácidos sobre los básicos es típica de las *Rhodophytas* y es responsable del *flavor* y sabor característico de las mismas (Galland-Irmouli y col., 1999; Mabeau y col., 1992).

El contenido de los aminoácidos esenciales: Leu, Lys, Val, Phe + Tyr y Met + Cys en *P. columbina* fue relativamente elevado, mientras que la proporción de Ile, His y Trp fue baja (**Tabla IV.2**). Con respecto al Trp, se pudo ver que dicho aminoácido fue el limitante, siendo 57% el puntaje químico (**PQ**) calculado de acuerdo al patrón de referencia FAO para niños en edad preescolar (FAO / OMS / UNU, 1985).

Por otro lado, la relación de aminoácidos esenciales / no esenciales obtenida para *P. columbina* fue relativamente buena, obteniéndose un valor de 0,65. Este resultado concuerda con el reportado por Galland-Irmouli y col. (1999), para *P. palmata* (0,66) y fue mayor al hallado por Fleurence (1999), para *P. tenera* (0,57). Cabe señalar que *P. columbina* también presentó aminoácidos libres, siendo la Ala el aminoácido más abundante.

La digestibilidad proteica *in vitro* (**DP**), obtenida para *P. columbina* fue 74,33 ± 3,0 %. Este resultado es similar al reportado por Mišurcová y col. (2010), para *P. palmata* y concuerda con los valores de **DP** hallados para proteínas vegetales. Cabe destacar que esta **DP** es inferior a la obtenida para proteínas de origen animal. Esto puede deberse al elevado contenido de fibra que posee *P. columbina* (**Tabla IV.1**), la cual podría bloquear el acceso de las enzimas proteolíticas al sitio de acción, reduciendo la actividad enzimática. Esto se traduce en una menor **DP** (Urbano y Goñi, 2002).

El **PDCAAS** obtenido para *P. columbina* fue 0,43 ± 0,03 (Trp). Este valor es igual o incluso mayor al hallado para distintas proteínas de legumbres (Henley y Kunster 1994). Cabe acotar que para una determinada proteína el máximo valor de **PDCAAS** es 1,0. En este caso, dicha proteína proporcionaría el 100% de los aminoácidos esenciales según el patrón de referencia recomendado por la FAO (FAO / OMS / UNU, 1985).

**Tabla IV.2** Perfil de aminoácidos de *P. columbina*

<b>Aminoácido</b>	<b>Aminoácidos totales (g 100g<sup>-1</sup> proteína)</b>	<b>Aminoácidos libres (g 100g<sup>-1</sup> proteína)</b>
Asp	12,22 ± 0,20	0,286 ± 0,01
Glu	10,5 ± 0,56	0,190 ± 0,01
Ser	6,16 ± 0,09	
His	1,26 ± 0,08	
Gly	8,87 ± 0,14	
Thr	5,91 ± 0,13	0,020 ± 0,001
Arg	6,19 ± 0,16	
Ala	12,54 ± 0,29	0,486 ± 0,02
Pro	3,96 ± 0,41	
Tyr	2,55 ± 0,05	
Phe	3,7 ± 0,06	
Val	5,85 ± 0,11	
Met	1,68 ± 0,07	
Cys	1,89 ± 0,03	
Ile	2,71 ± 0,05	
Trp	0,63 ± 0,01	
Leu	7,38 ± 0,11	
Lys	6,01 ± 0,10	

X ± DE

#### **IV.1.3 Contenido de fibra dietaria total**

La fibra dietaria total fue el componente más abundante en *P. columbina* (**Tabla IV.1**). Este resultado concuerda con lo reportado para otras especies del mismo género como *P. tenera* (33,6 - 50 g 100g<sup>-1</sup>) (Rupérez y Saura-Calixto, 2001). Cabe señalar, que el contenido de fibra dietaria total supera al encontrado en otro tipo de vegetales, tales como frijoles (25,04 ± 0,81 g 100g<sup>-1</sup>), lentejas (21,55 ± 0,22 g 100 g<sup>-1</sup>), etc. (Saura-Calixto y col., 2000), lo cual coincide con lo observado para diferentes tipos de algas rojas (Wong y Cheung, 2000).

#### **IV.1.4 Contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos**

El contenido de lípidos de *P. columbina* fue menor al encontrado por Sánchez-Machado y col. (2004) para *Porphyra* spp. (1,03 ± 0,4 g 100 g<sup>-1</sup>). Esto puede deberse a que no todas las especies del género *Porphyra* tienen la misma capacidad para almacenar los lípidos (Gressler y col., 2010). En este sentido, se ha establecido como norma general que el contenido de lípidos de las algas marinas siempre es inferior a 4 g 100g<sup>-1</sup> (Herbreteau y col., 1997).

En la **Tabla IV.3** se muestra el contenido relativo de ácidos grasos de *P. columbina*. Como se puede observar, los principales ácidos grasos presentes en el alga poseen de 14 a 20 átomos de carbono (C14:0 - C20:0), siendo los más relevantes los ácidos grasos insaturados de la serie C20 (C20: 4 (n-6) y C20: 5 (n-3)).

El ácido graso saturado más abundante en *P. columbina* fue el ácido palmítico (C16:0). Este resultado concuerda con lo reportado por Gressler y col. (2010) para cuatro tipos de algas rojas (*Laurencia filiformis*, *L. intricata*, *Gracilaria domingensis* y *G. birdiae*). Cabe señalar que el género *Porphyra* se caracteriza por tener el mayor contenido de ácido palmítico entre las algas rojas (Sánchez-Machado y col., 2004; Colombo y col., 2006).

El ácido esteárico (C18:0) fue el segundo ácido graso saturado más abundante en *P. columbina*. Sin embargo, su nivel fue mucho menor respecto del anterior. Por último, se observaron pequeñas proporciones de ácido láurico y ácido mirístico (C12:0 y C14:0, respectivamente).

Los ácidos grasos insaturados más abundantes en *P. columbina* fueron: ácido eicosapentaenóico o EPA (C20:5, n-3), ácido araquidónico (C20:4, n-6), ácido linolénico (suma C18:3) y por último ácido oleico (suma C18:1). Estos resultados son

similares a los obtenidos por Colombo y col. (2006), para *P. perforata*. Además, el contenido de EPA en *P. columbina* fue parecido al hallado por Sánchez-Machado y col. (2004) en *Palamaria* spp. (24,05 %). Cabe señalar que el EPA posee efectos antitrombóticos, hipolipemientes y antiinflamatorios, por lo que se considera muy beneficioso para la salud (Norziah y Ching, 2000).

**Tabla IV.3** Contenido relativo de ácidos grasos de *P. columbina*

Ácido graso	(%)	Ácido graso	(%)
C12:0	0,42 ± 0,03	C20:1	2,13 ± 0,01
C14:0	1,27 ± 0,09	C18:2 n-6	3,41 ± 0,09
C16:0	21,55 ± 0,7	C20:2 n-6	0,79 ± 0,06
C18:0	3,55 ± 0,15	Suma C18:3	11,40 ± 1,15
Suma C16:1	3,13 ± 0,27	C20:4 n-6	15,52 ± 0,08
Suma C18:1	8,50 ± 0,54	C20:5 n-3	28,36 ± 0,33

X ± DE

#### IV.1.5 Contenido de cenizas, minerales y DM

Como se puede ver en la **Tabla IV.1**, el contenido de cenizas en *P. columbina* fue mucho menor al hallado por la mayoría de los autores para diferentes algas rojas. Al respecto, Gressler y col. (2010) reportaron un contenido de cenizas de 22,5 a 38,4 g 100g<sup>-1</sup> para cuatro tipos de algas rojas (*L. filiformis*, *L. intricata*, *G. domingensis* y *G. birdiae*). Así mismo, Rupérez (2002) encontró en *P. tenera* un valor de cenizas de 20,59 ± 0,16 g 100 g<sup>-1</sup>. Los bajos niveles de cenizas pueden deberse a los sucesivos lavados con agua destilada que sufrió *P. columbina*, previo a su molienda y caracterización centesimal (ver **III.1**). Sin embargo, hay que destacar que el contenido de cenizas del alga es similar al hallado en vegetales terrestres en donde el valor promedio va desde 5 a 10 g 100 g<sup>-1</sup> (USDA, 2001).

La **Tabla IV.4** muestra el contenido de minerales y dializabilidad de P, Ca, Fe y Zn de *P. columbina*.

## *Resultados y Discusión*

Para la mayoría de las algas rojas, el mineral más abundante es el Na. Sin embargo, para *P. columbina* el nivel de dicho mineral fue casi diez veces inferior al reportado para otras especies del mismo género. Tal es el caso de *P. tenera* cuyo contenido de Na fue de  $3627 \pm 115 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (Rupérez, 2002). Como se mencionó anteriormente, los menores niveles de Na pueden estar asociados a los lavados con agua destilada realizados al alga durante su acondicionamiento.

**Tabla IV.4** Contenido de minerales y dializabilidad de P, Ca, Fe y Zn de *P. columbina*

Mineral	Contenido (mg 100g <sup>-1</sup> bs)	Dializabilidad (%)
Na	414,22 ± 8,96	ND
K	1444,17 ± 56,3	ND
P	379,90 ± 7,9	18,75 ± 0,01
Ca	443,70 ± 6,64	17,62 ± 0,16
Mg	491,53 ± 3,44	ND
Fe	22,00 ± 0,4	2,63 ± 0,02
Zn	1,46 ± 0,09	16,70 ± 0,44
Cu	0,51 ± 0,05	ND

X ± DE, bs: base seca. ND: no determinado.

Como se puede apreciar en la **Tabla IV.4**, el nivel de potasio fue casi cuatro veces superior al del sodio, siendo la relación Na/K menor a 0,3 (0,29). Esto último es muy interesante desde un punto de vista nutricional ya que el consumo de dietas ricas en sodio (alta relación Na/K), está estrechamente relacionado con problemas de hipertensión arterial. Por ejemplo, la relación Na/K en aceitunas en salmuera y salchichas es 43,63 y 4,89, respectivamente (Ortega-Calvo y col., 1993).

El contenido de P, Ca y Mg en *P. columbina* fue similar al reportado por Pérez y col. (2007), para esta misma alga. Sin embargo, la relación Ca/P obtenida en la presente

tesis fue levemente inferior (1,17). Como se puede ver en la **Tabla IV.4**, el nivel de Mg fue superior al del calcio, lo que concuerda con el patrón reportado para la mayoría de las *Rhodophytas* (McDermid y Stuercke, 2003).

El nivel de hierro en *P. columbina* fue muy parecido al hallado por Pérez y col. (2007), para esta misma alga (21,3 mg 100 g<sup>-1</sup>). Sin embargo, este valor fue superior al reportado por Rupérez (2002), para *P. tenera* (10,3 mg 100 g<sup>-1</sup>) e inferior al encontrado por Rao y col. (2007) en *P. vietnamensis* (33 mg 100 g<sup>-1</sup>). Esto demuestra que el contenido de Fe no sólo se ve influenciado con el período estacional y etapa de crecimiento del alga, sino también con el tipo de especie dentro de un mismo género (García-Casal y col., 2007).

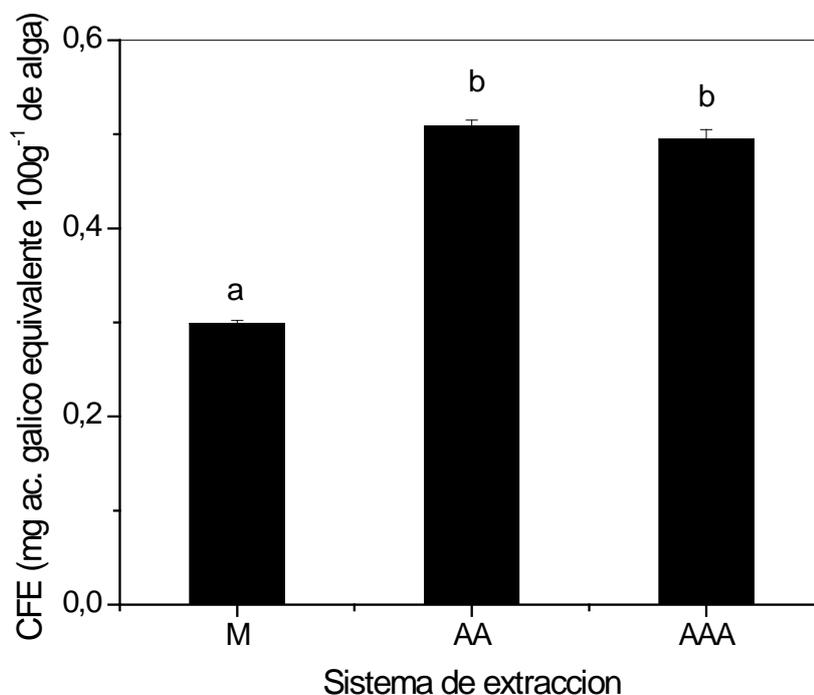
El contenido de Zn y Cu fue similar al reportado por Muse y col. (1999), para esta misma alga. También, Rao y col. (2007) encontraron un contenido de Cu muy similar al hallado en la presente tesis para *P. vietnamensis* (0,54 mg 100 g<sup>-1</sup>). Cabe señalar que el nivel de Zn fue inferior al máximo permitido en algas para alimentación humana en Japón y Francia (1,5 y 10 mg 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Indegaard y Minsaas, 1991).

La bioaccesibilidad de minerales fue evaluada como su dializabilidad. Los valores de dializabilidad obtenidos para P, Ca, Fe y Zn (DP, DCa, DFe y DZn, respectivamente) fueron similares a los reportados para otros tipos de alimentos. En este sentido, la DFe en fideos de trigo y lechuga fue del 4,59% y 2%, respectivamente (Dyner y col., 2007; Yang y Tsou, 2006). Por otro lado, la DZn obtenida para fideos de trigo y copos de maíz fue 12,72% y 30%, respectivamente (Dyner y col., 2007; Cagnasso y col., 2010). Mientras que la DCa para fideos de trigo y porotos de soja fue de 41,31% y 11,1%, respectivamente (Dyner y col., 2007; Kamchan et al. 2004).

Resulta oportuno acotar que las algas, además de ser una buena fuente de minerales, también aportan numerosos compuestos que inhiben su disponibilidad. Entre ellos se pueden destacar algunos componentes de la fibra dietaria y los compuestos fenólicos (Urbano y Goñi, 2002). Cabe señalar que si bien el ácido fítico es un factor antinutricional importante relacionado con la disminución de la disponibilidad de minerales (Szkudelski, 1997), en las algas su contenido es muy bajo (García-Casal y col., 2007) y el valor hallado en *P. columbina* fue de  $0,386 \pm 0,04$  g 100 g<sup>-1</sup>.

#### IV.1.6 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE)

En la **Figura IV.1** se muestra el contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE), a partir de *P. columbina* con diferentes sistemas de extracción (metanol: M, acetona / agua: AA y acetona / agua / ácido acético: AAA).



**Figura IV.1** – Contenido de compuestos fenólicos extractables a partir de *P. columbina* con diferentes sistemas de extracción (metanol: M, acetona / agua: AA y acetona / agua / ácido acético: AAA). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede observar, los sistemas AA y AAA permitieron obtener los mayores niveles de CFE a partir de *P. columbina*, mientras que con el sistema M se alcanzó el menor valor. Estos resultados concuerdan con los reportados por Uma y col. (2010) para *Lawsonia inermis*. En dicho trabajo, el contenido de CFE, obtenido con el sistema acetona / agua (80:20) fue superior al hallado con acetona pura (100%). En este mismo sentido, Chew y col. (2008) observaron que para extraer polifenoles a partir de dos especies de algas marinas (*Caulerpa racemosa* y *Kappaphycus alvarezii*), la mezcla metanol/agua (80:20) era mejor que metanol puro (100%).

A partir de estos resultados se puede decir que la adición de pequeñas cantidades de agua al medio extractivo (acetona), mejora la extracción de los compuestos fenólicos extractables presentes en *P. columbina*. Esto puede deberse, en primer lugar, a que el

agua genera un medio más polar que facilita una mayor solubilización de los diferentes compuestos fenólicos (Sultana y col., 2009; Uma y col., 2010; Mohammedi y Atik, 2011). En segundo lugar, se ha propuesto que la acetona actúa como inhibidor de la formación de complejos proteínas - polifenoles durante el proceso de extracción o incluso rompe los enlaces puente de hidrógeno establecidos entre los grupos carboxilos de las proteínas y los anillos fenólicos (Wang y col., 2009), lo que se manifiesta como una mayor solubilización de los compuestos fenólicos.

#### **IV.1.7 Conclusiones parciales**

- ✓ El contenido de proteínas en *P. columbina* fue similar al de otros vegetales tales como las leguminosas, siendo un aspecto característico de este tipo de algas.
- ✓ Los aminoácidos más abundantes fueron: Ala, Asp y Glu y la suma de Asp y Glu superó los 22 g 100g<sup>-1</sup> de proteína. Esta elevada proporción de aminoácidos ácidos es típica de las algas rojas y es responsable de su *flavor* y sabor característico.
- ✓ La proporción de Leu, Lys, Val, Phe + Tyr y Met + Cys fue relativamente elevada mientras que el contenido de Ile, His y Trp fue bajo. Cabe señalar que *P. columbina* también exhibió aminoácidos libres, siendo la Ala el aminoácido más abundante.
- ✓ El puntaje químico (**PQ**), calculado de acuerdo al patrón de referencia FAO para niños en edad preescolar fue 57%, siendo el Trp el aminoácido limitante.
- ✓ Los valores de digestibilidad proteica *in vitro* (**DP**) y **PDCAAS** fueron iguales o incluso mayores a los encontrados para distintas proteínas de origen vegetal. Sin embargo, el valor de **DP** resultó menor al hallado para proteínas animales, lo que pudo estar asociado con el elevado contenido de fibra del alga.
- ✓ La fibra dietaria total fue el componente más abundante en *P. columbina*. Esto es un aspecto típico de las algas en general y concuerda con lo reportado para otras especies del mismo género. Además, se pudo observar que el contenido de fibra superó al encontrado en otro tipo de vegetales, tales como frijoles y lentejas.
- ✓ El contenido de lípidos de *P. columbina* fue bajo pero estuvo comprendido dentro del rango establecido para las algas rojas. El principal ácido graso saturado e insaturado en el alga fue el ácido palmítico (C16:0) y el ácido eicosapentaenóico o EPA (C20:5, n-3), respectivamente.
- ✓ El contenido de cenizas fue menor al hallado para diferentes algas rojas. Los bajos niveles de cenizas pueden deberse a los sucesivos lavados con agua destilada que se realizaron en *P. columbina*, previo a su molienda y caracterización centesimal.

## Resultados y Discusión

---

- ✓ El nivel de Na fue casi diez veces inferior al reportado para otras especies del mismo género, mientras que el nivel de potasio fue casi cuatro veces superior al del sodio, siendo muy buena la relación Na/K.
- ✓ El contenido de P, Ca y Mg estuvo comprendido dentro de los valores comunes reportados para las algas rojas. Sin embargo, la relación Ca/P fue ligeramente inferior a la usualmente observada. El contenido de Mg fue superior al de Ca, siguiendo el patrón característico de las *Rhodophytas*.
- ✓ Los valores de dializabilidad obtenidos para P, Ca, Fe y Zn (DP, DCa, DFe y DZn, respectivamente), fueron similares a los informados para otros tipos de alimentos tales como: fideos de trigo, lechuga, copos de maíz, fideos de trigo y soja, etc.
- ✓ Los sistemas acetona / agua (AA) y acetona / agua / ácido acético (AAA), permitieron obtener los mayores niveles de compuestos fenólicos extractables a partir de *P. columbina*, mientras que con el sistema M (metanol), se consiguió el menor valor. La adición de pequeñas cantidades de agua al medio extractivo (acetona), mejoró la extracción de los compuestos fenólicos extractables presentes en el alga. Esto podría estar asociado no sólo con la generación de un medio más polar que facilita una la solubilización de los diferentes compuestos fenólicos sino también con la ruptura de los complejos *proteínas – polifenoles* por acción de la acetona.

## **Capítulo IV.2. Proceso de extracción y caracterización de las fracciones obtenidas**

### **IV.2.1 Definición de las condiciones de extracción para la obtención de las distintas fracciones (*proteínas y polisacáridos*), a partir de la materia prima**

El objetivo de esta etapa experimental fue definir un proceso que permitiera por un lado, extraer las proteínas solubles en agua a temperatura ambiente (*ficobiliproteínas*) y por otro, los ficocoloides (polisacáridos sulfatados: *carragenanos* y *agaranos*), libres de las proteínas anteriores. Para ello, se realizaron diferentes ensayos cuyos resultados se detallan a continuación.

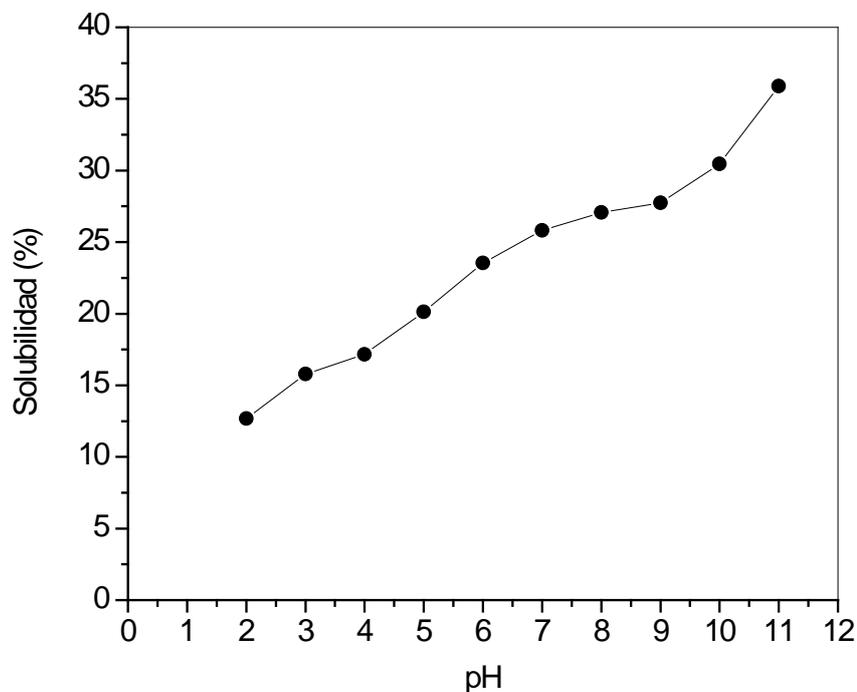
#### **IV.2.1.1 Etapa I: Extracción de las proteínas solubles en agua a 25°C**

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de esta etapa experimental fue extraer la mayor proporción de *ficobiliproteínas*, sin que estas pierdan su funcionalidad. Conjuntamente, se buscó obtener una baja proporción de ficocoloides (*carragenanos* y *agaranos*) en el extracto. Cabe señalar que los *ficocoloides* son altamente solubles en agua caliente (Melo y col., 2002), por lo que se decidió llevar a cabo una primera extracción acuosa a temperatura ambiente. En este sentido, Barbarino y Lourenço (2005) encontraron que el mejor método para extraer las proteínas solubles a partir de diferentes especies de algas (*P. acanthophora* var. *acanthophora*, *Sargassum vulgare* and *U. fasciata*), independientemente de la morfología o características bioquímicas, era la molienda y posterior dispersión del alga en agua a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones se produce la lisis celular mediante choque osmótico, facilitando la extracción de las proteínas (Rouxel y col., 2001).

Otros autores han propuesto el uso de hidróxido de sodio + 2-mercaptoetanol o enzimas (Celulasa + Xilanasas), para obtener buenos rendimientos proteicos a partir de diferentes especies de algas. Sin embargo, el empleo de un ambiente básico y reductor contribuye a la desnaturalización proteica, mientras que las enzimas facilitan la solubilización de los *ficocoloides* (Temperatura óptima de trabajo mayor a los 25°C (Fleurence y col., 1995, Joubert y Fleurence, 2008). Por este motivo, se decidió no tener en cuenta ambas alternativas para la **Etapa I**. Cabe señalar que el procedimiento elegido en la presente tesis concuerda con la mayoría de los procesos de extracción de *ficoeritrina* a partir de algas rojas (Denis y col., 2009a y 2009b).

### ✓ Elección del pH de extracción

Para seleccionar el pH de extracción de las *ficobiliproteínas* se procedió a evaluar la solubilidad proteica del alga a diferentes pHs (2,0 - 11,0), como se muestra en la **Figura IV.2**.



**Figura IV.2** – Porcentaje de solubilidad proteica de *P. columbina* a diferentes pHs (2,0 - 11,0).

Como se puede ver, *P. columbina* presentó menor solubilidad proteica a pH 2,0 que a los otros pH evaluados. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el punto isoelectrico (pI) de las *ficobiliproteínas*, en particular de la *ficoeritrina*, se encuentra en torno a 4,3 (Orta-Ramirez y col., 2000). Bajo esas condiciones, la molécula carece de carga neta y por lo tanto su interacción con el solvente es muy débil, lo que se evidencia como una baja solubilidad (Cheftel et al, 1989). Cabe señalar que a pHs superiores al pI la proteína adquiere carga negativa, lo que aumenta su repulsión electrostática con el solvente, incrementándose así su solubilidad. Esto se ve reflejado conforme asciende el pH, en particular a pHs alcalinos.

En base a estos resultados, un pH adecuado para la extracción proteica podría ser 8,0 o bien pHs superiores. Sin embargo, se ha reportado que la estabilidad de las *ficobiliproteínas* desciende conforme aumenta el pH. En particular se ha visto que a

pHs superiores o igual a 10,0 la *ficoeritrina* se encuentra totalmente desnaturalizada (Orta-Ramirez y col., 2000). Bajo estas condiciones, se produce la separación de los grupos cromóforos como consecuencia del desplegamiento proteico, lo que se traduce en la pérdida de las propiedades espectroscópicas de la *ficobiliproteína* (Ogawa y col., 1991). Además, puede ocurrir la ciclación de los anillos pirrólicos, favoreciendo la pérdida de su funcionalidad (Rudiger, 1992).

Ogawa y col. (1991) estudiaron la estructura de la *ficoeritrina* a distintos pHs y concluyeron que el rango de mayor estabilidad molecular estaba comprendido entre pH 5,0 y 9,0. Ellos vieron además, que en dicho rango de pH la *ficobiliproteína* adquiriría una conformación globular compacta que le confería una gran estabilidad. Posteriormente, Orta-Ramirez y col. (2002) observaron que el pH óptimo dentro de este rango para la estabilidad proteica era el neutro.

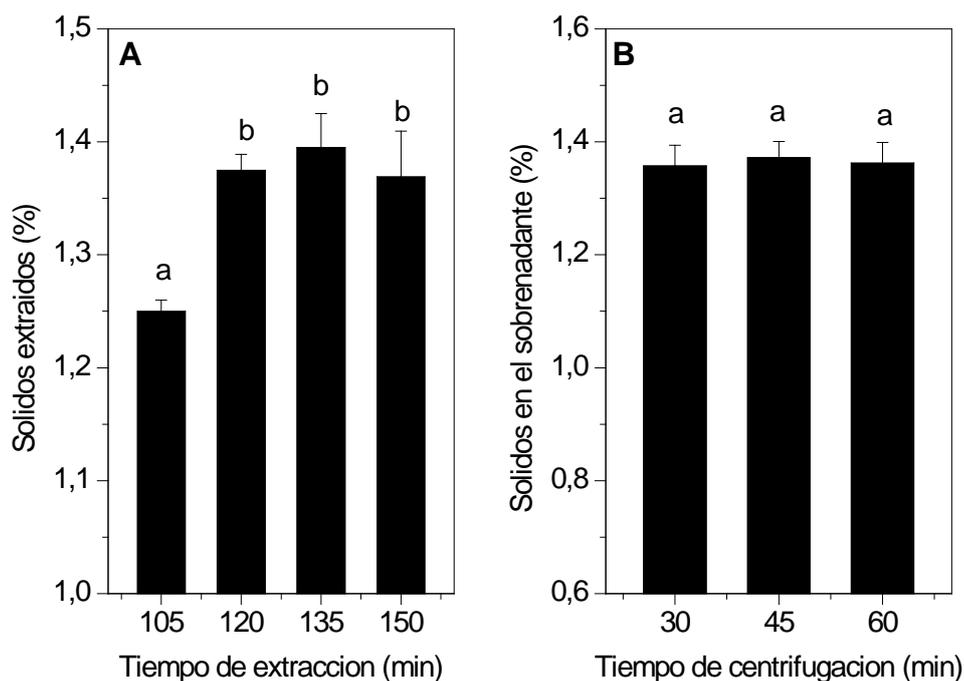
En base a todo lo expuesto y teniendo en cuenta el objetivo perseguido en esta etapa de extracción (extraer la mayor proporción de *ficobiliproteínas*, sin que éstas pierdan su funcionalidad), se escogió el pH 7,0 como pH de extracción.

#### ✓ **Elección del tiempo óptimo extracción y centrifugación**

Para seleccionar el tiempo óptimo de extracción, que permitiera obtener la mayor concentración de sólidos solubles en agua a temperatura ambiente y pH 7,0, se procedió como se describió en el punto **III.4.1.2**.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.3.A**. Como se puede observar hubo diferencias significativas en los niveles de sólidos extraídos entre los 105 minutos y los demás tiempos de extracción. Esto indica que a ese tiempo todavía no se había alcanzado el equilibrio en la extracción sólido – líquido. Sin embargo, para tiempos mayores o iguales a 120 minutos la proporción de sólidos extraídos se mantuvo constante. Este resultado indica que el sistema llegó al equilibrio. Por lo tanto, un aumento en el tiempo de extracción más allá de los 120 minutos no se traduce en un incremento del nivel de sólidos en el sobrenadante.

En base a estos resultados, y buscando el mayor rendimiento en el menor tiempo posible, se decidió llevar a cabo la **Etapa I** durante 2 horas.



**Figura IV.3** – Efecto del tiempo de extracción (A) y centrifugación (B), sobre el nivel de sólidos obtenido en el sobrenadante de la Etapa I. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Una vez seleccionado el tiempo óptimo de extracción de la **Etapa I**, se evaluó el efecto del tiempo de centrifugación sobre el nivel de sólidos en el sobrenadante. Como se puede apreciar en la **Figura IV.3.B**, el tiempo de centrifugación no afectó la proporción de sólidos en el sobrenadante ya que no hubo diferencias significativas entre los distintos tiempos: 30, 45 y 60 min, respectivamente. Por tal motivo, se escogió 30 minutos como tiempo óptimo de centrifugación.

Bajo estas condiciones de ensayo el rendimiento de sólidos y de proteínas para la **Etapa I** fue  $18,1 \pm 0,3$  y  $16,5 \pm 0,1$  g  $100\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por de S.F-Tischer y col. (2006) para el alga roja *Meristiella gelidium*. En dicho trabajo, se llevó a cabo un proceso de extracción similar al de la **Etapa I** durante 15 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . El rendimiento de sólidos y de proteínas obtenido fue 12 y 17 g  $100\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

#### IV.2.1.2 Etapa II: Extracción de los *ficocoloides* (carragenanos y agaranos)

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de esta etapa fue obtener, a partir del residuo insoluble de la **Etapa I**, la mayor proporción de *ficocoloides/sólidos*

*Resultados y Discusión*

*solubles* con el menor contenido proteico En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos a partir de las seis condiciones de proceso estudiadas (**Tabla IV.5**).

**Tabla IV.5** Elección de las condiciones óptimas de extracción de la **Etapla II**. Rendimiento de sólidos y proteínas del sobrenadante.

Condición	Descripción	Rendimiento de sólidos solubles (%)	Rendimiento de proteínas solubles (%)
1	2 hs, pH 7,0 y 25°C	0,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	33,8 ± 0,7 <sup>d</sup>
2	2 hs, pH 2,0 y 25°C	17,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	19,1 ± 0,9 <sup>b</sup>
3	2 hs, pH 12,0 y 25°C	18,8 ± 0,7 <sup>c</sup>	31,8 ± 0,6 <sup>d</sup>
4	2 hs, pH 12,0; 0,5% Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> y 25°C	15,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	26,1 ± 0,3 <sup>c</sup>
5	2 hs, pH 7,0 y 95°C	26,3 ± 0,6 <sup>e</sup>	14,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
6	Hidrólisis secuencial (celulasa + xilanasa)	13,3 ± 0,2 <sup>d</sup>	33,4 ± 0,8 <sup>d</sup>

X ± DE. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede ver en la **Tabla IV.5**, la condición 1 fue la que menor rendimiento de sólidos proporcionó. Esto confirma lo mencionado anteriormente acerca del equilibrio del sistema extractivo, en donde un aumento en el tiempo de extracción a temperatura ambiente y pH 7,0 no se traduce en un incremento en el nivel de sólidos extraídos. Por lo tanto, esta condición sólo actuaría como un lavado, favoreciendo la solubilización de las proteínas solubles ya extraídas que estaban retenidas en el residuo. Esto último se manifiesta en los resultados como un elevado rendimiento proteico.

Cuando se evaluó el efecto del pH sobre el rendimiento de sólidos y proteínas (condición 2 y 3), se pudo ver que la proporción de sólidos extraídos fue independiente del pH evaluado. Sin embargo, a pH alcalino hubo un marcado incremento en el rendimiento proteico. Esto concuerda con lo reportado por Fleurence y col. (1995) para las algas *Ulva rigida* y *Ulva rotundata*. En dicho trabajo se utilizó hidróxido de sodio (pH 13,0) + 2-mercaptoetanol, siendo el rendimiento proteico 26,8 ± 1,3 y 36,1 ± 1,4 g 100g<sup>-1</sup> para *U. rigida* y *U. rotundata*, respectivamente. Este incremento en el

rendimiento de proteínas puede atribuirse al efecto desnaturalizante que tiene el NaOH, el cual se incrementa bajo condiciones reductoras (Serot y col., 1994). Cabe señalar que en la presente tesis se utilizó Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> como agente reductor en lugar de 2-mercaptoetanol (condición 4), obteniéndose valores elevados en el rendimiento proteico pero menores a la condición 3. A pH ácido el rendimiento de proteínas fue uno de los más bajos, lo que puede estar relacionado con la baja solubilidad proteica a pH 2,0 (Orta-Ramirez y col., 2000). Además, se ha visto que a este pH la resistencia de la pared celular del género *Porphyra* es muy elevada, lo que podría dificultar la extracción de las proteínas presentes en el **dominio glicoproteico** (Zemke-White y col., 2000).

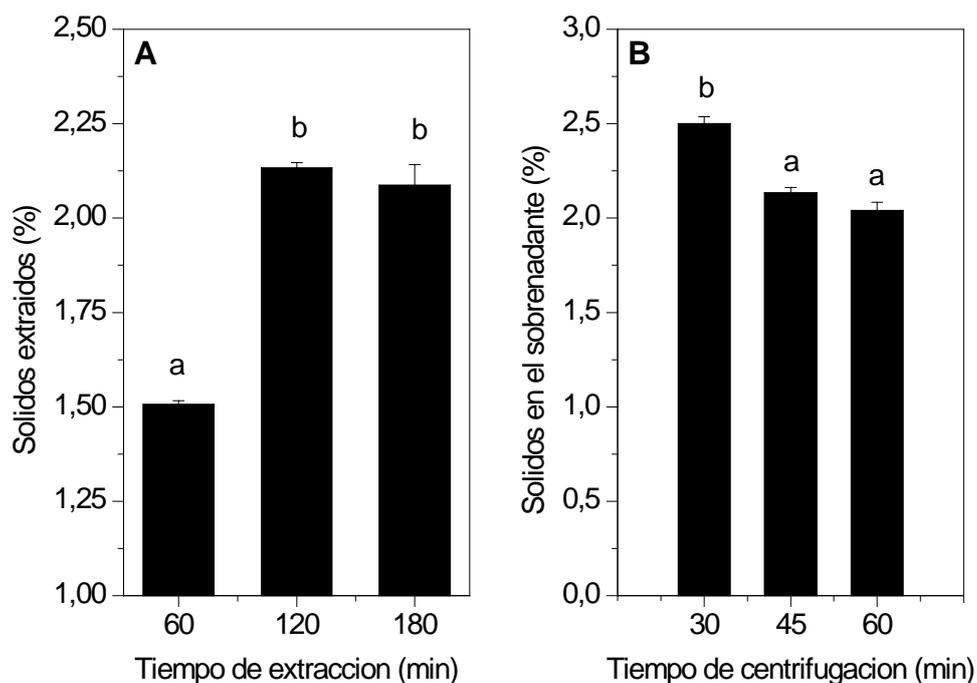
Como se puede observar en la **Tabla IV.5**, la condición 5 fue la que mayor rendimiento de sólidos proporcionó, obteniéndose el menor nivel proteico en el extracto. Este resultado concuerda con el obtenido por de S.F-Tischer y col. (2006), para el alga roja *M. gelidium* a 100°C durante 3 horas (25 g 100g<sup>-1</sup>). Este elevado nivel de sólidos está directamente asociado con la temperatura de extracción, ya que a 95°C se favorece la solubilización de los **ficocoloides** presentes en la estructura celular del alga (Zhang y col., 2005). Entre estos **ficocoloides** se destacan los **porfiranos** que constituyen el componente más importante de la pared celular en el género *Porphyra* y son la principal fracción soluble en agua caliente (Venkatpurwar y col., 2011). Cabe señalar que debido a la fuerte interacción *proteína – ficocoloide* que existe en la pared celular de las algas rojas (Fleurence y col., 1995; Barbarino y Lourenço, 2005), la presencia de las mismas en este extracto es inevitable.

Con la condición 6 (hidrólisis secuencial con celulasa + xilanasa), se obtuvo un bajo rendimiento de sólidos. Sin embargo, el rendimiento proteico fue muy elevado. Este resultado puede deberse a la acción conjunta de las enzimas celulasa y xilanasa, las cuales degradan los **polisacáridos fibrilares** presentes en la pared celular del alga, facilitando la solubilización de las proteínas que integran el **dominio glicoproteico** (Joubert y Fleurence, 2008).

Como el objetivo de esta etapa experimental fue obtener la mayor proporción **ficocoloides/sólidos**, con el menor nivel proteico, se seleccionó la **condición 5** para la **Etapa II**.

### ✓ Elección del tiempo óptimo extracción y centrifugación

Una vez seleccionada la **condición 5**, fue necesario comprobar si 2 horas de extracción eran un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio sólido – líquido. Por tal motivo, se decidió evaluar el efecto de distintos tiempos sobre el nivel de sólidos extraídos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.4.A**.



**Figura IV.4** – Efecto del tiempo de extracción (A) y centrifugación (B), sobre el nivel de sólidos obtenido en el sobrenadante de la Etapa II. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede observar en la **Figura IV.4**, no hubo diferencias significativas en los niveles de sólidos extraídos a 120 y 180 minutos. Esto indica que a las 2 horas de extracción ya se había alcanzado el equilibrio sólido – líquido. Sin embargo, la proporción de sólidos extraídos a los 60 minutos fue significativamente menor. Por lo tanto, 1 hora de extracción es un tiempo insuficiente para obtener la mayor proporción de sólidos solubles bajo la **condición 5**.

Una vez seleccionado el tiempo óptimo de extracción de la **Etapa II**, se evaluó el efecto del tiempo de centrifugación sobre el nivel de sólidos en el sobrenadante. Como se puede apreciar en la **Figura IV.4.B**, a los 30 minutos de centrifugación la proporción de sólidos fue mayor que la obtenida a los 45 y 60 min. Esto indica que a dicho tiempo todavía no se había logrado sedimentar todos los sólidos insolubles

## *Resultados y Discusión*

dispersados en el extracto. Sin embargo, para 45 y 60 minutos la proporción de sólidos en el sobrenadante no varió, indicando que 45 minutos sería el tiempo óptimo de centrifugación.

En base a todos estos resultados, se diseñó un proceso de extracción que fue detallado en el punto **III.4.3 (Figura III.2)**. Los rendimientos obtenidos para cada etapa se resumen en la **Tabla IV.6**. Cabe recordar que **FP** se obtuvo a partir de la **Etapa I**, mientras que **FF** fue obtenida en la **Etapa II**. Por último, el residuo insoluble del lavado 5 se denominó **R**.

**Tabla IV.6** Proceso de extracción definitivo. Rendimiento de sólidos y proteínas.

	<b>Descripción</b>	<b>Sólidos solubles (g 100<sup>-1</sup> muestra)</b>	<b>Proteínas (g 100<sup>-1</sup> proteínas)</b>
Sobrenadante Etapa I	2 hs, pH 7,0 y 25°C	18,3 ± 0,3	16,8 ± 0,1
Lavado 1	10 min, pH 7,0 y	0,6 ± 0,0	-
Lavado 2	25°C	0,1 ± 0,0	-
Sobrenadante Etapa II	2 hs, pH 7,0 y 95°C	25,32 ± 0,1	11,5 ± 0,3
Lavado 3		1,7 ± 0,6	-
Lavado 4	10 min, pH 7,0 y 95°C	0,6 ± 0,2	-
Lavado 5		0,0 ± 0,0	-

## IV.2.2 Caracterización de las fracciones obtenidas a partir de la materia prima (FP, FF y R) y sus hidrolizados (HFP y HR)

### IV.2.2.1 Caracterización de FP y FF

#### IV.2.2.1.a Composición química y perfil de compuestos fenólicos

En la **Tabla IV.7** se muestra la composición química de **FP** y **FF**. Como se puede observar, el contenido proteico de **FP** fue dos veces superior al de **FF**. Este resultado concuerda con lo reportado por de S.F-Tischer y col. (2006), para el alga roja *M. gelidium*. En dicho trabajo, la relación entre el contenido proteico de las fracciones obtenidas a 25°C y a 100°C fue aproximadamente 2,1.

**Tabla IV.7** Composición química de las fracciones **FP** y **FF**

	<b>FP</b>	<b>FF</b>
Proteínas (g 100 g <sup>-1</sup> bs)	28,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	14,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
R-ficoeritrina (g 100 g <sup>-1</sup> de proteínas)	3,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
C-ficocianina (g 100 g <sup>-1</sup> de proteínas)	1,9 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Hidratos de carbonos totales (g 100 g <sup>-1</sup> bs)*	50,1 ± 3,9 <sup>a</sup>	72,0 ± 3,3 <sup>b</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (g 100 g <sup>-1</sup> de hidrato de carbono totales)	6,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
CFE en agua (g 100 g <sup>-1</sup> bs)**	0,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
Cenizas (g 100 g <sup>-1</sup> bs)	14,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,4 ± 1,1 <sup>a</sup>

X ± DE, bs: base seca. \* Hidratos de carbono totales expresados como galactosa. \*\* CFE: contenido de fenoles extractables en agua expresados como equivalentes de ácido gálico. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede ver en la **Tabla IV.7**, el contenido de **R-ficoeritrina** para ambas fracciones fue superior al de **C-ficocianina**. Esto se debe a que la **R-ficoeritrina** es la principal **ficobiliproteína** presente en el género *Porphyra* (Niu y col., 2007).

Por otro lado, se puede observar que la fracción **FP** presentó una concentración de **R-ficoeritrina** 17 veces mayor que **FF**. Este resultado es similar al hallado por Denis y col. (2009a), para una fracción ultrafiltrada del alga roja *Grateloupia turuturu*. La marcada diferencia en el contenido de **R-ficoeritrina** entre ambas fracciones se debe a

las condiciones de extracción de la **Etapa I**. Como se mencionó anteriormente, en dicha etapa se favorece la extracción casi total de las *ficobiliproteínas*, permaneciendo una muy baja proporción en el residuo insoluble en agua a 25°C.

El contenido de hidratos de carbono totales en **FP** no fue despreciable y podría atribuirse a la presencia de carragenanos con baja capacidad de gelificación (de S.F-Tischer y col., 2006). El valor obtenido fue similar al reportado por Jiménez-Escrig y col. (2012), para un extracto acuoso del alga *G. pistillata* ( $\approx 47 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ). No obstante, la proporción de hidratos de carbono totales en **FP** fue menor a la obtenida en **FF**. Esto puede deberse a la elevada temperatura de extracción de la **Etapa II**, que no sólo contribuye a la solubilización de los carragenanos, sino que también favorece la extracción de los *porfiranos* (Maciel y col., 2008). Cabe señalar que el contenido de hidratos de carbono totales en **FF** fue similar al hallado por Zhang y col. (2005), para un extracto acuoso de *P. capensis* ( $72 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ).

Como se puede observar en la **Tabla IV.7**, el contenido de sulfatos de **FP** fue la mitad del de **FF**. Esto está directamente relacionado con la temperatura de extracción de cada etapa y el grado de sulfatación de los hidratos de carbono extraídos (Maciel y col., 2008). El valor obtenido para **FP** y **FF** concuerda con el hallado por Maciel y col. (2008) y Zhang y col. (2005), siendo éstos de  $6,4 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$  y  $12,1 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

El contenido de **CFE** en agua de **FP** fue 7 veces superior al hallado para **FF** (**Tabla IV.7**). Este valor es similar al reportado por Kuda y col. (2005) para *Porphyra* spp. ( $0,94 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ).

Como la proporción de **CFE** en **FF** fue muy inferior a la obtenida con **FP**, se decidió realizar el perfil de compuestos fenólicos sólo en esta última fracción. Los resultados con y sin hidrólisis ácida se muestran en la **Tabla IV.8**.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos obtenidos antes de la hidrólisis ácida constituyen las agliconas libres o los compuestos fenólicos no conjugados o no condensados, naturalmente presentes en **FP**. Contrariamente, los compuestos fenólicos obtenidos después de la hidrólisis ácida representan las agliconas totales o los compuestos fenólicos conjugados o condensados de **FP** (Tarola y col., 2012).

**Tabla IV.8** Perfil de compuestos fenólicos de **FP** antes y después de la hidrólisis ácida

Compuesto fenólico	Concentración de compuestos fenólico (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Antes de la hidrólisis ácida	Luego de la hidrólisis ácida
Ácido gálico	ND	2,47 ± 0,02
(±)-Catequina	ND	0,21 ± 0,01
(-)-Epicatequina	0,14 ± 0,01	5, 20 ± 0,02
Ácido ferúlico	ND	ND
Ácido p-cumárico	0,23 ± 0,01	ND
Rutina	ND	ND
Ácido cinámico	ND	ND
Ácido elágico	ND	ND
Quercitina	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Kaempferol	0,02 ± 0,00	ND
Compuestos fenólicos totales*	0,56	7,94

X ± DE, bs: base seca. ND: no detectado.\*Suma aritmética.

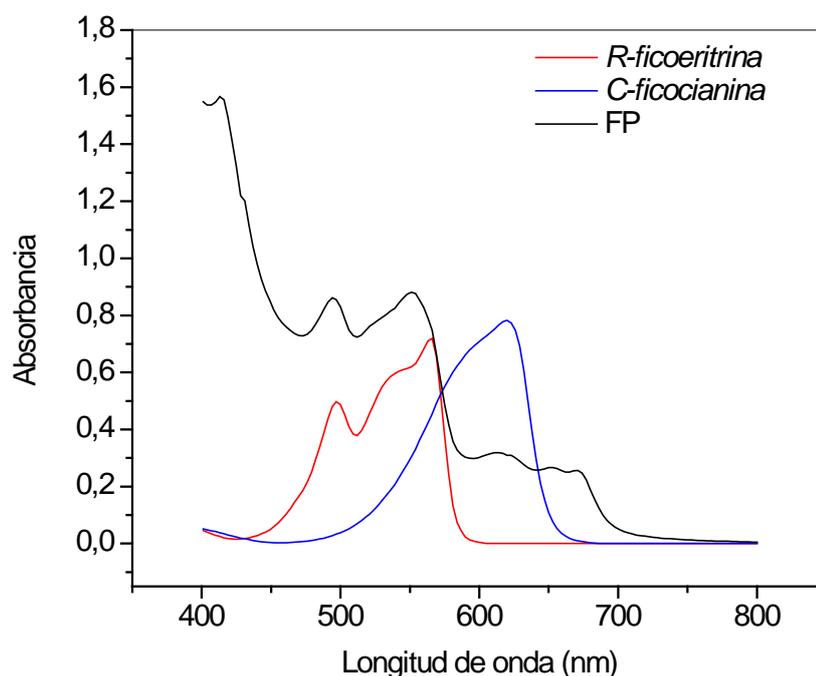
Como se puede ver en la **Tabla IV.8**, sólo fue posible detectar en su forma libre: epicatequina, ácido p-cumárico, quercitina y kaempferol. Sin embargo, luego de la hidrólisis ácida de **FP** el contenido de ácido gálico, catequina y epicatequina aumentó notablemente. Este incremento puede deberse a que la hidrólisis ácida desfavorece la interacción *proteínas – polifenoles*, además de permitir la despolimerización de los compuestos fenólicos, lo que se traduce como un aumento de los mismos post proceso. Cabe señalar que la ruptura de la pared celular del alga en los procesos extractivos conlleva a la liberación no sólo de las proteínas citoplasmáticas, sino también de los

compuestos fenólicos (Siriwardhana y col., 2008). Bajo estas condiciones, se favorece la interacción entre ambas moléculas mediante distintos tipos de enlaces (puente de hidrógeno, iónico e interacciones hidrofóbicas) (Wang y col., 2010).

