

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del grado Académico de  
Magíster en Salud Ambiental

**TITULO: PROPIEDADES BIOACTIVAS DE  
PÉPTIDOS DE HEZ DE MALTA Y DE ALGAS  
*PYROPIA COLUMBINA* Y *ULVA spp*  
LUEGO DE UNA DIGESTIÓN  
GASTROINTESTINAL SIMULADA**

Nombre y Apellido Tesista: Cecilia Cristina Botto

Director de Tesis: Silvina Rosa Drago

Co-director de Tesis: Raúl Esteban Cian

Lugar de realización: Laboratorio de Cereales y Oleaginosas

Instituto de Tecnología de Alimentos

Facultad de Ingeniería Química

Universidad Nacional del Litoral

**AÑO 2021**

Nunca pienso en el futuro, llega demasiado pronto.  
Locura es hacer la misma cosa una y otra vez esperando obtener diferentes resultados.

Albert Einstein

## **Agradecimientos**

A mi familia: padres, hermanos, esposo, hijos, por su paciencia y amor.

A Silvina Drago y Raul Cian por su generosidad y experticia.

A todos los investigadores del ITA que me recibieron con mucho afecto.

A mis compañeras de Maestría por los momentos vividos.

A los profesores de la Maestría y a los docentes de Patología y Fisiopatología por compartir sus saberes.

A Perlita que supervisó el “summary”

A la FBCB por estimularme a seguir estudiando

**Sinceras e Infinitas Gracias**

**Artículo científico publicado en el transcurso del trabajo de tesis**

“Antithrombotic Activity of Brewers’ Spent Grain Peptides and their Effects on Blood Coagulation Pathways”. Plant Foods for Human Nutrition. Raúl E. Cian & Antonela G. Garzón & Olga Martínez-Augustin & Cecilia C. Botto & Silvina R. Drago.# Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s11130-018-0682-1>

## Índice

Resumen .....	8
Summary .....	10
1. Introducción	
1.1- Salud Ambiental .....	12
1.2- Medio ambiente y alimentos .....	13
1.3- Alimentos saludables y funcionales .....	14
1.4- Incorporación de algas en la dieta .....	16
1.4.1- Algas rojas .....	18
1.4.2- Algas verdes .....	20
1.5- Aprovechamiento de subproductos de la Industria Alimentaria .....	21
1.5.1- Hez de malta .....	22
1.6- Compuestos bioactivos .....	23
1.6.1- Péptidos bioactivos .....	24
1.6.2- Péptidos bioactivos de algas marinas .....	24
1.6.3- Péptidos bioactivos de hidrolizados del bagazo de malta .....	25
1.7 – Propiedades bioactivas .....	26
1.7.1- Propiedades anticoagulantes y antitrombóticas .....	27
1.7.2- Propiedades hipoglucemiantes o antidiabetogénicas .....	29
1.7.3 Propiedades antioxidantes .....	31
1.7.4 - Actividad antihipertensiva .....	32
1.8 - Biodisponibilidad de péptidos bioactivos .....	34
2. Objetivos	
2.1 – Objetivo general .....	36
2.2- Objetivos específicos .....	36
3. Materiales y Métodos	
3.1 Estudio de las propiedades bioactivas de algas luego de una DGS .....	37
3.1.1- Materia prima: Algas .....	37
3.1.2 – Procesamiento de las muestras de <i>PC</i> y <i>U</i> .....	37
3.1.2.1- Acondicionamiento de las muestras .....	37
3.1.2.2- Determinación de la composición centesimal .....	38
3.1.3- Obtención de la FP a partir del alga roja <i>PC</i> .....	38