La gran diferencia entre el contenido de **CFE** en agua y los compuestos fenólicos totales obtenidos a partir del perfil (**Tabla IV.8**), puede deberse a la presencia de *halofenoles* en **FP**. Como se mencionó en la introducción, las algas rojas contienen elevados niveles de compuestos fenólicos halogenados (Liu y col., 2011), los cuales no son cuantificados en este perfil.

#### IV.2.2.1.b Barrido espectral de FP

Como se mencionó en el punto anterior, el contenido de *ficobiliproteínas* presentes en **FP** fue muy bajo. Por lo tanto, sólo se obtuvo el barrido espectral de **FP** y se lo comparó con el de los estándares: *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.5**.



**Figura IV.5** – Barrido espectral de FP y los estándares *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina* en buffer fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,8).

Como era de esperar, el espectro de **FP** mostró los picos característicos de *R-ficoeritrina* (566, 545 y 495 nm) y *C-ficocianina* (600 – 640 nm). Este resultado concuerda con los reportados por Niu y col. (2010) y Sampath-Wiley y Neefus (2007),

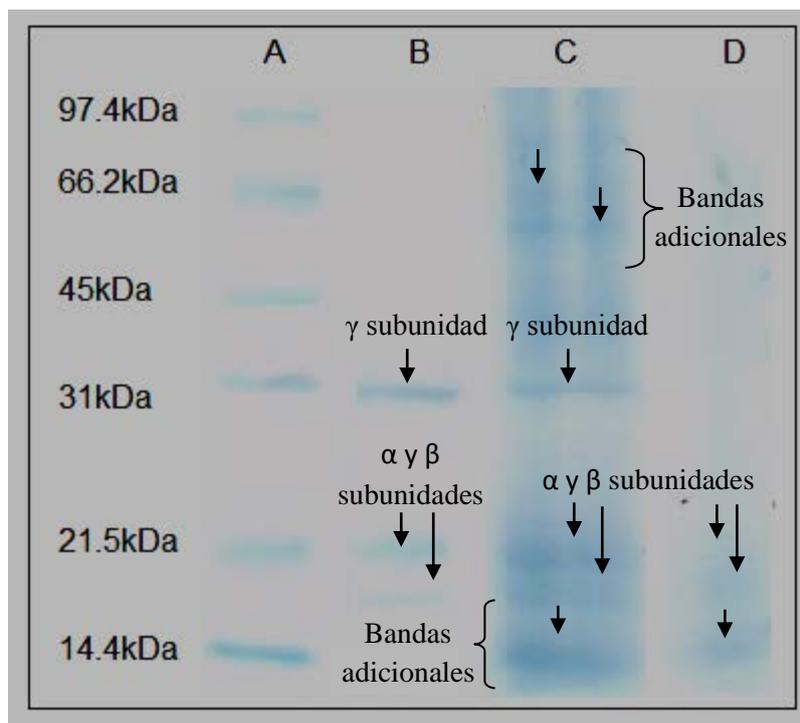
para barridos espectrales obtenidos bajo las mismas condiciones a partir de extractos de *P. yezoensis* y *P. purpurea*, respectivamente. Sin embargo, también se puede ver la presencia de otros picos en el barrido de **FP**, que difieren notablemente del espectro de las *ficobiliproteínas*. Este resultado sugiere que dicha fracción posee además de la *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*, otro tipo de pigmentos tales como *clorofila a* (sin el grupo fitol).

Como se mencionó anteriormente, la proporción de *R-ficoeritrina* en **FP** fue mayor que la de *C-ficocianina*. Esto se puede ver en el espectro de **FP**, ya que la intensidad del pico a 566 nm es mayor a la obtenida a 620 nm (máximos de absorbancia para *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*, respectivamente). Por otro lado, la absorbancia a 280 nm fue considerablemente superior a la hallada a 566 y 620nm. Este resultado podría deberse a la presencia de otras proteínas en **FP**. En este sentido, Rossano y col. (2003) calcularon la pureza de la *ficoeritrina* obtenida a partir de los extractos de alga roja *C. elongata*, mediante la relación de absorbancias a 566 nm y 280 nm ( $A_{566}/A_{280}$ ). En base a este cálculo, un valor de 4,5 es indicativo de pureza, mientras que valores inferiores indican la presencia de contaminantes proteicos en el extracto. Para **FP** el valor hallado fue 0,2, lo que denota la presencia de otras proteínas distintas de las *ficobiliproteínas* en dicha fracción, tales como las *lectinas* (Fitzgerald y col., 2011).

#### **IV.2.2.1.c Electroforesis SDS-PAGE de FP, FF y R-ficoeritrina**

En la **Figura IV.6** se muestra el perfil electroforético de **FP**, **FF** y *R-ficoeritrina*.

Como se puede ver, el estándar exhibió tres bandas proteicas, una cercana a los 30 kDa y dos entre 14,4 y 21,5 kDa (línea B). La primera de estas bandas se puede atribuir a la subunidad  $\gamma$ , cuyo peso molecular está comprendido entre 30 y 33 kDa. Mientras que las otras dos, probablemente correspondan a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la *ficobiliproteína* (17 y 19 kDa, respectivamente) (Niu y col., 2010). Estos componentes proteicos también fueron observados en el perfil electroforético de **FP** (línea C). Además, **FP** presentó otras bandas proteicas cuyo peso molecular aparente estuvo comprendido entre 45 – 66,2 kDa y 14 kDa. La presencia de estos componentes proteicos, distintos de los observados en el perfil de *R-ficoeritrina*, confirma lo mencionado anteriormente acerca de la presencia de otras proteínas que posee **FP**.



**Figura IV.6** – Electroforesis SDS-PAGE. Patrón de pesos moleculares (A), *R-ficoeritrina* (B), FP (C) y FF (D).

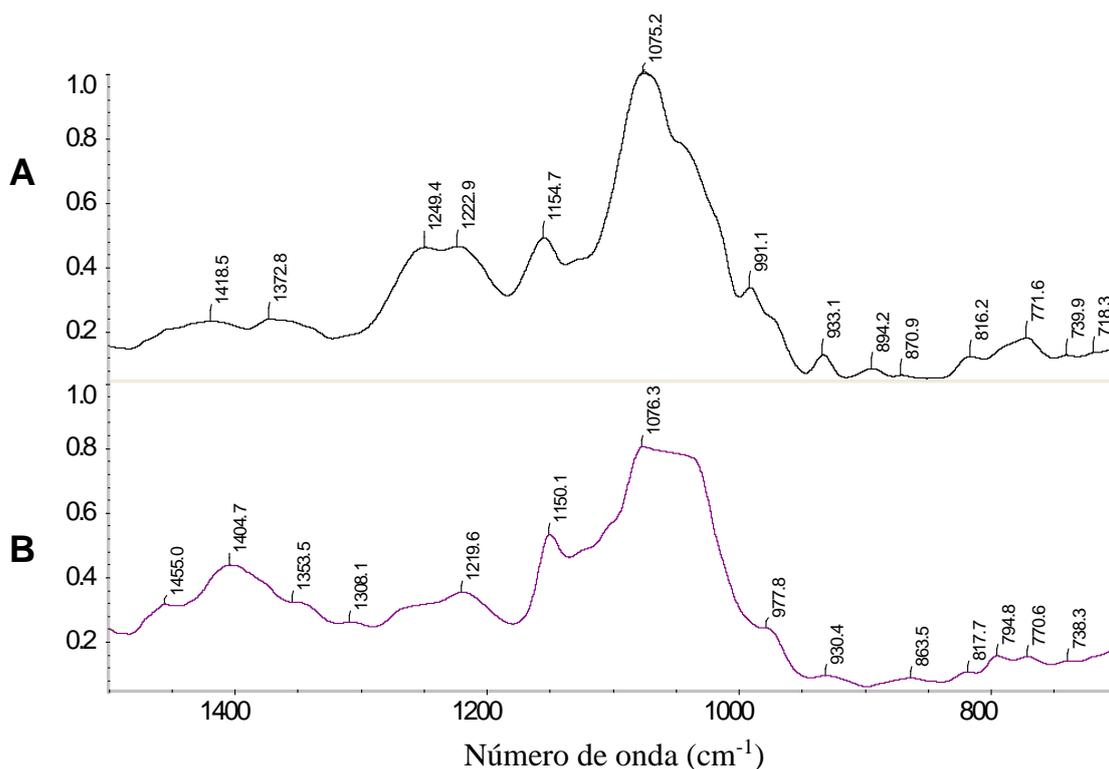
Para el caso de **FF**, sólo se observaron bandas con peso molecular aparente inferior a 21,5 kDa (línea D). Esto demuestra, por un lado, que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están presentes en dicha fracción, y por el otro, que la subunidad  $\gamma$  fue totalmente removida durante la **Etapa I** (ausencia de la banda proteica de 30 kDa).

Cabe señalar que la *C-ficocianina* posee subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  cuyos pesos moleculares aparentes son 19,5 y 21,5 kDa, respectivamente (Minkoxa y col., 2003). Por lo tanto, los componentes proteicos comprendidos entre 14,4 y 21,5 kDa presentes en **FP** y **FF** también podrían ser atribuidos a esta *ficobiliproteína*.

Por último, las bandas proteicas con peso molecular aparente cercano a 14,4 kDa (bandas adicionales), también han sido observadas en perfiles electroforéticos de otras algas rojas, tales como: *Chondrus crispus*, *G. verrucosa*, *P. palmata* y *P. umbicalis* (Rouxel y col., 2001), lo que podría estar asociado al *filo* del alga.

#### IV.2.2.1.d Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de FP y FF

En las **Figuras IV.7.A** y **B** se muestran los espectros de FTIR obtenidos para **FF** y **FP**, respectivamente.



**Figura IV.7** – Espectros FTIR obtenidos entre 1400 y 700  $\text{cm}^{-1}$  para FF (A) y FP (B).

La región comprendida entre 1500 y 700  $\text{cm}^{-1}$  usualmente se utiliza para obtener información sobre la estructura de los *ficocoloides*. Como se puede ver en la **Figura IV.7.A**, el espectro de **FF** exhibe las bandas características de los *porfiranos* (1372, 1249, 1154, 1075, 933, 893, 816 y 771  $\text{cm}^{-1}$ ). Este resultado concuerda con el espectro FTIR reportado por Zhang y col. (2005), para el alga roja *P. capensis*.

Las bandas a 1372 y 1249  $\text{cm}^{-1}$  presentes en el espectro de **FF**, se deben a las vibraciones de los enlaces **S=O** de los grupos sulfatos. Por otro lado, la prominente banda a 1075  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al esqueleto de los galactanos, mientras que la banda a 893  $\text{cm}^{-1}$  se asigna específicamente al agar contenido en esta fracción. Cabe acotar que la banda a 933  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del enlace **C-O-C** presente en la molécula de 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa (Souza y col., 2012).

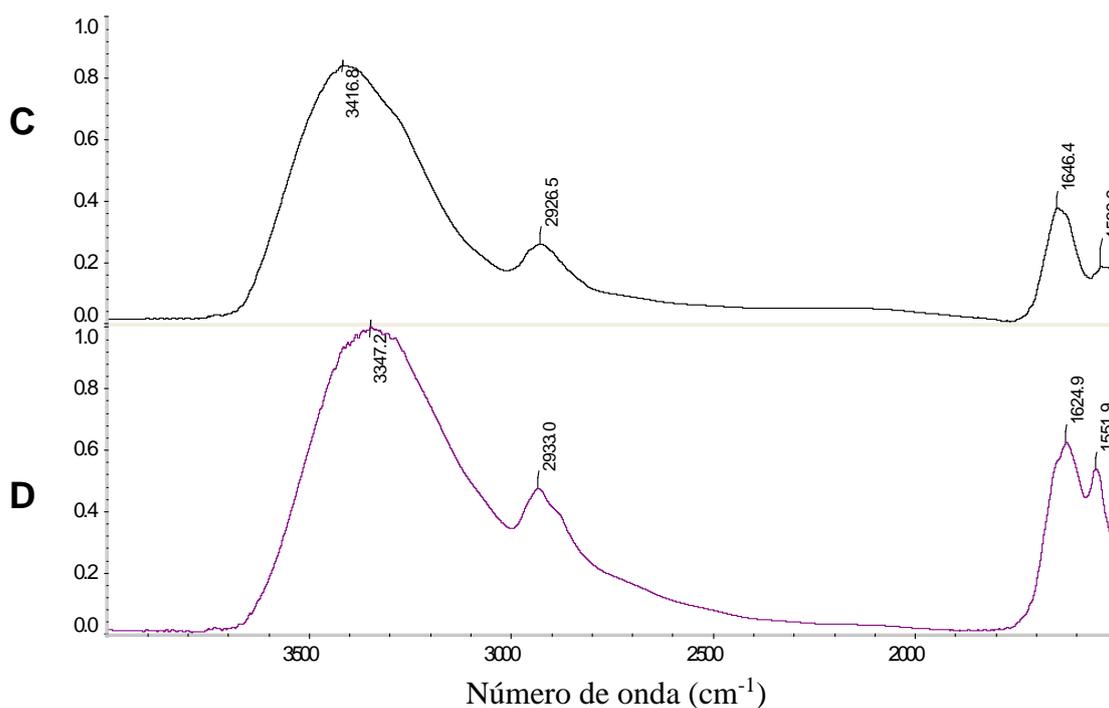
Para inferir la posición del grupo sulfato en la molécula de D-galactosa se suelen usar las bandas características a 845, 830 y 820  $\text{cm}^{-1}$ . Las mismas corresponden a la posición 4, 2 y 6 de la unidad de D-galactosa, respectivamente (Maciel y col., 2008; Gómez-Ordoñez y Rupérez, 2011). Como se puede apreciar en el espectro de **FF**, las bandas a 845  $\text{cm}^{-1}$  y 830  $\text{cm}^{-1}$  fueron indetectables. Sin embargo, a 820  $\text{cm}^{-1}$  fue posible distinguir un hombro en el espectro IR. Esto haría suponer que las moléculas de D-

galactosa y 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa presentes en **FF** carecerían de sulfatación en el C2. Pero habría un pequeño grado de sustitución en el C6 de la D-galactosa. Esto concuerda con lo reportado por Melo y col (2002), para el espectro IR del alga *G.cornea*.

Por último, las bandas a 1154 y 771  $\text{cm}^{-1}$  presentes en el espectro de **FF** no se pudieron asignar a ningún parámetro estructural. La presencia de las mismas también fue observada por Maciel y col. (2008), en el espectro IR del alga *G. birdiae*.

El espectro de **FP** fue muy distinto al obtenido con **FF** (**Figura IV.7.B**). Las principales bandas obtenidas con esta fracción fueron: 1308, 1219, 1150, 1076, 930, 863, 794 y 770  $\text{cm}^{-1}$ . En este sentido, se pudo apreciar que la banda asignada al esqueleto de los galactanos ( $\approx 1075 \text{ cm}^{-1}$ ), fue más importante que la exhibida por **FF**. Sin embargo, la banda correspondiente al agar desapareció (893  $\text{cm}^{-1}$ ). Además, fue posible observar que las bandas atribuidas a la vibración del enlace **S=O** de los grupos sulfatos en **FP** fueron muy débiles (1370 y 1250  $\text{cm}^{-1}$ ). En base a estos resultados se podría suponer que la proporción *carragenanos / agaranos (porfiranos)* en **FP** es mayor que la de **FF**, siendo menor el grado de sulfatación. Esto concuerda con lo observado en el punto **IV.2.2.1.a**, donde se vió que **FP** poseía un menor contenido de sulfatos respecto a **FF**, y un moderado nivel de hidratos de carbono totales atribuibles a la presencia de carragenanos solubles a 25°C.

Por otro lado, las proteínas producen hasta 9 bandas características en el infrarrojo denominadas: **Amida I**, **Amida II**, **Amida A**, **Amida B**, etc. Tanto **Amida I** como **Amida II**, son las dos principales bandas de los espectros IR. La primera es la más intensa y está asociada con la vibración de tensión del enlace C=O (1700 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ ). La segunda se relaciona con la vibración de flexión del enlace N-H y la vibración de tensión de los enlaces C-N y C-C (1600 y 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) (Dousseau y Pézolet, 1990). En este sentido, se puede apreciar que tanto **FF** como **FP** exhibieron las dos bandas características correspondientes a cada **Amida** (1649 y 1539  $\text{cm}^{-1}$  y 1629 y 1551  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). Sin embargo, las bandas en el espectro de **FP** fueron más intensas y estuvieron desfasadas respecto a las de **FF** (**Figuras IV.8.A y B**). Ambos fenómenos se deben, en primer lugar, a que **FP** posee mayor contenido proteico (**Tabla IV.7**), y en segundo lugar, a los distintos tipos de proteínas presentes en cada fracción (**Figura IV.6**).



**Figura IV.8** – Espectros FTIR obtenidos entre 4000 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  para FF (A) y FP (B).

Como se puede observar en las **Figuras IV.8.A y B**, el espectro de cada fracción presentó dos bandas en el rango de 3600 y 2800  $\text{cm}^{-1}$ . La primera corresponde a las vibraciones de tensión de los enlaces O-H y N-H (**Amida A y B**), mientras que la segunda se debe a la vibración de tensión de los enlaces C-H (Dousseau y Pézolet, 1990). Para ambas fracciones, la primera banda fue muy ancha y se centró en 3348  $\text{cm}^{-1}$  y 3417  $\text{cm}^{-1}$  para **FF** y **FP**, respectivamente. Sin embargo, la segunda banda fue más angosta y débil, visualizándose a 2932  $\text{cm}^{-1}$  y 2926  $\text{cm}^{-1}$  para **FF** y **FP**, respectivamente.

#### IV.2.2.2 Caracterización de los hidrolizados obtenidos a partir de FP (HFP)

##### IV.2.2.2.a Determinación del grado de hidrólisis (GH)

Como se mencionó en el punto **III.4.3.1.a**, se prepararon cuatro hidrolizados a partir de **FP** (**T, A, TA y AT**).

El GH obtenido con cada sistema se muestra en la **Tabla IV.9**. El **GH** obtenido con el sistema **A** fue superior al alcanzado con sistema **T**, para el mismo tiempo de hidrólisis. Esto indica que la enzima Alcalasa fue más efectiva que la enzima Tripsina para degradar las proteínas presentes en **FP**. Este resultado concuerda con lo reportado por Qu y col. (2010), para hidrolizados obtenidos a partir de *P. yezoensis*.

**Tabla IV.9** Grado de hidrólisis (GH) obtenido con los distintos sistemas enzimáticos

Hidrolizado	GH (%)
T	43,5 ± 1,9 <sup>a</sup>
A	57,7 ± 1,8 <sup>c</sup>
TA	48,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
AT	64,3 ± 1,9 <sup>d</sup>

X ± DE. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

El mayor **GH** se obtuvo hidrolizando primero con Alcalasa y luego con Tripsina (**AT**). Sin embargo, cuando se invirtió el orden de las enzimas el **GH** fue apenas superior al alcanzado con Tripsina (**T**). La pobre acción de Alcalasa en el sistema **TA** puede deberse a la falta de sitios específico en el sustrato luego de haber actuado la Tripsina. Cabe señalar que ambas enzimas son endopeptidasas con la misma especificidad (*serino proteasas*) (Cian y col., 2012).

#### IV.2.2.2.b Perfil de aminoácidos de FP y sus hidrolizados (HFP)

En la **Tabla IV.10** se muestra el perfil de aminoácidos de **FP** y sus hidrolizados (**HFP**).

Como se puede apreciar no hubo diferencias significativas entre el contenido de aminoácidos de **FP** y el de sus hidrolizados. A partir del perfil de aminoácidos se pudo ver que los aminoácidos más abundantes fueron: Glu, Ala y Asp. Este resultado concuerda con lo observado para *P. columbina* (**Tabla IV.2**). Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de las algas rojas la proporción de aminoácidos ácidos es muy elevada (Fleurence, 1999).

La suma de Asp y Glu para **FP**, **T**, **A**, **TA** y **AT** fue 29,8, 29,2, 30,5 y 30,9 g 100g<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en otras algas del género *Porphyra*, tales como: *P. acanthophora* (27 g 100g<sup>-1</sup> de proteína) (Galland-Irmouli y col., 1999). Resulta oportuno acotar que el elevado contenido de aminoácidos ácidos y no polares, tal como la Ala, se debería a la presencia de las *ficobiliproteínas* en **FP** (Raps y col., 1985).

**Tabla IV.10** Perfil de aminoácidos de **FP** y sus hidrolizados

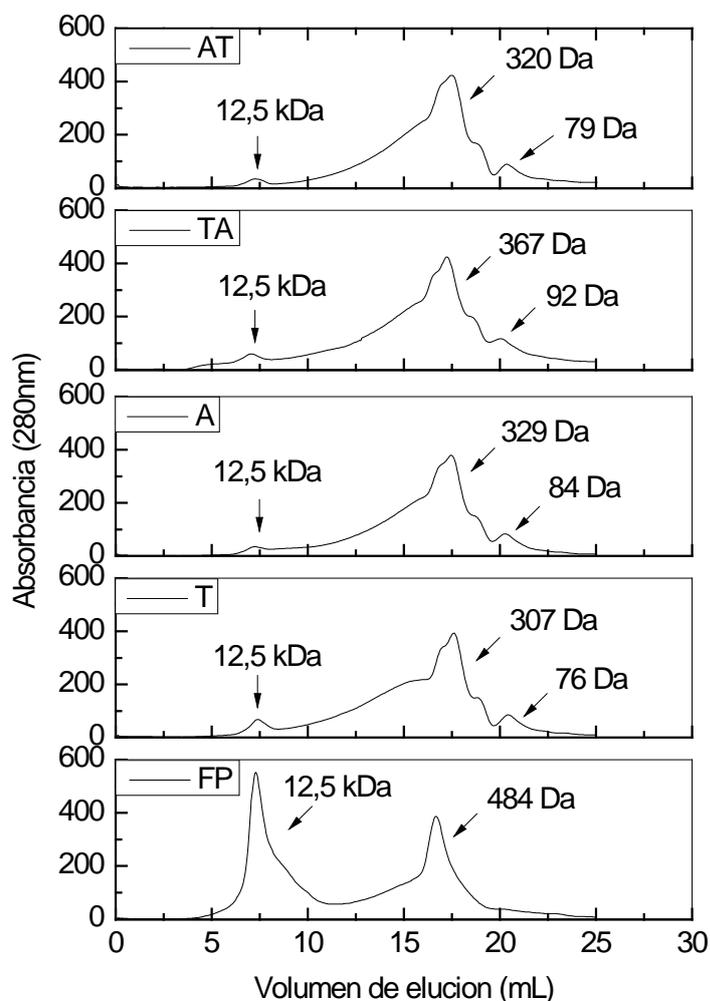
Aminoácido	Aminoácidos totales (g 100g <sup>-1</sup> proteína)				
	FP	T	A	TA	AT
Asp	13,5 ± 0,2	13,4 ± 0,1	13,3 ± 0,3	13,4 ± 0,1	13,5 ± 0,1
Glu	16,3 ± 0,5	16,0 ± 0,2	16,2 ± 0,1	15,9 ± 0,5	16,2 ± 0,1
Ser	5,6 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,3 ± 0,5	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,2
His	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3
Gly	8,8 ± 0,0	8,7 ± 0,3	8,9 ± 0,2	8,8 ± 0,1	8,7 ± 0,2
Thr	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,2	6,9 ± 0,3	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,1
Arg	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,0	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,0 ± 0,0
Ala	15,8 ± 0,3	15,9 ± 0,2	15,8 ± 0,3	15,8 ± 0,0	15,8 ± 0,1
Pro	5,2 ± 0,4	4,9 ± 0,2	5,0 ± 0,0	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,0
Tyr	1,6 ± 0,0	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,0
Phe	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,3
Val	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,0	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,2
Met	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,2
Cys	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,1
Ile	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,5
Trp	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Leu	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,5
Lys	4,0 ± 0,0	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,5

X ± DE

Por otro lado, se puede ver que el contenido de Thr, Leu, Ser, Gly y Pro fue relativamente elevado, mientras que la proporción de Cys, Met, His y Trp fue baja.

#### IV.2.2.2.c Perfil de pesos moleculares de FP y sus hidrolizados (HFP)

En la **Figura IV.9** se muestra el perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de FP y sus hidrolizados.



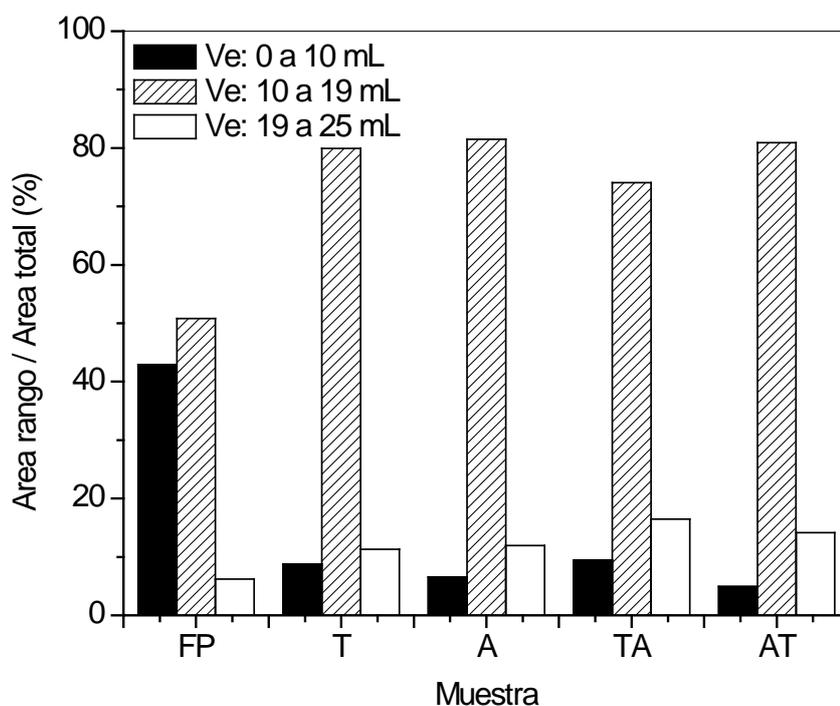
**Figura IV.9** – Perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de FP y HFP (FPLC).

FP exhibió dos picos (**Figura IV.9**), el primero corresponde a las proteínas presentes en esta fracción, cuyo peso molecular aparente fue superior a 12,5 kDa. El segundo pico corresponde a especies fundamentalmente de bajo peso molecular (484 Da), que fueron retenidas junto con las proteínas. Esto puede deberse a posibles interacciones entre las macromoléculas y las especies pequeñas durante la ultrafiltración. Cabe añadir que en este proceso se acumulan los solutos rechazados en la superficie de la membrana. Esto da lugar a un fenómeno de difusión de espalda que

disminuye la repulsión electrostática, favoreciendo las interacciones moleculares (Pouliot y col., 2006).

Los hidrolizados mostraron una degradación efectiva de las proteínas presentes en **FP** (> 12,5 kDa). Esto se manifestó en el perfil de pesos moleculares como una reducción casi completa del pico a 12,5 kDa con un ensanchamiento de la base del segundo pico (**Figura IV.9**). Este ensanchamiento, indicaría que el proceso de hidrólisis no sólo favorece la generación de péptidos pequeños, sino también de péptidos de tamaño molecular intermedio (**Figura IV.10**). Cabe señalar que el máximo del segundo pico en **HFP** está en torno a 340 Da, lo que indicaría que los péptidos pequeños generados tras la hidrólisis son mayoritarios. Si consideramos que el tamaño molecular promedio de un aminoácido es 120 Da, estas especies proteicas podrían ser *dipéptidos*. Además se pudo observar la aparición de un tercer pico de menor intensidad, cuyo peso molecular correspondería a aminoácidos libres (76 - 92 Da).

Cabe destacar que para el caso del hidrolizado **T** se observó un hombro entre los 15 y 16,3 mL de elución. Dicho rango corresponde a especies proteicas con pesos moleculares promedios de 2900 Da. Esto demuestra que en **T**, además de los péptidos de bajo peso molecular, hay una alta proporción de especies de tamaño intermedio.

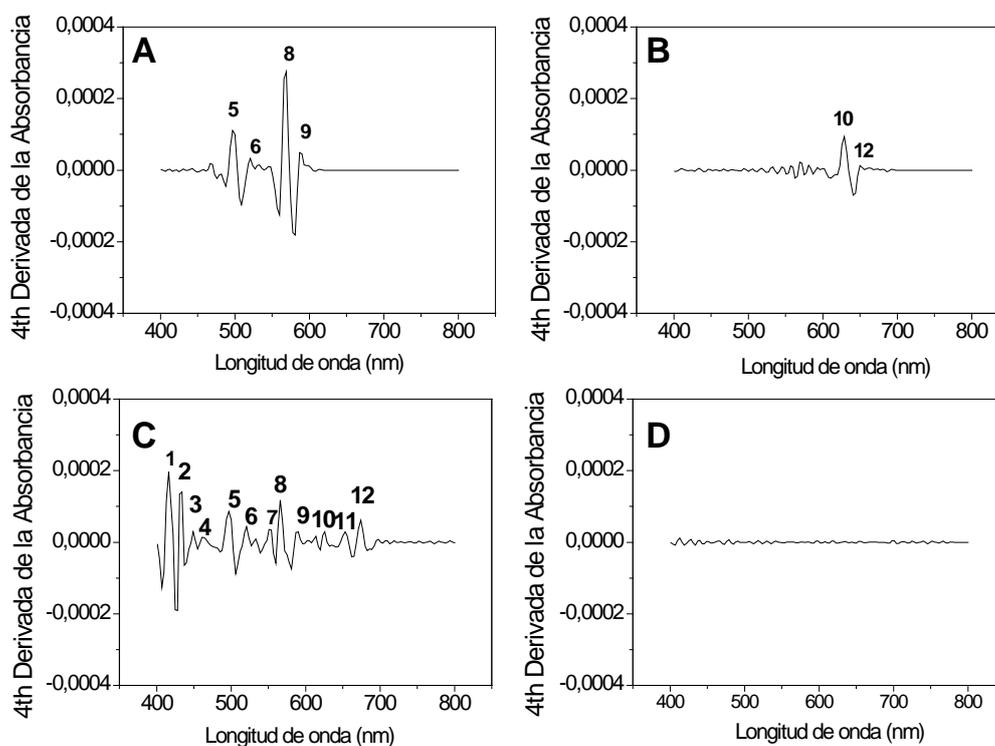


**Figura IV.10** – Relación de áreas para los tres picos obtenidos en el FPLC.

Como se puede apreciar en la **Figura IV.10**, el área comprendida entre 10 y 19 mL (segundo pico), aumentó significativamente luego del proceso de hidrólisis. El valor de **HFP** fue 56% mayor que el obtenido para **FP**. Para el caso del primer pico (área entre 0 y 10 mL), el valor hallado para **HFP** fue 83% menor al de **FP**. Esto demuestra, como se mencionó anteriormente, que el proceso de hidrólisis degradó efectivamente las proteínas presentes en la fracción ultrafiltrada, favoreciéndose la producción de péptidos con mediano y bajo peso molecular.

#### IV.2.2.2.d Cuarta derivada espectral de FP y sus hidrolizados (HFP)

En la **Figura IV.11** se muestran las gráficas correspondientes a las cuartas derivadas espectrales de *R-ficoeritrina*, *C-ficocianina*, **FP** y **HFP**.



**Figura IV.11** – Cuarta derivada obtenida a partir del barrido espectral de *R-ficoeritrina* (A), *C-ficocianina* (B), **FP** (C) y **HFP** (D) en buffer fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8).

**FP** exhibió 12 picos (**Figura IV.11.C**), 6 de los cuales están presentes en el perfil de *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina* (**Figura IV.11.A** y **B**, respectivamente). Los picos 5, 6, 8 y 9 corresponderían a la *R-ficoeritrina*, mientras que los picos 10 y 12 se deberían a la presencia de *C-ficocianina*. Como se mencionó anteriormente (**IV.2.2.1.b**), la evidencia de nuevos picos en la cuarta derivada espectral de **FP** podría deberse a la presencia de otros pigmentos en la fracción (*clorofila a* sin el grupo fitol).

Este resultado concuerda con el reportado por Sampath-Wiley y Neefus (2007), para la cuarta derivada espectral obtenida a partir del barrido en buffer fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> de *P. purpurea*.

Para el caso de **HFP** no fue posible distinguir ningún pico presente en **FP** (**Figura IV.11.D**). Esto demuestra, en concordancia con el **FPLC**, que las proteínas de **FP** fueron degradadas efectivamente. Cabe mencionar que durante la hidrólisis, los grupos cromóforos constituyentes de las *ficobiliproteínas* y los pigmentos no proteicos podrían ser liberados al medio de reacción. Esto favorecería la oxidación de los mismos, con la consecuente pérdida de las propiedades espectroscópicas (ausencia de picos de absorbancia).

### IV.2.2.3 Caracterización del residuo insoluble (R) y su hidrolizado (HR)

#### IV.2.2.3.a Composición de R

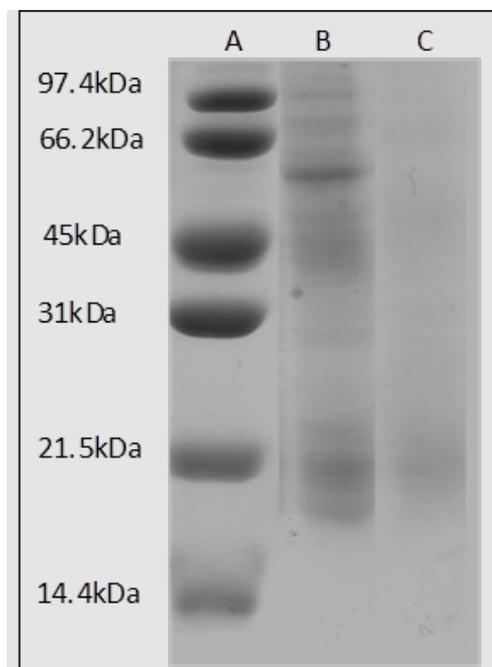
En la **Tabla IV.11** se muestra la composición elemental y centesimal de **R**. Puede observarse, que a pesar de ser un residuo de sucesivas extracciones acuosas (**Figura III.2**), tanto el remanente proteico como el de minerales continuó siendo elevado. Esto estaría indicando una fuerte asociación de estos compuestos con esta matriz residual. Como se mencionó anteriormente el alga *P. columbina* posee una elevada proporción de fibra, la cual podría estar interaccionando fuertemente con las proteínas, disminuyendo la eficiencia de extracción (Urbano y Goñi, 2002).

**Tabla IV.11** Composición elemental y centesimal de **R** expresado en base seca

Componentes	R (g 100g <sup>-1</sup> )
Cenizas	4,23 ± 0,13
Azufre	1,81 ± 0,04
Carbono	37,17 ± 0,21
Hidrógeno	6,79 ± 0,03
Nitrógeno	4,09 ± 0,05
Proteínas (Nx6,25)	25,53 ± 0,32
X ± DE	

#### IV.2.2.3.b Electroforesis SDS-PAGE de *P. columbina* y **R**

En la **Figura IV.11** se muestra el perfil electroforético de *P. columbina* y **R**.



**Figura IV.12** – Electroforesis SDS-PAGE. Patrón de pesos moleculares (A), *P. columbina* (B) y **R** (C).

Como se puede apreciar, el alga posee varias bandas proteicas comprendidas entre 14,4 y 94 kDa (línea B), siendo la banda correspondiente a 73 kDa característica del género *Porphyra* (Rouxel y col., 2001).

Para el caso de **R** (línea C), se puede ver una banda muy tenue alrededor de los 21,5 kDa, que también está presente en el alga. Esto indicaría que el proceso de extracción al cual se somete el alga permite extraer gran parte de sus componentes proteicos (31 a 97,4 kDa), quedando en **R** una fracción de bajo peso molecular.

#### IV.2.2.3.c Digestibilidad proteica (DP) y disponibilidad de minerales (DM) de **R**

Como se mencionó en el punto **IV.1.2**, la **DP** obtenida para el alga *P. columbina* fue similar a la hallada para otras algas rojas ( $74,33 \pm 3,0$  %). Sin embargo, el valor obtenido para **R** fue significativamente menor ( $59,02 \pm 0,40$  %). Esto podría estar relacionado con la fuerte interacción ya comentada de las proteínas de **R** con la matriz, lo que dificultaría su digestión enzimática.

La **Tabla IV.12** se muestran los valores del contenido y dializabilidad de los minerales: Ca, Fe y Zn de **R**.

**Tabla IV. 12** Contenido de minerales y dializabilidad de Ca, Fe y Zn de **R**

Mineral	Contenido (mg 100g <sup>-1</sup> bs)	Dializabilidad (%)
Ca	257,25 ± 10,77	20,42 ± 0,35
Fe	1,24 ± 4,19	1,75 ± 0,29
Zn	1,14 ± 0,35	14,54 ± 1,48

X ± DE, bs: base seca.

Si se tiene en cuenta el contenido de Ca, Fe y Zn en el alga *P. columbina* (Tabla IV.4), queda demostrado que el proceso de extracción produjo una disminución significativa de estos minerales en **R**. Este resultado concuerda con el contenido de cenizas obtenido para este residuo, el cual fue significativamente menor al hallado para el alga *P. columbina* (4,23 ± 0,13 vs. 6,46 ± 0,09 g 100g<sup>-1</sup> base seca).

En relación a la disponibilidad, **R** presentó mayor DCa y menor DFe y DZn que el alga. Sin embargo, a pesar de que las diferencias fueron significativas, son muy pequeñas y pueden no tener significado *in vivo*.

Por otra parte, los rangos de dializabilidad hallados concuerdan con los informados para otros alimentos (Dyner y col., 2007; Kamchan y col., 2004; Yang y Tsou, 2006; Cagnasso y col., 2010).

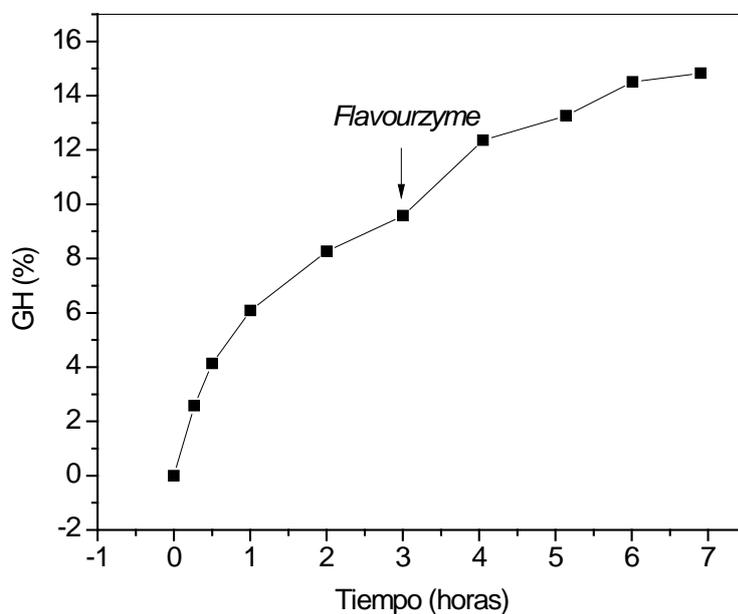
#### IV.2.2.3.d Caracterización del hidrolizado obtenido a partir de **R** (HR)

##### IV.2.2.3.d.1 Determinación del grado de hidrólisis (GH)

En la Figura IV.13, se muestra el seguimiento de la reacción de hidrólisis mediante la medición de aminos libres por OPA.

Como se puede apreciar, a medida que transcurrió el tiempo de reacción el grado de hidrólisis (**GH**) aumentó. Para la primera hora de reacción se produjo un aumento significativo del **GH**, lo que está relacionado con la acción de la enzima Fungal Protease Concentrate (**FC**). Cabe aclarar que esta enzima, además de poseer actividad endopeptidasa también presenta actividad exopeptidasa, lo que favorece la liberación rápida de aminoácidos, di y tri-peptidos, responsables del rápido incremento de **GH**. Posteriormente, se observó un aumento gradual del **GH** hasta alcanzar un valor de aproximadamente 10% a las tres horas de reacción. Al cabo de ese tiempo, hubo un

marcado incremento del **GH** relacionado con el agregado de la enzima Flavourzyme (**F**). Esta enzima posee principalmente acción exopeptidasa, lo que facilita una proteólisis más completa del sustrato (Chang y col., 2007). El GH obtenido al final del proceso secuencial (7 horas), fue de  $14,20 \pm 0,28$  %.



**Figura IV.13** – Seguimiento de la reacción de hidrólisis secuencial de R llevada a cabo con las enzimas Fungal Protease Concentrate (FC) y Flavourzyme (F).

#### IV.2.2.3.d.2 Composición de HR

En la **Tabla IV.13** se muestra la composición elemental y centesimal de **HR**.

**Tabla IV.13** Composición elemental y centesimal de **HR** expresado en base seca

Componentes	HR (g 100g <sup>-1</sup> )
Azufre	$2,08 \pm 0,1$
Carbono	$40,76 \pm 0,28$
Hidrógeno	$9,47 \pm 0,08$
Nitrógeno	$4,38 \pm 0,16$
Proteínas (Nx6,25)	$27,39 \pm 1,03$
X ± DE	

Como se puede apreciar, hubo un incremento significativo en el contenido de S, C, H, N y de proteínas en **HR** respecto a **R** (**Tabla IV.11**). Cabe mencionar que el hidrolizado consiste en la fracción solubilizada por hidrólisis enzimática del residuo, lo cual justifica la composición diferente.

#### **IV.2.2.3.d.3 Perfil de aminoácidos de R y su hidrolizado (HR)**

En la **Tabla IV.14** se muestra el perfil de aminoácidos de **R** y su hidrolizado. Siguiendo la tendencia observada en los anteriores perfiles aminoacídicos (**Tabla IV.2** y **Tabla IV.10**), los aminoácidos más abundantes tanto en **R** como en **HR** fueron: Asp, Ala y Glu. La suma de Asp y Glu para **R** y **HR** fue 20,3 y 22,6 g 100g<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en otras algas rojas tales como: *P. acanthophora* (19,5 g 100g<sup>-1</sup> de proteína, Lourenço y col., 2004) y *G. birdiae* (22 g 100g<sup>-1</sup> de proteína, Gressler y col., 2010). Por otro lado, el contenido de Ala y Leu fue similar al hallado por Galland-Irmouli y col. (1999), para el alga *P. palmata* (12,2 g 100g<sup>-1</sup> de proteína y 8,2 g 100g<sup>-1</sup> de proteína, respectivamente).

Cabe mencionar que el contenido de Asp, Glu, Ala y Trp en **HR** fue significativamente superior al de **R**, mientras que el contenido de Met, Cys y Phe fue significativamente inferior. Esto se ve claramente en los valores obtenidos para la relación aminoacídica entre ambas muestras (**A<sub>HR</sub> / A<sub>R</sub>**). En este sentido, la proporción obtenida para Trp y Cys fue: 2,1 y 0,5, respectivamente. Lo que indicaría que **HR** posee el doble de Trp y la mitad de Cys que **R**.

Los aminoácidos libres hallados en **HR** fueron: Asp, Glu, Ala, Ile, Leu, Phe y Lys. Dentro de éstos, el más abundante fue Asp (0,31 ± 0,02 g 100g<sup>-1</sup> de proteína), siguiéndole en proporción Leu (0,23 ± 0,01 g 100g<sup>-1</sup> de proteína). La presencia de estos aminoácidos libres en el hidrolizado podría deberse principalmente a la acción de la enzima **F** y en menor medida a la enzima **FC**. Como se mencionó anteriormente, la acción *exopeptidasa* facilita una proteólisis efectiva del sustrato, favoreciendo la liberación de tri- y di-péptidos, además de aminoácidos libres (Vioque y col., 1999; Cian, 2009).

Como se puede apreciar en la **Tabla IV.14**, hay una alta probabilidad de que los péptidos presentes en **HR** estén constituidos principalmente por los aminoácidos: Asp, Ala, Glu, Gly y Leu.

**Tabla IV.14** Perfil de aminoácidos de **R** y su hidrolizado

Aminoácido	Aminoácidos totales		A <sub>HR</sub> / A <sub>R</sub> (%)	A <sub>HR</sub> - A <sub>LHR</sub> (g 100g <sup>-1</sup> )
	(g 100g <sup>-1</sup> proteína)			
	R	HR		
Asp	11,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,1	12,0 ± 0,09
Glu	9,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,1	10,1 ± 0,01
Ser	6,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,0	6,4 ± 0,10
His	1,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,8	1,0 ± 0,02
Gly	9,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,0	9,6 ± 0,18
Thr	6,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,0	6,4 ± 0,01
Arg	6,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,9	6,4 ± 0,07
Ala	10,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,2	12,0 ± 0,10
Pro	3,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,0	3,5 ± 0,21
Tyr	2,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8	2,3 ± 0,01
Val	6,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,0	6,8 ± 0,01
Met	1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8	1,5 ± 0,05
Cys	1,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,5	0,9 ± 0,03
Ile	3,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,9	2,9 ± 0,06

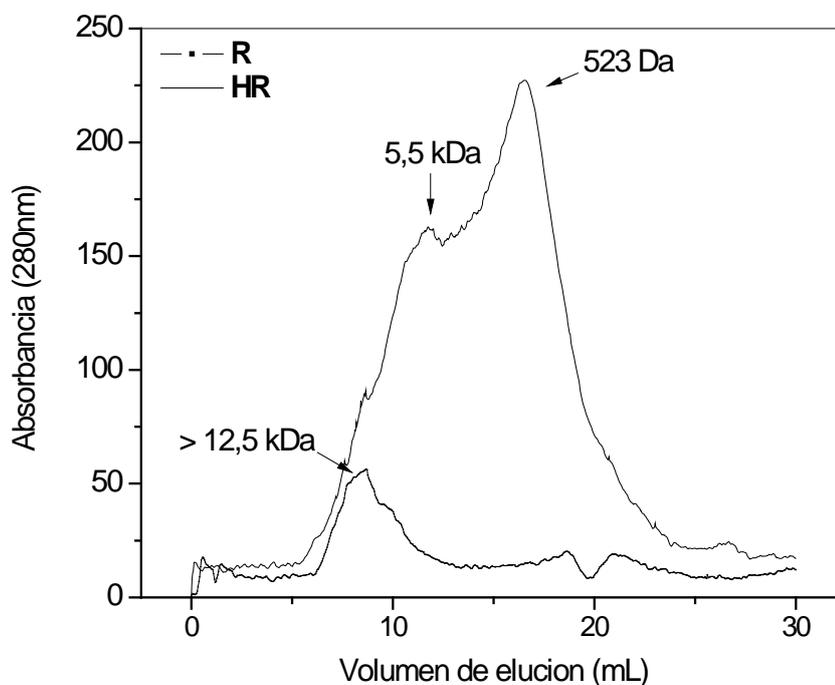
*Resultados y Discusión*

Trp	$0,3 \pm 0,0^a$	$0,6 \pm 0,0^b$	2,1	$0,6 \pm 0,09$
Leu	$8,4 \pm 0,5^a$	$8,0 \pm 0,0^a$	1,0	$7,8 \pm 0,01$
Phe	$4,3 \pm 0,0^b$	$3,6 \pm 0,1^a$	0,8	$3,5 \pm 0,05$
Lys	$6,0 \pm 0,1^a$	$5,4 \pm 0,5^a$	0,9	$5,2 \pm 0,02$

$X \pm DE$ .  $A_{HR} / A_R$  (%): proporción de aminoácidos.  $A_{HR} - A_{LHR}$  (%): proporción de aminoácidos peptídicos en **HR** (aminoácidos totales - aminoácidos libres). Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.2.2.3.d.4 Perfil de pesos moleculares de **R** y su hidrolizado (**HR**)

En la **Figura IV.14** se muestra el perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de **R** y su hidrolizado. **R** exhibió un pico principal cuyo peso molecular aparente fue superior a 12,5 kDa. Este pico correspondería a las proteínas presentes en **R**. Este resultado concuerda con el perfil electroforético (**Figura IV.12**), en donde se observó una banda proteica tenue alrededor de los 21,5 kDa. Por lo tanto, las proteínas eluidas a los 8,67 mL tendrían un tamaño molecular de aproximadamente 21,5 kDa.