3.1.3.1- Cuantificación de sólidos de la FP .....	38
3.1.4- Digestión gastrointestinal simulada (DGS).....	38
3.1.5- Análisis de la composición de las fracciones digeridas y dializadas..	39
3.1.6- Estudio de las propiedades bioactivas de algas <i>PC</i> , <i>U</i> y <i>FP</i> luego de una DGS .....	39
3.1.6.1- Evaluación de actividades anticoagulante y antitrombótica .....	39
3.1.6.2- Evaluación de capacidad hipoglucemiante .....	41
3.1.6.3- Evaluación de actividad antioxidante .....	44
3.1.6.4.- Evaluación de las propiedades anti-hipertensivas .....	45
3.2- Estudio de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM luego de una DGS .....	46
3.2.1 – Materia prima .....	46
3.2.2- Obtención de los hidrolizados de HM .....	46
3.2.3 - Digestión gastrointestinal de los hidrolizados de HM .....	47
3.2.4 – Fraccionamiento de los hidrolizados y de los hidrolizados digeridos..	49
3.2.5 – Análisis de los hidrolizados proteicos de HM .....	49
3.2.5.1- Composición elemental y contenido proteico .....	49
3.2.5.2-Determinación de AL .....	49
3.2.5.3- Determinación del grado de hidrólisis (GH) .....	49
3.2.6 - Determinación de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM.	50
3.2.6.1- Evaluación de actividad anticoagulante .....	50
3.2.6.2 - Actividad hipoglucemiante de péptidos de HM .....	50
3.2.6.3 - Actividad antioxidante de hidrolizados de HM .....	51
3.2.6.4 - Evaluación de capacidad anti-hipertensiva .....	51
3.3 – Análisis Estadístico .....	51
4. Resultados y Discusión	
4.1 - Estudio de las propiedades bioactivas de algas <i>PC</i> y <i>U</i> luego de una DGS .....	52
4.1.1- Composición de las macroalgas .....	52
4.1.2 - Caracterización de las fracciones digeridas de algas .....	54
4.1.3- Propiedades bioactivas luego de la DGS .....	56
4.1.3.1- Propiedades anticoagulantes y antitrombóticas .....	56
4.1.3.2- Propiedades hipoglucemiantes o antidiabetogénicas .....	59
4.1.3.3- Propiedades antioxidantes .....	62

4.1.3.4- Propiedad antihipertensiva .....	64
4.1.4 – Conclusiones parciales, muestras de algas .....	67
4.2 – Estudio de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM, luego de una DGS .....	68
4.2.1-Composición de la HM .....	68
4.2.2- Caracterización de los hidrolizados y sus fracciones .....	68
4.2.3- Propiedades bioactivas de los hidrolizados .....	69
4.2.3.1 – Actividad anticoagulante y antitrombótica .....	69
4.2.3.2 – Actividad hipoglucemiante .....	73
4.2.3.3 – Actividad antioxidante .....	75
4.2.3.4 – Actividad antihipertensiva .....	77
4.2.4 – Conclusiones parciales, hidrolizados de HM .....	78
5- Conclusiones generales .....	79
6- Bibliografía .....	80
7- Anexos .....	87
7.1 – Índice de Figuras .....	87
7.2 – Índice de Tablas .....	87
7.3 – Abreviaturas y símbolos .....	88

## Resumen

La salud, concepto que ha cambiado en el tiempo, es mirada en la actualidad en el marco ambiental natural. El desarrollo sostenible, entendido como el desarrollo que satisface las necesidades del presente, sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades, tiene a la totalidad de la humanidad en el centro de los intereses. Es imposible mejorar el ambiente sin incluir a los seres humanos, junto con los inherentes problemas sociales, culturales y económicos, en relación con los recursos naturales. En el enfoque eco-sistémico se considera con igual importancia al manejo ambiental, a los factores económicos y a las aspiraciones de la comunidad. La economía, el ambiente y las necesidades de la sociedad afectan la salud del ecosistema. Este enfoque promueve la acción positiva en el ambiente y mejora la salud y el bienestar de la comunidad. Las concepciones de la salud se mueven desde una perspectiva antropocéntrica hacia otra biocéntrica, en la cual el hombre funciona como parte del ecosistema como un integrante más. Los nutrientes para los seres humanos se encuentran en materiales comestibles que son parte del ecosistema. Estos contienen sustancias que pueden actuar como bioactivas, participando en el control de ciertas patologías como trombosis, diabetes, hipertensión y en el envejecimiento y daño celular aportando antioxidantes. Las sustancias bioactivas pueden ser obtenidas a partir de materias primas como las utilizadas en este trabajo (macroalgas marinas y bagazo de malta), a través de procesos de extracción y de hidrólisis, y se estudian para evaluar tanto sus características intrínsecas como las propiedades bioactivas de estas sustancias naturales posiblemente útiles para el mantenimiento de la salud ecosistémica.