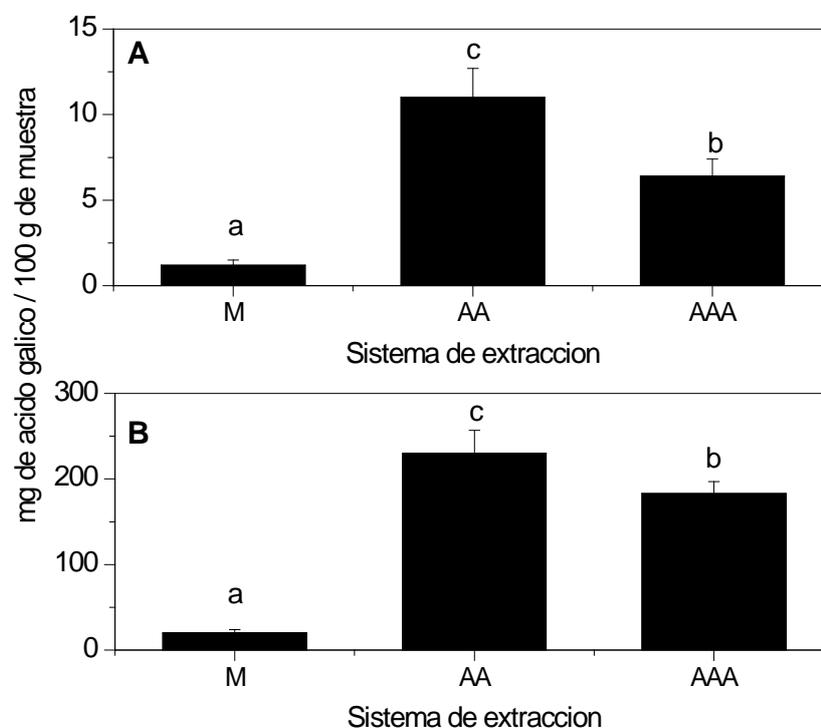
**Figura IV.14** – Perfil de pesos moleculares menores a 12,5 kDa de **R** y **HR** (FPLC).

Para el caso de **HR** se observaron dos picos. El primero corresponde a una fracción proteica cuyo peso molecular aparente es de aproximadamente 5,5 kDa, mientras que el segundo pico corresponde a péptidos con un tamaño promedio de 523 Da. Este resultado indicaría que el proceso de hidrólisis favoreció la generación de polipéptidos y especies proteicas de bajo peso molecular. Cabe señalar que la fracción peptídica de 523 Da parecería ser la más abundante en **HR**, ya que la intensidad del segundo pico fue mayor que la del primero. Si consideramos que el tamaño molecular promedio de un aminoácido es 120 Da, esta fracción podría estar formada por *tetra-péptidos*.

#### IV.2.2.3.d.5 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE) de R y HR

En las **Figuras IV.15.A** y **B** se muestra el contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE), a partir de **R** y **HR**, respectivamente.

Como se puede observar tanto para **R** como para **HR**, el sistema AA permitió obtener los mayores niveles de **CFE**, mientras que con el sistema M se obtuvo el menor valor. Estas diferencias en el contenido de **CFE**, obtenidas para los distintos sistemas extractivos, estarían relacionadas con las especies presentes en la muestra y la interacción de éstas con los diferentes solventes.



**Figura IV.15** – Contenido de compuestos fenólicos extractables a partir de R (A) y HR (B), con diferentes sistemas de extracción (metanol: M, acetona / agua: AA y acetona /

agua / ácido acético: AAA). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En base a estos resultados se puede decir que el sistema AA resultó apropiado para extraer los compuestos fenólicos a partir de **R** y **HR**, siendo el sistema metanólico inapropiado. Estos resultados concuerdan con los reportados por Turkmen y col. (2007), quienes observaron que los mayores rendimientos de extracción de polifenoles a partir de Té negro se obtenían con las mezclas de solventes (acetona/agua, etanol/agua y metanol/agua) y no con los mismos solventes puros.

Como se mencionó anteriormente para *P. columbina*, la presencia de agua en el sistema extractivo generaría un ambiente más polar lo que facilitaría una mayor solubilización de los diferentes compuestos fenólicos (Sultana y col., 2009; Uma y col., 2010; Mohammedi y Atik, 2011). Además, la acetona actuaría como inhibidor de la formación de complejos proteínas - polifenoles durante el proceso de extracción, rompiendo los enlaces puente de hidrógeno establecidos entre los grupos carboxilos de las proteínas y los anillos fenólicos (Wang y col., 2009). Ambos efectos se traducirían en una mayor solubilización de los compuestos fenólicos extractables. Por último, la mezcla acetona/agua es capaz de extraer compuestos fenólicos de ambos extremos de polaridad (alta y baja) (Uma y col., 2010), así como también polifenoles de polaridad moderada (Zhang y col., 2007; Singh y col., 2011), abarcando un amplio rango de especies fenólicas, lo que se manifiesta en estos resultados (**Figura IV.15**).

Resulta oportuno acotar que el comportamiento observado con **R** difiere al obtenido con *P. columbina* (mayor **CFE** con los sistemas AA y AAA) (**Figura IV.1**). Esto puede deberse a que los **CFE** retenidos en el residuo poseen distinta solubilidad que los de partida contenidos en el alga. Además, dicho contenido fue significativamente inferior al de *P. columbina*, lo que estaría indicando una gran solubilización durante las diferentes etapas de extracción del proceso (especialmente en la **Etapa I**).

Por otro lado, se pudo ver que el valor de **CFE** en **HR** fue significativamente mayor al de **R**. Este resultado concuerda con el hallado por Wang y col. (2010), para hidrolizados del alga *P. palmata*. Como es sabido, la proteólisis permite la liberación de péptidos y aminoácidos libres. Conjuntamente con estas fracciones proteicas se liberarían los compuestos fenólicos ligados a las proteínas mediante uniones del tipo

punto de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas (Siriwardhana y col., 2008; Wang y col., 2010), favoreciéndose su extracción y solubilización.

#### **IV.2.3 Conclusiones parciales**

- ✓ La menor solubilidad proteica de *P. columbina* en agua a temperatura ambiente se obtuvo a pH 2,0. Conforme el pH aumentó, los valores de solubilidad fueron creciendo, siendo máximos a pHs alcalinos. Este descenso a pHs ácidos se asoció con el punto isoelectrico de las *ficobiliproteínas*, el cual se sabe está en torno a 4,3.
- ✓ El pH de extracción más apropiado para solubilizar la mayor proporción de *ficobiliproteínas*, sin que pierdan su funcionalidad fue 7,0. Además, se observó que a las dos horas de proceso el sistema alcanzó el equilibrio de extracción sólido – líquido y que el tiempo de centrifugación no afectó la proporción de sólidos en el sobrenadante en el rango evaluado, por lo que se escogió como tiempo óptimo de centrifugación 30 minutos.
- ✓ Con respecto a la obtención de *ficocoloides*, la condición que permitió obtener el mayor rendimiento de sólidos con el menor contenido proteico a partir del residuo de extracción en agua a 25 °C fue una extracción en agua a 95°C y pH 7,0 durante 2 horas. El nivel de sólidos obtenido en esta etapa estuvo directamente asociado con la temperatura de extracción, la cual favoreció la solubilización de los *ficocoloides* presentes en la estructura celular del alga. Sin embargo, debido a la fuerte interacción *proteína – ficocoloide* que existe en la pared celular de las algas rojas, fue imposible obtener una fracción de ficocoloides totalmente libre de proteínas. El tiempo óptimo de centrifugación luego del proceso extractivo a 95°C fue 45 minutos.
- ✓ El proceso de extracción más conveniente en función de los objetivos perseguidos (obtención de *ficobiliproteínas* en primer lugar y *ficocoloides* en segundo), consistió de una primera etapa de extracción en agua a temperatura ambiente y pH 7,0 durante 2 horas (**Etapa I**), seguida de una segunda etapa extractiva en agua a 95°C y pH 7,0 durante el mismo período de tiempo (**Etapa II**).
- ✓ El contenido proteico de **FP** fue dos veces mayor que el de **FF**, siendo la proporción de *R-ficoeritrina* 17 veces superior. La proporción de hidratos de carbono totales en **FP** no fue despreciable y podría atribuirse a la presencia de carragenanos con baja capacidad de gelificación. No obstante, los niveles hallados para **FF** fueron significativamente superiores.

---

*Resultados y Discusión*

---

- ✓ El nivel de **CFE** en agua de **FP** fue 7 veces superior al encontrado en **FF**, siendo posible detectar en su forma libre: epicatequina, ácido p-cumárico, quercitina y kaempferol. Luego de la hidrólisis ácida de **FP**, el contenido de ácido gálico, catequina y epicatequina aumento notablemente. Este incremento pudo deberse a que la hidrólisis ácida desfavoreció la interacción *proteínas – polifenoles*, además de permitir la despolimerización de los compuestos fenólicos.
- ✓ El espectro en el rango 400 – 700 nm y la EF de **FP** demostraron la presencia de **R-ficoeritrina** y **C-ficocianina**. Además, se observó la presencia de otros pigmentos en esta fracción y de otras proteínas, distintas de las *ficobiliproteínas*, cuyos pesos moleculares aparentes estuvieron comprendidos entre 45 – 66,2 kDa y 14 kDa.
- ✓ La EF de **FF** sólo presentó bandas con peso molecular aparente inferior a 21,5 kDa. Esto demostró que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las *ficobiliproteínas* están presentes en dicha fracción y que la subunidad  $\gamma$  fue totalmente removida durante la **Etapa I**.
- ✓ El espectro FTIR de **FF** mostró las bandas características de los *porfiranos*. De su análisis se pudo ver que las moléculas de D-galactosa y 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa, presentes en la fracción, carecerían de sulfatación en el C2, pero tendrían un pequeño grado de sustitución en el C6 de la D-galactosa.
- ✓ El espectro FTIR de **FP** fue muy distinto al obtenido con **FF**, siendo la banda asignada al esqueleto de los galactanos más importante que la exhibida por **FF** y las bandas atribuidas a la vibración del enlace **S=O** de los grupos sulfatos, muy débiles. Esto hace suponer una mayor proporción de *carragenanos / agaranos (porfiranos)* en esta fracción.
- ✓ Respecto a los hidrolizados de **FP**, el **GH** obtenido con el sistema **A** fue superior al alcanzado con el sistema **T**, para el mismo tiempo de hidrólisis. Esto indicó que la enzima Alcalasa fue más efectiva que la enzima Tripsina para degradar las proteínas presentes en **FP**. El mayor **GH** se obtuvo hidrolizando primero con Alcalasa y luego con Tripsina (**AT**). Sin embargo, cuando se invirtió el orden de las enzimas, el **GH** fue apenas superior al alcanzado con Tripsina (**T**). La pobre acción de Alcalasa en el sistema **TA** se atribuyó a la falta de sitios específicos en el sustrato luego de haber actuado la Tripsina.
- ✓ No hubo diferencias significativas entre el contenido de aminoácidos de **FP** y el de sus hidrolizados, siendo los aminoácidos más abundantes: Glu, Ala y Asp.
- ✓ **FP** exhibió dos picos en el perfil de pesos moleculares, correspondiendo el primero a las proteínas presentes en esta fracción mayores a 12,5 kDa. El segundo pico se

---

*Resultados y Discusión*

---

atribuyó a especies fundamentalmente de bajo peso molecular (484 Da), que fueron retenidas junto con las proteínas durante el proceso de ultrafiltración.

- ✓ Los hidrolizados mostraron una degradación efectiva de las proteínas presentes en **FP**, lo que se manifestó en el perfil de pesos moleculares como una reducción casi completa del pico a 12,5 kDa y con un ensanchamiento de la base del segundo pico. Además, se observó que el proceso de hidrólisis no sólo favoreció la generación de péptidos pequeños, sino también de péptidos de tamaño molecular intermedio.
- ✓ Los péptidos pequeños generados tras la hidrólisis fueron mayoritarios, ya que se obtuvo un máximo en torno a 340 Da en los hidrolizados (*dipéptidos*). Además se pudo observar la aparición de un tercer pico de menor intensidad, cuyo peso molecular correspondería a aminoácidos libres.
- ✓ **FP** exhibió 12 picos en la cuarta derivada espectral, 6 de los cuales estuvieron presentes en el perfil de *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*. Los picos restantes corresponderían a otros pigmentos presentes en la fracción. En la cuarta derivada espectral de los hidrolizados no se observó ningún pico, lo que demostró una efectiva degradación de las proteínas presentes y la desnaturalización de los pigmentos no proteicos.
- ✓ El contenido proteico y de minerales de **R** continuó siendo elevado a pesar de ser un residuo que sufrió numerosos lavados. Esto estaría indicando una fuerte asociación de estos compuestos con esta matriz residual.
- ✓ En el perfil electroforético de **R** se vio una banda proteica muy tenue, también presente en el alga, lo que indicaría que el proceso de extracción al cual se somete el alga permite solubilizar gran parte de sus componentes proteicos, quedando en **R** una fracción de bajo peso molecular.
- ✓ El valor de **DP** obtenido para **R** fue inferior al del alga *P. columbina*. Esto podría estar relacionado con la fuerte interacción de las proteínas de **R** con la matriz, lo que dificultaría su digestión enzimática.
- ✓ El proceso de extracción produjo una disminución significativa de Ca, Fe y Zn, lo que fue evidenciado en **R**. En relación a la bioaccesibilidad, **R** presentó mayor DCa y menor DFe y DZn que el alga.
- ✓ Respecto a la hidrólisis de **R**, el agregado de una exopeptidasa en forma secuencial permitió aumentar el **GH** significativamente, lo que estuvo asociado con la acción de la enzima **F**, ya que favoreció la liberación rápida de aminoácidos, di y tri-peptidos, responsables del rápido incremento de **GH**.

## *Resultados y Discusión*

---

- ✓ Los aminoácidos más abundantes tanto en **R** como en **HR** fueron: Asp, Ala y Glu. Sin embargo, el contenido de dichos aminoácido en **HR** fue significativamente superior al de **R**. La acción de la enzima **F** favoreció la generación de aminoácidos libres en **HR**, siendo los mismos: Asp, Glu, Ala, Ile, Leu, Phe y Lys.
- ✓ **R** presentó componentes proteicos cuyo peso molecular aparente fue superior a 12,5 kDa. Sin embargo, **HR** presentó una fracción proteica de 5,5 kDa y otra mayor que correspondería a péptidos con un tamaño promedio de 523 Da (*tetra-péptidos*.)
- ✓ El sistema acetona / agua permitió obtener los mayores niveles de **CFE** tanto en **R** como en **HR**. No obstante, el valor en **HR** fue significativamente superior al del sustrato (**R**), lo que indica que el proceso de hidrólisis permitió liberar a los compuestos fenólicos retenidos en **R**.

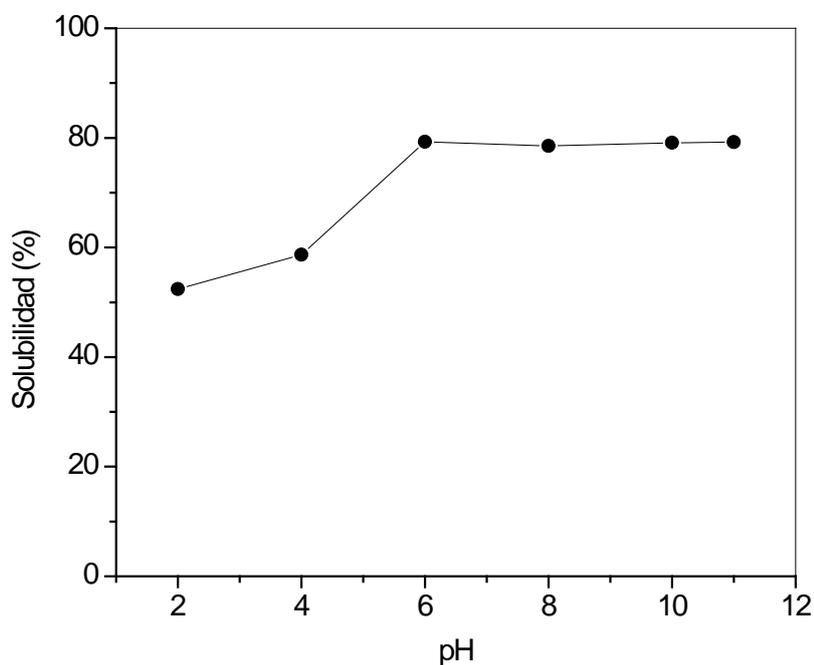
---

## Capítulo IV.3 Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las fracciones: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas

### IV.3.1 Propiedades de hidratación

#### IV.3.1.1 Solubilidad proteica de FP

En la **Figura IV.16** se muestra el porcentaje de solubilidad proteica de **FP** a diferentes pHs (2,0 - 11,0).

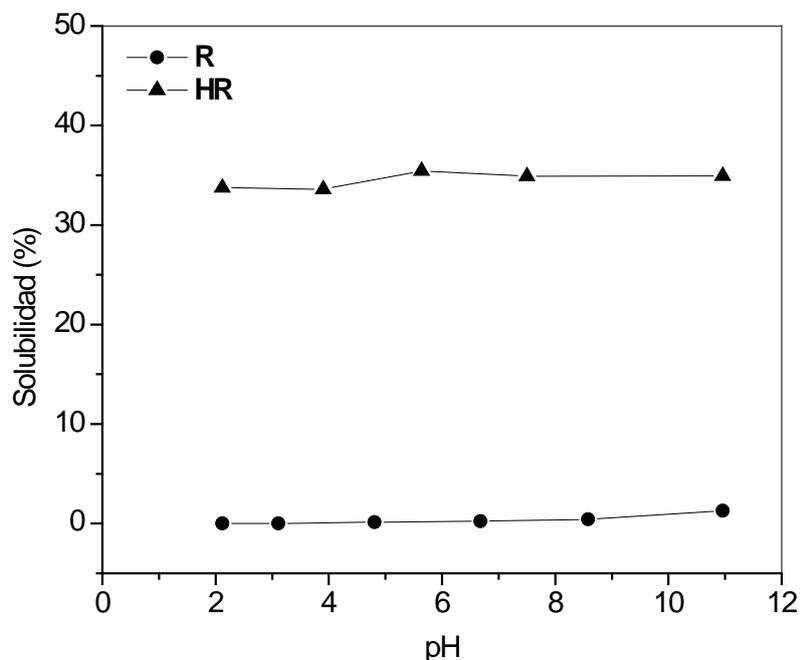


**Figura IV.16** – Porcentaje de solubilidad proteica de FP a diferentes pHs.

Como se puede observar en la **Figura IV.16**, **FP** presentó una elevada solubilidad proteica en el rango de pHs evaluados, siendo mayor entre pH neutro y alcalino. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que **FP** está constituida por componentes solubles en agua a temperatura ambiente del alga *P. columbina* (**Figura III.2**). Cabe destacar que el descenso de la solubilidad, conforme el pH disminuye, puede deberse al punto isoeléctrico de las *ficobiliproteínas*. Como se mencionó anteriormente, el punto isoeléctrico de la *ficoeritrina* se encuentra en torno a 4,3 (Orta-Ramirez y col., 2000), lo que favorecería la precipitación proteica en ese rango de pH. No obstante, el porcentaje de solubilidad a pH 2,0 siguió siendo elevado ( $52,4 \pm 0,4\%$ ).

### IV.3.1.2 Solubilidad proteica de R y HR

En la **Figura IV.17** se muestra el porcentaje de solubilidad proteica de **R** y su hidrolizado (**HR**).



**Figura IV.17** – Porcentaje de solubilidad proteica de R y HR a diferentes pHs.

**R** presentó muy baja solubilidad proteica en todo el rango de pH evaluado (2,0 – 11,0), siendo la misma ligeramente mayor a pH alcalino ( $1,28 \pm 0,06\%$ ). Esta baja solubilidad es de esperar, ya que este residuo es el producto final del proceso de extracción en agua a 25 y 95°C (**Figura III.2**), en donde se favorece la solubilización y extracción de las proteínas solubles en ambas condiciones. De esta manera, en **R** sólo quedan proteínas ligadas a fibra principalmente u otro tipo de componentes lo que dificulta su solubilización.

Por otro lado, la solubilidad de **HR** estuvo en torno al 35% en el rango de pH evaluado (2,0 – 11,0) y fue significativamente mayor a la obtenida para **R**. Este incremento se debe al proceso de hidrólisis, ya que durante la reacción se generan componentes de menor peso molecular como aminoácidos libres, di-péptidos, tri-péptidos (**Figura IV.14**), lo que aumenta el número de grupos polares (aminos y carboxilos), favoreciéndose la formación de enlaces tipo puentes de hidrógeno con el agua e incrementándose así la solubilidad (Balti y col., 2011).

### IV.3.2 Propiedades reológicas de FP y FF

Los datos experimentales obtenidos al evaluar el comportamiento reológico de ambas dispersiones acuosas (**FP** y **FF**), ajustaron satisfactoriamente con el modelo de Ostwald de Waele ( $r^2 = 0,9970$ ). Los parámetros obtenidos a partir de este modelo (**K** y **n**), y la viscosidad aparente se muestran en la **Tabla IV.15**.

**Tabla IV.15** Propiedades reológicas de las dispersiones obtenidas a partir de **FP** y **FF**

Fracción	Parámetros de Ostwald de Waele		Viscosidad aparente (mPa s)		
	K (Pa s <sup>n</sup> )	n	D = 60 s <sup>-1</sup>	D = 300 s <sup>-1</sup>	D = 500 s <sup>-1</sup>
FP	$2,9 \cdot 10^{-3} \pm 5,0 \cdot 10^{-4a}$	$1,01 \pm 0,07^b$	$2,9 \pm 0,5^a$	$2,9 \pm 0,5^a$	$2,9 \pm 0,5^a$
FF	$4,07 \pm 0,43^b$	$0,39 \pm 0,01^a$	$337,3 \pm 23,5^b$	$124,0 \pm 6,6^b$	$89,2 \pm 4,2^b$

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

La viscosidad de **FP** fue independiente de la velocidad de deformación (**D**). Sin embargo, para **FF** se observó un descenso de la misma a medida que aumentó **D**. El valor hallado de índice de flujo (**n**) para **FP** fue  $\approx 1$ , mientras que para **FF** fue  $< 1$ . Como se sabe, **n** es una medida del grado de desviación del comportamiento *newtoniano*, siendo mayor a 1 para fluidos *dilatantes*, iguales a 1 para *newtonianos* y menor a 1 para *pseudo-plásticos* (Muller, 1977). En base a estos resultados, se podría decir que la dispersión acuosa de **FP** exhibe un comportamiento del tipo *newtoniano*, mientras que la obtenida con **FF** muestra un comportamiento del tipo *pseudo-plástico*.

Las diferencias observadas en el comportamiento reológico de ambas fracciones podrían estar relacionadas con la proporción de las especies moleculares presentes en cada una de ellas (*proteínas* y *ficocoloides*). Como se mencionó anteriormente, el contenido de hidratos de carbonos de **FF** fue mayor al de **FP**, mientras que el nivel proteico resultó menor (**Tabla IV.7**). Además en **FP** se observó la presencia de componentes de bajo peso molecular. En base a esto, se podría pensar que el comportamiento *pseudo-plástico* de las dispersiones de **FF** se debe principalmente a la presencia *porfiranos* y *carragenanos*, mientras que el comportamiento *newtoniano* en **FP** se debería a la presencia *proteínas* y especies de bajo tamaño molecular. En concordancia con esto, Lizarraga y col. (2006) reportaron un comportamiento del tipo

*newtoniano* para dispersiones acuosas de proteínas del suero lácteo al 2% P/P, mientras que Marcotte y col. (2001) encontraron un comportamiento del tipo *pseudo-plástico* para dispersiones acuosas de *carragenanos* al 1% P/P. El comportamiento *pseudo-plástico* observado en las soluciones de *carragenanos* a bajas concentraciones podría explicarse en términos de alineación polimérica. Los polímeros se alinearían en dirección al flujo a medida que aumenta el esfuerzo de corte. Esto favorece la separación de las cadenas poliméricas y trae como resultado el descenso de la viscosidad aparente (Prentice, 1984).

Como se ve en la **Tabla IV.15**, los valores de viscosidad aparente para **FF** fueron significativamente superiores al hallado para **FP**. En este mismo sentido, el índice de consistencia (**K**) de **FF** fue mucho mayor al de **FP**. Esto indica que las dispersiones de **FF** son más viscosas que las obtenidas con **FP**. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la viscosidad intrínseca de cada dispersión. Al respecto, los valores hallados para **FP** y **FF** fueron:  $0,38 \pm 0,02 \text{ dL g}^{-1}$  y  $80,91 \pm 2,40 \text{ dL g}^{-1}$ , respectivamente. La mayor viscosidad en las dispersiones de **FF** es atribuida a la alta proporción de *ficocoloides* que posee esta fracción. Como se sabe, estos polímeros son altamente hidrofílicos y retienen grandes cantidades de moléculas de agua cuando están desplegados en medio acuoso, lo que incrementa su radio hidrodinámico. Este fenómeno, sumado al gran tamaño molecular que poseen, favorece el aumento de la viscosidad de la solución (Muller, 1977).

### **IV.3.3 Propiedades filmogénicas**

#### **IV.3.3.1 Contenido de proteínas, hidratos de carbonos totales y compuestos fenólicos extractables de las dispersiones filmogénicas**

En la **Tabla IV.16** se muestra el contenido de proteínas, hidratos de carbonos totales y compuestos fenólicos extractables de las dispersiones filmogénicas. Como puede observarse, el contenido de proteínas y **CFE** aumentó con el incremento de **FP** en la dispersión filmogénica. Sin embargo, el contenido de hidratos de carbonos totales disminuyó. Estos resultados son lógicos, ya que **FP** posee el doble de proteínas que **FF** y el contenido de **CFE** en esta fracción es 7 veces superior (**IV.2.2.1.a**). A su vez, el elevado nivel de hidratos de carbonos en **FF** se va diluyendo conforme aumenta la proporción de **FP**. En base a estos resultados se podría decir que la adición de **FP** a la

dispersión filmogénica, no sólo estaría aportando proteínas y especies de bajo peso molecular (484 Da), sino también compuestos fenólicos.

**Tabla IV.16** Contenido de proteínas, hidratos de carbonos totales y compuestos fenólicos extractables de las dispersiones filmogénicas

<b>Dispersión</b>	<b>Proteínas (g 100 g<sup>-1</sup> dispersión)*</b>	<b>Hidratos de carbonos totales (g 100 g<sup>-1</sup> dispersión)*</b>	<b>CFE (mg ácido gálico 100 g<sup>-1</sup> dispersión)</b>
FP <sub>0</sub>	0,14	0,72	1,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
FP <sub>25</sub>	0,18	0,67	5,06 ± 0,13 <sup>b</sup>
FP <sub>50</sub>	0,21	0,61	6,72 ± 0,12 <sup>c</sup>
FP <sub>75</sub>	0,25	0,56	6,99 ± 0,13 <sup>d</sup>
FP <sub>100</sub>	0,28	0,50	7,40 ± 0,10 <sup>e</sup>

X ± DE. \*Proteínas e hidratos de carbonos totales calculados en base a la composición de cada fracción. CFE: contenido de compuestos fenólicos extractables. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

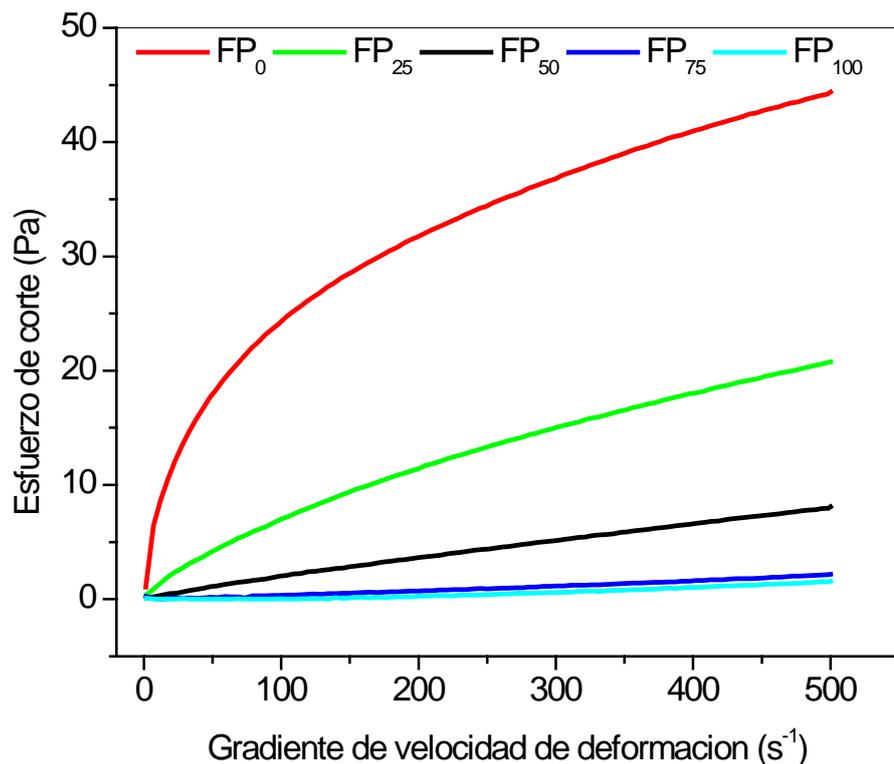
Además, el agregado de **FP** aumentó el nivel de *ficobiliproteínas* en las dispersiones filmogénicas, viéndose reflejado en el color de las películas obtenidas a partir de éstas (ver apariencia de las películas).

### III.3.3.2 Propiedades reológicas de las dispersiones filmogénicas

La relación entre la tensión de corte y el gradiente de velocidad de las dispersiones filmogénicas se muestra en la **Figura IV.18**.

Para el caso de FP<sub>25</sub> y FP<sub>50</sub> el comportamiento de flujo fue del tipo *pseudo-plástico*. Este resultado concuerda visto para **FF** (**Tabla IV.15**), y con lo observado por Lizarraga y col. (2006) para dispersiones acuosas de *λ-carragenina* al 1% P/P. Sin embargo, al aumentar la proporción de **FP** en la dispersión filmogénica (> 50% P/P), el comportamiento de flujo tiende a ser *newtoniano* (**Tabla IV.17**).

Además del cambio en el comporamiento del flujo (índice **n**; **Tabla IV.17**), la viscosidad de la dispersión va disminuyendo a medida que aumenta la proporción de **FP** en la dispersión filmogénica (**Figura IV.18**). Esto se atribuye al efecto de dilución que ocasiona esta fracción sobre los *ficocoloides* presentes. Como se mencionó anteriormente, **FP** aportaría proteínas y componentes de bajo peso molecular que reducen la resistencia al flujo de la dispersión.



**Figura IV.18** – Relación entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad de las dispersiones filmogénicas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>).

En concordancia con los resultados obtenidos para las curvas de flujo de cada dispersión filmogénica, el incremento de **FP** ocasionó un descenso en la consistencia y un aumento en el índice de flujo de las dispersiones hasta llegar a un valor cercano a la unidad para FP<sub>75</sub> (*newtoniano*); los valores hallados para las dispersiones FP<sub>100</sub> y FP<sub>0</sub> ya fueron presentados en la **Tabla IV.15**.

Resulta oportuno destacar que las propiedades reológicas de las dispersiones son muy importantes para la elaboración de películas, ya que son motivo de defectos en el producto final (Han y Gennadios, 2005). En este sentido, la homogenización de dispersiones altamente viscosas es muy difícil, y en consecuencia, se obtienen

películas muy heterogéneas. Además, la elevada viscosidad impide la eliminación de burbujas de aire retenidas en las películas, lo que se manifiesta como orificios en la matriz. Por el contrario, dispersiones poco viscosas generan películas muy delgadas con pobres propiedades mecánicas (Bertuzzi y col., 2007).

**Tabla IV.17** Propiedades reológicas de las dispersiones obtenidas a partir de **FP** y **FF**

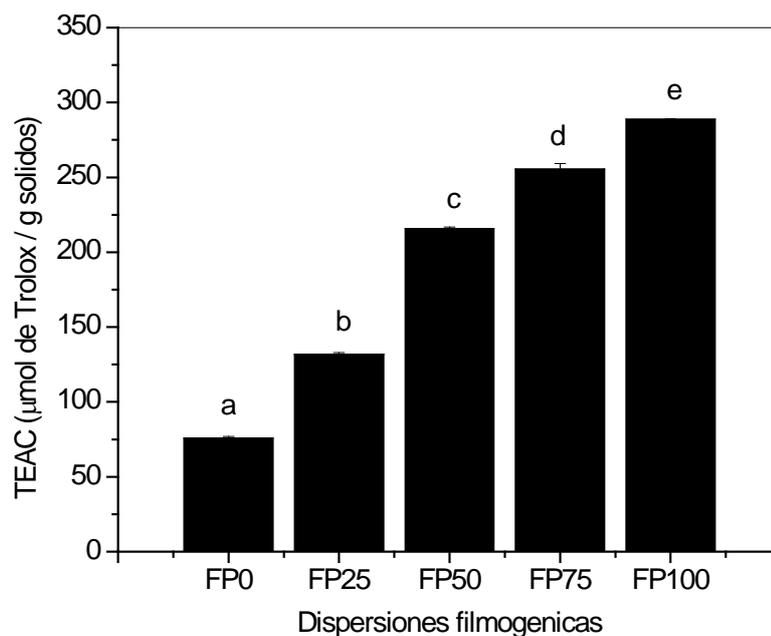
Dispersión	Parámetros de Ostwald de Waele		Viscosidad aparente (mPa s)		
	K (Pa s <sup>n</sup> )	n	D = 60 s <sup>-1</sup>	D = 300 s <sup>-1</sup>	D = 500 s <sup>-1</sup>
FP <sub>25</sub>	0,33 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,66 ± 0,01 <sup>a</sup>	79,7 ± 1,2 <sup>c</sup>	48,7 ± 1,2 <sup>c</sup>	40,3 ± 1,1 <sup>c</sup>
FP <sub>50</sub>	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,01 <sup>b</sup>	18,0 ± 3,7 <sup>b</sup>	15,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	14,6 ± 1,4 <sup>b</sup>
FP <sub>75</sub>	3,6 10 <sup>-3</sup> ± 6,0 10 <sup>-4a</sup>	1,05 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,6 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

### III.3.3.3 Propiedades antioxidantes de las dispersiones filmogénicas

La capacidad antioxidante Trolox equivalente (**TEAC**) de las dispersiones filmogénicas se muestra en la **Figura IV.19**. Todas las dispersiones presentaron capacidad antioxidante.

La dispersión FP<sub>0</sub> corresponde a una dispersión al 1% de **FF** que posee un elevado contenido de hidratos de carbonos (**Tabla IV.16**). La TEAC puede deberse a los polisacáridos sulfatados (*carragenanos* / *porfiranos*), ya que Rocha de Souza y col. (2007) reportaron interesantes propiedades antioxidantes *in vitro* de los *carragenanos*: iota, kappa y lambda. Por otra parte, se puede apreciar un incremento significativo de la TEAC conforme aumentó el contenido de **FP** en las dispersiones filmogénicas. En este sentido, el mayor valor de TEAC se obtuvo con la dispersión FP<sub>100</sub> que corresponde a una dispersión al 1% de **FP** que posee el mayor contenido de proteínas y compuestos fenólicos (**Tabla IV.16**), a los cuales podrían atribuirse la TEAC. Al respecto, numerosos investigadores han atribuido la capacidad antioxidante de las algas a las *ficobiliproteínas* y a los compuestos fenólicos presentes en ellas (Matanjun y col., 2008; Romay y col., 1998; Cherng y col., 2007).



**Figura IV.19** – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de las dispersiones filmogénicas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Cabe recordar que el contenido de hidratos de carbono de **FP** no fue despreciable (carragenanos solubles en agua a 25°C), por lo que el valor de TEAC también podría deberse, aunque en menor medida, a los polisacáridos sulfatados aportados por esta fracción. Jiménez-Escrig y col. (2012) y con Wang y col. (2009), demostraron que la capacidad antioxidante de las algas se debía fundamentalmente a la presencia de distintos compuestos bioactivos: polisacáridos sulfatados, proteínas y compuestos fenólicos.

#### III.3.3.4 Caracterización de las películas obtenidas

Una vez caracterizadas las fracciones (**FP** y **FF**) y sus dispersiones (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>), se prepararon las películas correspondientes. Los films obtenidos fueron evaluados en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. Cabe señalar que todas las películas fueron homogéneas y flexibles, a pesar de no poseer ningún tipo de plastificante.

##### III.3.3.4.1 Espesor, contenido de humedad y solubilidad de las películas

En la **Tabla IV.18** se resumen los resultados de espesor, contenido de humedad y solubilidad de las películas obtenidas a partir de FP y FF. El mayor espesor se obtuvo con la película FP<sub>0</sub>, siendo dicho valor similar al reportado por Ribeiro y col. (2007)

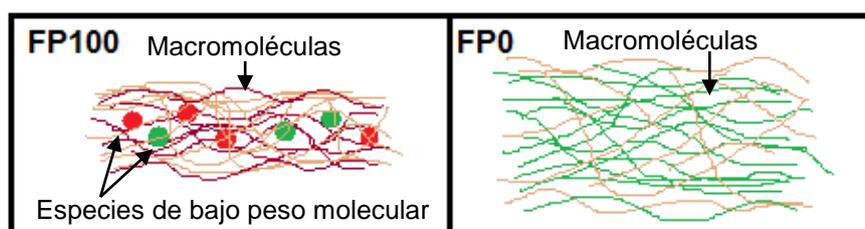
para películas obtenidas con  $\kappa$ -carragenina. Sin embargo, a medida que aumentó la proporción de **FP** los valores de espesor disminuyeron. Este descenso podría deberse al efecto de dilución que causa **FP** sobre los *ficocoloides* de **FF**. En este sentido, se obtuvo una correlación directa entre el espesor de las películas y el contenido de hidratos de carbono de las dispersiones filmogénicas correspondientes ( $r^2 = 0,972$ ) (**Tabla IV.16**).

**Tabla IV.18** Espesor, contenido de humedad y solubilidad de las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF**

Película	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Contenido de humedad ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )	Solubilidad (%)
FP <sub>0</sub>	28,25 $\pm$ 1,23 <sup>d</sup>	11,48 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	81,77 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>
FP <sub>25</sub>	27,23 $\pm$ 0,60 <sup>d</sup>	11,19 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	80,68 $\pm$ 3,34 <sup>a</sup>
FP <sub>50</sub>	22,43 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup>	12,08 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	82,97 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>
FP <sub>75</sub>	17,70 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	14,70 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	97,65 $\pm$ 1,09 <sup>b</sup>
FP <sub>100</sub>	12,90 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	20,72 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>	97,85 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>

X  $\pm$  DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A pesar de tener todas las películas el mismo contenido de sólidos (1% P/P), el espesor de la película FP<sub>0</sub> fue el doble del obtenido con la película FP<sub>100</sub> (**Tabla IV.18**). Esto estaría indicando un arreglo espacial diferente de las moléculas aportadas por cada fracción durante el proceso de secado de las películas. En este sentido, las especies pequeñas de **FP** (fracciones de 484kDa y compuestos fenólicos), podrían acomodarse de forma más compacta entre las más grandes (proteínas e hidratos de carbonos), generando matrices más finas pero con el mismo contenido de sólidos. Caso contrario ocurriría con **FF**, donde las moléculas formarían redes más laxas con importantes espacios intermoleculares, lo que favorecería el aumento del espesor (**Figura IV.20**).



**Figura IV.20** - Esquema del arreglo espacial de las moléculas presentes en cada película.

No hubo cambios significativos en el contenido de humedad de las películas (**Tabla IV.18**), excepto para aquellas en donde la proporción de **FP** fue muy elevada (**FP**<sub>75</sub> y **FP**<sub>100</sub>). Este mismo comportamiento fue observado para la solubilidad. Al respecto, el mayor valor se obtuvo con **FP**<sub>75</sub> y **FP**<sub>100</sub>, mientras que el menor fue para **FP**<sub>0</sub> (**Tabla IV.18**). Esto puede deberse a la elevada solubilidad de las moléculas presentes en **FP** (*ficobiliproteínas*, componentes proteicos de 484kDa y compuestos fenólicos). Cabe recordar que **FP** proviene del extracto soluble en agua a temperatura ambiente del alga *P. columbina*, cuya solubilidad sólo se ve afectada a pHs ácidos (**Figura IV.16**). Teniendo en cuenta estos resultados, se podría suponer que las *ficobiliproteínas* junto con las fracciones de 484kDa y los compuestos fenólicos estarían actuando como *plastificantes* de la red macromolecular generada por **FF** (*ficocoloides*).

Cabe añadir que altos valores de solubilidad indican una pobre resistencia al agua de las películas, siendo una propiedad ventajosa si se pretende utilizarlas como vehículo de compuestos bioactivos (Salgado y col., 2011).

#### III.3.3.4.2 Apariencia de las películas

En la **Tabla IV.19** se presentan los valores obtenidos para los parámetros de color (CIE-Lab) de las películas evaluadas.

**Tabla IV.19** Parámetros de color (CIE-Lab) de las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF**

Película	Parámetros de color (CIE-Lab)					
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	C*	h
FP <sub>0</sub>	67,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	-4,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	31,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	43,1 ± 0,2 <sup>c</sup>	32,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	98,7 ± 0,1 <sup>e</sup>
FP <sub>25</sub>	70,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	-2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	32,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	40,5 ± 1,0 <sup>b</sup>	32,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	94,9 ± 0,1 <sup>d</sup>
FP <sub>50</sub>	72,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	-0,1 ± 0,0 <sup>c</sup>	33,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	40,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	33,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	90,2 ± 0,1 <sup>c</sup>
FP <sub>75</sub>	74,3 ± 0,4 <sup>d</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>d</sup>	33,9 ± 1,5 <sup>b</sup>	39,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	34,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	85,2 ± 0,3 <sup>b</sup>
FP <sub>100</sub>	78,4 ± 1,1 <sup>e</sup>	4,7 ± 0,1 <sup>e</sup>	33,5 ± 0,4 <sup>b</sup>	37,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	33,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	81,9 ± 0,1 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

## Resultados y Discusión

Como se puede ver en la **Tabla IV.19**, la película  $FP_0$  exhibió los menores valores de  $L^*$  y de  $a^*$ , siendo éstos últimos negativos; mientras que los resultados obtenidos para  $\Delta E^*$  y  $h$  fueron los más elevados. Esto estaría indicando que el color de la película obtenida con **FF** tiende a ser *verde oscuro*, lo que se evidencia claramente en su aspecto (**Figura IV.21**).



**Figura IV.21** – Fotografía de las películas obtenidas a partir de FP y FF ( $FP_0$ ,  $FP_{25}$ ,  $FP_{50}$ ,  $FP_{75}$  y  $FP_{100}$ ).

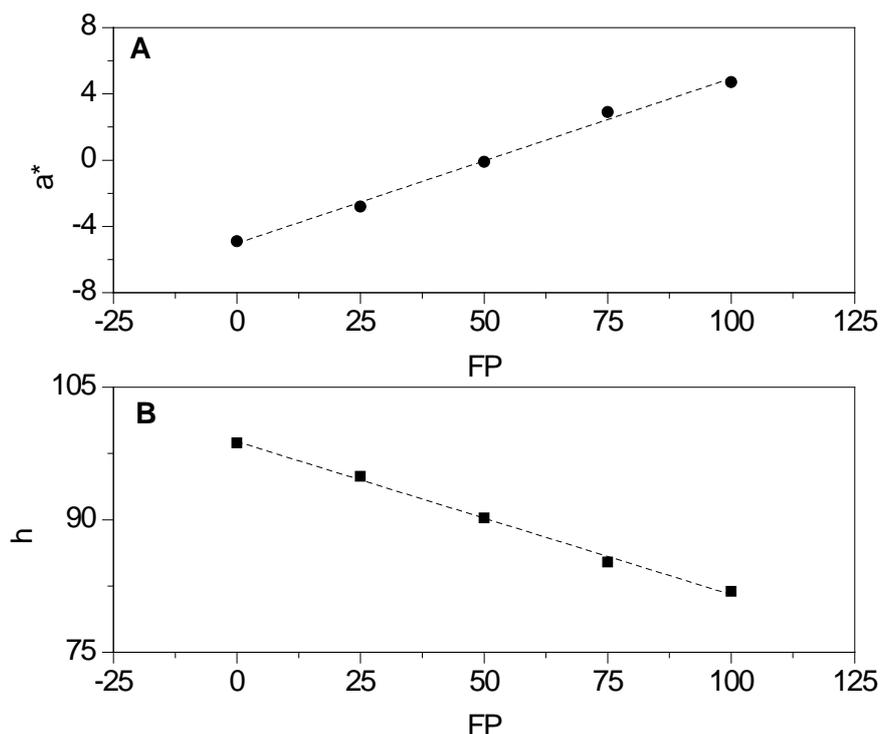
Sin embargo, a medida que creció la proporción de **FP** en las películas aumentaron los parámetros  $a^*$  y  $L^*$ , y disminuyeron  $\Delta E^*$  y  $h$ . Esto estaría indicando un cambio en el color de los films de *verde oscuro* a *rojo claro*, conforme aumentó el contenido de **FP** en la formulación. Este cambio en el color fue más notorio para la película  $FP_{100}$ , la cual presentó una neta coloración roja (mayores valores de  $a^*$ ) (**Figura IV.21**).

Esta relación *color* – **FP** podría asociarse con el contenido de *ficoeritrina* aportado por **FP** a cada película. Como se sabe, esta *ficobiliproteína* es un pigmento rojo natural que participa activamente en el proceso fotosintético de las algas rojas (Niu y col., 2010). Por lo tanto, al incrementar la proporción de **FP** en la formulaciones aumentó el nivel de proteínas en las películas y consecuentemente el de *ficoeritrina* (ver punto **IV.3.3.1**), lo que produjo un cambio del color de los productos obtenidos, de *verde oscuro* a *rojizo claro*. Esto se ve reflejado en la **Figura IV.22.A y B** donde se muestra una relación lineal entre los parámetros  $a^*$  y  $h$  con la proporción de **FP** en cada película, siendo los coeficientes de regresión  $r^2 = 0,9958$  y  $0,9960$ , para  $a^*$  y  $h$  respectivamente.

A medida que crece el nivel de **FP** en las películas aumenta el parámetro  $a^*$ , comenzando con valores negativos (verde) hasta alcanzar los positivos (rojo). Esto indica que las muestras tienden gradualmente a ser más rojas. También se puede ver que a menor concentración de **FP**, más grande es el parámetro  $h$ , lo que confirma una mayor

aproximación del vector al cuadrante negativo de  $a^*$  en el eje coordenadas CIE-Lab, denotando una coloración cada vez más verdosa de las películas.

Cabe agregar que los parámetros  $b^*$  y  $C^*$  prácticamente no fueron afectados por la adición de **FP**. Para el caso de  $b^*$ , se pudo observar un ligero aumento conforme lo hizo esta fracción en la formulación. Sin embargo, para el caso de  $C^*$  los valores fueron estadísticamente iguales, indicando similar nitidez en el color de las películas.



**Figura IV.22** - Relación entre los parámetros  $L^*$  (A) y  $b^*$  (B) con la proporción de FP en la formulación.

En la **Tabla IV.20** se muestran los valores de opacidad obtenidos para las películas evaluadas.

La película más opaca fue  $FP_0$ . Sin embargo, a medida que aumentó la proporción de **FP** en la formulación se observó un descenso de esta propiedad espectroscópica. En este sentido, el menor valor de opacidad se obtuvo con la película  $FP_{100}$ . Cabe señalar que el parámetro  $L^*$  pudo ser correlacionado de manera lineal e inversa con los valores de opacidad obtenidos para cada películas ( $r^2 = 0,9716$ ), lo que estaría indicando que a medida que aumentó la concentración de **FP**, las películas se tornaron más luminosas y menos opacas.

**Tabla IV.20** Opacidad de las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF**

<b>Película</b>	<b>Opacidad (UA cm<sup>-1</sup>)</b>
FP <sub>0</sub>	4,9 ± 0,1 <sup>d</sup>
FP <sub>25</sub>	4,1 ± 0,3 <sup>c</sup>
FP <sub>50</sub>	4,1 ± 0,0 <sup>c</sup>
FP <sub>75</sub>	3,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
FP <sub>100</sub>	1,8 ± 0,0 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Cabe recordar que la opacidad de las películas fue calculada como el área bajo la curva de las absorbancias obtenidas entre 400 - 800 nm dividido por el espesor de las mismas. Por lo tanto, los valores obtenidos de esta propiedad espectroscópica son independientes del espesor de cada film. Teniendo en cuenta esto, un aumento de la opacidad indicaría que el material absorbe más luz (disminuye su transmitancia), por lo que resulta menos transparente a la luz incidente (400 - 800 nm), oficiando de barrera. En base a esto, todas las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF** exhibieron interesantes propiedades de barrera, siendo más importantes a menor concentración de **FP** (mayor opacidad).

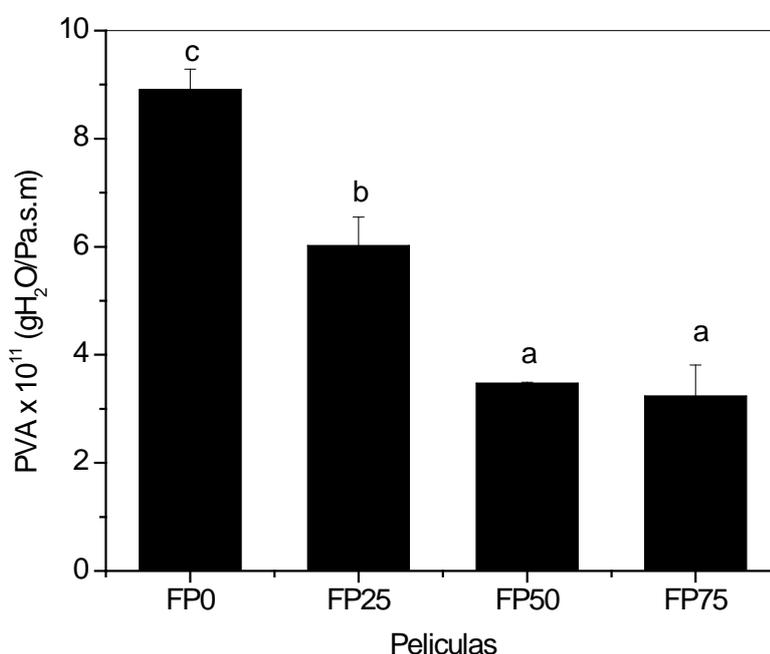
Por todo lo expuesto, se podría decir que las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF** podrían ser utilizadas para el *packaging* de diferentes productos alimenticios sensibles a la luz visible (400 - 800 nm) (Krikor y col., 2008).

Por otra parte, la coloración intensa, sobre todo para PF<sub>0</sub>, limitaría algunas posibles aplicaciones. Sin embargo, se podrían utilizar perfectamente para empacar productos de origen vegetal tales como los *mínimamente procesados* (dada la coloración verde y roja que poseen las películas), y cuya sensibilidad a la radiación puede ser crítica (Ribeiro y col., 2007).

### III.3.3.4.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La película FP<sub>100</sub> no pudo ser manipulada adecuadamente, debido a su elevada higroscopicidad, por lo que no se logró evaluar su permeabilidad al vapor de agua (PVA). En la **Figura IV.23** se muestra la PVA de las películas: FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub> y FP<sub>75</sub>.

Los valores de PVA de las películas FP<sub>0</sub> y FP<sub>25</sub> fueron similares a los reportados por Martins y col. (2012), para films obtenidos con mezclas de goma de algarrobo /  $\kappa$ -carragenina al 1% P/P. Al respecto, los valores obtenidos para las mezclas 100/0 y 60/40 fueron  $8,01 \pm 0,40 \times 10^{-11}$  y  $6,00 \pm 0,30 \times 10^{-11}$  g (Pa.s.m)<sup>-1</sup>, respectivamente.



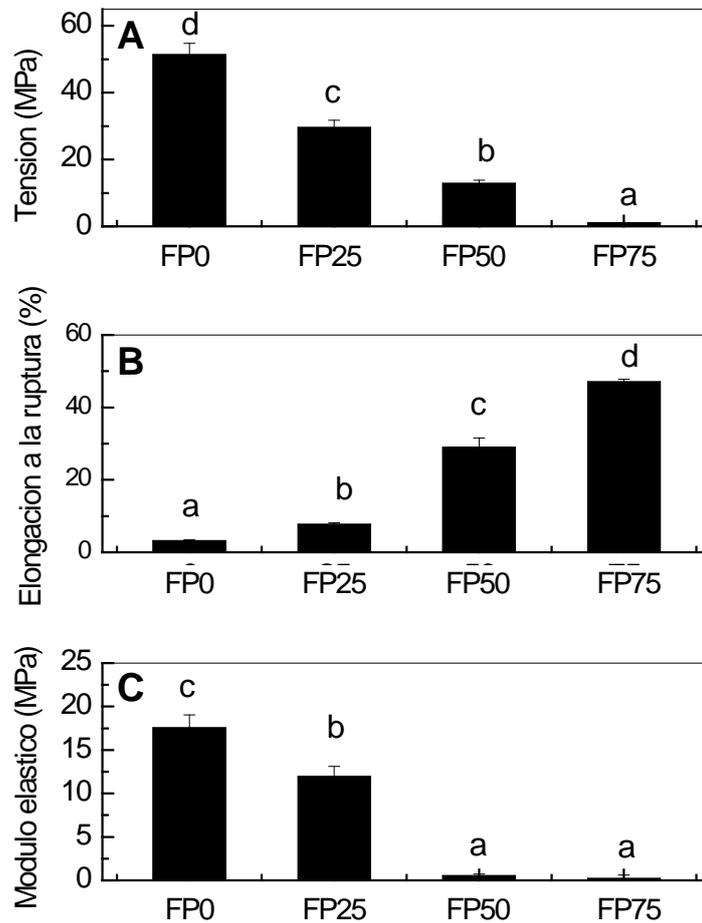
**Figura IV.23** – Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub> y FP<sub>75</sub>). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede apreciar a medida que aumentó la proporción de **FP** en las películas, disminuyó la PVA. En este aspecto, la PVA de la película FP<sub>75</sub> fue un 75% menor a la hallada para la película FP<sub>0</sub>. Este resultado podría estar relacionado con el menor espesor de las películas con alta proporción de **FP** (**Tabla IV.18**). Este efecto ya ha sido observado en otras películas hidrófilas (pectina, amilosa, éteres de celulosa, caseinato de sodio, y las proteínas de soja), en donde la PVA disminuye conforme lo hace el espesor de la película (Ghorpade y col., 1995).

#### III.3.3.4.4 Propiedades mecánicas y temperatura de transición vítrea (Tg)

Las **Figuras IV.24.A, B y C** muestran las propiedades mecánicas (medidas en *test de tensión*) de las películas estudiadas. Al igual que para PVA, no se pudo evaluar las propiedades mecánicas de la película FP<sub>100</sub> debido a problemas en su manipulación (alta higroscopicidad).

A pesar de no haber adicionado ningún tipo de plastificante, las propiedades mecánicas de la película FP<sub>0</sub> fueron muy buenas. En este sentido, se obtuvieron valores muy elevados de tensión y módulo elástico ( $\approx 50$  MPa y  $\approx 17,5$  MPa, respectivamente), mientras que la elongación a la rotura fue baja ( $\approx 3\%$ ). Estos resultados concuerdan con los reportados por Rhim (2012), para películas obtenidas con mezclas de agar y  $\kappa$ -carragenina.



**Figura IV.24** – Propiedades mecánicas de las películas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub> y FP<sub>75</sub>). Fuerza de tensión (A), Elongación a la ruptura (B) y Módulo elástico o de Young (C), medidos en el test de tensión. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede observar a medida que aumentó el nivel de **FP** en las películas, disminuyeron progresivamente la tensión y el módulo elástico (**Figuras IV.24.A y C**), mientras que aumentó gradualmente la elongación a la rotura (**Figuras IV.24.B**). En concordancia con lo observado para el espesor, este resultado sugeriría una acción *plastificante* de **FP** sobre la matriz generada por **FF**.

Según Sothornvit y Krochta (2000), existen dos principales tipos de plastificantes: 1- moléculas capaces de formar puentes de hidrógeno, que interactúan con los polímeros e interrumpen las interacciones polímero-polímero y contribuyen a mantener la distancia entre las cadenas de polímeros. 2- moléculas capaces de interactuar con grandes cantidades de agua para retener más moléculas de agua, lo que resulta en mayor contenido de humedad y radio hidrodinámico. Por lo general, debido a la naturaleza hidrofílica del agua, biopolímeros y plastificantes; y debido a los puentes de hidrógeno existentes en abundancia en sus estructuras es muy difícil separar estos mecanismos (Han y Gennadios, 2005). Este es el caso de **FP**, ya que al incrementar su proporción en la matriz generada por **FF** no sólo aumentó la humedad y solubilidad de las películas sino también decreció el espesor de las mismas.

Cabe señalar que el efecto plastificante de **FP** no pudo ser observado en el estudio de la temperatura de transición vítrea de las películas ( $T_g$ ). Al respecto, no hubo diferencias significativas en los valores de  $T_g$  hallados para las distintas películas (**Tabla IV.21**).

**Tabla IV.21** Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las películas obtenidas a partir de **FP** y **FF**

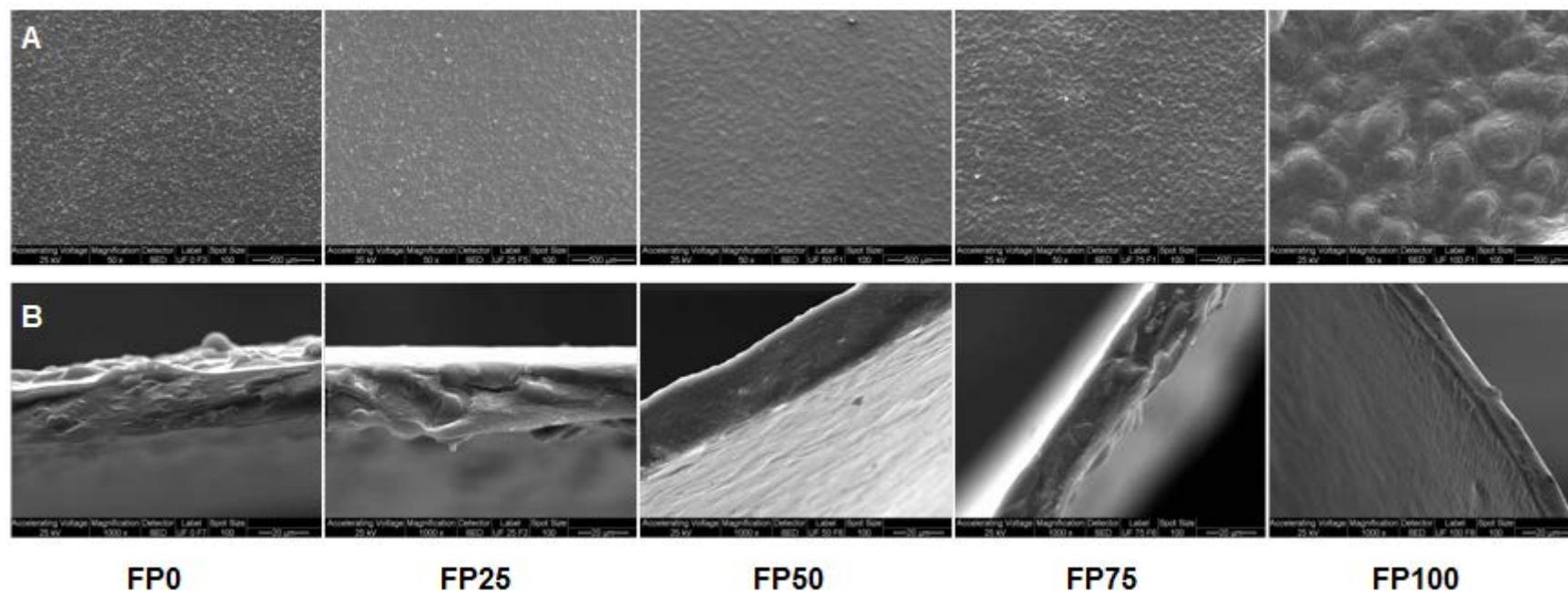
<b>Película</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>
FP <sub>0</sub>	$-32,7 \pm 1,2^a$
FP <sub>25</sub>	$-33,9 \pm 1,1^a$
FP <sub>50</sub>	$-34,0 \pm 1,8^a$
FP <sub>75</sub>	$-33,3 \pm 1,2^a$
FP <sub>100</sub>	$-32,0 \pm 1,5^a$

X  $\pm$  DE. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### **III.3.3.4.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La microscopia electrónica de barrido de la superficie y sección transversal (obtenida por crio-fracturación en nitrógeno líquido) de las películas se muestra en las **Figuras IV.25.A y B.**

En la **Figura IV.25.A** se puede ver que las películas mostraron superficies ligeramente rugosas y sin poros. La rugosidad de las mismas fue menos perceptible en la película FP<sub>50</sub>, observándose un aumento notable a elevadas proporciones de **FP** (películas FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>). A partir de la SEM de la sección transversal se pudo ver que todas las películas exhibieron una estructura compacta, uniforme, de elevada densidad y con apariencia homogénea (**Figura IV.25.B**), lo que indicaría una buena compatibilidad entre las especies moleculares presentes en **FP** y **FF**. Además, se pudo apreciar que el espesor de las películas disminuyó progresivamente a medida que aumentó el contenido de **FP** en la formulación (de FP<sub>0</sub> a FP<sub>100</sub>). Esto concuerda con los valores de espesor obtenidos utilizando el medidor de espesor de recubrimiento digital.

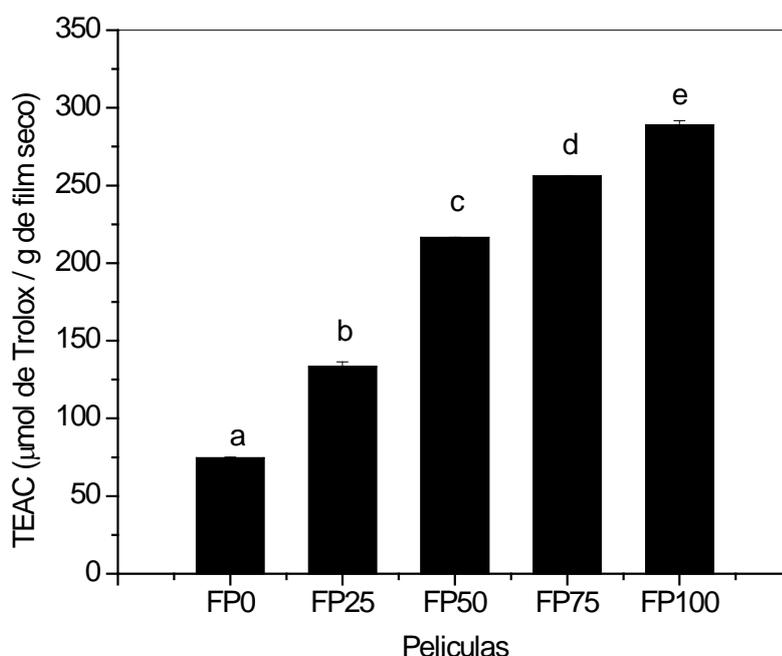


**Figura IV.25** – Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las películas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>). Barrido de la superficie a 50X (A) y barrido de la sección transversal a 1000X (B).

### III.3.3.4.6 Propiedades antioxidantes de las películas

En los últimos años se han publicado trabajos en donde se agregan compuestos antioxidantes a distintas matrices biodegradables, ya sea a base de proteínas o polisacáridos, para aumentar la vida útil del producto en contacto con la película o bien para que estos compuestos sean liberados lentamente cuando forman parte de un envoltorio (Salgado y col., 2013; Giménez y col., 2013). En este sentido, y teniendo en cuenta la actividad antioxidante registrada en las dispersiones filmogénicas de **FP** y **FF**, se decidió evaluar esta propiedad en las películas obtenidas a partir de ambas fracciones (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>).

La capacidad antioxidante Trolox equivalente (**TEAC**), de las películas obtenidas (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>) se muestra en la **Figura IV.26**.

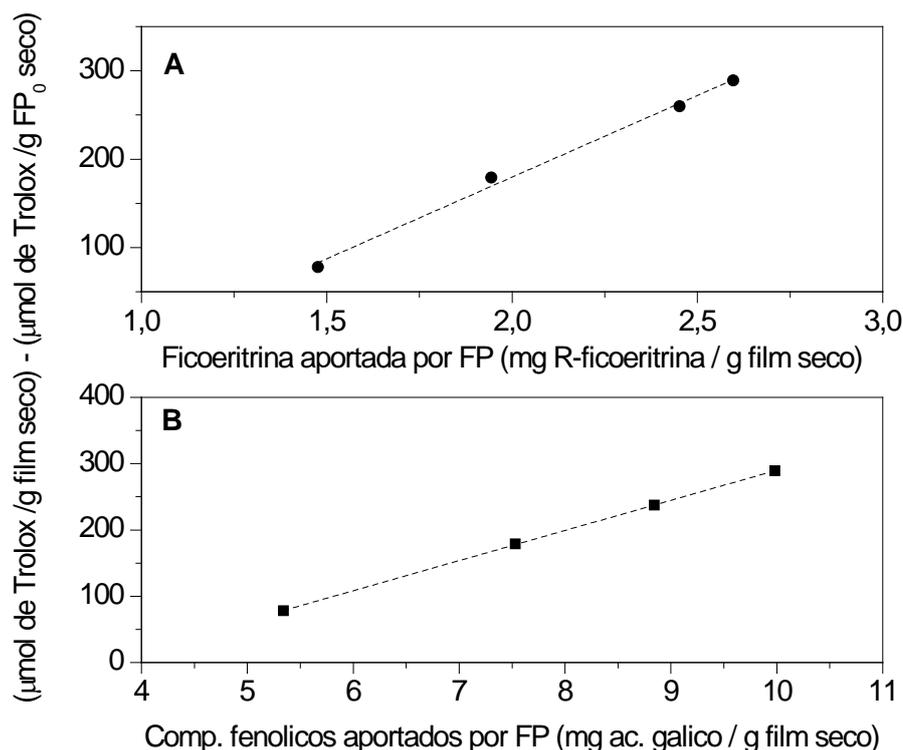


**Figura IV.26** – Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de las películas obtenidas a partir de FP y FF (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Todas las películas exhibieron capacidad antioxidante, siendo la misma dependiente de la concentración de **FP**. En este sentido, a medida que aumentó la proporción de esta fracción en las películas, la TEAC obtenida fue cada vez mayor.

Esta relación **TEAC** – **FP** podría deberse a las *ficobiliproteínas* y los compuestos fenólicos aportados por **FP**. Como se mencionó anteriormente, esta

fracción posee un mayor contenido de proteínas y compuestos fenólicos que **FF**, los cuales serían los principales responsables del aumento de TEAC (Matanjun y col., 2008; Romay y col., 1998; Cherng y col., 2007). Esto se ve reflejado en la **Figura IV.27.A y B** donde se muestra una relación lineal entre el contenido de *ficoeritrina* y compuestos fenólicos con la TEAC de cada película. Al respecto, los coeficientes de regresión para la *ficoeritrina* y los compuestos fenólicos aportados por **FP** fueron:  $r^2 = 0,9942$  y  $0,9998$ , respectivamente.

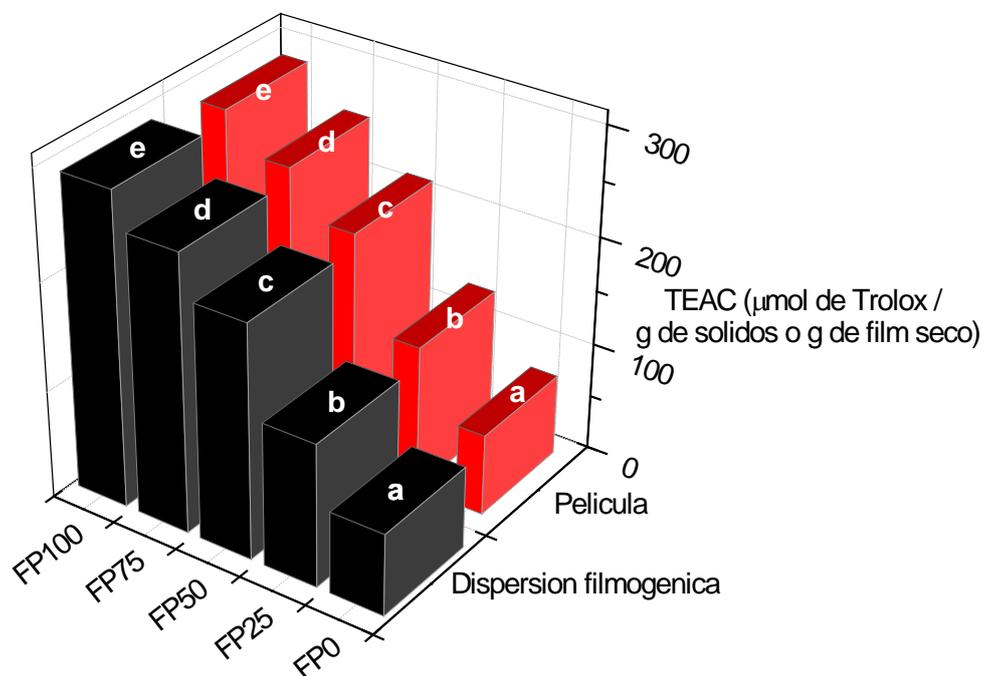


**Figura IV.27** - Relación entre la diferencia entre TEAC de cada película (FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>) y la TEAC de FP<sub>0</sub> con el contenido de *ficoeritrina* (A) y compuestos fenólicos (B) aportados por FP.

Como se mencionó anteriormente los polisacáridos sulfatados también poseen capacidad antioxidante (Jiménez-Escrig y col., 2012). Sin embargo, cuando se relacionó la TEAC de las películas con el contenido de hidratos de carbonos aportado por **FP**, se obtuvo una relación inversa ( $r^2 = 0,9874$ ). Lo que estaría indicando que estas especies moleculares no son las principales responsables del aumento de esta propiedad bioactiva en las películas. En base a estos resultados, se podría decir que el incremento de TEAC en los films se debe a las *ficobiliproteínas* y los compuestos fenólicos aportados por **FP**.

Un aspecto muy importante a destacar es que no hubo diferencias significativas entre la TEAC de las películas y la obtenida con sus respectivas dispersiones

filmogénicas. Esto se ve reflejado en la **Figura IV.28** donde se muestran los valores de ambas TEAC.



**Figura IV.28** - Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de las dispersiones filmogénicas y de sus respectivas películas de FP y FF (FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub>, FP<sub>50</sub>, FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub>). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En base a estos resultados, se podría decir que el proceso de secado a 60°C durante 5 horas no afectó la TEAC originalmente presente en cada dispersión. Esto hace suponer que los compuestos antioxidantes presentes en cada fracción resistieron la degradación térmica durante la elaboración de las películas.

#### IV.3.4 Conclusiones parciales

- ✓ **FP** presentó elevada solubilidad proteica en el rango de pH evaluado, siendo mayor a pHs neutro y alcalinos. Esta elevada solubilidad se debe a la composición de **FP**, donde los componentes solubles en agua a temperatura ambiente del alga *P. columbina* son mayoritarios. A pH ácido la solubilidad descendió ligeramente, lo que estuvo asociado con el punto isoeléctrico de las *ficobiliproteínas*.
- ✓ **R** presentó muy baja solubilidad en todo el rango de pH evaluado, siendo la misma ligeramente mayor a pH alcalino. La solubilidad de **HR** fue significativamente superior a la de **R**, ya que el proceso de hidrólisis favoreció la generación de

componentes de bajo peso molecular muy hidrofílicos y poco sensibles a las variaciones de pH.

- ✓ La dispersión acuosa de **FP** exhibió un comportamiento del tipo *newtoniano*, mientras que la obtenida con **FF** mostró un comportamiento del tipo *pseudo-plástico*. El comportamiento *newtoniano* en **FP** se debería a la presencia *proteínas* y especies de bajo tamaño molecular, mientras que el comportamiento *pseudo-plástico* de **FF** estaría asociado con la elevada proporción de *porfiranos* y *carragenanos* en la fracción.
- ✓ Los valores de viscosidad aparente e índice de consistencia (**K**) para **FF** fueron significativamente superiores a los hallados para **FP**. Esto indicó que las dispersiones de **FF** fueron más viscosas que las obtenidas con **FP**, lo que fue evidenciado claramente al determinar la viscosidad intrínseca de cada dispersión.
- ✓ Al aumentar la proporción de **FP** en la dispersión filmogénica, el comportamiento de flujo cambió de *pseudo-plástico* a *newtoniano*. Para el caso de FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub> y FP<sub>50</sub> el comportamiento de flujo fue *pseudo-plástico*, mientras que FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub> fue *newtoniano*.
- ✓ Hubo un incremento significativo de la TEAC conforme aumentó **FP** en las dispersiones filmogénicas, siendo máximo en FP<sub>100</sub>. Este aumento estuvo estrechamente relacionado con las *ficobiliproteínas* y los compuestos fenólicos aportados por esta fracción. Cabe señalar que la TEAC exhibida inicialmente por la dispersión FP<sub>0</sub> se debió a los polisacáridos sulfatados presentes en **FF**.
- ✓ El espesor de las películas disminuyó a medida que aumentó la proporción de **FP**, siendo mínimo en la película FP<sub>100</sub>. Esto se debió al efecto de dilución que causó **FP** sobre los *ficocoloides* de **FF**.
- ✓ A pesar de tener todas las películas el mismo contenido de sólidos, el espesor de la película FP<sub>0</sub> fue el doble del obtenido para la película FP<sub>100</sub>. Esto indicó un arreglo espacial diferente de las moléculas aportadas por cada fracción durante el proceso de secado de las películas.
- ✓ No hubo cambios significativos en el contenido de humedad y solubilidad de las películas, excepto para las películas FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub> donde se observó un aumento que pudo deberse a la elevada solubilidad de las moléculas presentes en **FP**, las cuales estarían actuando como *plastificantes* de la red macromolecular generada por **FF**.
- ✓ La película FP<sub>0</sub> exhibió los menores valores de L\* y de a\*, siendo estos últimos negativos, lo que indica que la película obtenida con **FF** exhibió una coloración

*verde oscura*. Sin embargo, a medida que creció la proporción de **FP** en las películas aumentaron los parámetros  $a^*$  y  $L^*$  y disminuyeron  $\Delta E^*$  y  $h$ , lo que indicó un cambio en el color de los films de *verde oscuro* a *rojo claro*.

- ✓ Al incrementar la proporción de **FP** en las formulaciones aumentó el nivel de proteínas en las películas y consecuentemente el de *ficoeritrina*. Por lo tanto, la relación *color* – **FP** podría estar asociada con el contenido de esta *ficobiliproteína* en cada film.
- ✓ La opacidad de las películas disminuyó conforme aumentó la proporción de **FP** en la formulación, siendo  $FP_{100}$  la película menos opaca. La opacidad estuvo en relación inversa con el parámetro  $L^*$  de las películas, indicando que a medida que aumentó la concentración de **FP**, las películas se tornaron más luminosas y menos opacas.
- ✓ La permeabilidad al vapor de agua disminuyó conforme aumentó la proporción de **FP** en las películas. Este resultado se debió al descenso en el espesor de las películas con elevada proporción de **FP**. La película  $FP_{100}$  no pudo ser manipulada adecuadamente, debido a su elevada higroscopicidad, por lo que no se logró evaluar su permeabilidad al vapor de agua y sus propiedades mecánicas.
- ✓ Las propiedades mecánicas de la película  $FP_0$  fueron muy buenas. Sin embargo, a medida que aumentó el nivel de **FP** en las películas, disminuyeron progresivamente la tensión y el módulo elástico, mientras que aumentó gradualmente la elongación a la rotura. Esto sugeriría una acción *plastificante* de **FP** sobre la matriz generada por **FF**. Las películas mostraron superficies ligeramente rugosas y sin poros. Además todas las películas exhibieron una estructura compacta, uniforme, de elevada densidad y con apariencia homogénea, lo que indicaría una buena compatibilidad entre las especies moleculares presentes en **FP** y **FF**.
- ✓ Todas las películas exhibieron capacidad antioxidante, siendo la misma dependiente de la concentración de **FP**. El incremento de TEAC en los films se debió principalmente a las *ficobiliproteínas* y los compuestos fenólicos aportados por **FP**, ya que se obtuvo una relación lineal entre estos componentes y la TEAC de cada película. No hubo diferencias significativas entre la TEAC de las películas y la obtenida con sus respectivas dispersiones filmogénicas. Por lo tanto, el proceso de secado no afectó la capacidad antioxidante originalmente presente en cada dispersión, lo que haría suponer que los compuestos antioxidantes presentes en cada fracción resistieron la degradación térmica durante la elaboración de las películas.

## Capítulo IV.4 Evaluación de las propiedades bio-funcionales de los hidrolizados obtenidos a partir de FP y R

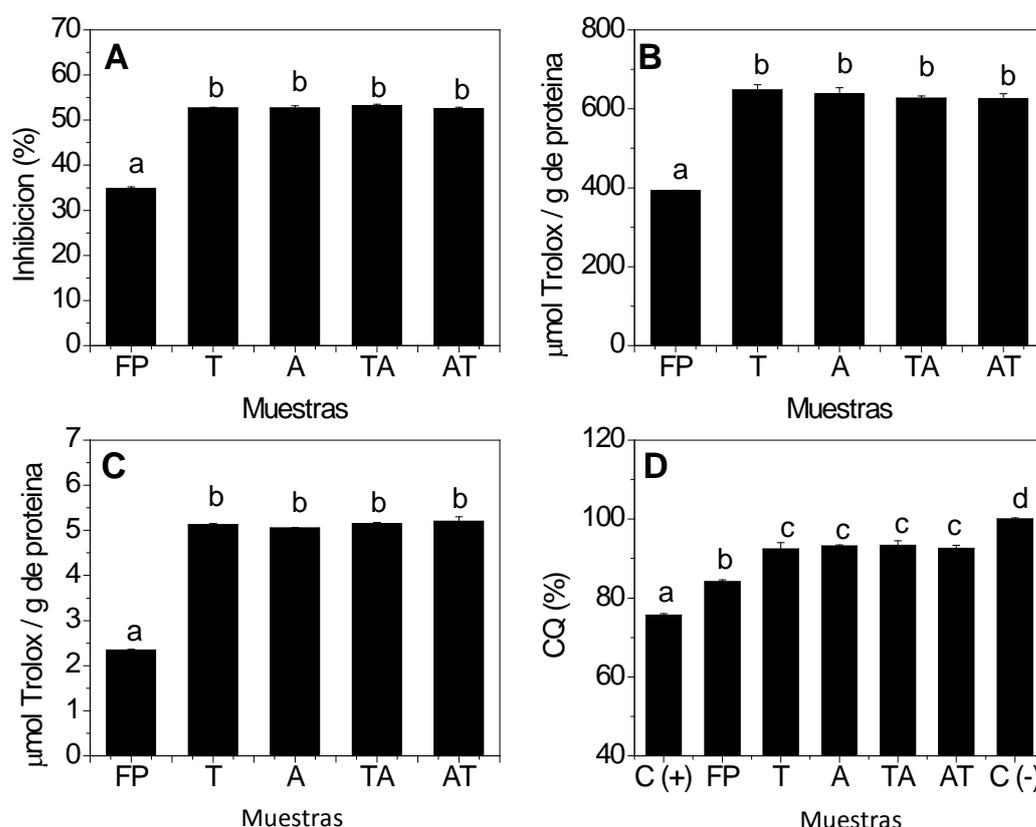
### IV.4.1 Propiedades bio-funcionales de FP y sus hidrolizados (HFP)

A fin de determinar las propiedades bio-funcionales de **FP** y sus hidrolizados (**HFP**), se evaluaron sus propiedades antioxidantes, antihipertensivas e inmunomoduladoras.

#### IV.4.1.1 Propiedades antioxidantes

Para evaluar las propiedades antioxidantes de **FP** y **HFP** se utilizaron cuatro métodos *in vitro* diferentes. Al respecto, se emplearon dos métodos del tipo **ET** (DPPH y ABTS<sup>+</sup>), uno del tipo **HAT** (ORAC) y otro basado en la capacidad quelante de metales de transición (capacidad quelante ligada al Cu<sup>2+</sup>).

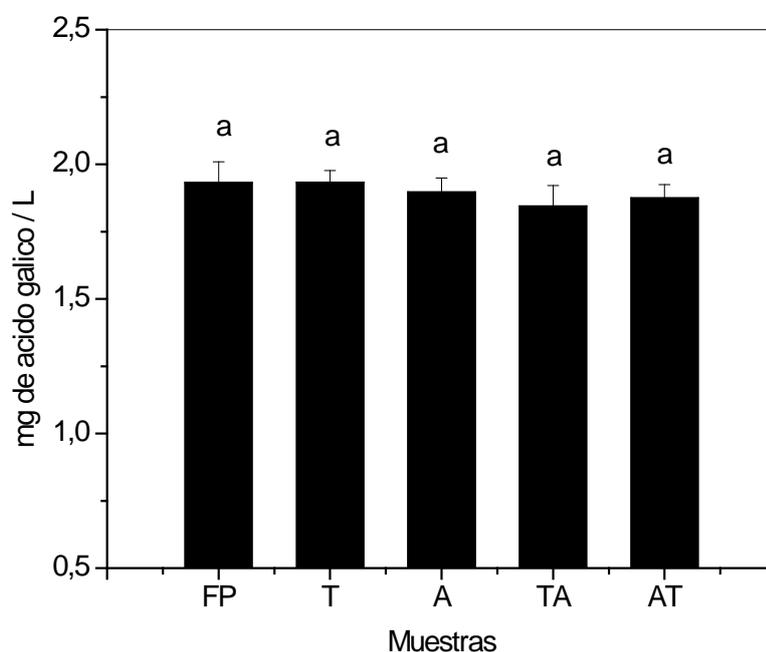
En las **Figuras IV.29.A, B, C y D** se muestra la capacidad antioxidante de **FP** y **HFP** (**T, A, TA y AT**), evaluada con los distintos métodos.



**Figura IV.29** - Capacidad antioxidante de FP y sus hidrolizados. Inhibición del radical DPPH (A), inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> (TEAC) (B), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (C) y capacidad quelante ligada al Cu<sup>2+</sup> (CQ) (D). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el capítulo anterior, se vió que **FP** tiene buenas propiedades antioxidantes, atribuibles principalmente a las *ficobiliproteínas* y a los compuestos fenólicos presentes en esta fracción. No obstante, en sus hidrolizados se pudo apreciar un aumento significativo de esta bioactividad (**Figura IV.29**), el cual podría estar asociado con la liberación de péptidos antioxidantes durante el proceso de hidrólisis. Cabe recordar que los *péptidos bioactivos* son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora (*ficobiliproteínas* y/o *lectinas* en este caso), que ejercen su función al ser liberados en la hidrólisis (Fitzgerald y col., 2011).

El proceso de hidrólisis también favorece la liberación de compuestos fenólicos ligados a las proteínas (Wang y col., 2010). Por lo tanto, se podría pensar que el aumento de la capacidad antioxidante observada en **HFP** también se debe a estas especies moleculares. Sin embargo, cuando se procedió a evaluar el nivel de estos compuestos en el medio de reacción, no fue posible distinguir cambios significativos entre **FP** y sus hidrolizados (**Figura IV.30**). Lo que estaría confirmando la acción antioxidante de los péptidos generados tras la proteólisis.



**Figura IV.30** – Contenido de compuestos fenólicos solubles en el medio de reacción (ABTS<sup>+</sup>). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se mencionó en la introducción, las propiedades antioxidantes de los péptidos están estrechamente relacionadas con su tamaño molecular, composición y

secuencia aminoacídica (Kim y Wijesekara, 2010; Qian y col., 2008). En relación al tamaño, numerosos trabajos han atribuido la mayor capacidad antioxidante a especies de bajo peso molecular, como así también a las de tamaño intermedio (Peng y col., 2009; Qian y col., 2008; Sheih y col.; 2009). Si se tiene en cuenta que los hidrolizados poseen una fracción mayoritaria de 340 Da y especies de aproximadamente 2900 Da (**Figura IV.9**), se podría suponer que la capacidad antioxidante observada con los diferentes sistemas de ensayo se debe principalmente a estos péptidos.

Este resultado concuerda con lo reportado por numerosos investigadores para distintos hidrolizados. Al respecto, Wang y col. (2007) encontraron que el mayor efecto inhibitorio frente al radical DPPH se debía a fracciones peptídicas menores a 5 kDa, obtenidas a partir de hidrolizados de gluten de trigo. Zhang y col. (2010) trabajaron con hidrolizados de proteínas de soja y observaron que la fracción menor a 3 kDa era la principal responsable de inhibir la oxidación de la fluoresceína (ORAC). Por otro lado, Cian y col. (2011), obtuvieron el mayor valor de TEAC (ABTS<sup>+</sup>) con fracciones peptídicas menores a 5 kDa, obtenidas a partir de hidrolizados de hemoglobina bovina.

Cabe destacar que no hubo diferencias significativas en la capacidad antioxidante obtenida para los diferentes hidrolizados (**T**, **A**, **TA** y **AT**) en los sistemas de ensayo estudiados (**Figura IV.30**). Esto haría suponer que las especies peptídicas generadas durante la hidrólisis, además de tener una distribución de peso molecular parecida, tendrían una secuencia similar, dependiendo del sitio de hidrólisis de las enzimas.

Como se vió en la **Tabla IV.10**, la proporción de aminoácidos ácidos y no polares en **HFP** fue muy elevada. Además, se observó que el nivel de Thr, Leu, Ser, Gly y Pro fue relativamente alto. En base a esto, se podría pensar que la capacidad antioxidante exhibida por los distintos péptidos presentes en **HFP** estaría dada principalmente por aminoácidos ácidos y no polares. En este sentido, se ha reportado que los aminoácidos Ala y Pro tienen la habilidad de frenar la peroxidación lipídica ocasionada por los radicales hidrofóbicos generados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados. Además, se ha observado que los aminoácidos ácidos pueden actuar como donadores de electrones o protones, lo que contribuye con la neutralización de los radicales libres (Qian y col., 2008).

La capacidad quelante está estrechamente influenciada por la presencia de ciertos aminoácidos en la secuencia peptídica (Rajapakse y col., 2005; Giménez y col., 2009). En este sentido, se ha podido observar que la His juega un rol fundamental en esta propiedad, ya que puede formar quelatos entre su grupo imidazol y los iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc.). Al respecto, Torres-Fuentes y col. (2011) reportaron que una alta proporción de His en la secuencia peptídica (20-30%) proporciona excelentes propiedades quelantes a los péptidos.

Como se mencionó en la caracterización de **HFP**, la proporción de His fue relativamente baja (**Tabla IV.10**), por lo que no se podría atribuir a este aminoácido la elevada capacidad quelante exhibida por los hidrolizados. Sin embargo, se ha visto que los aminoácidos ácidos poseen fuerte actividad quelante si el pH en el medio de reacción es neutro. Cabe recordar que a pH 7,0, tanto el Asp como el Glu están cargados negativamente (Asp,  $\text{pK}_a=3,86$ ; Glu,  $\text{pK}_a=4,25$ ), lo que favorece su interacción con los iones metálicos (Saiga y col., 2003). En base a esto, y dada la alta proporción de aminoácidos ácidos que tienen los hidrolizados, se podría pensar que la elevada capacidad quelante mostrada por **T**, **A**, **TA** y **AT** se debe principalmente a los aminoácidos Glu y Asp presentes en la secuencia peptídica.

La capacidad quelante exhibida por **FP** también puede estar relacionada a los compuestos fenólicos presentes en ella, que como se sabe, poseen la habilidad de complejar los metales de transición (Wijesekara y Kim, 2010).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta cuando se estudia la capacidad antioxidante de una determinada muestra es el medio de reacción utilizado para llevarla a cabo. Es decir, si se trata de un medio acuoso u orgánico (Clausen y col., 2009). En este sentido, se sabe que la reacción del radical DPPH transcurre en medio metanólico, donde la solubilidad de los péptidos presentes en el hidrolizado se puede ver afectada (Ren y col., 2008). Mientras que, para el caso del radical  $\text{ABTS}^+$ , la reacción se lleva a cabo en medio acuoso (PBS 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,4), donde las fracciones peptídicas son altamente solubles (Prior y col., 2005).

En base a esto, se decidió estudiar la capacidad antioxidante de los péptidos presentes en cada hidrolizado con técnicas que utilizan solventes diferentes (metanol y PBS). Para ello, se determinó la concentración de proteínas que inhibe el 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) de los radicales DPPH o  $\text{ABTS}^+$ . Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.22**.

**Tabla IV.22** Concentración de proteínas de **FP** y sus hidrolizados que inhibe el 50% de los radicales (DPPH o ABTS<sup>+</sup>).

Muestra	IC <sub>50</sub> (DPPH)	IC <sub>50</sub> (ABTS <sup>+</sup> )
FP	4,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>b</sup>
T	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
A	2,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
TA	2,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
AT	3,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada hidrolizado, usando los dos métodos de ensayo (DPPH o ABTS<sup>+</sup>), no difirieron significativamente entre sí. Esto estaría indicando, por un lado, que la solubilidad de los péptidos antioxidantes presentes en **HFP** no fue afectada por el metanol (igual IC<sub>50</sub> para DPPH y ABTS<sup>+</sup>), y por el otro, que la potencia antioxidante de **T**, **A**, **TA** y **AT** es la misma (igual IC<sub>50</sub> entre todos los hidrolizados).

Además, se pudo observar que la IC<sub>50</sub> de **FP** fue significativamente mayor que la obtenida para sus hidrolizados. Esto estaría indicando una menor capacidad de bloquear los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>. Este resultado concuerda con lo observado por numerosos investigadores al comparar la IC<sub>50</sub> de un determinado sustrato con la obtenida para su respectivo hidrolizado (Orsini Delgado y col., 2011; Cian y col., 2011; Ren y col., 2008).

En base estos resultados se podría decir que los péptidos presentes en **HFP** ejercerían su efecto antioxidante mediante diversos mecanismos químicos, siendo los principales: transferencia de electrones o átomos de hidrógeno y quelación de metales de transición.

#### IV.4.1.2 Propiedades antihipertensivas

En la **Tabla IV.23** se muestran los porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (**ECA I**), obtenidos para **FP** y sus hidrolizados (**T**, **A**, **TA** y **AT**).

**Tabla IV.23** Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (**ECA I**), obtenidos para **FP** y sus hidrolizados.

Muestra	Inhibición de ECA I (%)
<b>FP</b>	- 23,9 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>T</b>	36,8 ± 2,4 <sup>b</sup>
<b>A</b>	35,6 ± 0,3 <sup>b</sup>
<b>TA</b>	38,1 ± 1,8 <sup>b</sup>
<b>AT</b>	35,2 ± 3,0 <sup>b</sup>

X ± DE. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Todos los hidrolizados fueron capaces de inhibir a la **ECA I**. Este resultado concuerda con lo observado por numerosos investigadores al evaluar las propiedades antihipertensivas de forma *in vitro* (inhibición de **ECA I**), de distintos hidrolizados proteicos (Drago y col., 2013; Cian y col., 2011; Hong y col., 2008; Segura Campos y col., 2013). Cabe señalar que los valores de inhibición obtenidos en la presente tesis son similares a los hallados por Qu y col. (2010), para hidrolizados de *P. yezoensis* obtenidos con la enzima Alcalasa ( $\approx 30\%$ ).

El efecto inhibitorio de **HFP** sobre **ECA I** puede deberse principalmente a los péptidos generados durante la hidrólisis. Al respecto, se ha visto que las algas marinas son una muy buena fuente de péptidos con propiedades antihipertensivas (Sheih y col., 2009).

Como se puede observar, el porcentaje de inhibición de **ECA I** obtenido con los distintos hidrolizados (**T**, **A**, **TA** y **AT**) no varió significativamente. Esto puede deberse al tamaño molecular parecido que poseen los péptidos presentes en cada hidrolizado (**Figura IV.9**). Como se mencionó anteriormente, la fracción mayoritaria de **HFP**

estaría formada por *dipéptidos* (340 Da), que serían los principales responsables de la inhibición de **ECA I** (Wilson y col., 2011). En este sentido, Sato y col. (2002) reportaron muy buenas propiedades antihipertensivas *in vivo* de siete *dipéptidos* aislados a partir de un hidrolizado de *wakame* (alga marrón *Undaria pinnatifida*), producido con la enzima Protease S.

Resulta oportuno recordar que en la inhibición de **ECA I**, además del tamaño peptídico influye la secuencia de los aminoácidos, ya que dependiendo del tipo de aminoácido que se encuentra en la posición *C-terminal* se tiene una mayor o menor inhibición de la enzima. Se ha visto que la presencia de Pro en dicha posición es muy importante para lograr un efecto inhibitorio (López-Fandiño y col., 2006). Sin embargo, esto no es una regla general ya que se han aislado e identificado péptidos inhibidores de **ECA I** que poseen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en su grupo C-terminal (Torruco-Uco y col., 2008). Además, se ha visto que la **ECA I** también posee gran afinidad por sustratos cuyo residuo N-terminal tiene aminoácidos ramificados (Leu, Ile y Val) (Wijesekara y col., 2011). Si se tiene en cuenta que **HFP** posee un elevado contenido de Ala y un nivel relativamente alto de Pro y Leu (todos aminoácidos hidrofóbicos y uno de ellos ramificado), podría suponerse que la actividad inhibitoria sobre esta enzima se debe principalmente a la presencia de dichos aminoácidos en la secuencia de los péptidos.

Cabe mencionar que para el caso del sustrato (**FP**), se obtuvo un valor negativo de inhibición de **ECA I** (**Tabla IV.23**). Esto quiere decir que en lugar de inhibir a la enzima, **FP** favoreció su acción. Este resultado ya ha sido observado para otros tipos de sustratos tales como gluten de trigo tratado térmicamente (Drago y col., 2013).

#### **IV.4.1.3 Propiedades inmunomoduladoras**

En una primera instancia se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras de **FP** sobre esplenocitos, macrófagos y linfocitos T de rata, a una concentración proteica de 1, 0,1 y 0,01 g L<sup>-1</sup>. Además se trató de dilucidar el mecanismo celular por el cual esta fracción ejercía dicha propiedad bioactiva. Posteriormente, se procedió a estudiar las propiedades inmunomoduladoras de los hidrolizados obtenidos a partir de esta fracción (**T**, **A**, **TA** y **AT**), y se las comparó con las de **FP**.