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar las propiedades bioactivas del alga roja *Pyropia columbina*, de una fracción proteica obtenida de ella, del alga verde *Ulva spp*, y de hidrolizados de hez de malta, luego de una simulación de digestión gastrointestinal, a fin de poder estimar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes. Para ello, las algas verde y roja, la fracción proteica del alga roja y los hidrolizados proteicos de la hez de malta fueron sometidos a una digestión gastrointestinal simulada y se estudiaron en las distintas fracciones digeridas la presencia de actividad biológica. Se realizaron evaluaciones de propiedades bioactivas anticoagulantes, antihipertensiva, antidiabetogénica y antioxidante empleando diferentes metodologías *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron que la digestión

gastrointestinal liberó péptidos de las algas roja (*Pyropia columbina*) y su fracción proteica, y del alga verde (*Ulva spp*) que presentaron efectos sobre algunos parámetros de coagulación, sobre la inhibición de enzima  $\alpha$ -glucosidasa y la enzima DPP-IV (hipoglucemiantes), actividad antioxidante (medida como poder reductor y como inhibición de radical ABTS<sup>+</sup>), e inhibición de la ECA-I, que dependió de la fracción digerida estudiada y de la fuente de los compuestos bioactivos.

En cuanto a los péptidos obtenidos a partir de la hez de malta (subproducto de la industria cervecera), ya sea antes y después de su digestión gastrointestinal simulada, también presentaron propiedades bioactivas. Por ultrafiltración, se obtuvieron fracciones de pesos moleculares mayores y menores a 1 kDa, demostrándose actividad anticoagulante, inhibición de ambas enzimas digestivas de carbohidratos ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa), capacidad antioxidante (poder reductor e inhibición de los radicales ABTS<sup>+</sup> y DPPH), e inhibición de ECA-I, particularmente en la fracción de menor peso molecular.

En consecuencia es meritorio dirigir una mirada hacia los productos naturales como fuentes de péptidos bioactivos, para ser utilizados como ingredientes bio- funcionales en el desarrollo de alimentos funcionales, por su potencial acción en el control y prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

## Summary

Health, a concept that has changed over time, is currently viewed within the natural environmental framework. Sustainable development, known as the development that solves daily demands without future consequences, includes the whole humanity as the center of interest. It seems impossible to improve the environment without the human being and the relationship of the humanity with social, cultural and economic problems in touch with natural resources. The ecosystem approach gives the same importance to environment, economics and community aspirations. The economy, the environment and the needs of society affect the health of the ecosystem. This approach promotes positive action in the environment and improves the health and well-being of the community. The focus of health is moving from the anthropocentric view to a biocentric one, where people work as another part of the ecosystem. Human nutrients are provided by ecosystem raw materials. They might contain bioactive substances, which could participate in controlling diseases as thrombosis, diabetes, hypertension or preventing oxidative damage on cells by releasing antioxidant molecules. Bioactive substances may be obtained from raw materials, such as those used in this thesis (macroalgae and brewer's spent grain), through extraction and hydrolysis. They are studied in aspects as intrinsic characteristics and bioactive properties to be used in ecosystemic health maintenance.

The aim of this research was to evaluate bioactive properties of different natural products: red macroalgae *Pyropia columbina*, a protein fraction obtained from it, green macroalgae *Ulva spp*, and hydrolysates obtained from brewer's spent grain, all of them treated with a simulated gastrointestinal digestion, in order to estimate the bioaccessibility of the bioactive peptides. Red and green algae, the protein fraction of red algae, and the hydrolysates from brewer's spent grain were digested in a simulated gastrointestinal digestion and the presence of biological activity was studied in the different digested fractions. Anticoagulant, antidiabetogenic, antioxidant, and antihypertensive properties were studied using different *in vitro* methods. The results showed that the peptides released from the red seaweed (*Pyropia columbina*) and its protein fraction, and from green seaweed (*Ulva spp.*) had effects on some coagulation parameters, on the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and DPP-IV enzymes (hypoglycemic activity), on ECA-I (antihypertensive property), and also evidenced antioxidant effects

(measured by reductive power and ABTS<sup>+</sup> inhibition). The effects depended on the digested peptide fraction and their source.