**IV.4.1.3.1 Propiedades inmunomoduladoras de FP**

Los resultados de proliferación celular, estimada mediante la incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina) a las células, se muestran en la **Tabla IV.24**.

**Tabla IV.24** Efecto de **FP** sobre la proliferación de esplenocitos y macrófagos evaluada mediante la incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina).

FP (g L <sup>-1</sup> de proteínas)	LPS (µg mL <sup>-1</sup> )	Incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina) (dpm)	
		Esplenocitos	Macrófagos
		0	0
0,1	0	691,8 ± 6,8 <sup>b</sup>	513,0 ± 14,5 <sup>b</sup>
1	0	379,9 ± 17,4 <sup>a</sup>	220,2 ± 26,9 <sup>a</sup>
0	1	1036,1 ± 82,7 <sup>d</sup>	ND
0,1	1	872,3 ± 48,1 <sup>c</sup>	ND

X ± DE. ND: no determinado. LPS: lipopolisacárido bacteriano. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede observar, **FP** ejerció un efecto mitogénico sobre los esplenocitos, ya que incrementó la incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina a una concentración de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Este resultado concuerda con lo observado para otras fracciones proteicas obtenidas a partir de fuentes no convencionales. Al respecto, Hsu y col. (1997) aislaron la proteína Fip-*vvo* a partir del hongo *Volvariella volvacea*, la cual incrementó la incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina en linfocitos humanos de sangre periférica, obteniéndose el máximo efecto a 5 mg L<sup>-1</sup> de proteínas.

En base a este resultado, se podría pensar que **FP** posee ciertas proteínas capaces de estimular a la población linfocitaria presente en los esplenocitos (mezcla celular constituida por linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos, etc.). Si se tiene en cuenta que las algas rojas constituyen una fuente importante de *lectinas*, las cuales tienen un marcado efecto mitogénico sobre las poblaciones celulares (Aneiros y Garateix, 2004; Holanda y col., 2005), podría suponerse que la actividad mitogénica

## *Resultados y Discusión*

exhibida por **FP** se debe principalmente a este tipo de proteínas. Al respecto, Molchanova y col. (2010), lograron purificar una *lectina* a partir del alga roja *Tichocarpus crinitus*, la cual mostró interesantes propiedades mitogénicas en linfocitos humanos de sangre periférica, obteniéndose el máximo efecto a 0,78 mg L<sup>-1</sup> de proteínas. Para el caso de los macrófagos también se observó una acción mitogénica por parte de **FP** a 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas (**Tabla IV.24**). Sin embargo, la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en estas células fue menor a la observada para los esplenocitos, lo que podría estar asociado con la ausencia de la población linfocitaria.

Cabe destacar que tanto la *R-ficoeritrina* como la *C-ficocianina* no presentaron actividad mitogénica en las mismas poblaciones celulares evaluadas (los datos no se muestran).

Para ambas poblaciones celulares (esplenocitos y macrófagos), el efecto ocasionado por **FP** fue concentración dependiente. En este sentido, se pudo apreciar una pérdida total de la acción mitogénica a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas (**Tabla IV.24**), lo que podría deberse a un efecto citotóxico de **FP** a esa concentración proteica, sobre las poblaciones celulares estudiadas. Esto se ve reflejado en la **Tablas IV.25**, donde se muestran los niveles lactato deshidrogenasa (LDH), liberada al medio de cultivo de esplenocitos y macrófagos, respectivamente.

**Tabla IV.25** Nivel de lactato deshidrogenasa (mU μL<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo de esplenocitos y macrófagos en presencia o ausencia de **FP**

Población celular	FP (g L <sup>-1</sup> de proteínas)	Basal	LPS	ConA
Esplenocitos	0	20,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	20,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	22,5 ± 0,4 <sup>a</sup>
	0,1	21,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	21,8 ± 1,0 <sup>a</sup>
	1	113,8 ± 2,0 <sup>b</sup>	138,0 ± 4,1 <sup>b</sup>	139,6 ± 0,5 <sup>b</sup>
Macrófagos	0	24,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	24,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	
	0,1	23,8 ± 2,9 <sup>a</sup>	24,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	
	1	100,3 ± 2,7 <sup>b</sup>	104,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	

X ± DE. LPS: lipopolisacárido bacteriano. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede ver, la concentración de 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas resultó tóxica para las células (esplenocitos y macrófagos), ya que hubo un aumento significativo de la enzima LDH en el medio de cultivo respecto al control (0 g L<sup>-1</sup> de proteínas). La enzima LDH se libera al medio de cultivo como consecuencia de la lisis celular ocasionada por algún agente tóxico o injuria, lo que se manifiesta con un incremento en su concentración. Este efecto citotóxico también fue observado en presencia de los estímulos (LPS y ConA para esplenocitos y LPS para macrófagos).

A diferencia de lo anterior, la concentración de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas no ocasionó ningún efecto tóxico sobre las poblaciones celulares, ya sea en condiciones basales como estimuladas (**Tabla IV.25**). Este resultado también fue observado para la población linfocitaria en presencia o ausencia de estímulo (ConA), lo que se ve reflejado en la **Tabla IV.26**.

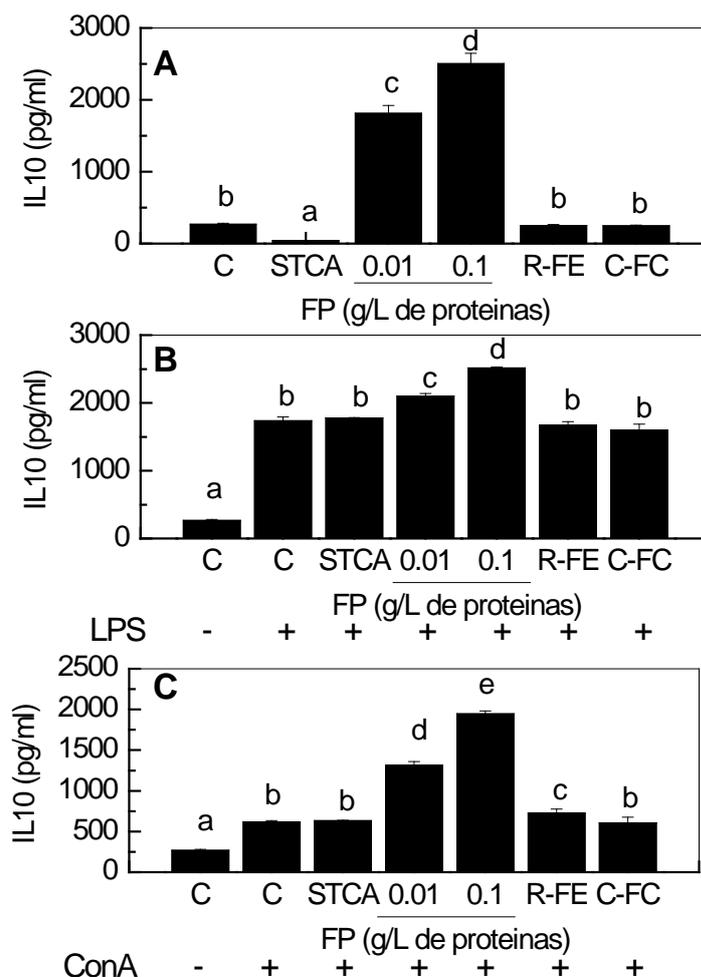
**Tabla IV.26** Nivel de lactato deshidrogenasa (mU μL<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo de linfocitos T en presencia o ausencia de **FP**

<b>FP (g L<sup>-1</sup> de proteínas)</b>	<b>Basal</b>	<b>ConA</b>
0	24,3 ± 2,0 <sup>a</sup>	24,3 ± 2,0 <sup>a</sup>
0,1	24,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	25,5 ± 2,2 <sup>a</sup>
1	108,3 ± 2,4 <sup>b</sup>	163,8 ± 2,9 <sup>b</sup>

X ± DE. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió no utilizar la concentración de 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas para los posteriores ensayos de inmunomodulación, siendo el nivel máximo evaluado el de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas.

En las **Figuras IV.31.A, B y C** se muestra el efecto de **FP** sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de LPS y ConA (B y C, respectivamente). La adición de **FP** al medio de cultivo incrementó la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Cabe señalar que este incremento fue concentración dependiente, obteniéndose el máximo valor de IL10 a 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas.



**Figura IV.31** – Efecto de FP, *R-ficoeritrina* (R-FE) y *C-ficocianina* (C-FC) sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata. Los esplenocitos fueron cultivados en presencia de FP (0,01 y 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FE (0,01 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FC (0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas) y STCA (sobrenadante de FP luego de la precipitación con TCA), en ausencia (A) o presencia de LPS o ConA (B y C, respectivamente). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se mencionó en la introducción, tanto las *ficobiliproteínas* como los *polisacáridos sulfatados* poseen determinadas propiedades inmunomoduladoras (Mohamed y col., 2012; Romay y col., 1998). Además, se ha visto que los *compuestos fenólicos* (flavonoides), dependiendo de las condiciones de ensayo, exhiben propiedades antiinflamatorias (López-Posadas y col., 2010). En base a esto, se podría pensar que la acción inmunomoduladora ejercida por FP sobre los esplenocitos de rata podría deberse principalmente a estas especies moleculares (*ficobiliproteínas*, *polisacáridos sulfatados* y *compuestos fenólicos*).

Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de las *ficobiliproteínas* (*R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*), sobre la secreción de IL10 en los esplenocitos de rata no fue posible

## Resultados y Discusión

observar diferencias significativas respecto al control (producción basal) (**Figura IV.31**). Esto estaría indicando que tanto la *R-ficoeritrina* como la *C-ficocianina* no serían las principales responsables del incremento de IL10 en el medio de cultivo y, consecuentemente, del efecto inmunomodulador observado con **FP**. Además, ninguna de las dos *ficobiliproteínas* produjo un aumento significativo de LDH en el medio de cultivo, lo que haría suponer que la falta de efecto por parte de estas proteínas sobre la producción de IL10 no está ligada a un problema de citotoxicidad sobre la población esplénica (**Tabla IV.27**).

**Tabla IV.27** Nivel de lactato deshidrogenasa ( $\text{mU } \mu\text{L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo de esplenocitos en presencia o ausencia de *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*

Ficobiliproteína	Proteínas ( $\text{g L}^{-1}$ )	Basal	LPS	ConA
	0	$24,2 \pm 0,6^a$	$24,9 \pm 2,0^a$	$25,5 \pm 0,2^a$
<i>R-ficoeritrina</i>	0,01	$23,6 \pm 1,0^a$	$22,2 \pm 2,2^a$	$23,9 \pm 1,6^a$
<i>C-ficocianina</i>	0,01	$25,7 \pm 1,7^a$	$22,7 \pm 1,9^a$	$23,6 \pm 2,2^a$

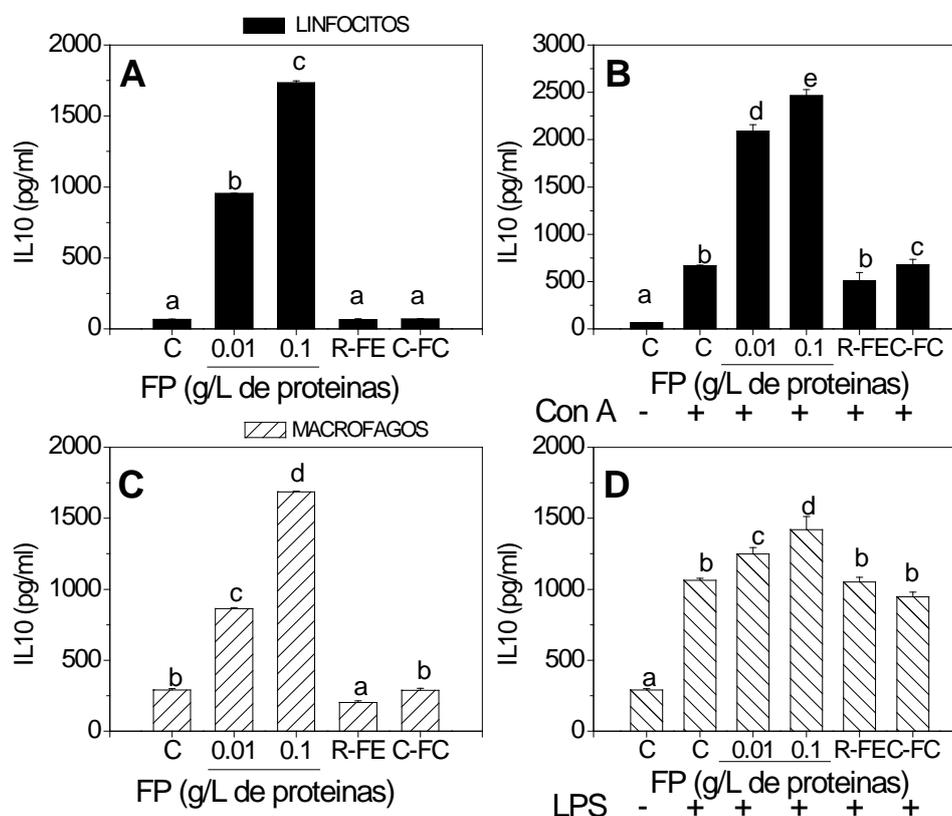
$X \pm \text{DE}$ . LPS: lipopolisacárido bacteriano. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al evaluar los componentes no proteicos presentes en **FP** (**StCA**), se pudo observar un efecto inhibitorio sobre la producción de IL10 en condiciones basales (**Figura IV.31.A**), mientras que no hubo aumento significativo respecto al control en presencia de los estímulos (**Figura IV.31.B y C**). Este resultado estaría indicando que el aumento de IL10 en la población esplénica no es inducido por *polisacáridos sulfatados* o *compuestos fenólicos* presentes en **FP**.

En base a todo lo expuesto, se podría pensar que **FP** ejerce su acción sobre la población esplénica mediante otras proteínas presentes en la fracción. Entre éstas cabría destacar a las *lectinas*. Como se mencionó anteriormente, **FP** exhibió un efecto mitogénico importante, lo que haría suponer la presencia de estas proteínas en la fracción. Además, se ha visto que las *lectinas* exhiben interesantes propiedades antiinflamatorias (Holdt y Kraan, 2011), lo que concuerda con lo observado para la IL10 (aumento de la secreción).

Cabe señalar que el LPS estimula a los macrófagos, mientras que la ConA lo hace sobre los linfocitos T. En base a esto, se podría pensar que **FP** tiene la capacidad

de modular ambas poblaciones celulares presentes en los esplenocitos, dando lugar a un incremento de IL10 en el medio de cultivo. Esto fue corroborado posteriormente al evaluar la acción de esta fracción sobre dichas células purificadas, lo que se ve reflejado en la Figuras IV.32.A, B, C y D.



**Figura IV.32** – Efecto de FP, *R-ficoeritrina* (R-FE) y *C-ficocianina* (C-FC) sobre la secreción de IL10 en linfocitos (A y B) y macrófagos (C y D). Las células fueron cultivadas en presencia de FP (0,01 y 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FE (0,01 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FC (0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), en ausencia (A y C) o presencia de LPS (D) o ConA (B). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p < 0,05).

FP indujo un incremento de la producción de IL10 en ambas poblaciones celulares (linfocitos T y macrófagos), tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Cabe destacar que este efecto fue más pronunciado en los linfocitos T, lo que haría suponer que dichas células son el principal blanco de acción de esta fracción.

Cuando se evaluaron ambas *ficobiliproteínas*, se observó el mismo comportamiento descrito para los esplenocitos. Es decir, no hubo efecto alguno sobre la producción de IL10 (Figuras IV.32.A, B, C y D). Cabe señalar que no se evidenciaron efectos tóxicos sobre ninguna de las dos poblaciones celulares estudiadas (Tabla IV.28).

**Tabla IV.28** Nivel de lactato deshidrogenasa (mU  $\mu\text{L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo de linfocitos o macrófagos en presencia o ausencia de *R-ficoeritrina* y *C-ficocianina*

Ficobiliproteína	Proteínas (g L <sup>-1</sup> )	Macrófagos		Linfocitos T	
		Basal	LPS	Basal	ConA
	0	24,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	23,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	24,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	25,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
<i>R-ficoeritrina</i>	0,01	22,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	24,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	23,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	21,8 ± 1,0 <sup>a</sup>
<i>C-ficocianina</i>	0,01	24,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	26,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	22,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	23,7 ± 1,7 <sup>a</sup>

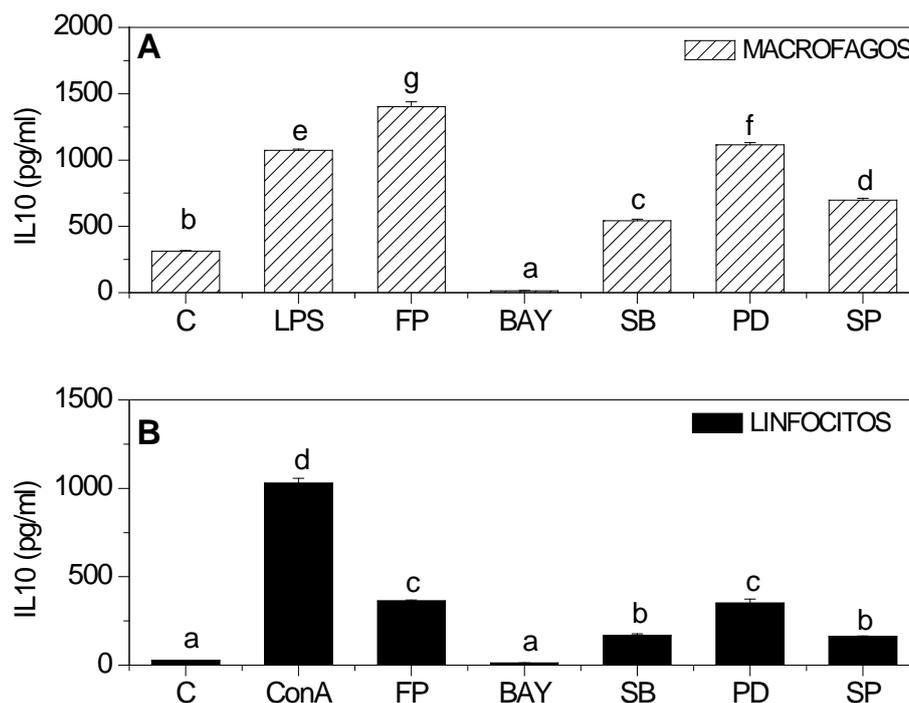
X ± DE. LPS: lipopolisacárido bacteriano. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se mencionó en la introducción, tanto el factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) como las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) participan activamente en la respuesta inmune. En este sentido, se ha visto que ambos factores de transcripción están involucrados en la producción de IL10 por parte de los monocitos/macrófagos (Ma y col., 2011; Portis y col., 2001).

Para determinar el rol del NF- $\kappa$ B y las MAPK en la producción de IL10 inducida por **FP**, se utilizaron inhibidores (**PD** inhibidor de MAPK ERK 1/2, **SB** inhibidor de p38 MAPK, **SP** inhibidor de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y **BAY** inhibidor de NF- $\kappa$ B.). Los resultados obtenidos tanto en macrófagos como en linfocitos T se muestran en las **Figuras IV.33.A y B**, respectivamente.

Como se puede ver, la adición de **SB** o **SP** al medio de cultivo produjo un descenso de la expresión de IL10 en ambas poblaciones celulares (macrófagos y linfocitos T). Sin embargo, al agregar **PD** no se observó ningún efecto importante sobre el nivel de dicha citoquina (**Figuras IV.33.B**). Esto estaría indicando que el efecto ejercido por **FP** sobre los macrófagos y linfocitos depende de los factores de transcripción: p38 y JNK.

Cabe destacar que ninguno de los inhibidores MAPK impidió la secreción total de IL10. Lo que haría suponer que esta vía juega un papel secundario en la expresión de dicha citoquina inducida por **FP**.

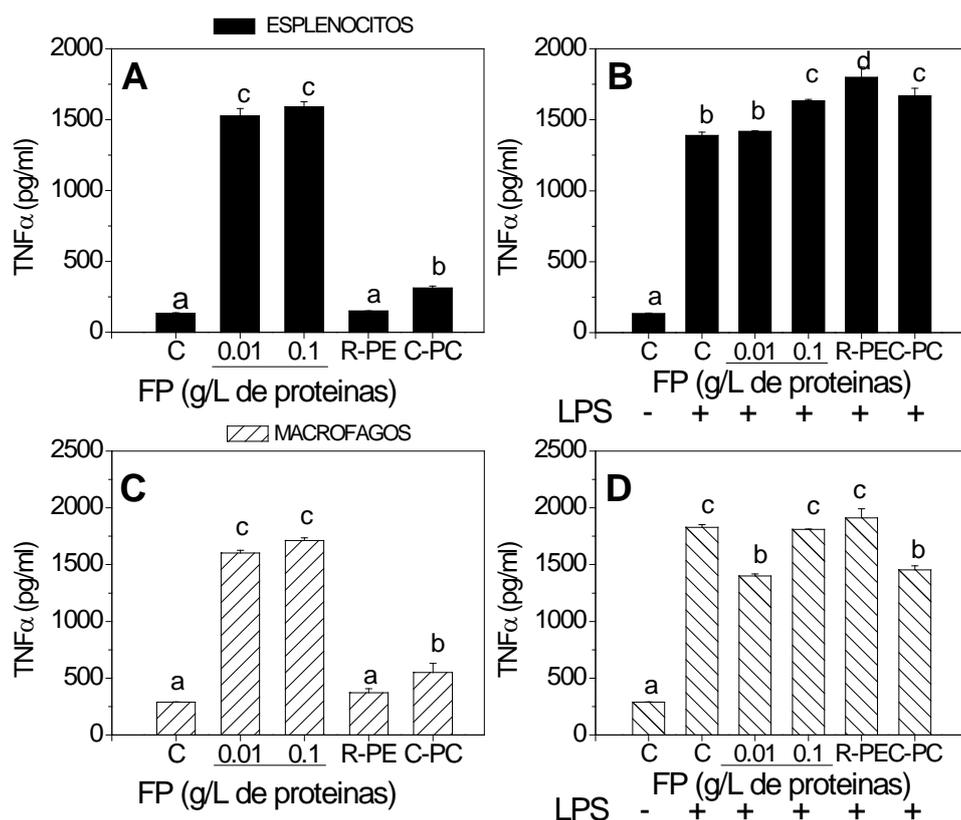


**Figura IV.33** – Efecto de los inhibidores del NF- $\kappa$ B y las MAPK sobre la producción de IL10 inducida por FP en macrófagos (A) y linfocitos (B). Las células fueron cultivadas en presencia de FP ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas) y los inhibidores (PD inhibidor de MAPK ERK 1/2, SB inhibidor de p38 MAPK, SP inhibidor de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y BAY inhibidor de NF- $\kappa$ B). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al emplear **BAY**, se observó una inhibición casi total de la secreción de IL10 en linfocitos, siendo total en macrófagos (**Figuras IV.33.A y B**). Esto estaría indicando que **FP** ejerce su acción principalmente mediante el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La participación dual de las MAPK y el NF- $\kappa$ B sobre la secreción de IL10 no es inesperada, ya que ambas vías se activan por acción de la enzima I $\kappa$ B quinasa (IKK), en respuesta a un estímulo (Requena y col., 2009). Esta enzima fosforila a la proteína inhibitoria I $\kappa$ B, la cual está unida al NF- $\kappa$ B, favoreciendo su ubiquitinación y posterior degradación proteosómica. Esto promueve la liberación del NF- $\kappa$ B, el cual ingresa al núcleo celular para regular la expresión génica (Wong y col., 2007).

En las **Figuras IV.34.A, B, C y D** se muestra el efecto de **FP** sobre la secreción de TNF $\alpha$  en esplenocitos y macrófagos tanto en condiciones basales como en presencia de LPS.



**Figura IV.34** – Efecto de FP, *R-ficoeritrina* (R-FE) y *C-ficocianina* (C-FC) sobre la secreción de TNF $\alpha$  en esplenocitos (A y B) y macrófagos (C y D). Las células fueron cultivadas en presencia de FP (0,01 y 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FE (0,01 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FC (0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), en ausencia (A y C) o presencia de LPS (B y D). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede apreciar, la adición de **FP** al medio de cultivo en ausencia del estímulo incrementó la producción de TNF $\alpha$  en ambas poblaciones celulares. Sin embargo, este efecto prácticamente desapareció en presencia del LPS (**Figuras IV.34.B y D**). Esto último podría estar asociado con el aumento de IL10 en presencia del estímulo (**Figuras IV.31.B y IV.31.D**). Al respecto, se sabe que dicha citoquina modula en baja la producción de TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  (Waal y col., 1991).

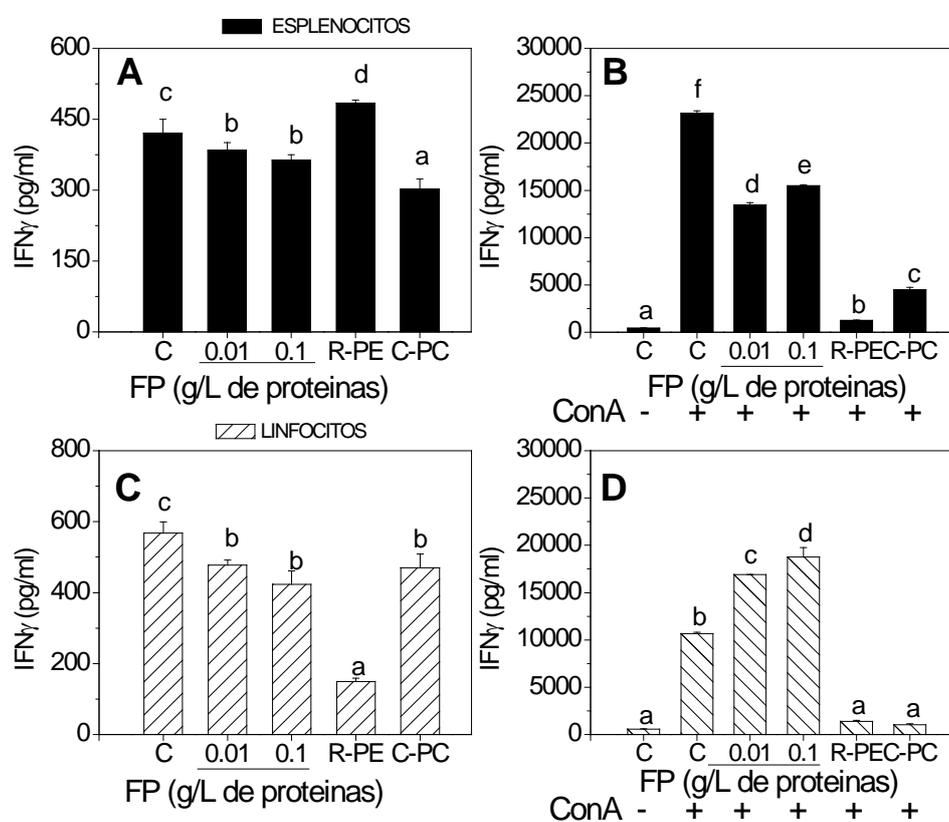
En concordancia con lo anterior, no se observaron cambios significativos en los niveles de IL6 e IL1 $\beta$  en el medio de cultivo de macrófagos al adicionar **FP**. Este comportamiento fue evidenciado tanto en condiciones basales como en presencia de LPS (datos no mostrados), lo que estaría confirmando la acción moduladora de IL10 sobre las demás citoquinas en presencia del estímulo.

Cabe añadir que el efecto ocasionado por las *ficobiliproteínas* sobre los esplenocitos y macrófagos, en condiciones basales y estimuladas, para el TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  fue muy diferente al ejercido por **FP** (**Figuras IV.34.A, B, C y D**). Esto haría

suponer que tanto la **R-FE** como la **C-FC** presentes en dicha fracción no serían las principales responsables del efecto inmunomodulador.

En las **Figuras IV.35.A, B, C y D** se muestra el efecto de **FP** sobre la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  en esplenocitos y linfocitos T, tanto en condiciones basales como en presencia de Con A.

El agregado de **FP** al medio de cultivo de esplenocitos de rata inhibió la producción de  $\text{IFN}\gamma$ . Este efecto se observó tanto en condiciones basales como en presencia de ConA (**Figuras IV.35.A y B**), siendo más pronunciado en éste último ( $\approx 50\%$ ). Este resultado haría suponer que **FP** promueve la secreción de IL10 e inhibe la del  $\text{IFN}\gamma$  en la población celular esplénica.



**Figura IV.35** – Efecto de FP, *R-ficoeritrina* (R-FE) y *C-ficocianina* (C-FC) sobre la secreción de  $\text{IFN}\gamma$  en esplenocitos (A y B) y linfocitos T (C y D). Las células fueron cultivadas en presencia de FP (0,01 y 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FE (0,01 g L<sup>-1</sup> de proteínas), C-FC (0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), en ausencia (A y C) o presencia de ConA (B y D). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Cabe destacar que este efecto inhibitorio no fue observado en los linfocitos T purificados, ya que se observó un aumento significativo de  $\text{IFN}\gamma$  en presencia de **FP** y Con A (**Figuras IV.35.D**). Este incremento haría suponer que la acción inhibitoria ejercida por **FP** sobre la secreción de dicha citoquina requiere de la presencia de otras

células distintas a los linfocitos T que están en los esplenocitos, tales como los macrófagos del tipo M2.

El hecho de que **FP** promueva la secreción de IL10 en distintas poblaciones celulares, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos, y que la magnitud de la respuesta de dicha citoquina en comparación con las demás sea mucho mayor, podría sugerir que el efecto global de esta fracción es del tipo antiinflamatorio. Sin embargo, se debe tener cuidado de no extrapolar estos resultados al efecto *in vivo*, ya que hay muchas variables a tener en cuenta que pueden alterar los resultados hallados en la presente tesis.

#### **IV.4.1.3.2 Propiedades inmunomoduladoras de HFP**

Se procedió a estudiar el efecto de **HFP** sobre la viabilidad celular de las distintas poblaciones celulares a 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Para ello, se evaluó el nivel de LDH en el medio de cultivo de esplenocitos en condiciones basales y en presencia de LPS o ConA. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla IV.29**.

Al igual que para **FP**, la concentración de 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas de **HFP** resultó tóxica para los esplenocitos, ya que hubo un aumento significativo de la enzima LDH en el medio de cultivo respecto al control (0 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Este efecto citotóxico también fue observado en presencia de los estímulos (LPS y ConA).

Cabe agregar que la toxicidad celular exhibida por **FP** a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas no fue eliminada con la proteólisis (**Tabla IV.29**), lo que haría suponer que hay otros componentes no proteicos en la fracción que resultan tóxicos para las células.

A diferencia de lo anterior, la concentración de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas no ocasionó ningún efecto tóxico sobre las poblaciones celulares, ya sea en condiciones basales como estimuladas (**Tabla IV.29**). En base a esto, se decidió utilizar dicha concentración para los posteriores ensayos de inmunomodulación.

En las **Figuras IV.36.A, B y C** se muestra el efecto de **HFP** sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de LPS y ConA (B y C, respectivamente).

*Resultados y Discusión***Tabla IV.29** Nivel de lactato deshidrogenasa (mU  $\mu\text{L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo de esplenocitos en presencia o ausencia de **HFP**

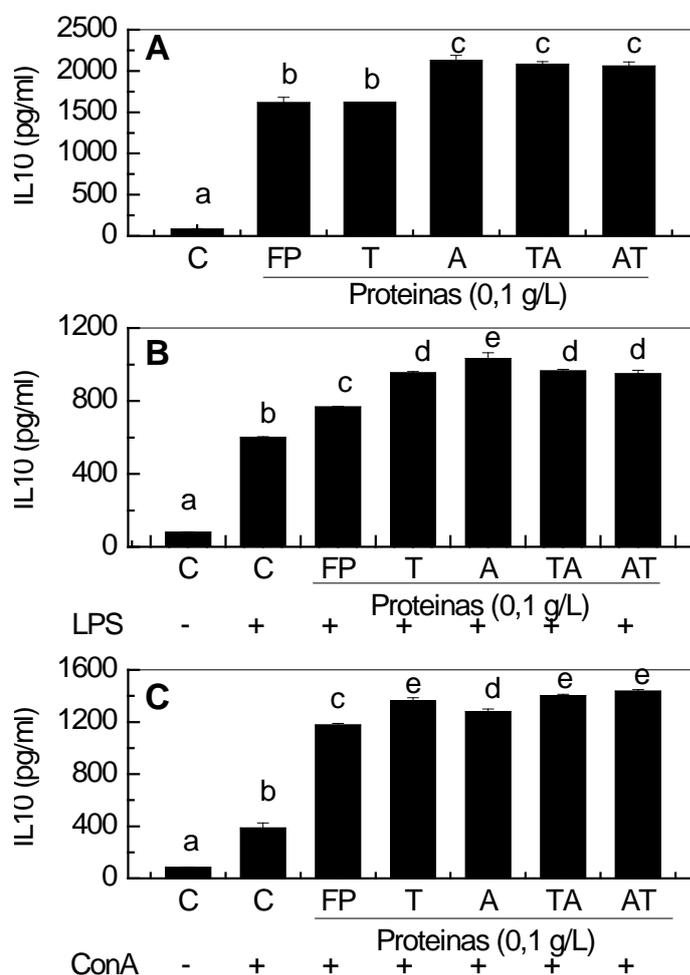
<b>HFP</b>	<b>Proteínas (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Basal</b>	<b>LPS</b>	<b>ConA</b>
T	0	29,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	29,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	27,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
	0,1	28,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	29,4 ± 1,8 <sup>a</sup>	27,3 ± 3,6 <sup>a</sup>
	1	116,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	107,2 ± 7,4 <sup>b</sup>	142,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
A	0	29,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	29,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	27,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
	0,1	28,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	27,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	27,9 ± 2,8 <sup>a</sup>
	1	159,1 ± 1,2 <sup>b</sup>	229,5 ± 3,4 <sup>b</sup>	134,6 ± 0,5 <sup>b</sup>
TA	0	29,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	29,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	27,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
	0,1	29,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	28,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	25,7 ± 2,1 <sup>a</sup>
	1	113,1 ± 4,8 <sup>b</sup>	263,5 ± 8,6 <sup>b</sup>	445,5 ± 2,7 <sup>b</sup>
AT	0	29,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	29,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	27,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
	0,1	29,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	28,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	28,4 ± 2,1 <sup>a</sup>
	1	146,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	229,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	304,3 ± 2,7 <sup>b</sup>

X ± DE. LPS: lipopolisacárido bacteriano. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La adición de **HFP** al medio de cultivo incrementó la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Cabe señalar que este aumento fue significativamente superior al obtenido con **FP** a la misma concentración proteica (0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Esto haría suponer que los péptidos bioactivos generados tras la hidrólisis poseen una actividad inmunomoduladora más potente que su sustrato (**FP**).

Como se mencionó anteriormente, el LPS estimula a los macrófagos y la ConA a los linfocitos T. En base a esto, se podría pensar que **HFP** tiene la capacidad de modular ambas poblaciones celulares presentes en los esplenocitos, dando lugar a un incremento

de IL10 en el medio de cultivo. Cabe agregar que las principales células productoras de esta citoquina en la población esplénica son los macrófagos y los linfocitos T reguladores (Treg) (Requena y col., 2010).

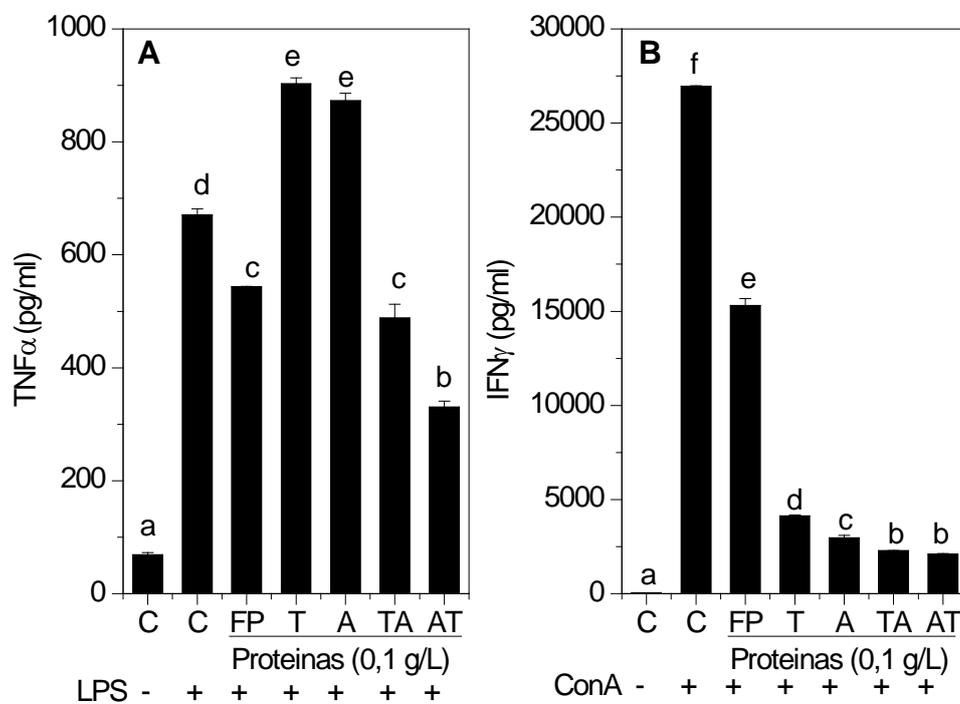


**Figura IV.36** – Efecto de FP y sus hidrolizados sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata. Los esplenocitos fueron cultivados en presencia de FP o HFP a 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas, en ausencia (A) o presencia de LPS o ConA (B y C, respectivamente). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p < 0,05).

En las **Figuras IV.37.A y B** se muestra el efecto de **HFP** sobre la secreción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en esplenocitos, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA, respectivamente).

Como se puede ver en la **Figura IV.37.A**, tanto **FP** como los hidrolizados **TA** y **AT** tuvieron un efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF $\alpha$ , siendo para **AT** del 50%. Sin embargo, para el caso de **T** y **A** se obtuvo un resultado opuesto. Es decir, estos hidrolizados promovieron la liberación de esta citoquinas al medio de cultivo. En base a

esto se podría pensar que la secuencia peptídica de los péptidos presentes en cada hidrolizado juega un rol fundamental en la inmunomodulación, ya que el tamaño molecular de todos los hidrolizados es muy parecido (**Figura IV.9**).



**Figura IV.37** – Efecto de FP y sus hidrolizados sobre la secreción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en esplenocitos de rata. Los esplenocitos fueron cultivados en presencia de FP o HFP a 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas, en presencia de LPS o ConA (A y B, respectivamente). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

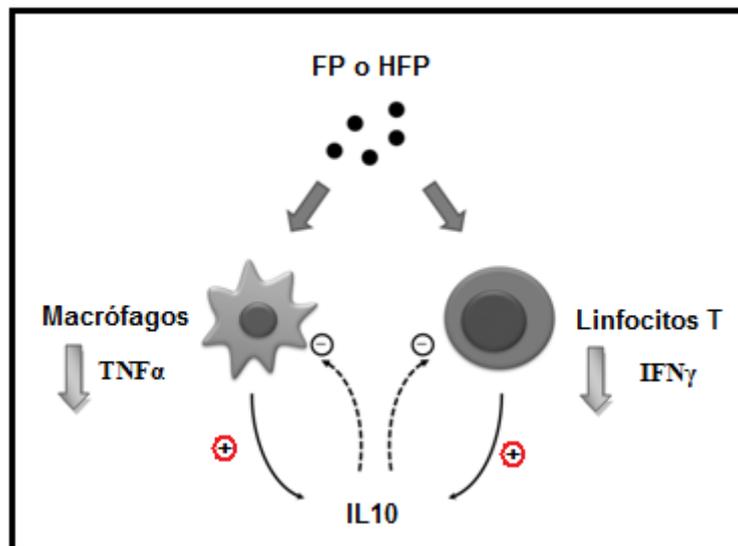
Este efecto supresor sobre la producción de TNF $\alpha$  podría estar asociado con el aumento de IL10 en el medio de cultivo (**Figura IV.36**). Como se sabe, esta citoquina inhibe la secreción del TNF $\alpha$  producido por los macrófagos en presencia del LPS (Feng y col., 1993). De esta manera, **FP** y los hidrolizados **TA** y **AT** favorecerían la producción de IL10, la cual a su vez inhibiría la secreción del TNF $\alpha$  en presencia del LPS.

Por otro lado, la adición de **HFP** al medio de cultivo inhibió la producción de IFN $\gamma$ . Este efecto fue mucho más pronunciado para los hidrolizados **TA** y **AT**, obteniéndose una inhibición del 80% (**Figura IV.37.B**). Este resultado concuerda con lo observado para el TNF $\alpha$ , ya que la IL10 también regula en baja la secreción de IFN $\gamma$  producido por los linfocitos T helper 1 (Th1) en presencia de ConA (Feng y col., 1993).

Cabe añadir que la ConA posee la capacidad de estimular a los linfocitos T, favoreciendo la diferenciación de los mismos en distintas subpoblaciones celulares (Dwyer y Johnson, 1981). Entre estas poblaciones se tienen a los linfocitos Treg (con actividad inmunosupresora) y los Th1 (con actividad pro-inflamatorios) (Kaiko y col., 2008). Teniendo en cuenta esto, se podría pensar que tanto **FP** como sus hidrolizados, modulan la diferenciación de las células T a Treg en presencia de ConA, lo que se traducen en un aumento de IL10 y un descenso de IFN $\gamma$  en el medio de cultivo esplénico.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Requena y col. (2010), quienes estudiaron el efecto del glicomacropéptido bovino sobre esplenocitos de rata. En dicho trabajo se observó un aumento en la producción de IL10 y un efecto supresor sobre las citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ), a una concentración de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas en presencia del estímulo (LPS o ConA). Los autores posteriormente corroboraron los resultados de forma *in vivo* con un modelo de inflamación intestinal en ratas, y concluyeron que las células target para la inmunomodulación ejercida por el glicomacropéptido bovino eran los linfocitos T reguladores (Treg).

En **Figura IV.38**, se resume el posible mecanismo de acción mediante el cual **FP** y sus hidrolizados (**TA** y **AT**), ejercen su efecto inmunosupresor *in vitro*.



**Figura IV.38** - Esquema del posible mecanismo de acción de FP, TA y AT sobre los esplenocitos.

#### **IV.4.2 Propiedades bio-funcionales de HR**

A fin de determinar las propiedades bio-funcionales de **HR**, se procedió a evaluar las propiedades antioxidantes, antihipertensivas e inmunomoduladoras de dicho hidrolizado. Cabe aclarar que la bio-funcionalidad de **R** no se estudió debido a su baja solubilidad acuosa (**Figura IV.17**).

##### **IV.4.2.1 Propiedades antioxidantes**

Para evaluar las propiedades antioxidantes de **HR** se emplearon dos métodos *in vitro* del tipo **ET** (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) y uno basado en la capacidad quelante de metales de transición (capacidad quelante ligada al Cu<sup>2+</sup>).

**HR** presentó una TEAC de  $1,54 \pm 0,02$  mmol de Trolox g<sup>-1</sup> de proteínas y un valor de inhibición del radical DPPH de  $49,4 \pm 2,4\%$  a 0,9 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Esta capacidad antioxidante podría deberse a los péptidos bioactivos, aminoácidos libres y compuestos fenólicos liberados durante la hidrólisis de **R**.

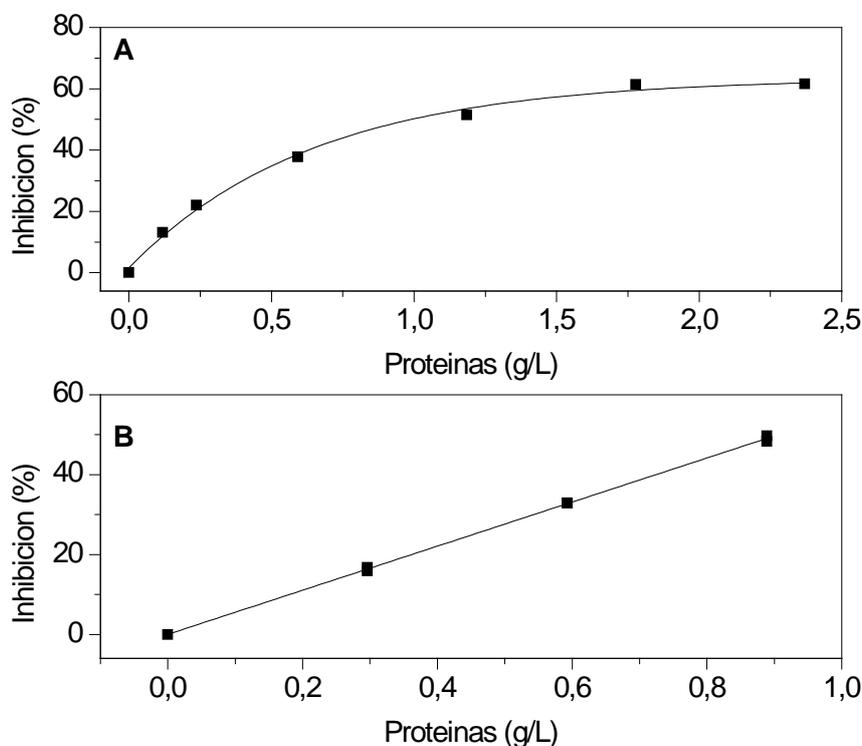
Como se mencionó anteriormente, los hidrolizados que tienen fracciones peptídicas de bajo peso molecular exhiben mayores propiedades antioxidantes que los que poseen componentes de gran tamaño (Wang y col., 2010). Al respecto, se ha sugerido que la hidrólisis secuencial con una endo + exoproteasa favorece la generación de especies proteicas pequeñas y aminoácidos libres, los cuales pueden ingresar fácilmente al sistema de ensayo redox, dando mayores valores de capacidad antioxidante (Dávalos y col., 2004; Moosman y Behl, 2002; Segura Campos y col., 2013).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Sheih y col. (2009), para hidrolizados obtenidos a partir de un residuo proteico del alga *Chlorella vulgaris*. En dicho trabajo, los autores lograron aislar un péptido de 1309 Da cuya secuencia fue Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe, que exhibió muy buenas propiedades antioxidantes frente al radical DPPH y ABTS<sup>+</sup>.

En la **Figura IV.15** se mostró que el contenido de **CFE** en **HR** fue superior al de **R**. Este incremento fue asociado al proceso de hidrólisis que contribuiría con la ruptura de los enlaces entre las proteínas y los compuestos fenólicos (Ngo y col., 2011), traduciéndose en una mayor extracción y solubilización de estas especies. Por lo tanto, la capacidad antioxidante observada en **HR** también podría deberse a los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado. En este sentido, Wang y col. (2010), trabajando

con hidrolizados proteicos obtenidos a partir del alga roja *P. palmata*, asociaron el bloqueo del radical DPPH a las especies fenólicas liberadas tras la proteólisis.

En las **Figuras IV.39.A y B** se muestra la influencia de la concentración proteica de **HR** sobre las propiedades antioxidantes.



**Figura IV.39** – **A.** Inhibición del radical cation ABTS<sup>+</sup> medida a los 6 minutos de reacción en función de la concentración de HR (0,12 – 2,37 g L<sup>-1</sup> de proteínas); **B.** Inhibición del radical DPPH medida a los 30 minutos de reacción en función de la concentración de HR (0,3 – 0,9 g L<sup>-1</sup> de proteínas) (B).

A medida que se incrementó la concentración proteica de **HR**, en el rango de 0,12 a 2,37 g L<sup>-1</sup> de proteínas, se produjo un aumento en la capacidad antioxidante del hidrolizado hasta alcanzar un “plateau” (**Figura IV.39.A**). Este comportamiento de tipo asintótico ya ha sido observado para otras fuentes proteicas tales como: gluten de trigo (Wang y col., 2007), yema de huevo (Sakanaka y Tachibana, 2006), proteínas de hoja de alfalfa (Xie y col., 2008), proteínas de amaranto (Orsini Delgado y col., 2011), etc.

A partir de la curva de la **Figuras IV.39.A**, se obtuvo el valor de IC<sub>50</sub> de 1,01 ± 0,02 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Este valor fue inferior al obtenido por Ren y col. (2008) para una fracción alcalina del hidrolizado de músculo de pez *Ctenopharyngodon idellus* (2,11 ± 0,10 g L<sup>-1</sup> de proteínas). Sin embargo, Sheih y col. (2009) observaron un valor

---

de IC<sub>50</sub> de 0,04 g L<sup>-1</sup> para un hidrolizado obtenido con pepsina a partir del alga *Chlorella vulgaris*, lo que implica una mayor capacidad antioxidante.

Para el caso del radical DPPH, a medida que se incrementó la concentración proteica de **HR**, en el rango de 0,3 – 0,9 g L<sup>-1</sup> de proteínas, la capacidad antioxidante aumentó linealmente (**Figura IV.39.B**). Este comportamiento lineal ya ha sido observado por diversos investigadores para este radical. Al respecto, Song y col. (2008) observaron este comportamiento con hidrolizados de proteínas de *Arca subcrenata*, en un rango proteico de 2 - 12 g L<sup>-1</sup>. Balti y col. (2011) obtuvieron la misma relación, pero para dos hidrolizados de proteínas de músculo de calamar (*Sepia officinalis*) en un rango de concentraciones de 0,5 - 3 g L<sup>-1</sup> de proteínas.

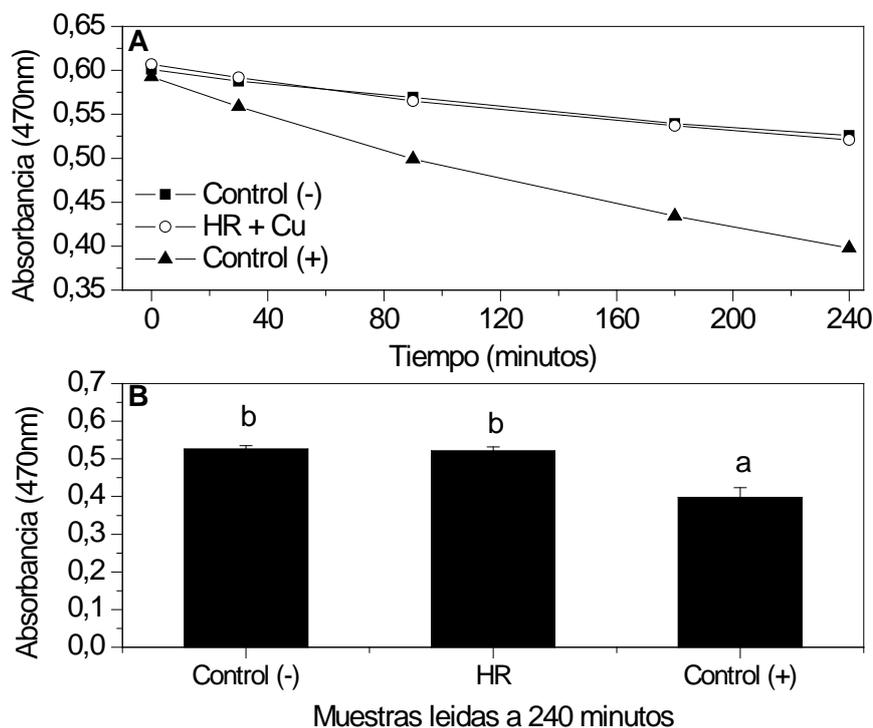
A partir de la curva de la **Figura IV.39.B**, se obtuvo el valor de IC<sub>50</sub> de 0,91 ± 0,01 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Este valor fue inferior al obtenido por Song y col. (2008), quienes trabajaron con un hidrolizado proteico de *Arca subcrenata* (6,23 g L<sup>-1</sup> de proteínas).

Como se mencionó anteriormente, los péptidos bioactivos poseen generalmente entre 3 y 20 aminoácidos (Tierney y col., 2010). Si se tiene en cuenta que **HR** presenta una fracción proteica de 523 Da (**Figura IV.14**), podríamos suponer que la capacidad antioxidante frente a los radicales (ABTS<sup>+</sup> y DPPH), se debe a estos *tetra-péptidos*. En este sentido, Shen y col. (2010) obtuvieron un hidrolizado de ovotransferrina, en el cual encontraron que la mayor actividad antioxidante se debía a dos tetra-péptidos (Trp-Asn-Ile-Pro y Gly-Trp-Asn-Ile) presentes en el hidrolizado.

Cabe recordar que **HR** también posee aminoácidos libres tales como Asp, Glu, Ala, Ile, Leu, Phe y Lys (**Tabla IV.14**), lo que haría pensar que la capacidad antioxidante exhibida por el hidrolizado también es atribuible a dichos aminoácidos. Al respecto, diversos autores han afirmado que las propiedades antioxidantes de los péptidos se deben a los distintos aminoácidos ácidos, aromáticos y ramificados presentes en la secuencia peptídica (Sarmadi y Ismail, 2010; Qian y col., 2008).

En la **Figura IV.40** se muestran los resultados obtenidos al evaluar la capacidad quelante (CQ) que poseen los péptidos de **HR** frente al catión divalente cobre (Cu<sup>2+</sup>). Cabe recordar que en este ensayo, el Cu<sup>2+</sup> actúa como catalizador de la oxidación del β-caroteno, disminuyendo su absorbancia a 470 nm. Los péptidos que poseen CQ

complejan el  $\text{Cu}^{2+}$  y evitan su acción catalítica, lo que se manifiesta como un menor descenso de absorbancia del  $\beta$ -caroteno.



**Figura IV.40** –**A**. Absorbancia del  $\beta$ -caroteno a 470 nm en función del tiempo de reacción en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  [control (-)], en presencia de HR ( $1 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas) y  $\text{Cu}^{2+}$  (HR + Cu), y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  [control (+)]. **B**. Absorbancia del  $\beta$ -caroteno a 470 nm los 240 minutos. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede ver en la **Figura IV.40.A**, a medida que transcurre el tiempo de reacción, la absorbancia a 470 nm para el control (-) (sin  $\text{Cu}^{2+}$ ) desciende ligeramente. Este leve descenso en la absorbancia puede deberse a la degradación oxidativa del  $\beta$ -caroteno ocasionada por la luz y el oxígeno (Megías y col., 2008). Por el contrario, para el caso del control (+) (con  $\text{Cu}^{2+}$ ), la absorbancia a 470 nm disminuye rápidamente, conforme pasa el tiempo de reacción. Esto indicaría que el  $\text{Cu}^{2+}$  estaría actuando como catalizador de la oxidación del  $\beta$ -caroteno. Para el caso de HR +  $\text{Cu}^{2+}$  se puede apreciar un comportamiento casi idéntico al del control (-), no habiendo diferencias significativas para los 240 minutos de reacción (**Figura IV.40.B**), lo que estaría indicando que HR posee péptidos con CQ que impiden la acción pro-oxidante del  $\text{Cu}^{2+}$  sobre el  $\beta$ -caroteno. El valor de CQ obtenido para HR a los 240 minutos fue de  $96,72 \pm 0,04\%$ .

Como se explicó en el punto **IV.4.1.1**, los aminoácidos ácidos a pH 7,0 están cargados negativamente, lo que les confiere interesantes propiedades quelantes (Saiga y col., 2003). Si tenemos en cuenta que hay una alta probabilidad de que los péptidos presentes en **HR** estén constituidos por los aminoácidos: Asp, Ala, Glu, Gly y Leu (**Tabla IV.14**), podríamos pensar que la elevada CQ mostrada por **HR** se debe principalmente a estas especies aminoacídicas presentes en los péptidos.

Cabe añadir que la CQ exhibida por **HR** también puede estar relacionada a los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado, los cuales poseen la habilidad de complejar los metales de transición (Wijesekara y Kim, 2010).

#### **IV.4.2.2 Propiedades antihipertensivas**

El valor de inhibición de **ECA I** por parte de **HR** a  $2,37 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas fue de  $45,65 \pm 0,95\%$ . Este resultado fue mayor al hallado por Khantaphant y col. (2011) para un hidrolizado obtenido a partir de proteínas musculares del pez *Lutjanus vitta* mediante hidrólisis enzimática secuencial (Alcalasa 2 horas + Flavourzyme 2 horas). En dicho trabajo, el valor de inhibición de la enzima fue de 35% para una concentración proteica de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , lo que indica que los péptidos presentes en **HR** resultan más activos que los obtenidos a partir de *Lutjanus vitta*. Sin embargo, Wang y col. (2008), obtuvieron un hidrolizado con Alcalasa empleando como sustrato proteínas de maní que inhibió en un 67% a **ECA I** a una concentración de proteínas de  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

Murakami y col. (2004), analizaron varios productos comerciales constituidos por péptidos, entre ellos uno denominado WE80BG obtenido a partir de proteínas del suero de la leche, cuyo peso molecular medio fue de 570 Da. Luego de diferentes etapas de purificación, encontraron que la fracción peptídica responsable de la mayor actividad era el *tetra-péptido*: Ala-Leu-Pro-Met. Si consideramos que el **HR** está constituido principalmente por *tetra-péptidos* (**Figura IV.14**), se podría suponer que la acción inhibitoria sobre **ECA I** se debe mayoritariamente a ellos. En concordancia con esto, Suetsuna y Chen (2001), aislaron el *tetra-péptido*: Ile-Val-Val-Glu a partir de un hidrolizado del alga *C. vulgaris*, el cual exhibió muy buena acción inhibitoria sobre **ECA I**.

Como se mencionó anteriormente, **HR** también posee una fracción proteica cuyo peso molecular aparente es de aproximadamente 5,5 kDa ( $\approx 45$  aminoácidos). Sin embargo, los péptidos inhibidores de **ECA I** generalmente poseen entre 2 a 30

aminoácidos (Wilson y col., 2011). Por lo tanto, la fracción de 5,5 kDa no sería la principal responsable del efecto inhibitorio ejercido por **HR** sobre **ECA I**. Esto concuerda con Segura Campos y col. (2013), quienes obtuvieron la mayor inhibición de **ECA I** con la fracción peptídica < 1 kDa (69,3%), proveniente de un hidrolizado de Chia (*Salvia hispanica*) que se obtuvo de forma secuencial con las enzimas Alcalasa (1 hora) y Flavourzyme (1,5 horas).

Cabe recordar que en la inhibición de **ECA I**, además del tamaño peptídico, influye la secuencia y el tipo de aminoácidos (López-Fandiño y col., 2006). En este sentido, se han aislado e identificado péptidos inhibidores de dicha enzima que poseen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en su grupo C-terminal (Torruco-Uco y col., 2008). Al respecto, **HR** posee un elevado contenido de los aminoácidos hidrofóbicos: Ala y Leu (**Tabla IV.14**), por lo que podría suponerse que la actividad inhibitoria sobre **ECA I** se debe principalmente a la presencia de tales aminoácidos en la secuencia peptídica.

Por último, el elevado nivel de **CFE** en **HR** (**Figura IV.15**) podría jugar un rol muy importante en la inhibición de **ECA I**. Como se mencionó anteriormente, estos compuestos pueden formar quelatos con el  $Zn^{2+}$  que se encuentra en el sitio activo de la enzima, dando a lugar a su inactivación (Wijesekara y Kim, 2010). Al respecto, Athukorala y Jeon (2005) reportaron que la hidrólisis enzimática del alga marrón *E. cava*, que posee un alto contenido de compuestos fenólicos, era una buena herramienta para obtener hidrolizados con potente acción inhibitoria frente a **ECA I**. En dicho trabajo, los autores atribuyeron la inhibición tanto a los péptidos como a los polifenoles liberados tras la proteólisis. En este mismo sentido, Ngo y col. (2011), confirmaron que la elevada actividad inhibitoria de los hidrolizados obtenidos a partir del alga marrón *E. cava*, se debía al alto contenido de *florotaninos*.

#### **IV.4.2.3 Propiedades inmunomoduladoras**

En primer lugar, se estudió el efecto de **HR** (0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas) sobre la viabilidad celular de las distintas poblaciones celulares mediante la cuantificación de LDH. Este ensayo se realizó tanto en condiciones basales como en presencia del estímulo (LPS o ConA). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.30**.

**Tabla IV.30** Nivel de lactato deshidrogenasa ( $\text{mU } \mu\text{L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo de esplenocitos, linfocitos T y macrófagos en presencia o ausencia de **HR**

Población celular	HR ( $\text{g L}^{-1}$ de proteínas)	Basal	LPS	ConA
Esplenocitos	0	$24,2 \pm 0,6^a$	$24,9 \pm 2,0^a$	$25,5 \pm 0,2^a$
	0,1	$23,8 \pm 2,1^a$	$23,5 \pm 1,5^a$	$23,8 \pm 1,5^a$
	1	$23,8 \pm 0,9^a$	$22,6 \pm 0,7^a$	$22,5 \pm 1,6^a$
Linfocitos T	0	$24,3 \pm 2,0^a$		$25,5 \pm 2,0^a$
	0,1	$23,7 \pm 1,7^a$		$21,6 \pm 1,6^a$
	1	$21,8 \pm 1,0^a$		$23,8 \pm 1,5^a$
Macrófagos	0	$24,9 \pm 1,8^a$	$24,6 \pm 1,0^a$	
	0,1	$25,7 \pm 0,7^a$	$25,0 \pm 1,1^a$	
	1	$24,3 \pm 1,1^a$	$24,3 \pm 0,7^a$	

$X \pm \text{DE}$ . LPS: lipopolisacárido bacteriano. ConA: concanavalina A. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Ninguna de las concentraciones evaluadas resultó tóxica para las células, lo que se manifiesta en los niveles de LDH en el medio de cultivo respecto al control ( $0 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas). La ausencia de citotoxicidad también fue observada en presencia de los estímulos LPS y ConA.

Al no presentar toxicidad en ninguna de las concentraciones estudiadas, el efecto de **HR** sobre la proliferación de esplenocitos y linfocitos T se evaluó en su nivel más alto ( $1 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.31**.

**HR** aumentó la proliferación celular de los esplenocitos y linfocitos T en condiciones basales y estimuladas, respectivamente. Esto estaría indicando que **HR** actúa como agente mitótico sobre las diferentes poblaciones celulares, particularmente en los linfocitos T, en donde el valor obtenido para **HR** a  $1 \text{ g L}^{-1}$  no varió significativamente con respecto a ConA ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Cabe destacar que ConA es una

*lectina* con conocida actividad mitogénica, por lo que es de esperar un incremento en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (control positivo) (Kong y col., 2008).

**Tabla IV.31** Efecto de **HR** sobre la proliferación de esplenocitos y linfocitos T evaluada mediante la incorporación de timidina tritiada ([<sup>3</sup>H]-timidina).

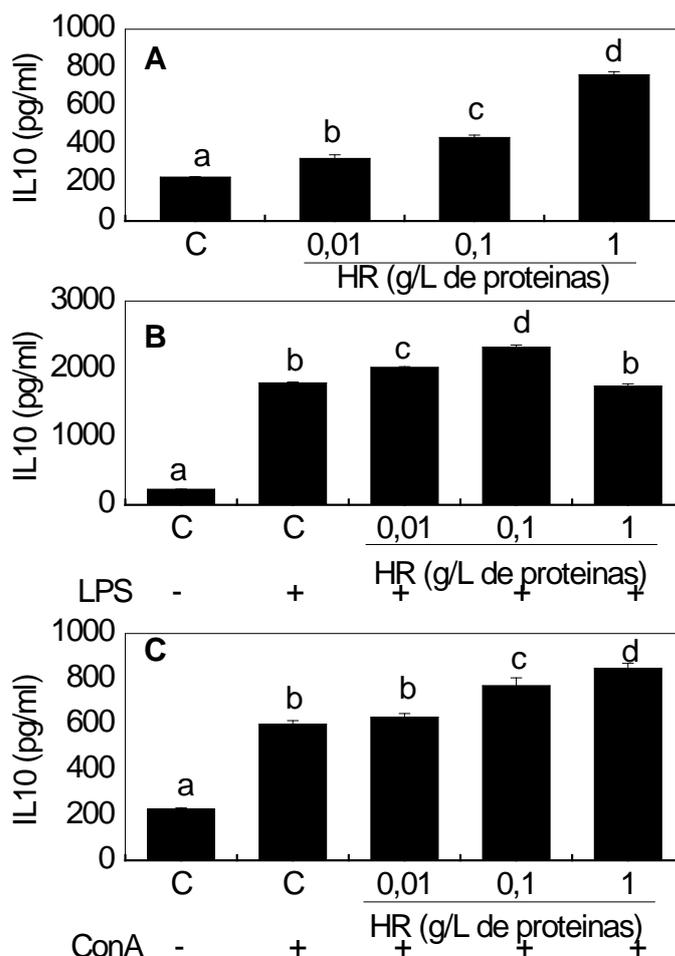
HR (g L <sup>-1</sup> de proteínas)	ConA (µg mL <sup>-1</sup> )	Incorporación de timidina tritiada ([ <sup>3</sup> H]-timidina) (dpm)	
		Esplenocitos	Linfocitos
0	0	668,5 ± 18,9 <sup>a</sup>	168,3 ± 20,2 <sup>a</sup>
1	0	851,5 ± 17,3 <sup>b</sup>	216,5 ± 27,6 <sup>b</sup>
0	5	1946,3 ± 10,6 <sup>c</sup>	238,7 ± 11,5 <sup>b</sup>
1	5	2574,3 ± 15,3 <sup>d</sup>	407,0 ± 28,3 <sup>c</sup>

X ± DE. ConA: concanavalina A. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Este resultado concuerda con lo reportado por Kong y col. (2008), quienes trabajaron con hidrolizados obtenidos a partir de proteínas de soja empleando diferentes sistemas enzimáticos (Alcalasa, Alcalasa + Flavourzyme, Papaína). En dicho trabajo, los autores lograron obtener fracciones peptídicas con interesantes propiedades mitogénicas sobre los linfocitos T.

Cabe añadir que el efecto mitótico exhibido por algunos hidrolizados se ha atribuido a la presencia de péptidos con bajo peso molecular (Yang y col., 2009). En este sentido, distintos investigadores han aislado e identificado péptidos estimuladores de la población linfocitaria que poseen entre 100 y 1000 Da (Kong y col., 2008; Suetsuna y col., 1991; Yang y col., 2009). Si se tiene en cuenta que **HR** posee una fracción mayoritaria de 523 Da, podría suponerse que la actividad mitótica exhibida por el hidrolizado se debe a la presencia de estos péptidos (*tetra-péptidos*).

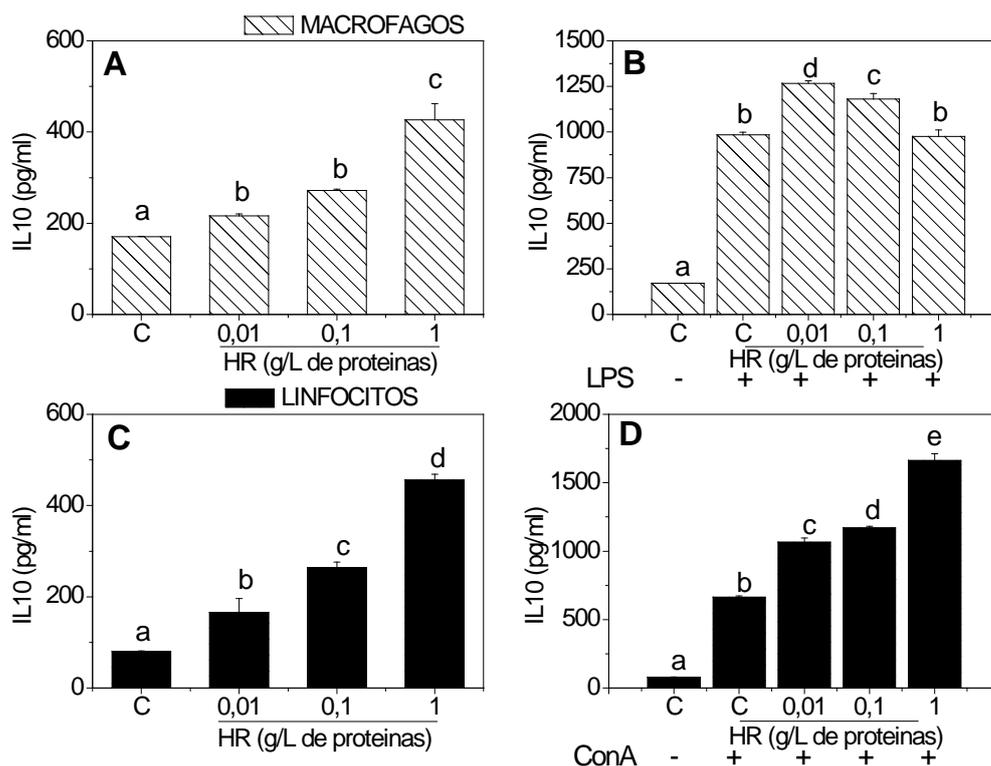
En las **Figuras IV.41.A, B y C** se muestra el efecto de **HR** sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de LPS y ConA (B y C, respectivamente).



**Figura IV.41** – Efecto de HR sobre la secreción de IL10 en esplenocitos de rata. Los esplenocitos fueron cultivados en presencia de HR (0,01, 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), en ausencia (A) o presencia de LPS o ConA (B y C, respectivamente). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

La adición de **HR** al medio de cultivo incrementó la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Cabe señalar que este incremento fue concentración dependiente bajo condiciones basales y en presencia de ConA, obteniéndose el máximo valor de IL10 a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Sin embargo, en presencia de LPS, se obtuvo un comportamiento distinto, correspondiendo el máximo nivel de IL10 a 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas.

En base a estos resultados, se podría decir que **HR** tiene la capacidad de modular tanto a los macrófagos como a los linfocitos T presentes en los esplenocitos, dando lugar a un incremento de IL10 en el medio de cultivo. Esto se ve reflejado en las **Figuras IV.42.A, B, C y D**, donde se muestra la acción del hidrolizado sobre las dos poblaciones celulares purificadas.

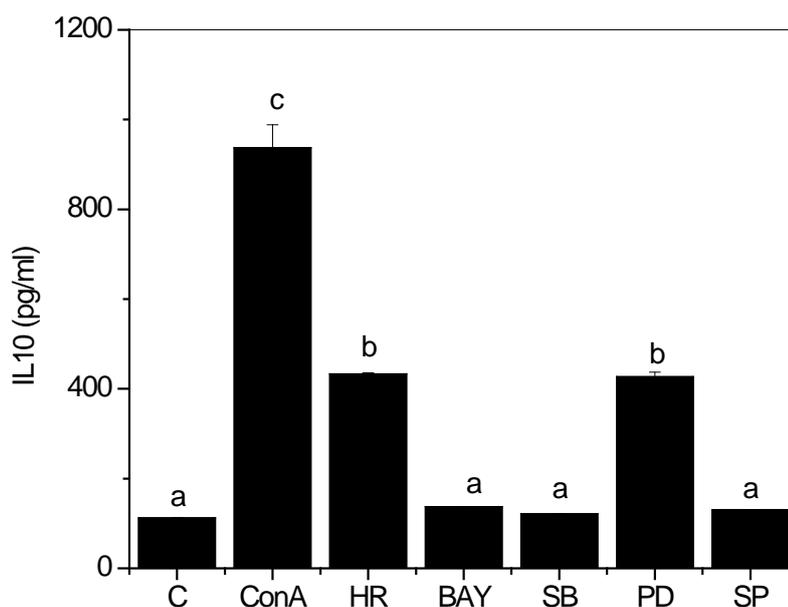


**Figura IV.42** – Efecto de HR sobre la secreción de IL10 en macrófagos (A y B) y linfocitos (C y D). Las células fueron cultivadas en presencia de HR (0,01, 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas), en ausencia (A y C) o presencia de LPS (B) o ConA (D). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

HR produjo un incremento de la producción de IL10 en ambas poblaciones celulares (linfocitos T y macrófagos), tanto en ausencia como en presencia de LPS o ConA. Este efecto fue más potente en los linfocitos T, lo que haría suponer que dichas células son el principal blanco de acción del hidrolizado.

Cabe mencionar que el comportamiento observado para los esplenocitos estimulados con LPS + HR a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas, se repitió en los macrófagos bajo las mismas condiciones (**Figura IV.42.B**). Esto estaría indicando que el hidrolizado ejerce una acción secundaria sobre la producción de IL10 en esta población celular, siendo el óptimo de concentración inferior a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas.

Al igual que para FP, se determinó el rol del NF-κB y las MAPK en la producción de IL10 inducida por HR en linfocitos T. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.43**.

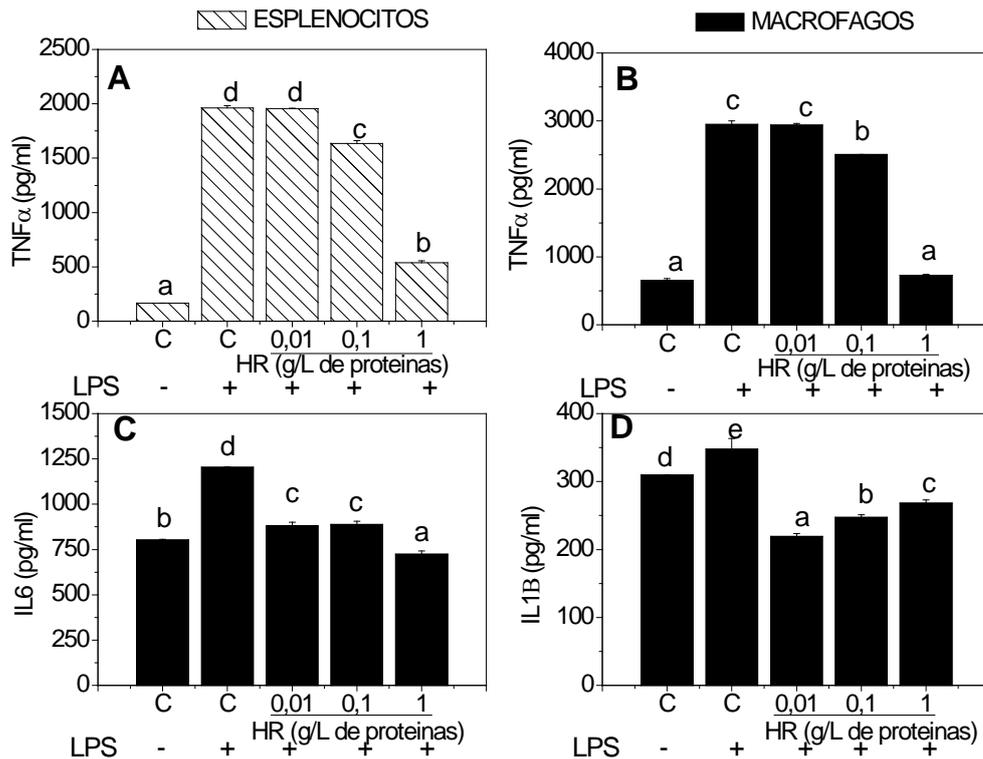


**Figura IV.43** – Efecto de los inhibidores del NF- $\kappa$ B y las MAPK sobre la producción de IL10 inducida por HR en linfocitos. Las células fueron cultivadas en presencia de HR ( $1 \text{ g L}^{-1}$  de proteínas) y los inhibidores (PD inhibidor de MAPK ERK 1/2, SB inhibidor de p38 MAPK, SP inhibidor de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y BAY inhibidor de NF- $\kappa$ B). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La adición de **SB**, **SP** o **BAY** al medio de cultivo produjo un descenso de la expresión de IL10 en los linfocitos T. Sin embargo, al agregar **PD** no se observaron cambios respecto al hidrolizado. Esto estaría indicando que el efecto ejercido por **HR** sobre la expresión de IL10 en los linfocitos T, depende de los factores de transcripción: p38, JNK y NF- $\kappa$ B.

Como se mencionó anteriormente, la participación dual de las MAPK y el NF- $\kappa$ B sobre la secreción de IL10 no es inesperada, ya que ambas vías se activan por acción de la enzima I $\kappa$ B quinasa (IKK), en respuesta a un estímulo (Requena y col., 2009).

En las **Figuras IV.44.A, B, C y D** se muestra el efecto de **HR** sobre la secreción de TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  en esplenocitos y macrófagos en presencia de LPS.

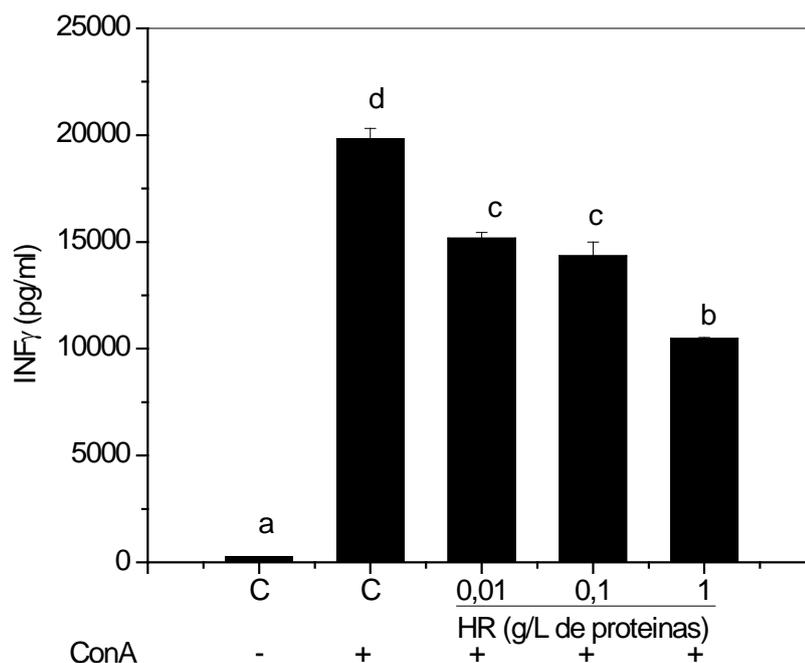


**Figura IV.44** – Efecto de HR sobre la secreción de TNF $\alpha$  en esplenocitos y macrófagos (A y B) y sobre la secreción de IL6 e IL1 $\beta$  en macrófagos (C y D). Las células fueron cultivadas en presencia de HR (0,01, 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas) en presencia de LPS. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede ver, **HR** ejerció un efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  en presencia del LPS. Este resultado estaría indicando una marcada acción antiinflamatoria del hidrolizado sobre las poblaciones celulares estudiadas, la cual puede estar asociada al aumento de IL10.

Como se sabe, la IL10 ejerce una potente acción sobre las células inmunes, inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ma y col., 2001). Uno de los mecanismos observados en macrófagos consiste en favorecer la secreción de receptores TNF $\alpha$ , los cuales se unen al TNF $\alpha$  e impiden su acción sobre las células blanco. A su vez, la IL10 potencia la producción de IL-1R que inhibe la unión de la IL1 $\beta$  con su receptor celular (Foey y col., 1998). En base a esto se podría suponer que **HR** favorece la secreción de IL10, la cual modula en baja la producción de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas. Cabe señalar que al bloquearse la producción de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  se inhibe la expresión de IL6 (Waal y col., 1991) (**Figura IV.44.C**).

Este mismo comportamiento anti-inflamatorio fue observado al evaluar el efecto de **HR** sobre la secreción de IFN $\gamma$  en esplenocitos + Con A (**Figura IV.45**)

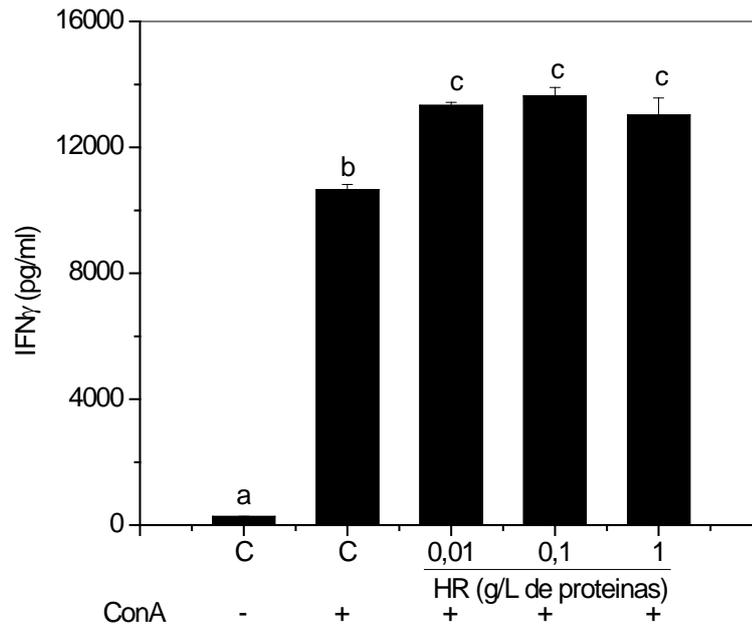


**Figura IV.45** – Efecto de HR sobre la secreción de IFN $\gamma$  en esplenocitos. Las células fueron cultivadas en presencia de HR (0,01, 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas) en presencia de ConA. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se puede ver, la menor producción de IFN $\gamma$  respecto al control + ConA, se obtuvo con la concentración de 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas de **HR**. Esta disminución fue aproximadamente del 50%, lo que demuestra un gran efecto inmunosupresor.

Cabe destacar que este efecto también fue observado en esplenocitos sin la adición de ConA (datos no mostrados). Por lo tanto, **HR** modularía la diferenciación celular de los linfocitos T a células Treg (productoras de IL10), impidiendo la generación de células Th1 secretoras de IFN $\gamma$ . Este efecto mitótico concuerda con lo observado anteriormente en el estudio de proliferación celular (**Tabla IV.31**).

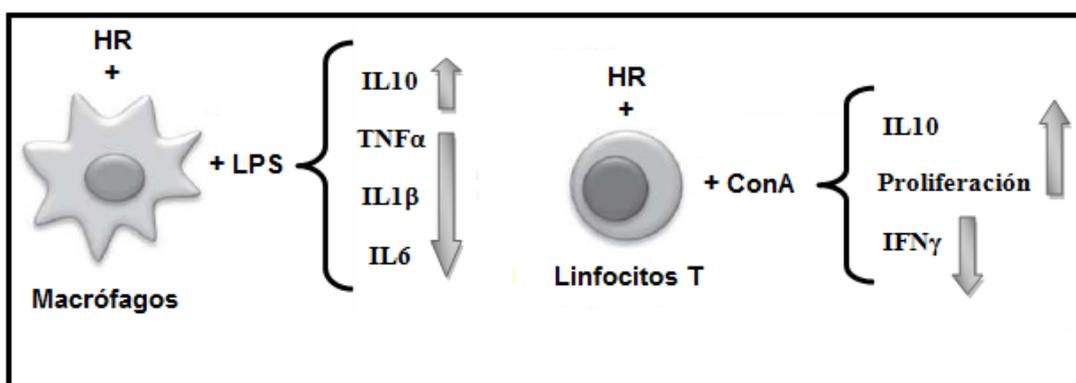
Un aspecto importante a destacar es que el efecto inmunosupresor sobre el IFN $\gamma$  no fue observado en los linfocitos T. Es decir, la adición de **HR** al medio de cultivo de dichas células produjo un aumento de la producción de IFN $\gamma$  en lugar de una disminución (**Figura IV.46**). Este hecho haría suponer que la acción inhibitoria ejercida por **HR** sobre la secreción de esta citoquina, requiere de la presencia de otras células distintas a los linfocitos T que están en los esplenocitos (linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, etc.). Al respecto, se ha reportado la existencia de macrófagos del tipo M1 que favorecen la diferenciación de células Th0 a Treg, mediada por la secreción de IL10 (Chawla y col., 2011).



**Figura IV.46** – Efecto de HR sobre la secreción de IFN $\gamma$  en linfocitos T. Las células fueron cultivadas en presencia de HR (0,01, 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas) en presencia de ConA. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El hecho de que **HR** ejerza un efecto mitótico sobre los esplenocitos y linfocitos T promoviendo la secreción de IL10 en distintas poblaciones celulares, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos, e inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias en esplenocitos y macrófagos, podría sugerir un efecto global antiinflamatorio de este hidrolizado. Sin embargo, se debe tener cuidado de no extrapolar estos resultados al efecto *in vivo*, ya que hay muchas variables a tener en cuenta que pueden alterar los resultados hallados en la presente tesis.

En **Figura IV.47**, se resume el posible mecanismo de acción mediante el cual **HR** ejerce su efecto inmunosupresor *in vitro* en esplenocitos.



**Figura IV.47** - Esquema del posible mecanismo de acción de HR sobre los esplenocitos.

---

#### IV.4.3 Conclusiones parciales

- ✓ La capacidad antioxidante de los hidrolizados fue significativamente superior a la de **FP**. Esto se debió a la generación de péptidos antioxidantes durante el proceso de hidrólisis, tanto de bajo peso molecular como de tamaño intermedio que presentarían principalmente aminoácidos no polares y ácidos.
- ✓ Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada hidrolizado y sistema de ensayo (DPPH o ABTS<sup>+</sup>), no difirieron significativamente entre sí, indicando que la solubilidad de los péptidos antioxidantes presentes en los hidrolizados no fue afectada por el solvente y que la potencia antioxidante de los hidrolizados fue la misma.
- ✓ Todos los hidrolizados fueron capaces de inhibir de manera semejante a la **ECA I**. El efecto inhibitorio podría deberse principalmente a *dipéptidos* generados durante la hidrólisis con residuos de Ala, Pro y Leu presentes en la secuencia peptídica, ya que su proporción en los distintos hidrolizados fue elevada.
- ✓ **FP** ejerció un efecto mitogénico sobre los esplenocitos y macrófagos, ya que incrementó la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina a una concentración de 0,1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Este efecto fue concentración dependiente, observándose una pérdida total de la acción mitogénica a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Esta actividad mitogénica se debería principalmente a *lectinas* presentes en la fracción.
- ✓ La adición de **FP** al medio de cultivo aumentó la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, macrófagos y linfocitos T, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Este efecto podría deberse a la presencia de *lectinas* en la fracción ya que cuando se evaluaron las *ficobiliproteínas* en estas poblaciones celulares no se observó efecto alguno sobre la producción de IL10.
- ✓ La acción ejercida por **FP** sobre la expresión de IL10 en los macrófagos y linfocitos T dependió principalmente del factor de transcripción NF-κB, siendo secundario el rol de los factores de transcripción: p38 y JNK.
- ✓ **FP** inhibió la secreción de TNFα, IL6 e IL1β en esplenocitos y macrófagos estimulados con LPS. Esta acción fue atribuida al aumento de IL10 en el medio de cultivo y a su efecto supresor sobre las demás citoquinas.
- ✓ El agregado de **FP** al medio de cultivo de esplenocitos de rata inhibió la producción de IFNγ. Sin embargo, en los linfocitos T purificados el efecto inhibitorio desapareció. Esto pudo deberse a la ausencia de ciertas células que favorecerían la

---

producción de IL10 y que sólo están presentes en la población esplénica (macrófagos M2).

- ✓ Los hidrolizados incrementaron la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Este aumento fue significativamente superior al obtenido con **FP** a la misma concentración proteica. Por lo tanto, la actividad inmunomoduladora de los péptidos bioactivos generados tras la hidrólisis fue más potente que la del sustrato.
- ✓ Los hidrolizados **TA** y **AT** tuvieron un efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Este efecto supresor pudo deberse al aumento de IL10 en el medio de cultivo conjuntamente con la diferenciación celular de los linfocitos T a T reguladores.
- ✓ **HR** presentó muy buenas propiedades antioxidantes atribuibles a los péptidos bioactivos (*tetra-péptidos*), aminoácidos libres y compuestos fenólicos liberados durante la hidrólisis de **R**.
- ✓ La elevada CQ mostrada por **HR**, se debió principalmente a los péptidos y compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado.
- ✓ **HR** inhibió efectivamente a la enzima **ECA I**. Este efecto inhibitorio se atribuyó a los péptidos bioactivos y compuestos fenólicos liberados durante la proteólisis. Los péptidos inhibidores presentes en **HR** serían *tetra-péptidos*, siendo los aminoácidos Ala y Leu los principales responsables de la inhibición.
- ✓ **HR** no presentó citotoxicidad en ninguna de las concentraciones evaluadas. Además, aumentó la proliferación celular de los esplenocitos y linfocitos T en condiciones basales y estimuladas a 1 g L<sup>-1</sup> de proteínas. Esta acción mitogénica se atribuyó principalmente a *tetra-péptidos* presentes en el hidrolizado.
- ✓ La adición de **HR** al medio de cultivo incrementó la producción de IL10 en los esplenocitos de rata, macrófagos y linfocitos T; tanto en condiciones basales como en presencia de los estímulos (LPS o ConA). Este aumento fue más pronunciado en los linfocitos T, lo que haría suponer que dichas células fueron su principal blanco de acción. El efecto ejercido por **HR** sobre la expresión de IL10 en los linfocitos T dependió de los factores de transcripción: p38, JNK y NF- $\kappa$ B.
- ✓ **HR** inhibió la secreción de TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  en esplenocitos y macrófagos presencia del LPS. Este resultado indicaría una marcada acción supresora sobre las poblaciones celulares estudiadas, la cual podría estar asociada con el aumento de IL10.

## *Resultados y Discusión*

---

- ✓ La secreción de IFN $\gamma$  en esplenocitos disminuyó con el agregado de **HR** al medio de cultivo, en ausencia o presencia de ConA, indicando una fuerte acción moduladora. Sin embargo, este efecto no fue observado en los linfocitos T. Esto haría suponer que la acción inhibitoria ejercida por el hidrolizado sobre la secreción de IFN $\gamma$ , requiere de la presencia de otras células tales como los macrófagos del tipo M1, los cuales favorecen la diferenciación de células Th0 a T reguladoras productoras de IL10.

## Capítulo IV.5 Elaboración de un alimento con el alga. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bio-accesibilidad de compuestos activos

Se elaboraron productos expandidos a base de sémola de maíz comercial con diferentes niveles de reemplazo del alga *P. columbina*. Sobre los productos obtenidos se evaluaron las propiedades fisicoquímicas (expansión, volumen específico, consumo específico de energía mecánica, solubilidad y absorción de agua), las propiedades antioxidantes y las características sensoriales. En vista de obtener un alimento funcional, se seleccionó el producto expandido con mejores aptitudes organolépticas, se lo caracterizó nutricionalmente, y se lo sometió a una digestión gástrica *in vitro* por medio de la cual se estudió la bio-accesibilidad de minerales y compuestos activos.

### IV.5.1 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos

En primer lugar se estudió el efecto de la adición del alga *P. columbina*, sobre las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.32**.

**Tabla IV.32** Propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos (Ma, MaPc<sub>1</sub>, MaPc<sub>2</sub> y MaPc<sub>3</sub>)

	Productos expandidos			
	Ma	MaPc1	MaPc2	MaPc3
<b>Torque (UB)</b>	600,1 ± 1,4 <sup>d</sup>	475,2 ± 0,7 <sup>c</sup>	375,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	325,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
<b>Caudal (g min<sup>-1</sup>)</b>	98,9 ± 3,6 <sup>b</sup>	91,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	88,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	87,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>CEEM (J g<sup>-1</sup>)</b>	56,1 ± 2,0 <sup>d</sup>	47,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	39,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	34,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>Expansión</b>	3,5 ± 0,0 <sup>d</sup>	3,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>Volumen específico (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	7,3 ± 0,0 <sup>d</sup>	6,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	6,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>Solubilidad (%)</b>	32,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	32,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	31,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	33,2 ± 0,7 <sup>a</sup>
<b>Absorción de agua (ml g<sup>-1</sup>)</b>	7,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

El agregado de niveles crecientes de *P. columbina* produjo un descenso en la expansión (E), el volumen específico (VE) y el consumo de energía mecánica (CEEM). Esto estaría indicando que el reemplazo parcial de la harina de maíz con el alga reduce el nivel de fricción, disminuyendo el CEEM y el grado de cocción estimado a través del VE.

Estos resultados concuerdan con los reportados por algunos investigadores que han trabajado con mezclas de harinas de cereales y legumbres u otros vegetales (Dehghan-Shoar y col., 2010; Pastor-Cavada y col., 2011). En dichos trabajos, se observó un descenso de E, torque y CEEM, conforme aumentó el porcentaje de reemplazo.

Las diferencias observadas en las propiedades fisicoquímicas pueden estar asociadas con la composición química de las mezclas obtenidas. Por ejemplo, se ha visto que la adición de materiales ricos en fibra dietaria o proteínas a fórmulas amiláceas reduce el VE del producto extrudido debido a un descenso en el grado de cocción (Veronica y col., 2006).

Cabe señalar que no se observaron cambios en la solubilidad y la absorción de agua, lo que indica que estos métodos son menos sensibles que los mencionados anteriormente para evaluar el grado de cocción.

#### **IV.5.2 Evaluación del color y de las características sensoriales de los productos expandidos**

En la **Tabla IV.33**, se presentan los valores obtenidos para los parámetros de color (CIE-Lab). Como se puede ver, Ma exhibió los mayores valores de L\*, b\*,  $\Delta E^*$  y C\*. Esto estaría indicando que el color de dicho producto expandido tiende a ser *amarillo claro*.

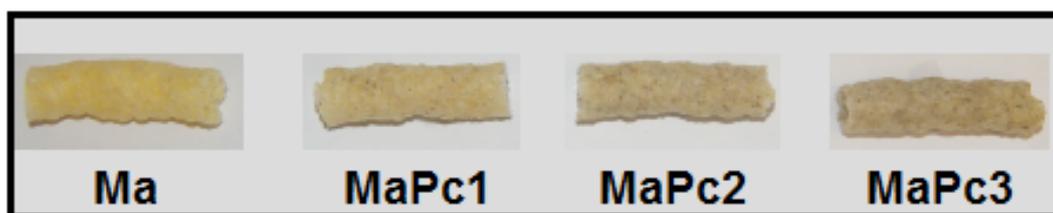
Sin embargo, a medida que creció la proporción de *P. columbina* en la formulación, disminuyeron los valores de los parámetros L\*, b\*,  $\Delta E^*$  y C\*. Además, el valor de a\* fue más negativo. Esto estaría indicando que la adición del alga ocasiona un cambio en el color de los productos obtenidos, variando de *amarillo claro* a un *amarillo verdoso más oscuro*. Esta variación en el color fue más notoria para MaPc<sub>3</sub> (**Figura IV.48**).

## Resultados y Discusión

**Tabla IV.33** Parámetros de color (CIE-Lab) de los productos expandidos (Ma, MaPc<sub>1</sub>, MaPc<sub>2</sub> y MaPc<sub>3</sub>)

Producto Expandido	Parámetros de color (CIE-Lab)					
	L*	a*	b*	ΔE*	C*	h
Ma	87,1 ± 0,5 <sup>d</sup>	-1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	39,9 ± 0,4 <sup>d</sup>	39,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	39,9 ± 0,3 <sup>d</sup>	92,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
MaPc <sub>1</sub>	79,5 ± 0,8 <sup>c</sup>	-2,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	32,1 ± 0,6 <sup>c</sup>	36,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	32,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	94,1 ± 0,0 <sup>b</sup>
MaPc <sub>2</sub>	76,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	-2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	28,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	35,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	28,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	94,7 ± 0,0 <sup>b</sup>
MaPc <sub>3</sub>	72,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	-2,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	26,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	34,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	25,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	94,7 ± 0,0 <sup>b</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).



**Figura IV.48** – Fotografía de los productos extrudidos obtenidos (Ma, MaPc<sub>1</sub>, MaPc<sub>2</sub>, y MaPc<sub>3</sub>).

Esta relación *color* – *contenido de P. columbina* podría estar asociada con el aporte de pigmentos por parte del alga (*ficobiliproteínas* o *clorofila*), a la sémola de maíz. Por lo tanto, al incrementar la proporción de *P. columbina* se produce un cambio en el color de los productos obtenidos. Esto se ve reflejado al correlacionar los parámetros L\* y b\* con la proporción de alga presente en cada producto. Al respecto, se pudo obtener una relación lineal directa entre ambos parámetros y el contenido de *P. columbina* en el producto expandido, siendo los coeficientes de regresión  $r^2 = 0,9741$  y  $0,9573$ , para L\* y b\* respectivamente.