Brewer's spent grain peptides showed bioactive properties, before and after the simulated gastrointestinal digestion. By ultrafiltration, fractions with molecular weights greater and less than 1 kDa were obtained. They presented anticoagulant activities, inhibition of the digestive enzymes ( $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase), antioxidant activity (reductive power, inhibition of ABTS<sup>+</sup> and DPPH), ACE-I inhibition, especially peptides of lower molecular weight.

Consequently, natural products may be chosen as a source of bioactive peptides to be used in the development of healthy food, due to their potential activity for the control or the prevention of chronic metabolic diseases.

## **INTRODUCCION**

### **1.1- Salud Ambiental**

En términos de la OMS la Salud Ambiental refiere a los factores físicos, químicos y biológicos, externos a la persona, que potencialmente afectan la salud o provocan enfermedad, e incluye el asesoramiento y el control de dichos factores ambientales a los fines de prevenir enfermedades y crear ambientes saludables.

El NIH (Instituto Nacional de Salud de los EEUU) considera a la Salud Ambiental como la ciencia que estudia la manera en que el ambiente natural (aire, agua, suelo y materiales físicos, químicos, biológicos y sociales de los alrededores) influye sobre salud y enfermedad humanas. El ambiente construido por el hombre, es decir viviendas, oficinas, escuelas, granjas, industrias, rutas; el uso de la tierra y el manejo de los residuos, modifican el ambiente natural y contaminan el aire. Ciertos aspectos del estilo de vida como dietas y actividad física, estatus socioeconómico y demás influencias sociales pueden afectar la salud.

El ambiente y el estilo de vida, tanto como la situación política, social y económica son determinantes de la situación de salud de la población. De allí que la salud de cada persona sea el resultado de la interacción entre su organismo y el ambiente. Los modos en que se construyen y protegen los hábitats en donde la gente vive, trabaja, se educa, se divierte, se transporta, son manifestaciones de esos determinantes. Según la Organización Panamericana de la Salud: “La salud ambiental refiere a un concepto general que incorpora aquellos planeamientos o actividades que tienen que ver con los problemas de salud asociados con el ambiente, teniendo en cuenta que el ambiente humano contempla un contexto complejo de factores y elementos de variada naturaleza que actúan favorable o desfavorablemente sobre el individuo” (de Titto *et al* 2014).

La salud, concepto que ha cambiado en el tiempo, es mirada en la actualidad en el marco ambiental natural. El desarrollo sostenible, entendido como el desarrollo que satisface las necesidades del presente, sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades, tiene a la totalidad de la humanidad en el centro de los intereses. Es imposible mejorar el ambiente sin incluir a los seres humanos, junto con los inherentes problemas sociales, culturales y económicos, en relación con los recursos naturales.

## 1.2- Medio ambiente y alimentos

El hombre es un animal omnívoro por excelencia. En las sociedades occidentales, los hábitos alimentarios de la mayoría de las personas implican el consumo de alimentos diferentes, preparados o conservados de diversas formas.

El organismo humano es una organización estructural y funcional modificable a través de la dieta, siendo los alimentos una fuente de variados nutrientes y el medio ambiente un espacio heterogéneo que los provee. La incorporación de alimentos es una acción necesaria para conseguir el funcionamiento correcto de la organización corporal. En la medida que se pueda disponer de una dieta equilibrada, que cubra las demandas diarias y personales de nutrientes, se puede esperar un estado de salud.