En la **Tabla IV.34** se muestran los valores de los atributos sensoriales de los productos expandidos obtenidos a partir de la evaluación sensorial.

A partir de la evaluación sensorial se pudo observar una variación significativa en el color (**Tabla IV.34**). Esto concuerda con los resultados obtenidos para los parámetros de color (CIE-Lab), descriptos anteriormente. En este sentido, se pudo

obtener una correlación lineal entre  $L^*$ ,  $b^*$  o  $C^*$  y el color de los productos expandidos, siendo los coeficientes de regresión  $r^2 = 0,9625$ ,  $0,9622$  y  $0,9904$  para  $L^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$ , respectivamente. Cabe señalar que el color de MaPc<sub>3</sub> excedió el valor límite acordado por el panel de expertos (6), por lo que se consideró inadecuado.

**Tabla IV.34** Atributos sensoriales de los productos expandidos (Ma, MaPc<sub>1</sub>, MaPc<sub>2</sub> y MaPc<sub>3</sub>)

	Producto expandido			
	Ma	MaPc1	MaPc2	MaPc3
<b>Color</b>	1,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,5 <sup>c</sup>	7,1 ± 0,2 <sup>d</sup>
<b>Olor</b>	2,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Flavor</b>	2,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>Gusto</b>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>Crujienticidad</b>	8,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>Pegajosidad</b>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>d</sup>

$X \pm DE$ . Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para el caso del olor, gusto y crujienticidad no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos para los distintos expandidos. Sin embargo, el flavor y la pegajosidad aumentaron significativamente respecto al control (Ma). El valor deseable de flavor en la escala utilizada fue 5,0.

En vista de obtener un alimento funcional con agregado del alga *P. columbina*, se seleccionó el producto expandido MaPc<sub>2</sub>, ya que exhibió buenas características sensoriales en cuanto a color, flavor y pegajosidad.

Como se mencionó en el punto **III.8**, MaPc<sub>2</sub> fue caracterizado según su perfil de aminoácidos, digestibilidad proteica *in vitro* y **CFE**. Además se evaluó la *bioaccesibilidad* de minerales y de compuestos activos (midiendo la capacidad antioxidante: ABTS, DPPH, capacidad quelante y poder reductor y la inhibición de ECA I) luego de una digestión que simula los procesos fisiológicos. Todos estos

resultados fueron comparados con el control (Ma), los cuales se muestran a continuación.

### IV.5.3 Evaluación de las propiedades nutricionales y antioxidantes de los productos expandidos

#### IV.5.3.1 Composición centesimal, perfil de aminoácidos, PQ, DP y PDCAAS

En la **Tabla IV.35** se muestra la composición centesimal de Ma y MaPc<sub>2</sub>.

**Tabla IV. 35** Composición centesimal de Ma y MaPc<sub>2</sub>

Composición	Productos expandidos	
	Ma (g 100g <sup>-1</sup> bs)	MaPc <sub>2</sub> (g 100g <sup>-1</sup> bs)
Proteínas (N x 6,25)	8,92 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,60 ± 0,01 <sup>b</sup>
Cenizas	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>b</sup>
Fibra dietaria total	6,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,06 ± 0,03 <sup>b</sup>
Fibra dietaria insoluble	5,29 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,79 ± 0,01 <sup>b</sup>
Fibra dietaria soluble	1,55 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,03 <sup>a</sup>
Lípidos (extracto etéreo)	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,05 <sup>a</sup>
Humedad	7,39 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,06 ± 0,20 <sup>b</sup>

X ± DE, bs: base seca. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede ver, el contenido de proteínas y fibra dietaria total e insoluble en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al hallado con Ma. Este incremento puede estar relacionado con la composición centesimal del alga. Como se describió en el capítulo **IV.1**, el componente más abundante en *P. columbina* fue la fibra dietaria total (**Tabla IV.1**), siguiéndole en orden de magnitud las proteínas.

Además, se pudo observar un aumento significativo en el contenido de cenizas de MaPc<sub>2</sub>. Si bien los niveles de cenizas en el alga fueron inferiores a los reportados en

la bibliografía ( $6,46 \pm 0,09 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ), los valores no dejan de ser elevados si se los compara con la sémola de maíz comercial.

Los aminoácidos más abundantes en Ma y MaPc<sub>2</sub> fueron: Asp, Glu, Leu y Ala, como se ve reflejado en la **Tabla IV.36** donde se muestra el perfil de aminoácido de ambos productos expandidos. Además, el contenido de Asp en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma. Esto puede deberse a que dicho aminoácido es uno de los más abundantes en *P. columbina* (**Tabla IV.2**). Como se mencionó anteriormente, la proporción de aminoácidos ácidos en la mayoría de las algas marinas es muy elevada (Fleurence, 1999).

El contenido de Met y Pro en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma, mientras que el contenido de Arg fue significativamente inferior. Esto se ve claramente en los valores obtenidos para la relación aminoacídica entre ambas muestras ( $A_{\text{MaPc}_2} / A_{\text{Ma}}$ ). En este sentido, la proporción obtenida para Met fue: 1,98, lo que indicaría que MaPc<sub>2</sub> posee casi el doble de dicho aminoácido respecto a Ma. Cabe recordar que tanto la Met como la Pro juegan un rol importante en las propiedades bioactivas de los péptidos que las contienen (propiedades antioxidantes e inhibitorias de ECA I, respectivamente).

El puntaje químico (**PQ**) calculado de acuerdo al patrón de referencia FAO (FAO / OMS / UNU, 1985) para niños en edad preescolar de Ma y MaPc<sub>2</sub> fue 37,8% y 35,9%, respectivamente. Para ambos productos expandidos el aminoácido limitante fue la Lys. Este resultado concuerda con lo reportado por Prabhasankar y col. (2009), quienes adicionaron el alga *U. pinnatifida* a pastas elaboradas a base de trigo, y evaluaron el perfil aminoacídico de los productos obtenidos.

No hubo diferencias significativas en la digestibilidad proteica *in vitro* (**DP**), obtenida para ambos productos expandidos. Los valores para Ma y MaPc<sub>2</sub> fueron:  $89,02 \pm 3,47\%$  y  $91,21 \pm 0,26$ , respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados para proteínas vegetales, pero inferiores a los obtenidos para proteínas de origen animal (Balandrán-Quintana y col., 1998).

**Tabla IV.36** Perfil de aminoácidos de Ma y MaPc<sub>2</sub>

Aminoácido	Aminoácidos totales (g 100g <sup>-1</sup> proteína)		A <sub>MaPc2</sub> / A <sub>Ma</sub> (%)
	Ma	MaPc <sub>2</sub>	
Asp	7,40 ± 0,25 <sup>a</sup>	8,32 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,12
Glu	22,49 ± 0,32 <sup>a</sup>	21,63 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,96
Ser	6,19 ± 0,07 <sup>b</sup>	5,74 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,93
His	2,84 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,94
Gly	4,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,98
Thr	3,97 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,85 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,97
Arg	4,57 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,83
Ala	9,28 ± 0,07 <sup>a</sup>	10,03 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,08
Pro	2,57 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,36
Tyr	3,41 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,00
Val	3,97 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,08 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,03
Met	0,51 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,98
Cys	2,16 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,93
Ile	2,92 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,92
Trp	0,44 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,19
Leu	15,50 ± 0,53 <sup>a</sup>	15,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,00
Phe	5,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,37 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,95
Lys	1,93 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,95

X ± DE. A<sub>MaPc2</sub> / A<sub>Ma</sub> (%): proporción de aminoácidos. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

El **PDCAAS** obtenido para Ma y MaPc<sub>2</sub> fue prácticamente el mismo, no habiendo diferencias significativas entre las muestras. Los valores para Ma y MaPc<sub>2</sub> fueron de 33,7 y 32,7%, respectivamente. Estos resultados son iguales o incluso mayores a los obtenidos para distintas proteínas de legumbres (Henley y Kunster 1994). Cabe recordar que para una determinada proteína el máximo valor de **PDCAAS** es 100%. En este caso, dicha proteína proporcionaría el 100% de los aminoácidos esenciales según el patrón de referencia recomendado por la FAO (FAO / OMS / UNU, 1985).

#### IV.5.3.2 Contenido y disponibilidad de minerales (DM) de Ma y MaPc<sub>2</sub>

La **Tabla IV.37** se muestra el contenido de minerales y los valores de dializabilidad de Ca, Mg, Fe y Zn, de Ma y MaPc<sub>2</sub>.

**Tabla IV.37** Contenido de minerales y dializabilidad de Ca, Mg, Fe y Zn de Ma y MaPc<sub>2</sub>.

Mineral	Contenido (mg 100g-1 bs)		Dializabilidad (%)	
	Ma	MaPc <sub>2</sub>	Ma	MaPc <sub>2</sub>
Na	37,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	125,91 ± 0,12 <sup>b</sup>	ND	
K	72,09 ± 1,93 <sup>a</sup>	71,24 ± 0,32 <sup>a</sup>	ND	
P	74,92 ± 1,22 <sup>a</sup>	93,11 ± 1,15 <sup>b</sup>	ND	
Ca	2,89 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,93 ± 0,32 <sup>b</sup>	100,02 ± 2,65 <sup>b</sup>	60,05 ± 0,39 <sup>a</sup>
Mg	30,18 ± 0,66 <sup>a</sup>	47,66 ± 1,72 <sup>b</sup>	38,87 ± 0,11 <sup>a</sup>	59,31 ± 0,55 <sup>b</sup>
Fe	0,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>a</sup>	20,03 ± 0,34 <sup>b</sup>	16,51 ± 0,23 <sup>a</sup>
Zn	0,48 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>a</sup>	60,94 ± 2,17 <sup>b</sup>	39,73 ± 0,18 <sup>a</sup>

X ± DE, bs: base seca. ND: no determinado. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05).

Como se puede ver, no hubo diferencias significativas en el contenido de K, Fe y Zn entre Ma y MaPc<sub>2</sub>. Sin embargo, la proporción de Na, P, Ca y Mg en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior a la de Ma. Este aumento se debe a que el alga *P. columbina* tiene mayor contenido de estos minerales (**Tabla IV.4**). Además, se puede

observar que el contenido de Mg en MaPc<sub>2</sub> es significativamente superior al de Ca, lo que concuerda con el patrón observado para la mayoría de las algas marinas (Pérez y col., 2007).

En relación a la disponibilidad, MaPc<sub>2</sub> presentó mayor DMg que Ma. Sin embargo, la adición del alga *P. columbina* produjo un descenso significativo de la DCa, DFe y DZn respecto al control. Esta disminución podría estar asociada con el contenido de fibra que posee MaPc<sub>2</sub>. Como se vio anteriormente, dicho producto expandido exhibió mayor contenido de fibra dietaria total que el control (**Tabla IV. 35**), lo que haría suponer una fuerte interacción entre estos componentes y los minerales presentes en MaPc<sub>2</sub>, disminuyendo su solubilidad y consecuentemente su dializabilidad (Oliveira y col., 2009; Urbano y Goñi, 2002).

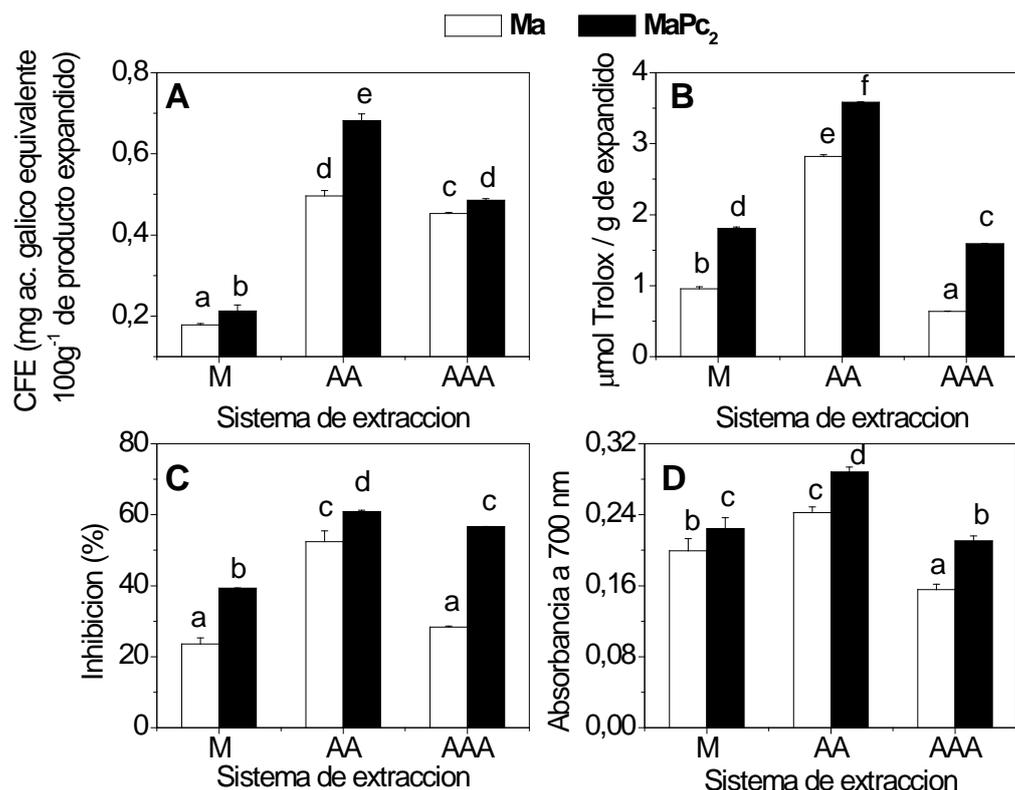
El ácido fítico también es considerado un factor antinutricional relacionado con la disminución de la disponibilidad de minerales (Szkudelski, 1997). Sin embargo, su contenido en ambos productos expandidos fue estadísticamente igual ( $0,535 \pm 0,010$  y  $0,519 \pm 0,005$  g 100 g<sup>-1</sup>, para Ma y MaPc<sub>2</sub> respectivamente). Por lo tanto, la menor disponibilidad de Ca, Fe y Zn en MaPc<sub>2</sub> no se debería a la presencia de dicho compuesto en el producto expandido.

Otros factores que disminuyen la disponibilidad de minerales son los compuestos fenólicos (Urbano y Goñi, 2002). Si se tiene en cuenta que la adición del alga *P. columbina* a la sémola de maíz comercial aumentó el contenido de estas especies en la matriz alimentaria (ver **IV.5.3.3**), se podría pensar que la disminución de la DCa, DFe y DZn en MaPc<sub>2</sub> también se debe a estos compuestos.

#### **IV.5.3.3 Contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE) y capacidad antioxidante**

En la **Figura IV.49.A** se muestra el contenido de compuestos fenólicos extractables (CFE), a partir de Ma y MaPc<sub>2</sub> con diferentes sistemas de extracción (metanol: M, acetona / agua: AA y acetona / agua / ácido acético: AAA).

Como se puede observar, el sistema AA permitió obtener los mayores niveles de CFE a partir de Ma y MaPc<sub>2</sub>, mientras que con el sistema M se obtuvo el menor valor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para *P. columbina*, **R** y **HR**.



**Figura IV. 49** – Contenido de compuestos fenólicos extractables a partir de Ma y MaPc<sub>2</sub> con diferentes sistemas de extracción (metanol: M, acetona / agua: AA y acetona / agua / ácido acético: AAA) (A); y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos (inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> (TEAC) (B), inhibición del radical DPPH (C), y poder reductor (D)). Barras con distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se mencionó anteriormente, la adición de pequeñas cantidades de agua al medio extractivo mejora la extracción de los compuestos fenólicos extractables presentes en una matriz determinada. Esto se debe a la generación de un ambiente más polar como consecuencia de la adición de agua. Este medio facilitaría una mayor solubilización de los diferentes compuestos fenólicos presentes en Ma y MaPc<sub>2</sub> (Sultana y col., 2009; Uma y col., 2010; Mohammedi y Atik, 2011). Además, la acetona actuaría como inhibidor de la formación de complejos proteínas - polifenoles durante el proceso de extracción (Wang y col., 2009), favoreciendo su solubilización.

El contenido de **CFE** de MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma. Este resultado se obtuvo en todos los sistemas extractivos estudiados, siendo más pronunciado en AA. Dicho aumento se debe a los compuestos fenólicos aportados por el alga *P. columbina* a la matriz alimentaria.

Como se mencionó anteriormente, las algas marinas son una buena fuente de compuestos fenólicos (Sabeena Farvin y Jacobsen, 2013), tales como: flavonoides,

ácidos fenólicos y taninos condensados. Además, contienen *halofenoles* los cuales difieren en algunos aspectos de los compuestos fenólicos convencionales (Ngo y col., 2011).

Como se puede apreciar en las **Figuras IV.49.B, C y D**, la capacidad antioxidante obtenida con MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior a la del control (Ma). Este comportamiento se vio en todos los sistemas extractivos estudiados, siendo más evidente con el sistema AA. Dicho incremento puede atribuirse a los compuestos fenólicos aportados por el alga, los cuales se sabe poseen muy buenas propiedades antioxidantes (Wang y col., 2009).

Estos resultados concuerdan con los observados por Prabhasankar y col. (2009), quienes adicionaron el alga *Sargassum marginatum* a pastas elaboradas a base de trigo y compararon las propiedades antioxidantes de los productos obtenidos respecto a los controles (trigo solo).

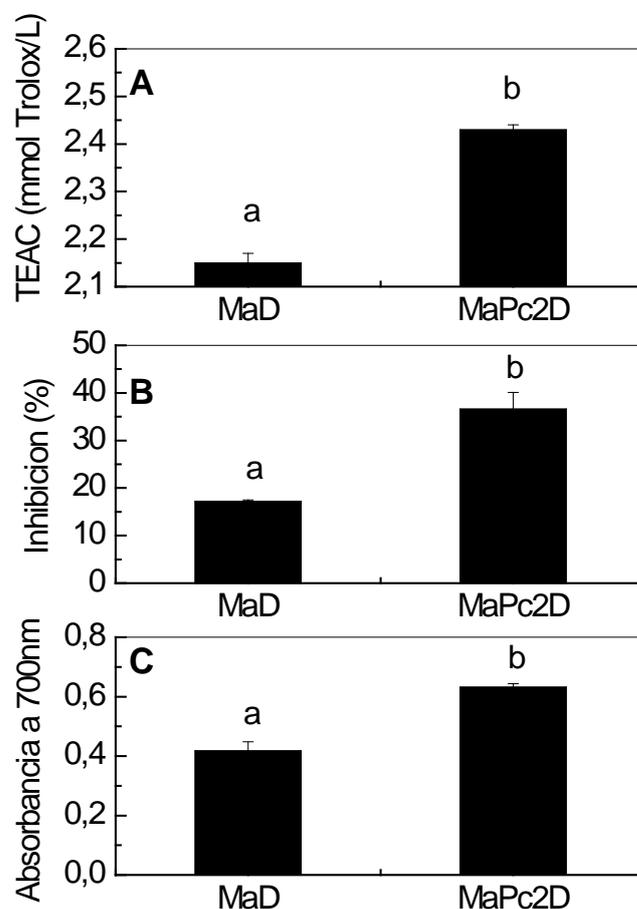
Además, se pudo observar que el sistema AA proporcionó los mayores valores de capacidad antioxidantes para ambos productos expandidos. Este aumento está en relación directa con el contenido de **CFE**, el cual también fue significativamente superior en dicho sistema (**Figura IV.49.A**). Este resultado demuestra claramente el rol clave que juegan los compuestos fenólicos en esta propiedad bioactiva. En este sentido, Wang y col. (2009), reportaron una elevada correlación entre el contenido de **CFE** y la inhibición del radical DPPH en extractos obtenidos a partir de diez especies de algas.

Como se mencionó anteriormente las algas rojas también poseen otros compuestos antioxidantes tales como: *polisacáridos sulfatados*, *AMM* y *ficobiliproteínas* (Tierney y col., 2010; Bermejo y col., 2008). Teniendo en cuenta esto, se podría suponer que la adición del alga *P. columbina* a la sémola de maíz comercial no sólo aporta **CFE**, sino también otros compuestos bioactivos los cuales contribuyen con las propiedades antioxidantes exhibidas por MaPc<sub>2</sub>.

#### **IV.5.4 Evaluación de la bio-accesibilidad de compuestos activos**

La dializabilidad de los compuestos bioactivos presentes en Ma y MaPc<sub>2</sub> fue evaluada simulando una digestión gástrica con pepsina y pancreatina como se mencionó en el punto **III.8**.

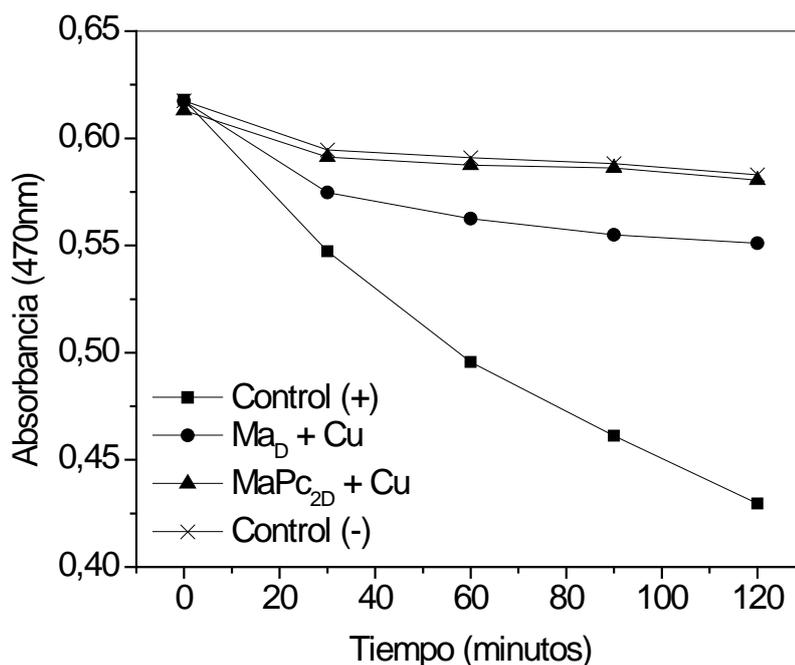
En las **Figuras IV.50.A, B y C** se muestra la capacidad antioxidante de Ma<sub>D</sub> y MaPc<sub>2D</sub>, evaluada con los distintos métodos (inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> (TEAC), inhibición del radical DPPH y poder reductor, respectivamente.)



**Figura IV.50** - Capacidad antioxidante de los dializados de Ma y MaPc<sub>2</sub>. Inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> (TEAC) (A), inhibición del radical DPPH (B), y poder reductor (C). Barras con distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

La capacidad antioxidante exhibida por Ma y MaPc<sub>2</sub> perduró luego del proceso de digestión gástrica *in vitro* (**Figuras IV.50.A, B y C**). Esto haría suponer que los compuestos antioxidantes presentes en ambos productos expandidos resisten la hidrólisis enzimática a 37°C, siendo los mismos bio-accesibles (< 6 a 8 kDa).

Además, se puede observar la misma tendencia observada en Ma y MaPc<sub>2</sub>, es decir la mayor capacidad antioxidante corresponde al dializado del producto expandido con alga (MaPc<sub>2D</sub>). Este comportamiento también fue observado al medir la CQ de los dializados (**Figura IV.51**).



**Figura IV.51** – Absorbancia del  $\beta$ -caroteno a 470 nm en función del tiempo de reacción en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  [control (-)], en presencia de  $\text{Ma}_D$  o  $\text{MaPc}_{2D}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{Ma}_D + \text{Cu}$  o  $\text{MaPc}_{2D} + \text{Cu}$ ), y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  [control (+)].

A medida que transcurre el tiempo de reacción, la absorbancia a 470 nm para el control (-) (sin  $\text{Cu}^{2+}$ ), desciende ligeramente debido a la degradación oxidativa del  $\beta$ -caroteno ocasionada por la luz y el oxígeno (Megías y col., 2008). Por el contrario, para el caso del control (+) (con  $\text{Cu}^{2+}$ ), la absorbancia a 470 nm disminuye rápidamente, conforme pasa el tiempo de reacción debido a la oxidación del  $\beta$ -caroteno catalizada por el  $\text{Cu}^{2+}$ . Para el caso de  $\text{Ma}_D + \text{Cu}^{2+}$  se puede apreciar un comportamiento intermedio entre ambos controles, mientras que para  $\text{MaPc}_{2D} + \text{Cu}^{2+}$  la tendencia es muy similar a la del control (-). Esto estaría indicando que  $\text{MaPc}_{2D}$  posee compuestos que exhiben mayor CQ que los aportados por  $\text{Ma}_D$ , lo que queda demostrado en el valor de CQ obtenido para ambos dializados ( $80,45 \pm 2,81$  y  $99,40 \pm 2,25$  %, para  $\text{Ma}$  y  $\text{MaPc}_2$  respectivamente).

Como se mencionó anteriormente las propiedades antioxidantes podrían estar ligadas a los compuestos fenólicos presentes en los productos expandidos. Sin embargo, dado que el contenido de compuestos fenólicos dializados a partir de  $\text{Ma}$  y  $\text{MaPc}_2$  no difiere significativamente (**Tabla IV.38**), se podría pensar que la naturaleza de los compuestos fenólicos dializados a partir de las muestras es distinta.

**Tabla IV.38** Compuestos fenólicos y aminos libres dializados de Ma<sub>D</sub> y MaPc<sub>2D</sub>.

Dializado	Compuestos fenólicos dializados (mg AG/g CFE)	Aminos libres dializados (mEq Serina/g proteína)
Ma <sub>D</sub>	66,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	81,3 ± 2,6 <sup>a</sup>
MaPc <sub>2D</sub>	67,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	77,6 ± 2,7 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

En la **Tabla IV.38** también se muestran los aminos libres dializados a partir de las muestras. Se observa que no hubo diferencias significativas en la dializabilidad de aminos libres obtenida para ambos productos expandidos. Estos resultados concuerdan con la **DP** obtenida para Ma y MaPc<sub>2</sub>. En base a esto, se podría suponer que la proporción de péptidos bioactivos generados tras la digestión gástrica es la misma en ambos dializados. Sin embargo, la secuencia peptídica podría ser distinta, ya que la fuente proteica difiere entre Ma y MaPc<sub>2</sub>.

El porcentaje de inhibición de **ECA I** y la concentración de proteínas que inhibe el 50% de la enzima (IC<sub>50</sub>), se muestra en la **Tabla IV.39**.

**Tabla IV.39** Porcentaje de inhibición de **ECA I** y concentración de proteínas que inhibe el 50% de enzima de Ma<sub>D</sub> y MaPc<sub>2D</sub>.

Dializado	Inhibición de ECA I (%)	IC <sub>50</sub> (g L <sup>-1</sup> de proteínas)
Ma <sub>D</sub>	35,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,01 <sup>b</sup>
MaPc <sub>2D</sub>	41,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>a</sup>

X ± DE. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

La inhibición de **ECA I** obtenida con MaPc<sub>2D</sub> fue significativamente superior a la obtenida con Ma<sub>D</sub>. En este mismo sentido, el valor de IC<sub>50</sub> de MaPc<sub>2D</sub> fue significativamente inferior al de Ma<sub>D</sub>. Lo que demuestra un mayor efecto inhibitorio del dializado MaPc<sub>2D</sub> respecto al control. Este resultado concuerda con lo observado en las propiedades antioxidantes y podría deberse, como fue explicado en el caso de las

propiedades antioxidantes, tanto a los péptidos bio-accesibles generados durante la hidrólisis como a los compuestos fenólicos dializados.

#### **IV.5.5 Conclusiones parciales**

- ✓ El agregado de niveles crecientes del alga *P. columbina* a la sémola de maíz produjo un descenso en el consumo de energía mecánica durante la extrusión y una disminución de la expansión y el volumen específico de los productos expandidos. Esto indica que el reemplazo parcial de la harina de maíz con el alga reduce el nivel de fricción, disminuyendo el consumo de energía mecánica y el grado de cocción estimado a través del volumen específico. Este efecto podría deberse al mayor contenido de fibra dietaria aportada por el alga a la matriz alimentaria.
- ✓ La solubilidad y absorción de agua resultaron poco sensibles para evaluar el grado de cocción, ya que no se observaron cambios significativos de dichos parámetros entre los distintos productos expandidos.
- ✓ Los expandidos a base de maíz (Ma) presentaron mayores valores de  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E^*$  y  $C^*$ . Esto indicó que el color de dicho producto expandido fue **amarillo claro**. Sin embargo, a medida que aumentó la proporción de *P. columbina* en la formulación se observó un descenso de estos parámetros, variando el color de **amarillo claro** a un **amarillo verdoso** más oscuro. Esta variación en el color fue más notoria para el expandido con mayor proporción de alga (MaPc<sub>3</sub>) y estaría asociada con el aporte de pigmentos del alga.
- ✓ Se obtuvo una correlación lineal entre  $L^*$ ,  $b^*$  o  $C^*$  y el puntaje asignado al color de los productos expandidos en la evaluación sensorial.
- ✓ Para el olor, gusto y crujienticidad no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos para los distintos expandidos. Sin embargo, el flavor y la pegajosidad aumentaron significativamente con el agregado del alga.
- ✓ Se seleccionó el producto expandido MaPc<sub>2</sub>, ya que presentó buenas características sensoriales (color, flavor y pegajosidad).
- ✓ El contenido de proteínas, fibra dietaria total e insoluble y cenizas en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al hallado con Ma. Este incremento estuvo relacionado con la composición del alga.
- ✓ Los aminoácidos más abundantes en Ma y MaPc<sub>2</sub> fueron: Asp, Glu, Leu y Ala. El contenido de Met y Pro en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma, mientras que el contenido de Arg fue significativamente inferior.

---

*Resultados y Discusión*

---

- ✓ No hubo diferencias significativas en los valores de digestibilidad proteica *in vitro* (**DP**), puntaje químico (**PQ**) y **PDCAAS**, obtenidos para ambos productos expandidos. El aminoácido limitante para Ma y MaPc<sub>2</sub> fue la Lys.
- ✓ No hubo diferencias significativas en el contenido de K, Fe y Zn entre Ma y MaPc<sub>2</sub>. Sin embargo, la proporción de Na, P, Ca y Mg en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior a la del control. Este aumento se debe a la adición del alga *P. columbina*. Además el contenido de Mg en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ca, lo que coincidió con el patrón observado para la mayoría de las algas marinas.
- ✓ MaPc<sub>2</sub> presentó mayor DMg que Ma. Sin embargo, la adición del alga produjo un descenso significativo de la DCa, DFe y DZn respecto a Ma. Esta disminución podría estar asociada con el aporte de fibra y compuestos fenólicos por parte del alga, los cuales reducen la dializabilidad de estos minerales.
- ✓ El sistema AA permitió obtener los mayores niveles de compuestos fenólicos extractables a partir de Ma y MaPc<sub>2</sub>, mientras que con el sistema M se obtuvo el menor valor. Además, el contenido de compuestos fenólicos extractables de MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma en todos los sistemas estudiados. Este incremento se atribuyó a los compuestos fenólicos aportados por el alga a los expandidos.
- ✓ La capacidad antioxidante obtenida con MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior a la del control (Ma), lo que estuvo asociado con el nivel de compuestos fenólicos en cada muestra.
- ✓ La capacidad antioxidante y la inhibición de **ECA I** exhibida por Ma y MaPc<sub>2</sub> perduró luego del proceso de digestión gástrica *in vitro* y fue superior para el dializado de MaPc<sub>2</sub> (MaPc<sub>2D</sub>). La mayor capacidad antioxidante y inhibidora de ECA I puede atribuirse a la diferente naturaleza de los compuestos fenólicos y los péptidos generados por hidrólisis dializados aportados por *P. columbina*, ya que no hubo diferencias significativas en la dializabilidad de compuestos fenólicos y aminos libres para ambos productos expandidos.

# V. Conclusiones

---

## V. CONCLUSIONES GENERALES

### *Estudio de la composición y las propiedades nutricionales de la materia prima*

- ✓ Los dos componentes mayoritarios del alga *P. columbina* fueron la fibra dietaria total y las proteínas. Esto es un aspecto típico de las algas rojas en general y concuerda con lo observado para otras especies del mismo género.
- ✓ El alga *P. columbina* presentó mejor puntaje químico que las proteínas de los cereales, siendo su digestibilidad proteica *in vitro* similar a las proteínas de origen vegetal.
- ✓ *P. columbina* exhibió un alto contenido de ácido palmítico y ácido eicosapentaenóico. Cabe señalar que el ácido eicosapentaenóico posee efectos antitrombóticos, hipolipemientes y antiinflamatorios, por lo que se considera muy beneficioso para la salud.
- ✓ El contenido de minerales en el alga fue elevado, obteniéndose muy buena relación Na/K. Este aspecto es muy importante desde un punto de vista nutricional ya que el consumo de dietas ricas en sodio (alta relación Na/K), está estrechamente relacionado con problemas de hipertensión arterial.
- ✓ Se obtuvieron valores medios de dializabilidad para P, Ca y Zn, los cuales fueron similares a los hallados para otro tipo de alimentos.
- ✓ Actualmente la bibliografía disponible sobre la composición centesimal de algas es muy abundante. Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado sobre la composición centesimal de *P. columbina* y mucho menos sobre sus aspectos nutricionales. En base a esto, se podría decir que los resultados presentados en la presente tesis constituyen un gran aporte para la comunidad científica.

### *Proceso de extracción y caracterización de las fracciones obtenidas*

- ✓ El proceso de extracción más conveniente en función de los objetivos perseguidos (obtener las *ficobiliproteínas* en su forma nativa y luego los *ficocoloides* libres de las proteínas anteriores), consistió de una primera etapa de extracción en agua a temperatura ambiente y pH 7,0 durante 2 horas (**Etapa I**), seguida de una segunda etapa extractiva en agua a 95°C y pH 7,0 durante el mismo período de tiempo (**Etapa II**).
- ✓ El contenido de proteínas (*R-ficoeritrina*, etc.) y compuestos fenólicos de **FP** fue significativamente superior al de **FF**. Esta diferencia se debió a las condiciones de

---

extracción de la **Etapa I**, las cuales favorecieron la solubilización de dichas especies.

- ✓ A partir del barrido espectral y el perfil electroforético de **FP**, se pudo concluir que dicha fracción posee otras proteínas además de las *ficobiliproteínas*, las cuales fueron extraídas en la **Etapa I**.
- ✓ La proporción de hidratos de carbono totales y sulfatos en **FF** fue mayor a la hallada en **FP**, indicando una mayor solubilización de los *ficocoloides* en el agua a 95°C (**Etapa II**). Esto fue corroborado con el FTIR de ambas fracciones, donde se observaron marcadas diferencias entre los espectros.
- ✓ El mayor **GH** se obtuvo hidrolizando primero con Alcalasa y luego con Tripsina (**AT**). La pobre acción Alcalasa en el sistema **TA** se debería a la falta de sitios específicos en el sustrato luego de haber actuado la Tripsina.
- ✓ La degradación efectiva de las proteínas presentes en **FP**, se manifestó en el perfil de pesos moleculares y en la cuarta derivada espectral de sus hidrolizados (**T**, **A**, **TA** y **AT**). Además, se pudo ver que el proceso de hidrólisis favoreció principalmente la generación de péptidos pequeños cuyo tamaño molecular fue de 340 Da (*dipéptidos*).
- ✓ Las proteínas presentes en **R** fueron degradadas eficientemente por el sistema enzimático secuencial, esto se manifestó en el perfil de pesos moleculares de **HR**. Además, se pudo ver que el proceso de hidrólisis no sólo favoreció la generación de péptidos pequeños cuyo tamaño molecular fue de 523 Da (*tetra-péptidos*), sino que también liberó los compuestos fenólicos retenidos en el sustrato (**R**).

*Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de las fracciones: propiedades de hidratación, reológicas y filmogénicas*

- ✓ La dispersión acuosa de **FP** exhibió un comportamiento del tipo *newtoniano*, mientras que la obtenida con **FF** mostró un comportamiento del tipo *pseudo-plástico*. El comportamiento *newtoniano* en **FP** se debería a la presencia *proteínas* y especies de bajo tamaño molecular (484 Da y compuestos fenólicos), mientras que el comportamiento *pseudo-plástico* de **FF** estaría asociado con la elevada proporción de *porfiranos* y *carragenanos* en la fracción.
- ✓ Los valores de viscosidad aparente e índice de consistencia (**K**) para **FF** fueron significativamente superiores a los hallados para **FP**. Esto indicó que las

- dispersiones de **FF** fueron más viscosas que las obtenidas con **FP**. Lo que fue evidenciado claramente al determinar la viscosidad intrínseca de cada dispersión.
- ✓ Debido a la composición química diferente de cada fracción, el contenido de proteínas (*ficobiliproteínas*) y compuestos fenólicos extractables aumentó con el incremento de **FP** en la dispersión filmogénica y el nivel de hidratos de carbonos totales disminuyó.
  - ✓ Al aumentar la proporción de **FP** en la dispersión filmogénica el comportamiento de flujo cambió de *pseudo-plástico* a *newtoniano*. Para el caso de FP<sub>0</sub>, FP<sub>25</sub> y FP<sub>50</sub> el comportamiento de flujo fue *pseudo-plástico*, mientras que FP<sub>75</sub> y FP<sub>100</sub> fue *newtoniano*. Esta variación en el comportamiento reológico podría deberse al efecto de dilución que ocasiona **FP** sobre los *ficocoloides* aportados por **FF**.
  - ✓ Hubo un incremento significativo de la TEAC conforme aumentó **FP** en las dispersiones filmogénicas, siendo máximo en FP<sub>100</sub>. Este aumento estuvo estrechamente relacionado con las *ficobiliproteínas* y los compuestos fenólicos proporcionados por esta fracción. Cabe señalar que la TEAC exhibida inicialmente por la dispersión FP<sub>0</sub>, se debió a los polisacáridos sulfatados presentes en **FF**.
  - ✓ El agregado de **FP** a las películas: **i**) cambió el color de los films de *verde oscuro* a *rojo claro* (incremento de a\* y L\*), disminuyendo su opacidad; **ii**) redujo el espesor; **iii**) ejerció un efecto plastificante en la matriz de **FF**, manifestándose en el contenido de humedad, la solubilidad en agua y las propiedades mecánicas de las películas resultantes, pero no en su permeabilidad al vapor de agua y **iv**) produjo un aumento en la TEAC, que se correlacionó linealmente con el contenido de compuestos fenólicos y *R-ficoeritrina*.
  - ✓ La tecnología empleada en la presente tesis permitió obtener a partir de *P. columbina* películas biodegradables activadas con interesantes propiedades antioxidantes, mecánicas y de barrera. Teniendo en cuenta estos resultados, dichos films podrían ser utilizados para el *packaging* de diferentes productos alimenticios sensibles a la oxidación, tales como vegetales mínimamente procesados.

#### *Evaluación de las propiedades bio-funcionales de los hidrolizados obtenidos a partir de FP y R*

- ✓ La capacidad antioxidante de los hidrolizados fue significativamente superior a la de **FP**. Esto se debió a la presencia de péptidos antioxidantes de bajo e intermedio tamaño molecular. Cabe señalar que la potencia antioxidante fue la misma para

todos los hidrolizados, no viéndose afectada la solubilidad peptídica por el tipo de solvente del sistema de ensayo (igual IC<sub>50</sub>).

- ✓ Todos los hidrolizados de **FP** fueron capaces de inhibir a la **ECA I**. Este efecto inhibitorio podría deberse principalmente a *dipéptidos* con elevada proporción de Ala, Pro y Leu en su secuencia peptídica.
- ✓ **FP** ejerció un efecto mitogénico sobre los esplenocitos y macrófagos, el cual se debería principalmente a *lectinas* presentes en la fracción. Además, ejerció una acción del tipo anti-inflamatoria mediada principalmente por la secreción de IL10 vía NF-κB. El incremento en la producción de esta citoquina estaría asociado con la diferenciación de los linfocitos Th0 a T reguladores en presencia de los macrófagos M2. Cabe señalar que el efecto anti-inflamatorio fue observado en macrófagos y esplenocitos, viéndose disminuida la producción de TNFα, IL6, IL1β e IFNγ.
- ✓ Los hidrolizados **TA** y **AT** exhibieron un efecto anti-inflamatorio significativamente superior al **FP**, indicando mayor actividad inmunomoduladora de los péptidos bioactivos generados tras la hidrólisis.
- ✓ **HR** presentó muy buenas propiedades antioxidantes e inhibitorias de **ECA I**, atribuibles a los péptidos bioactivos (*tetra-péptidos*) y compuestos fenólicos liberados durante la hidrólisis de **R**.
- ✓ La hidrólisis enzimática de **R** permitió obtener *tetra-péptidos* con interesantes propiedades mitogénicas. Estos péptidos favorecerían la diferenciación de linfocitos Th0 a linfocitos T reguladores en presencia de macrófagos M2, lo que se manifiesta como un marcado aumento en la expresión de IL10 vía p38, JNK y NF-κB. Dicha citoquina ejercería un efecto anti-inflamatorio sobre macrófagos y esplenocitos, disminuyendo la secreción de TNFα, IL6, IL1β e IFNγ.
- ✓ La obtención de fracciones proteicas a partir de *P. columbina* y su posterior hidrólisis es una temática sin precedentes. Tampoco hay información en cuanto a las propiedades bioactivas de dichos hidrolizados. Por lo tanto, esta investigación es una fuente de información útil en el estudio de la modificación estructural de estas proteínas y sus potenciales aplicaciones. En este sentido, tanto los hidrolizados de **FP** como **HR** se podrían emplear como agentes antioxidantes para la preservación de alimentos. Además, se podrían utilizar en la industria farmacéutica como agentes anti-inflamatorios si se corroborara su acción *in vivo*. Cabe resaltar que la producción de **HR** aporta valor agregado al proceso tradicional de obtención de *ficocoloides*.

---

***Elaboración de un alimento con algas. Estudio de sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y bio-accesibilidad de compuestos activos***

- ✓ El agregado de niveles crecientes de *P. columbina* produjo un descenso en el nivel de fricción, disminuyendo el consumo de energía mecánica y la expansión y el grado de cocción de los extrudidos. Además, se observó un descenso en los parámetros L\*, b\*,  $\Delta E^*$  y C\*, variando el color de **amarillo claro** a un **amarillo verdoso** más oscuro. Esta variación en el color fue más notoria para MaPc<sub>3</sub> y se debió a los pigmentos aportados por el alga.
- ✓ De la evaluación sensorial se pudo concluir que el porcentaje de adición más adecuado de *P. columbina* fue el de 3,5% (MaPc<sub>2</sub>), ya que permitió obtener buenas características sensoriales en cuanto a color, flavor y pegajosidad.
- ✓ El contenido de proteínas, fibra dietaria total e insoluble y cenizas en MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al hallado para el control (Ma). Este incremento estuvo relacionado con la composición centesimal del alga. Además, no se observaron diferencias significativas entre los valores de digestibilidad proteica *in vitro*, puntaje químico y PDCAAS de ambos productos expandidos (Ma y MaPc<sub>2</sub>). El contenido de compuestos fenólicos extractables de MaPc<sub>2</sub> fue significativamente superior al de Ma en todos los sistemas estudiados. Este aumento se atribuyó a los compuestos fenólicos aportados por el alga a los expandidos, lo que proporcionó una mayor capacidad antioxidante al producto MaPc<sub>2</sub>.
- ✓ La capacidad antioxidante exhibida por Ma y MaPc<sub>2</sub> perduró luego del proceso de digestión gástrica *in vitro* y fue superior para el dializado con alga (MaPc<sub>2D</sub>). En este mismo sentido, se observó un mayor efecto inhibitorio sobre ECA I. Este aumento de las propiedades bioactivas en MaPc<sub>2D</sub>, se debió a los compuestos fenólicos y péptidos bioactivos aportados por *P. columbina*, los cuales serían potencialmente bio-accesibles.
- ✓ El proceso de extrusión permitió obtener un **alimento funcional** a base de sémola de maíz con agregado de *P. columbina*, el cual exhibió interesantes propiedades bioactivas *in vitro*. Si se tiene en cuenta que en occidente son muy pocos los alimentos funcionales desarrollados con algas o sus extractos, los resultados obtenidos en la presente tesis adquieren gran relevancia para la ciencia y tecnología de alimentos. No obstante, queda pendiente corroborar los efectos bioactivos con ensayos *in vivo*.

En conclusión, *P. columbina* resultó ser una buena fuente natural de nutrientes (fibra dietaria y proteínas) y compuestos bioactivos (antioxidantes, antihipertensivos e inmunomoduladores). Además, la tecnología de formación de películas por *casting* permitió obtener films biodegradables con interesantes propiedades antioxidantes, mecánicas y de barrera, los cuales pueden ser utilizados para el *packaging* de diferentes productos alimenticios sensibles a la oxidación. Por último, el proceso de extrusión resultó ser una buena alternativa para obtener un alimento bio-funcional a base de sémola de maíz con agregado de *P. columbina*, el cual exhibió interesantes propiedades bioactivas *in vitro*.

## VI. Bibliografía

---

**VI. BIBLIOGRAFÍA**

- A.O.A.C. (1993). Method 931-01- Methods of Analysis for Nutrition Labelling. Ed. Sullivan DM, Carpenter DE. cap 26, 331-365
- A.O.A.C. (1995). Official Methods of Analysis, (16th ed.), Horowitz, Washigton DC, USA.
- Ahmadi, F.; Kadivar, M. y Shahedi, M. (2007). *Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff in model and food systems*. Food Chem. 105, 57-64.
- Alaiz, M.; Navarro, J.; Giron, J. y Vioque, E. (1992). *Amino acid analysis by highperformance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate*. J Chromatogr. 591, 181-186.
- Al-Alawi, A.; Al-Marhubi, I.; Al-Belushi, M. y Soussi, B. (2011). *Characterization of Carrageenan Extracted from Hypnea bryoides in Oman*. Mar Biotechnol, 13, 893-899.
- Anderson, R.; Conway, H.; Pfeiffer, V. y Griffin, E. (1969). *Gelatinization of corn grits by roll and extrusion-cooking*. Rev. Agrop. Tec de Alim. 26, 552-564.
- Aneiros, A. y Garateix, A. (2004). *Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures*. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 803, 41-53.
- Arvizu, D.; Rodríguez, Y.; Hernández, G. y Murillo, J. (2007). *Chemical constituents of Eisenia arborea Areschoug from Baja California Sur, México*. Invest. Marinas 35, 63-69.
- ASTM. (2004). *Annual book of ASTM standards; ASTM International*. Philadelphia, PA, USA.
- Athukorala, Y. y Jeon, Y. (2005) *Screening for angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Ecklonia cava*. J Food Sci. Nutr. 10, 134–139.
- Balandrán-Quintana, R.; Barbosa-Cánovas, G.; Zazueta-Morales, J.; Anzaldúa-Morales, A. y Quintero-Ramos, A. (1998). *Functional and nutritional properties of extruded whole Pinto bean meal (Phaseolus vulgaris L.)*. J. Food Sci. 63, 113 – 116.
- Balti, R.; Bougatef, A.; El Hadj Ali, N.; Ktari, N.; Jellouli, K.; Nedjar-Arroume, N. y Nasri, M. (2011). *Comparative study on biochemical properties and antioxidative*

*activity of cuttlefish (Sepia officinalis) protein hydrolysates produced by Alcalase and Bacillus licheniformis NHI proteases.* J Amino Acids. 1-11.

Barbarino, E. y Lourenço, S. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. J Appl Phycol. 17, 447-460.

Barnes, P. y Karin, M. (1997). *Nuclear Factor  $\kappa$  B — A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.* New Engl J Med. 336, 1066-1071.

Básaca-Loya, G.; Valdez, M; Enríquez-Guevara, E.; Gutiérrez-Millán, L. y Burboa, M. (2009). *Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga Rhodospirillum rubrum.* Ciencias Marinas 35, 359-368.

Bermejo, P.; Pinero, E. y Villar, A. (2008). *Iron chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protein extract of Spirulina platensis.* Food Chem. 110, 436 – 445.

Bermejo, R.; Acién, F.; Ibáñez, J.; Fernández, J.; Molinab, E. y Alvarez-Pezc, J. (2003). *Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga Porphyridium cruentum by expanded-bed adsorption chromatography.* J. Chromatogr. B 790, 317-325.

Bermejo-Román, R.; Álvarez-Pez, J.; Acién Fernández, F. y Molina Grima, E. (2002). *Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga Porphyridium cruentum.* J Biotechnol. 93, 73-85.

Bertuzzi, M.; Armada, M. y Gottifredi, J. (2007) *Physicochemical characterization of starch based films.* J Food Eng. 82, 17-25.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. y Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.* LWT - Food Sci Technol. 28, 25-30.

Brodie, J. y Irvine, L. (2003). *Seaweeds of the British Isles. Part 3b.* The Natural History Museum, Londres, Reino Unido.

Brody, A.; Bugusu, B.; Han, J.; Sand, C. y McHugh, T. (2008). *Innovative Food Packaging Solutions.* J Food Sci. 73, 107-116.

- Cagnasso, C.; López, L.; Binaghi, M.; Pellegrino, N. y Valencia, M. (2010). *Iron and zinc dialysability in commercial breakfast cereals fortified with elemental iron, ferrous sulphate or ferric sodium EDTA*. *Revista Chilena de Nutrición*. 37, 138-144.
- Campo, V.; Kawano, D.; da Silva, D. y Carvalho, Ivone. (2009). *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis*. *Carbohydr. Polym.* 77, 167-180.
- Cánovas, J.; Rentero, P.; Martínez-Cachá Martínez, A.; Hernández, M. y Alemán, J. (2011). *Péptidos bioactivos*. *Clin Invest Arterioscl.* 23, 219-227.
- Cao, G.; Alessio, H. y Cutler, R. (1993). *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. *Free Radical Biol. Med.* 14, 303-311.
- Cao, N.; Fu, Y. y He, J. (2007). *Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films*. *Food Hydrocolloids* 21, 1153-1162.
- Cardozo, K.; Guaratini, T.; Barros, M.; Falcão, V.; Tonon, A.; Lopes, N.; Campos, S. y Torres, M.; Souza, A.; Colepicolo, P. y Pinto, E. (2007). *Metabolites from algae with economical impact*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 146, 60-78.
- Cert, A.; Moreda, W. y Pérez-Camino, M. (2000). *Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial*. *Grasas y Aceites*, 51, 447-456.
- Chang, C.; Wu, K. y Chiang, S. (2007). *Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates*. *Food Chem.* 100, 1537-1543.
- Chang, S.; Dohrman, A.; Basbaum, C.; Ho, S.; Tsuda, T.; Toribara, N.; Gum, J. y Kim, Y. (1994). *Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer*. *Gastroenterology* 107, 28-36.
- Chawla, A.; Nguyen, K. y Sharon Goh, S. (2011). *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 738-749.
- Cheftel, J.; Cuq, J. y Lorient, D. (1989). *Proteínas Alimentarias*. Ed Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Cherng, S.; Cheng, S.; Tarn, A. y Chou, T. (2007). *Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages*. *Life Sci.* 81, 1431-1435.

- Chew, Y.; Lim, Y.; Omar, M. y Khoo, K. (2008). *Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia*. LWT - Food Sci. Technol. 41, 1067-1072.
- Chi, H.; Barry, S.; Roth, R.; Wu, J.; Jones, E. y Bannet, A. (2006). *Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses*. PNAS 14, 2274-2279.
- Christen, Y. (2000). *Oxidative stress and Alzheimer's disease*. Am. J. Clin. Nutr. 71, 621-629.
- Cian, R. (2009). *Estudio de propiedades bio-funcionales de péptidos provenientes de hemoglobina bovina y su incorporación a productos extrudidos*. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Cian, R.; Drago, S. y González, R. (2011). *Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina*. INNOTEC. 6, 42-46.
- Cian, R.; Drago, S. y González, R. (2012). *Influence of pH on colour and iron content of peptide fractions obtained from bovine Hb concentrate hydrolysates*. Int. J. Food Sci. Technol. 47, 1348-1353.
- Clausen, M.; Skibsted, L. y Stagsted, J. (2009). *Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays*. J Agric. Food Chem. 57, 2912-2919.
- Colombo, M.; Risè, P.; Giavarini, F.; De Angelis, L.; Galli, C. y Bolis, C. (2006). *Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids*. Plant Foods Human Nutrit. 61, 67-72.
- Cox, S.; Abu-Ghannam, N. y Gupta, S. (2010). *An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds*. Int Food Res J. 17, 205-220.
- Crystal, R. y Ramon, J. (1992). *GSHSystem. Glutación: eje de la defensa antioxidante*. Excerpta Médica, Amsterdam. Holanda.
- Damodaran, S. (1989). *Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins*. Food Proteins. Ed. Kinsella, J.E. and Soucie, W.G. The American Oil Chemist' Society. cap.3, USA, p. 21-51.

- Dávalos, A.; Miguel, M.; Bartolomé, B. y López-Fadiño, R. (2004) *Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis*. J Food Protect. 67, 1939–1944.
- de la Coba, F.; Aguilera, J.; Figueroa, F.; de Gálvez, M. y Herrera, E. (2009). *Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen*. J Appl Phycol. 21, 161-169.
- de S:F-Tischer, P.; Talarico, L.; Nosedá, M.; Guimarães, S.; Damonte, E. y Duarte, M. (2006). *Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from Meristiella gelidium againts herpes simplex and dengue virus*. Carbohydr. Polym. 63, 459-465.
- Dehghan-Shoar, Z.; Hardacre, A. y Brennan, C. (2010). *The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene*. Food Chem. 123, 1117 – 1122.
- Denis, C.; Ledorze, C.; Jaouen, P. y Fleurence, J. (2009a). *Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of Rphycoerythrin from the red macroalga Grateloupia turuturu*. Bot. Mar. 52, 278-281.
- Denis, C.; Massé, A.; Fleurences, J. y Jaouen, P. (2009b). *Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macroalgae Grateloupia turuturu: Process definition and up-scaling*. Sep. Purification Technol. 69, 37–42.
- Dodgson, K., & Price, R. (1962). *A note on the determination of the ester sulphate content of sulfated polysaccharides*. Biochem. J. 84, 106-110.
- Dousseau, F. y Pézolet, M. (1990). *Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II Infrared bands. Comparison between classical and partial least squares methods*. Biochem. 29, 8771–8779
- Drago, S. (2007). *Modificaciones enzimáticas del gluten y su relación con las propiedades funcionales*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Drago, S. y González, R. (2001). *Foaming properties of enzymatically hydrolyzed wheat gluten*. Innov. Food Sci Emerging Technol. 269-273.

- Drago, S.; Binaghi, M. y Valencia, M. (2005). *Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas*. Food Sci. 70, 107-112.
- Drago, S.; Luggren, P.; Vioque, J.; Bentancur Ancona, D.; Chel Guerrero, L. y González, R. (2013). *Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo*. Ed OmniaScience Barcelona, España. pp. 83-109.
- Dubois, M.; Gillis, K.; Hamilton, J.; Rebers, P. y Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem. 28, 350-356.
- Dwyer, J. y Johnson, C. (1981). The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. Clin. Exp. Immunol. 46, 237-249.
- Dyner, L.; Drago, S.; Piñeiro, A.; Sánchez, H.; González, R.; Villaamil, E. y Valencia M. (2007). *Composición y aporte potencial de hierro, calcio y zinc de panes y fideos elaborados con harinas de trigo y amaranto*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57, 69-77.
- Estévez, J.; Ciancia, M.; Rodríguez, M. y Cerezo, A. (2003). *Ficocoloides de algas rojas (Rhodophyta): carragenanos, agaranos y DL-híbridos*. Investigaciones en Argentina. Bol Soc Argent Bot. 38, 13-28.
- FAO. (2013). *Cultured aquatic species fact sheets, Porphyra spp*. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Porphyra\\_spp/es#tcNA0064](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Porphyra_spp/es#tcNA0064).
- FAO/WHO/UNU (United Nations University). (1985). Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series N°. 724. Geneva, Switzerland: WHO.
- Feng, L.; Tang, W.; Chang, J. y Wilson, C. (1993). Molecular cloning of rat cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) cDNA and expression in spleen and macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 452-458.
- Fitzgerald, C.; Gallagher, E.; Tasdemir, D. y Hayes, M. (2011). *Heart health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods*. J Agric Food Chem. 59, 6829-6836.
- Fleurence, J. (1999). *Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses*. Trends Food Sci. Technol. 10, 25-28.

- Fleurence, J., Le Coeur, C.; Mabeau, S.; Maurice, M. y Landrein, A. (1995). *Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata**. J Appl Phycol. 6, 577-582.
- Foey, A.; Parry, S.; Williams, L.; Feldmann, M.; Foxwell, B. y Brennan, F. (1998). Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- $\alpha$ : Role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. J Immunol. 160, 920–928.
- Fu, X.; Sun, L.; Yang, G.; Lu, W.; Zhao, M. y Gong, X. (2011). *The subunits analysis of R-phycoerythrin from marine red algae by isoelectric focusing*. Afr. J. Biotechnol. 10, 7640-7649.
- Funami, T.; Hiroe, M.; Noda, S.; Asai, I.; Ikeda, S. y Nishinarib, K. (2007). *Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations*. Food Hydrocolloids 21, 617-629.
- Galland-Irmouli, A.; Fleurence, J.; Lamghari, R.; Luçon, M.; Rouxel, C.; Barbaroux, O.; Bronowicki, J.; Villaume, C. y Guéant, J. (1999). *Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse)*. J Nutrit. Biochem. 10, 353–359.
- Galland-Irmouli, A.; Pons, L., Luçon, M.; Villaume, C.; Mrabet, N.; Guéant, J. y Fleurence, J. (2000). *One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis*. J. Chromatogr. B, 739, 117-123.
- García, D. (2004). *Los metabolitos secundarios de las especies vegetales*. Pastos y Forrajes 27, 1-12.
- García-Casal, M.; Pereira, A.; Leets, I.; Ramírez, J. y Quiroga, M. (2007). *High iron content and bioavailability in humans from four species of marine algae*. J. Nutr. 137, 2691 – 2695.
- Ge, B.; Qin, S.; Han, L.; Lin, F. y Ren, Y. (2006). *Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli**. J Photochem. Photobiol. B: Biol. 84, 175-180.
- Ghorpade, V.; Li, H.; Gennadios, A. y Hanna, M. (1995). *Chemically modified soy protein films*. Transactions of the ASAE. 38, 1805–1808.

- Giménez, B.; Alemán, A.; Montero, P. y Gómez-Guillén M. (2009). *Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid*. Food Chem. 114, 976-983.
- Giménez, B.; López de Lacey, A.; Pérez-Santín, E.; López-Caballero, M. y Montero, P. (2013). *Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract*. Food Hydrocolloids. 30, 264 – 271.
- Glazer, A. y Hixó, C. (1975). *Characterization of R-phycoerythrin*. J. Biol. Chem. 250, 5487-5495.
- Gómez Ayala, A. (2006). *Inmunidad y nutrición*. Farmacia Profesional 20, 52-57.
- Gómez-Ordóñez, E. y Rupérez, P. (2011). *FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds*. Food Hydrocolloids 25, 1514-1520.
- González, R.; De Greef, D.; Torres, R.; Borrás, F. y Robuti, J. (2004). *Effects of endosperm hardness and extrusion temperature on properties of products obtained with grits from two commercial maize cultivars*. LWT - Food Sci Technol, 37, 193-198.
- González, R.; Remondetto, G.; Coutas, R.; Santiago, L. y Bonaldo, A. (1995). *Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja*. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 35, 77-91.
- González, R.; Torres, R.; De Greef, D.; Tosi, E. y Re, E. (2002) Brazilian J Chem. Eng. 19, 391-395.
- Gressler, V.; Yokoya, N.; Fujii, M.; Colepicolo, P.; Mancini Filho, J.; Torres, R. y Pinto, E. (2010). *Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species*. Food Chem. 120, 585–590.
- Guadix, A.; Guadix, E.; Páez-Dueñas, M.; González-Tello, P. y Camacho F. (2000). *Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins*. Ars Pharm. 41, 79-89.
- Guiry, M. y Guiry, G. (2010). *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Http://www.algaebase.org](http://www.algaebase.org).
- Hagerman, A. E. (2002). *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA.

- Halprin, K. y Ohkawara, A. (1966). *Carbohydrate metabolism in psoriasis: an enzymatic study*. J. Invest. Dermatol. 47, 222-229.
- Han, J. (2002). *Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents*. Protein-based Films and Coatings. Ed. A. Gennadios. CRC Press, Boca Raton, Florida. Estados Unidos. p. 485-499.
- Han, J. y Gennadios, A. (2005). *Edible films and coatings: a review*. In J. H. Han (Ed.), Innovations in food packaging (pp. 239-262). San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Hannum, S. (2004). *Potential impact of strawberries on human health: A review*. Cr. Cr. Rev. Food Sci. 44, 1- 17.
- Harnedy, P. y Fitzgerald, R. (2011). *Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae*. J. Phycol. 47, 218-232.
- Hayakari, M.; Kondo, Y. y Izumi, H. (1978). *A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme*. Anal Biochem. 84, 361-369.
- Henley, E. y Kuster, J. (1994). *Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring*. Food Technol. 48, 74-77.
- Henley, E. y Kuster, J. (1994). Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. Food Technol- 48, 74-77.
- Herbreteau, F.; Coiffard, L.; Derrien, A. y De Roeck-Holtzhauer Y. (1997). *The fatty acid composition of five species of macroalgae*. Botanica Marina. 40, 25–27.
- Holanda, M., Melo, V.; Silva, L.; Amorim, R.; Pereira, M. y Benavides, N. (2005). *Differential activity of a lectin from Solieria filiformis against human pathogenic bacteria*. Brazilian J Medical Biol Res. 38, 1769-1773.
- Holdt, S. y Kraan, S. (2011). *Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation*. J Appl Phycol. 23, 543-597.
- Hong, F.; Ming, L.; Yi, S.; Zhanxia, L.; Yongquan, W. y Chi, L. (2008). *The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?*. Peptides. 29, 1062-1071.
- Hsu, H.; Hsu, C.; Lin, R.; Kao, C. y Lin, J. (1997). *Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from Volvariella volvacea*. Biochem. J. 323, 557–565.

- Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. (2005). *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856.
- Ignat, I.; Volf, I. y Popa, V. (2011). *A critical review of method for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food Chem. 126, 1821-1835.
- Indegaard, M. y Minsaas, J. (1991). *Animal and human nutrition*. In M. D. Guiry, and G. Blunden (Eds.), *Seaweed resources in Europe: uses and potential* (pp. 21–64). Chichester: John Wiley and Sons Ltd.
- Institute of Food Technologists. (2005). *Expert Report: Functional foods: opportunities and challenges*. pp 1-66.
- Jäkälä, P. y Vapaatalo, H. (2010). *Antihypertensive Peptides from Milk Proteins*. Pharmaceuticals 3, 251-272.
- Jiménez-Escrig, A.; Gómez-Ordóñez, E. y Rupérez, P. (2012). *Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals*. J Appl Phycol. 24, 1123-1132.
- Joubert, Y. y Fleurence, J. (2008). *Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta)*. J. Appl. Phycol. 20, 55-61.
- Kadam, S. y Prabhasankar, P. (2010). *Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products*. Food Res Int. 43, 1975-1980.
- Kaiko, G.; Horvat, J.; Beagley, K. y Hansbro, P. (2008). *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?*. Immunol. 123, 326–338.
- Kamchan, A.; Puwastien, P.; Sirichakwal, P. y Kongkachuichai, R. (2004). *In vitro calcium bioavailability of vegetables, legumes and seeds*. J Food Composition Anal. 17, 311-320.
- Karadag, A.; Ozcelik, B. y Saner, S. (2009). *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities*. Food Anal. Methods 2, 41-60.
- Kato, T. y Owen, R. (1999). *Structure and function of intestinal mucosal epithelium, in Mucosal Immunology*, 2da ed. (Ogra R, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds.). Academic Press, Inc, San Diego, CA, Estados Unidos. pp 115-132.

- Khantaphant, S.; Benjakul, S. y Kishimura, H. (2011). *Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and comercial proteases*. *Process Biochem.* 46, 318-327.
- Kim, S. y Wijesekara, I. (2010). *Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review*. *J Funct Foods*, 2, 1-9.
- Kinsella, J. (1981). *Relationships between structure and functional properties of food proteins*. *Food Proteins*. Ed. Fox, P.F. y Condon J. J. Appl. Sci. Publishers. London 3, 51-243.
- Knutsen, S.; Mylabodsky, D; Larsen, B. y Usov, A. (1994). *A modified system of nomenclature for red algal galactans*. *Bot. Mar.* 37, 163-169.
- Kokini, J.; Lih, S. y Chedid, L. (1992). *Effect of starch structure on starch rheological properties*. *Food Technol.* 46, 124-139.
- Kolender, A.; Pujol, C.; Damonte, E.; Matulewicz, M. y Cerezo, A. (1997). *The system of sulfated  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties*. *Carbohydr. Res.* 304, 53-60.
- Kong, X.; Guo, M.; Hua, Y.; Cao, D. y Zhang, C. (2008). *Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins*. *Biores. Technol.* 99, 8873–8879.
- Korbee, N.; Figueroa, F. y Aguilera, J. (2006). *Accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs): biosynthesis, photocontrol and ecophysiological functions*. *Rev. Chilena Historia Nat.* 79, 119-132.
- Krikor, H.; Tarrago, S. y Jansen, C. (2011). *Polymeric Material for Making a Packaging Article Having Oxygen-Barrier Properties and Low Light*. United States Patent Application 20110244155.
- Kuda, T.; Tsunekawa, M.; Goto, H. y Araki, Y. (2005). *Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan*. *J Food Comp. Anal.* 18, 625 – 633.
- Kumar, M.; Kumari, P.; Trivedi, N.; Shukla, M.; Gupta, V.; Reddy, C. y Jha, B. (2011). *Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India*. *J Applied Phycol.* 23, 797-810.

- Laemmli, U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227-680.
- Lay, L. y Kokini, J. (1991). *Physicochemical and rheological of starch during extrusion (a review)*. *Biotechnol Progress* 7, 251-266.
- Lee, R. (2008). *Phycology. Fourth edition*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, p. 89-132.
- Lewis, E. (1974). *Protein, peptide, and free amino acid composition in some species of Laurencia from Saurashtra coast. Proceedings Indian National Sci. Academy, Part B. Biol. Sci.* 40, 38–43.
- Li, G.; Le, G.; Shi, Y. y Shrestha, S. (2004). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects*. *Nutr. Res.* 24, 469-486.
- Liu, M.; Hansen, P. y Lin, X. (2011). *Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities*. *Mar. Drugs* 9, 1273-1292.
- Lizarraga, M.; De Piante Vicin, D.; González, R.; Rubiolo, A. y Santiago, L. (2006), *Rheological behaviour of whey protein concentrate and  $\lambda$ -carrageenan aqueous mixtures*. *Food Hydrocolloids*, 20, 740-748.
- Llewellyn, C. y Airs, R. (2010). *Distribution and Abundance of MAAs in 33 Species of Microalgae across 13 Classes*. *Mar. Drugs* 8, 1273-1291.
- López-Fandiño, R.; Otte, J. y Van Camp, J. (2006). *Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity*. *Int. Dairy J.* 16, 1277-1293.
- López-Posadas, R.; Ballester, I.; Mascaraque, C.; Suárez, M.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O. y Sánchez de Medina, F. (2010). *Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF- $\kappa$ B in an intestinal epithelial cell line (IEC18)*. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1714–1726.
- Lourenço, S.; Barbarino, E.; Lavín, P.; Lanfer Marquez, U. y Aidar, E. (2004) *Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors*. *Eur. J. Phycol.* 39, 17–32.

- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, L. y Randall, R. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Ma, M.; Bae, I.; Lee, H. y Yang, C. (2006). *Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)*. Food Chem. 96, 36-42.
- Mabeau, S.; Cavaloc, E.; Fleurence, J. y Lahaye, M. (1992). *New seaweed based ingredients for the food industry*. Int. Food Ingredients. 3, 38-45.
- MacColl, R.; Eisele, L.; Endres, H. y Bowser, W. (1999). *Studies on R-phycoerythrins from two Antarctic marine red algae and a mesophilic red alga*. Polar Biol. 22, 384-388.
- Maciel, J.; Chaves, L.; Souza, B.; Teixeira, D.; Freitas, A.; Feitosa, J. y de Paula, R. (2008). *Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae**. Carbohydr. Polym. 71, 559-565.
- Marcotte, M.; Hoshahili, H. y Ramaswamy, H. (2001). *Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature*. Food Res. Int. 34, 695-703.
- Martínez-Augustín, O. y Martínez de Victoria Muñoz, E. (2006). *Proteínas y péptidos en nutrición enteral*. Nutr. Hosp. 21, 1-14.
- Martins, J.; Cerqueira, M. y Vicente, A. (2012). *Influence of a-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films*. Food Hydrocolloids. 27, 220-227.
- Matanjun, P., Mohamed, S.; Mustapha, N.; Muhammad, K. y Ming, C. (2008). *Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo*. J. Appl. Phycol. 20, 367-373.
- McDermid, K. y Stuercke, B. (2003). *Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds*. J Appl. Phycol. 15, 513-524.
- Megías, C.; Pedroche, J.; Yust, M.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F. y Vioque, J. (2008). *Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin*. LWT - Food Sci Technol. 41, 1973-1977.

- Melo, M.; Feitosa, J.; Freitas, A. y de Paula, R. (2002). *Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria cornea*. Carbohydr. Polym. 49, 491-498.
- Miller, I. (1997). *The chemotaxonomic significance of the water soluble red algal polysaccharides*. Recent Res. Dev. Phytochem. 531-565.
- Minkova, K.; Tchernov, A.; Tchorbadjieva, M.; Fournadjieva, S.; Antova, R. y Busheva, M. (2003). *Purification of C-phycoyanin from Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. J Biotechnol. 102, 55-59.
- Mishra, V.; Temelli, F.; Ooraikul Shacklock, P. y Craigie, J. (1993). *Lipids of the red alga Palmaria palmata*. Botanica Marina. 36, 169–174.
- Mišurcová, L.; Kráčmar, S.; Klejdus, B. y Vacek, J. (2010). *Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products*. Czech J Food Sci. 27-35.
- Mitchell, J. y Areas, J. (1992). *Structural changes in biopolymers during extrusion. Food Extrusion Science and Technology*. (JL Kokini, CT Ho, MV Karwe Eds). Marcel Dekker ,New York, Estados Unidos, p 345-360.
- Mohamed, S.; Hashim, S. y Rahman, H. (2012). *Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy*. Trends Food Sci. Technol. 23, 83-96.
- Mohammedi, Z. y Atik, F. (2011). *Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from Tamarix aphylla (L.) Karst*. Int. J Pharma Bio Sci. 2, 609-615.
- Molchanova, V.; Chernikov, O.; Chikalovets, I. y Lukyanov, P. (2010). *Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga Tichocarpus crinitus (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta)*. Bot. Mar. 53, 69–78.
- Montolalu, R.; Tashiro, Y.; Matsukawa, S. y Ogawa, H. (2008). *Effects of extraction parameters on gel properties of carrageenan from Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta)*. J. Appl. Phycol. 20, 521-526.
- Moosmann, B. y Behl, C. (2002). *Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure-activity relationship*. Mol. Pharmacol. 61,260–268.

- Moreira-Araújo, R.; Araújo, M. y Arêas, J. (2008). *Fortified food made by the extrusion of a mixture of chickpea, corn and bovine lung controls iron-deficiency anaemia in preschool children*. Food Chem. 107, 158-164.
- Muller, H. (1977). *Introducción a la reología de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 169.
- Munda, I. (1977). *Differences in amino acid composition of estuarine and marine fucoïds*. Aquatic Botany. 3, 273–280.
- Murakami, M.; Tonouchi, H.; Takahashi, R.; Kitazawa, H.; Kawai, Y.; Negishi, H. y Saito, T. (2004). *Structural analysis of a new antihypertensive peptide ( $\beta$ -Lactosin B) isolated from a commercial whey product*. J. Dairy Sci. 87, 1967–1974.
- Murray, J.; Delahunty, C. y Baxter, I. (2001). *Descriptive sensory analysis: past, present and future*. Food Res. Int. 34, 461-471.
- Muse, J.; Stripeikis, J.; Fernández, F.; d'Huicque, L.; Tudino, M.; Carducci, C. y Troccoli, O. (1999). *Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina*. Environ. Pollut. 104, 315-322.
- Neuman, M. (2007). *Immune dysfunction in inflammatory bowel disease*. Translational Res. 149, 173-174.
- Ngo, D.; Wijesekara, I.; Vo, T.; Ta, Q. y Kim, S. (2011). *Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview*. Food Res Int. 44, 523-529.
- Nielsen, P.; Petersen, D. y Dambmann, C. (2001). *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. J. Food Sci. 66, 642-646.
- Niu, J.; Chen, Z.; Wang, G. y Zhou, B. (2010). *Purification of phycoerythrin from Porphyra yezoensis Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption*. J. Appl. Phycol. 22, 25-31.
- Niu, J.; Wang, G.; Zhou, B.; Lin, X. y Chen, C. (2007). *Purification of Rphycoerythrin from Porphyra haitanensis (Bangiales, Rhodophyta) using expanded-bed absorption*. J. Phycol. 43, 1339-1347.
- Norziah, M. y Ching, C. (2000). *Nutritional composition of edible seaweed Gracilaria changgi*. Food Chem. 68, 69–76.

- Nosedá, M.; Viana, A.; Duarte, M. y Cerezo, A. (2000). *Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds*. Carbohydr. Polym, 42, 301-305.
- Novoa, A.; Motidome, M.; Mancini-Filho, J.; Linares, A.; Tanae, M.; Torres, L. y Lapa, A. (2001). *Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina Bryothamnion triquetrum (S.G.Gmelim) Howe*. Brazilian J Pharma Sci. 37, 373-382.
- Nuthong, P.; Benjakul, S. y Prodpran, T. (2009). *Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents*. Int J Biol Macromol. 44, 143-148.
- Ogawa, H.; Mizuno, H.; Saito, T.; Yamada, Y.; Oohusa, T. y Iso, N. (1991). *Effects of pH on the conformation of phycoerythrin from Nori Porphyra sp.* Nippon Suisan Gakkaishi. 57, 899-903.
- Oliveira, M.; Ponte Freitas, A.; Urano Carvalho, A.; Tavares Sampaio, T.; Farias, D., Alves Teixeira, D.; Gouveia, S.; Gomes Pereira, J. y Marrir de Castro Catanho de Sena, M. (2009). *Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil*. Food Chem. 115, 254 – 259.
- Olivera Carrión, M. (2007). *Alimentos Funcionales en Argentina*. La Alimentación Latinoamericana 272, 6-12.
- Ondetti, M. (1977). *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents*. Sci. 196, 441-444.
- Oren, A. y Gunde-Cimerman, N. (2007). *Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?*. FEMS Microbiol Lett. 269, 1-10.
- Orsini, M.; Tironi, V. y Añón, M. (2011). *Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion*. LWT - Food Sci. Technol. 44, 1752-1760.
- Orta-Ramirez, A.; Merrill, J. y Smith, D. (2000). *pH Affects the Thermal Inactivation Parameters of R-Phycoerythrin from Porphyra yezoensis*. J. Food Sci. 65, 1046-1050.
- Ortega-Calvo, J.; Mazuelos, C.; Hermosín, B. y Saíz-Jiménez, C. (1993). *Chemical composition of Spirulina and eucaryotic algae food products marketed in Spain*. J Appl. Phycol. 5, 425–435.

- Ou, S.; Kwok, K. y Kang, Y. (2004). *Changes in vitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film*. J Food Eng. 64, 301-305.
- Parker, B. (1964) *The structure and chemical composition of cell walls in three chlorophycean algae*. Phycologia 4, 63-74.
- Pastor-Cavada, E.; Drago, S.; González, R.; Juan, R.; Pastor J., Alaiz, M. y Vioque, J. (2011). *Effects of the addition of wild legumes (Lathyrus annuus and Lathyrus clymenum) on the physical and nutritional properties of extruded products based on whole corn and brown rice*. Food Chem. 128, 961–967.
- Peng, X.; Xiong, Y. y Kong, B. (2009). *Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance*. Food Chem. 113, 196-201.
- Pereira-Pacheco, F.; Robledo, D.; Rodríguez-Carvajal, L. y Freile-Pelegrián, Y. (2007). *Optimization of native agar extraction from Hydropuntia cornea from Yucatán, México*. Bioresour Technol. 98, 1278-1284.
- Pérez, A.; Farías, S.; Strobl, A.; Pérez, L.; López, C.; Piñeiro, A.; Roses, O. y Fajardo, M. (2007). *Levels of essential and toxic elements in Porphyra columbina and genus Ulva from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina*. Sci. Total Environ. 376, 51–59.
- Perez, A.; Perez, L.; Strobl, A.; Camarda, S.; Farias, S.; López, C. y Fajardo, M. (2010). *Variación estacional de arsénico total en algas comestibles recolectadas en el Golfo de San Jorge (Chubut, Argentina)*. Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal 16-30.
- Petrucelli, S. (1993) *Modificaciones Estructurales de Aislados Proteicos de Soja Producidos por Tratamientos Reductores y Térmicos y su Relación con Propiedades Funcionales*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Pihlanto, A. (2006). *Antioxidative peptides derived from milk proteins*. Int Dairy J. 16, 1306-1314.
- Plaza, M.; Cifuentes, A. y Ibáñez, E. (2008). *In the search of new functional food ingredients from algae*. Trends Food Sci. Technol. 19, 31-39.
- Portis, T.; Harding, J. y Ratner, L. (2001). *The contribution of NF- $\kappa$ B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors*. Blood. 98, 1200–1207.

- Prabhasankar, P.; Ganesan, P.; Bhaskar, N.; Hirose, A.; Stephen, N.; Gowda, L.; Hosokawa, M. y Miyashita, K. (2009). *Edible Japanese seaweed, wakame (Undaria pinnatifida) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation*. Food Chem. 115, 501-508.
- Prabhasankar, P.; Ganesan, P.; Bhaskar, N.; Hirose, A.; Stephen, N.; Gowda, L.; Hosokawa, M. y Miyashita, K. (2009). *Edible Japanese seaweed, wakame (Undaria pinnatifida) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation*. Food Chem. 115, 501 – 508.
- Prado-Fernández, J.; Rodríguez-Vásquez, J.; Tojo, E. y Andrade, J. (2003). *Quantitation of k-, i- and l-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression*. Analytica Chimica Acta 480, 23-37.
- Prentice, J. (1984). *Measurements in the rheology of foodstuffs*. Elsevier Applied Science Publishers. pp191.
- Prior, R.; Wu, X. y Schaich, K. (2005). *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. J Agric Food Chem. 53, 4290-4302.
- Qian, Z.; Jung, W. y Kim, S. (2008). *Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Rana catesbeiana Shaw*. Biores. Technol. 99, 1690–1698.
- Qu, W.; Maa, H.; Pan, Z.; Luo, L.; Wang, Z. y He, R. (2010). *Preparation and antihypertensive activity of peptides from Porphyra yezoensis*. Food Chem. 123, 14–20.
- Rajapakse, N.; Mendis, E.; Jung, W.; Je, J. y Kim, S. (2005). *Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties*. Food Res. Int. 38, 175-182.
- Ramón, J. (1993). *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. Ed. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A.), Madrid, España. p 238-249.
- Rao, P., Mantri, V. y Ganesan, K. (2007). *Mineral composition of edible seaweed Porphyra vietnamensis*. Food Chem. 102, 215–218.
- Raps, S.; Kycia, J.; Ledbetter, M. y Siegelman, H. (1985) *Light intensity adaptation and phycobilisome composition of Myrocystis aeruginosa*. Plant Physiol. 79, 983-987.

Raven; P.; Evert, R. y Eichhorn, S. (1996). *Biología Vegetal, Quinta edición*. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. p 248-259.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biol. Med. 26, 1231-1237.

Ren, J.; Zhao, M.; Shi, J.; Wang, J.; Jiang, Y.; Cui, C.; Kakuda, Y. y Xue, S. (2008). *Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry*. Food Chem. 108, 727-736.

Requena, P. (2009). *Mecanismo de acción del glucomacropéptido como agente antiinflamatorio intestinal*. Tesis de Doctor por la Universidad de Granada, Universidad de Granada, Granada, España.

Requena, P.; Daddaoua, A.; Guadix, E.; Zarzuelo, A.; Suárez, M.; Sánchez de Medina, F. y Martínez-Augustin, O. (2009). *Bovine glycomacropéptido induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF- $\kappa$ B signal transduction pathways*. Br. J. Pharmacol. 157, 1232-1240.

Requena, P.; González, R.; López-Posadas, R.; Abadía-Molina, A.; Dolores Suárez, M., Zarzuelo, A.; Sánchez de Medina, F. y Martínez-Augustin, O. (2010). *The intestinal antiinflammatory agent glycomacropéptido has immunomodulatory actions on rat splenocytes*. Biochem. Pharmacol. 79, 1797-1804.

Retz de Carvalho, L. y Roque N. (2000). *Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas*. Química Nova, 23, 757-764.

Rhim, J. (2012). *Physical-mechanical properties of agar/ $\kappa$ -carrageenan blend film and derived clay nanocomposite film*. J Food Sci. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02988.x.

Ribeiro, C.; Vicente, A.; Teixeira, A. y Miranda, C. (2007). *Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence*. Postharvest Biol. Technol. 44, 63-70.

Risso, S.; Escudero, C.; Estevao, B.; de Portela, M. y Fajardo, M. (2003). *Chemical composition and seasonal fluctuations of the edible green seaweed, Monostroma undulatum, Wittrock, from the Southern Argentina coast*. Arch Latinoam Nutr. 53, 306-11.

- Rocha de Souza, M.; Marques, C.; Dore, C.; da Silva, F.; Oliveira Rocha, H. y Leite, E. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 19, 153–160.
- Rodríguez Silveira, M.; Monereo Megías, S. y Molina Baena, B. (2003). *Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿Cerca o lejos?*. *Revista Española de Salud Pública*, 3, 317-331.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.; Lage-Yusty, M. y López-Hernández, J. (2010). *Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption*. *Food Chem.* 121, 634-638.
- Romay, C.; Armesto, J.; Ramirez, D.; González, R.; Ledón, N. y García, I. (1998). *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae*. *Inflamm Res.* 47, 36-41.
- Rossano, R.; Ungaro, N.; Ambrosio, A.; Liuzzi, G. y Riccio, P. (2003). *Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae Corallina elongata Ellis & Solander*. *J. Biotechnol.* 101, 289-293.
- Rouilly, A. y Rigal, L. (2002). *Agro-Materials: A Bibliographic Review*. *J Macromol Sci.* 42, 441-479.
- Rouxel, C.; Daniel, A.; Jérôme, M.; Etienne, M. y Fleurence, J. (2001). *Species identification by SDS-PAGE of red algae used as seafood or a food ingredient*. *Food Chem.* 74, 349-353.
- Rudiger, W. (1992). *Events in the phytochrome molecule after irradiation*. *Photochem. Photobiol.* 56, 803-809.
- Rudloff, S. y Lönnerdal, B. (1992). *Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments*. *J Pediatric Gastroenterol Nutrit.* 15, 25-33.
- Rupérez, P. (2002). *Mineral content of edible marine seaweeds*. *Food Chem.* 79, 23–26.
- Rupérez, P. y Saura-Calixto, F. (2001). *Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds*. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 349–354.

- Sabeena Farvin, K. y Jacobsen, C. (2013). *Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast*. Food Chem. 138, 1670–1681.
- Sabeena Farvin, K. y Jacobsen, C. (2013). *Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast*. Food Chem. 138, 1670–1681.
- Saiga, A.; Tanabe, S. y Nishimura, T. (2003). *Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment*. J. Agric. Food Chem. 51, 3661–3667.
- Sakanaka, S. y Tachibana, Y. (2006). *Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates*. Food Chem. 95, 243-249.
- Salgado, P.; Fernández, G.; Drago, S. y Mauri, A. (2011). *Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films*. Food Hydrocolloids, 25, 1433-1440.
- Salgado, P.; López-Caballero, M.; Gómez-Guillén, C.; Mauri, A. y Pilar Montero, M. (2013). *Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties*. Food Hydrocolloids. 33, 74-84.
- Sampath-Wiley, P. y Neefus, C. (2007). *An improved method for estimating R-phycoerythrin and R-phycoerythrin contents from crude aqueous extracts of Porphyra (Bangiales, Rhodophyta)*. J. Appl. Phycol. 19, 123-129.
- Sánchez-Machado, D.; López-Cervantes, J.; López-Hernández, J. y Paseiro-Losada, P. (2004). *Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds*. Food Chem. 85, 439–444.
- Sarmadi, B. y Ismail, A. (2010). *Antioxidative peptides from food proteins: A review*. Peptides 31, 1949-1956.
- Sato, M.; Hoskawa, T.; Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Muramoto, K. y Kahara, T. (2002). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (Undaria pinnatifida) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats*. J. Agric. Food Chem. 50, 6245-6252.

- Saura-Calixto, F.; García-Alonso, A.; Goñi, I. y Bravo, L. (2000). *In Vitro Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis*. J. Agric. Food Chem. 48, 3342-3347.
- Schanderl, S. (1970). *Tannins and related phenolics*. In: Joslyn MA (ed) *Methods in food: analysis physical, chemical and instrumental methods of analysis* New York: Academic. p. 701- 725.
- Segura Campos, M.; Peralta González, F.; Chel Guerrero, L. y Betancur Ancona, D. (2013). *Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (Salvia hispanica) Produced by Enzymatic Hydrolysis*. Int. J Food Sci. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/15848>.
- Sekar, S. y Chandramohan, M. (2008). *Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization* J Appl Phycol. 20, 113-136.
- Serot, T.; Courcoux, T. y Guillemineau, F. (1994). *Extraction and partial characterization of protein from the green alga Ulva sp.* Sciences des Aliments. 14, 301-309.
- Shames, B.; Selzman, C.; Maeldrum, D.; Pulida, E.; Barton, H.; Meng, X.; Harken, A. y McIntyre, R. (1998). *Interleukin-10 stabilizes inhibitory kBα in human monocytes*. Shock, 10, 389-394.
- Sheih, I.; Fang, T. y Wu, T. (2009). *Isolation and characterisation of a novel angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste*. Food Chem. 115, 279-284.
- Shen, S.; Chahal, B.; Majumder, K.; You, S. y Wu, J. (2010). *Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS*. J. Agric. Food Chem. 58, 7664-7672.
- Singh, A.; Kuila, A.; Yadav, G. y Banerjee, R. (2011). *Process optimization for the extraction of polyphenols from Okara*. Food Technol. Biotechnol. 49, 322-328.
- Singh, S.; Gamlath, S. y Wakeling, L. (2007). *Nutritional aspects of food extrusion: a review*. Int J Food Sci Technol. 42, 916-929.
- Sinha, R.; Singh, S. y Häder, D. (2007). *Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals*. J Photochem Photobiol B: Biol. 89, 29-35.

- Siriwardhana, N.; Kim, K.; Lee, K.; Kim, S.; Ha, J.; Song, C.; Lee, J. y Jeon, Y. (2008). *Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from Hizikia fusiformis by integrating treatments of enzymes, heat and pH control*. Int. J Food Sci. Technol. 43, 587-596.
- Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B. y Klenk, D. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem. 150, 76-85.
- Song, L.; Li, T.; Yu, R.; Yan, C.; Ren, S. y Zhao, Y. (2008). *Antioxidant activities of hydrolysates of Arca Subcrenata prepared with three proteases*. Marine Drugs. 6, 607-619.
- Sothornvit, R. y Krochta, J. (2000). *Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films*. J Agric. Food Chem. 48, 6298-6302.
- Souza, B.; Cerqueira, M.; Bourbon, A.; Pinheiro, A.; Martins, J.; Texeira, J.; Coimbra, M. y Vicente, A. (2012). *Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria biridiae*. Food Hydrocolloids, 27, 287–292.
- Su, H.; Xie, B.; Chen, X.; Wang, J.; Zhang, X.; Zhou, B. y Zhang, Y. (2010). *Efficient separation and purification of allophycocyanin from Spirulina (Arthrospira) platensis*. J Appl Phycol. 22, 65-70.
- Suetsuna, K y Chen, J. (2001). *Identification of antihypertensive peptides from peptic digests of two microalgae, Chlorella vulgaris and Spirulina platensis*. Marine Biotechnol. 3, 305-309.
- Suetsuna, K.; Chen, J. y Yamauchi, F. (1991). *Immunostimulating peptides derived from sardine muscle and soybean protein: Amino acid sequence, synthesis and biological properties*. Clinical Represent. 25, 75–86.
- Sultana, B.; Anwar, F. y Ashraf, M. (2009). *Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts*. Molecules. 14, 2167-2180.
- Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K. y Bigger, S. (2003). *Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications*. J. Food Sci. 68, 408-420.

Sutherland, D.; Lindstrom, S.; Nelson, W.; Brodie, J.; Lynch, M.; Hwang, M.; Choi, H.; Miyata, M.; Kikuchi, N.; Oliveira, M.; Farr, T.; Neefus, C.; Mols-Mortensen, A.; Milstein, D. y Müller, K. (2011). *A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta)*. J. Phycol. 47, 1131–1151.

Szkudelski, T. (1997). *Phytic acid-its influence on organism*. J. Anim. Feed Sci. 6, 427 – 438.

Tapia, M.; Rojas-Graü, M.; Rodríguez, E.; Ramírez, J., Carmona, A. y Martín-Belloso, O. (2007). *Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits*. J Food Sci. 72, 190-196.

Tarola, A.; Van de Velde, F.; Salvagni, L. y Preti, R. (2013). *Determination of phenolic compounds in strawberries (Fragaria ananassa Duch) by high performance liquid chromatography with diode array detection*. Food Anal. Methods 6, 227-237.

Tierney, M.; Croft, A. y Hayes, M. (2010). *A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae*. Botanica Marina 53, 387-408.

Torgensen, H. y Toledo, R. (1977). *Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems*. J Food Sci. 42, 1615 – 1620.

Torres-Fuentes, C.; Alaiz, M. y Vioque, J. (2011). *Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates*. Food Chem. 129, 485-490.

Torruco-Uco, J.; Domínguez-Magaña, M.; Dávila-Ortíz, G.; Martínez-Ayala, A.; Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. (2008). *Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión*. Ciencia y Tecnología Alimentaria 6, 158-168.

Turkmen, N.; Velioglu, Y.; Sari, F. y Polat, G. (2007). *Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black Tea*. Mol. 12, 484-496.

Uma, D.; Ho, C. y Wan Aida, W. (2010). *Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (Lawsonia inermis) leaves*. Sains Malaysiana. 39, 119-128

- Urbano, G. y Goñi, I. (2002). *Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (Porphyra tenera) and Wakame (Undaria pinnatifida), as a source of dietary fibre*. Food Chem. 76, 281–286.
- USDA. (2001). *Agricultural research service*. Nutrient Database for Standard Reference, 14.
- Usov, A. (1998). *Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups*. Food Hydrocolloids 12, 301-308.
- Usov, A.; Bilan, M. y Shashkov, A. (1997). *Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga Corallina pilulifera P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae)*. Carbohydr. Res. 303, 93-102.
- Van de Velde, F. (2012). Cambios en el potencial saludable y la calidad nutricional y sensorial de frutillas mínimamente procesadas como consecuencia de las condiciones de procesamiento, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Van den Hoek, C.; Mann, D. y Jahns, H. (1989). *Algae. An introduction to phycology, First edition*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, p. 627.
- Venkatpurwar, V.; Shiras, A. y Pokharkar, V. (2011). *Porphyran capped gold nanoparticles as a novel carrier for delivery of anticancer drug: In vitro cytotoxicity study*. Int. J. Pharm. 409, 314-320.
- Veronica, A.; Olusola, O. y Adebawale, E. (2006). Qualities of extruded puffed snacks from maize/soybean mixture. J. Food Processing Eng. 29, 149 – 161.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clementea, A.; Pedrochea, J.; Bautistab, J. y Millan, F. (1999). *Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate*. J Am. Oil Chemists' Soc. 76, 819-823.
- Waal, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. y Vries, J. (1991). *Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J. Exp. Med. 174, 1209–1220.
- Wang, J.; Hu, J.; Cui, J.; Bai, X.; Dua, Y.; Miyaguchi, Y. y Lin, B. (2008). Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. Food Chem. 111, 302–308.

- Wang, J.; Zhao, M.; Zhao, Q. y Jiang, Y. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.* 101, 1658-1663.
- Wang, T.; Jónsdóttir, R. y Ólafsdóttir, G. (2009). *Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds*. *Food Chem.* 11, 6240 – 248.
- Wang, T.; Jónsdóttir, R.; Kristinsson, H.; Hreggvidsson, G.; Jónsson, J.; Thorkelsson, G. y Ólafsdóttir, G. (2010). *Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata**. *LWT – Food Sci. Technol.* 43, 1387–1393.
- Whitfield, F.; Helidoniotis, F.; Shaw, K. y Svoronos, D. (1999). *Distribution of Bromophenols in Species of Marine Algae from Eastern Australia*. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2367-2373.
- Wijesekara, I. y Kim, S. (2010). *Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry*. *Mar. Drugs* 8, 1080-1093.
- Wijesekara, I.; Qian, Z.; Ryu, B.; Ngo, D. y Kim, S. (2011). *Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweeds pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate*. *Food Res. Int.* 44, 703–707.
- Wilson, J.; Hayes, M. y Carney, B. (2011). *Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products*. *Food Chem.* 129, 235-244.
- Wolfgor, R.; Drago, S.; Rodríguez, V.; Pellegrino, N. y Valencia, M. (2002). *In vitro measurement of available iron in fortified foods*. *Food Res. Int.* 35, 85-90.
- Wong, C.; Li, P. y Lam, C. (2007). Intracellular JNK, p38 MAPK and NF-kB regulate IL-25 induced release of cytokines and chemokines from costimulated T helper lymphocytes. *Immunol Lett.* 112, 82-91.
- Wong, K. y Cheung P. (2000). *Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part I - proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties*. *Food Chem.* 71, 475-482.
- Xie, Z.; Huang, J.; Xu, X. y Jin, Z. (2008). *Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate*. *Food Chem.* 111, 370-376.

- Yang, R. y Tsou, S. (2006). *Enhancing iron bioavailability of vegetables through proper preparation-principles and applications*. J Int. Cooperation. 107-119.
- Yang, R.; Zhang, Z.; Pei, X.; Han, X.; Wang, J.; Wang, L.; Long, Z.; Shen, X. y Li, Y. (2009). *Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice*. Food Chem. 113, 464–470.
- Yoon, H.; Müller, K.; Sheath, R.; Ott, F. y Bhattacharya, D. (2006). *Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta)*. J. Phycol. 42, 482-492.
- Yoshie, Y.; Wang, W.; Petillo, D. y Suzuki, T. (2000). *Distribution of catechins in Japanese seaweeds*. Fisheries Sci. 66, 998-1000.
- Yu, S.; Blennow, A.; Bojko, M.; Madsen, F.; Olsen, C. y Engelsen, S. (2002). *Physico-chemical Characterization of Floridean Starch of Red Algae*. Starch/Stärke 54, 66-74.
- Yust, M.; Pedroche, J.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Millán, F. y Alaiz, M. (2004). *Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection*. Food Chem. 85, 317-320.
- Zadernowski, R.; Czaplicki, S. y Naczka, M. (2009). *Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*)*. Food Chem. 112, 685- 689.
- Zemke-White, W.; Clements, K. y Harris, P. (2000) *Acid lysis of macroalgae by marine herbivorous fishes: effects of acid pH on cell wall porosity*. J Exp. Mar. Biol. Ecol. 245, 57-68.
- Zhang, L.; Li, J. y Zhou, K. (2010). *Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation*. Biores. Technol. 101, 2084–2089.
- Zhang, Q.; Qi, H.; Zhao, T.; Deslandes, E.; Ismaeli, N.; Molloy, F. y Critchley, A. (2005). *Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta)*. Carbohydr Res. 340, 2447-2450.