La cultura ancestral conoce bien la vinculación entre alimentación y buena salud, y además aprecia el buen saber y las tradiciones que revelan ese vínculo. Sin embargo, la ciencia ha enfocado, y quizá limitado, la relación alimentación-salud atendiendo sólo a los aspectos nutritivos de la comida. El extraordinario desarrollo de la bioquímica desde comienzos del siglo XX y su gran impacto en las ciencias biológicas es probablemente la causa de que los alimentos se hayan considerado en cuanto al aprovisionamiento de combustibles y de materiales plásticos para la renovación de los tejidos. En el binomio alimentación y salud habría que reconocer otros beneficios que no se encasillan en los aspectos puramente nutricionales. Entre ellos habría efectos funcionales de mejora, asociados a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas más allá del crecimiento y desarrollo normales del cuerpo, y reducción del riesgo de enfermedades (Juarez *et al* 2005).

El Código Alimentario Argentino (CAA) define como alimento a toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. Sin embargo, los alimentos están constituidos por una gran diversidad de sustancias de distinta naturaleza, que pueden considerarse como i) compuestos nutritivos; ii) compuestos sin carácter nutricional naturalmente presentes que pueden tener beneficios en el consumidor o ser anti-nutritivos (compuestos fenólicos, antioxidantes, alcaloides, enzimas, ácidos nucleicos); iii) compuestos presentes accidentalmente, procedentes del medio ambiente y generalmente debido a la acción contaminante del hombre (insecticidas, fungicidas, metales pesados, dioxinas); iv) compuestos de origen exógeno, adicionados de forma voluntaria por el hombre para

facilitar el procesado de los alimentos, mejorar las propiedades organolépticas o aumentar la vida útil (antioxidantes, colorantes, estabilizantes) (Pérez-Llamas *et al*, 2010).

Como se mencionó, los alimentos aportan los nutrientes, que son las sustancias que permiten el mantenimiento de todas las funciones biológicas del organismo (estado de salud). Incluyen los macronutrientes que suministran principalmente energía (carbohidratos y lípidos), los componentes estructurales (aminoácidos y ácidos grasos esenciales) y los dos, micronutrientes y oligoelementos, con importantes funciones regulatorias e incluso estructurales (vitaminas y minerales) (Portela, 2006).

También, y como objeto de estudio de esta tesis, los alimentos aportan otros compuestos beneficiosos para la salud que serán liberados o generados a partir de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal.

Debido a su extraordinaria diversidad, los organismos marinos como las macroalgas son fuentes valiosas de componentes alimentarios nutritivos y fitoquímicos con propiedades bioactivas. Además, son ricas en proteínas que tienen potencial como fuente para la obtención de péptidos bioactivos con beneficios para la salud y para la prevención de enfermedades. Los péptidos bioactivos pueden ser obtenidos por acción de proteinasas y peptidasas de grado alimentario y ser usados como ingredientes alimentarios naturales funcionales (Harnedy y FitzGerald, 2011), o ser generados *in vivo* en el tracto gastrointestinal.

### **1.3- Alimentos saludables y funcionales**

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que en forma natural o procesada contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición. El término “*alimento funcional*” fue utilizado por primera vez en Japón a principios de los años 80, y desde allí se ha extendido hacia el resto del mundo. Es en Japón donde se inicia la comercialización de alimentos especialmente formulados para cumplir con una función de salud. A estos alimentos se los categorizó como *Foods for Specified Health Uses* (FOSHU) y fueron el inicio de una nueva era de la industria alimentaria: la era de los alimentos funcionales. Una definición más básica y general podría ser “aquellos alimentos naturales o procesados que, además de satisfacer

las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios para la salud o reducen el riesgo de padecer enfermedades”.

Instituciones de diversos países han definido al alimento funcional como:

a) “Un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado suficientemente que beneficia (más allá de proporcionar una nutrición adecuada desde el punto de vista tradicional) a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad” (*International Life Science Institute - ILSI*).

b) “Alimentos modificados o que contengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene” (*Consejo de Nutrición y Alimentación de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos*).

c) “Aquellos productos a los cuales intencionalmente se les adiciona un compuesto específico para incrementar sus propiedades saludables” (*Centro de Información Internacional de Alimentos -IFIC*).

d) “Un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee efectos benéficos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales , en forma relevante para la salud y el bienestar y/o que reduzca el riesgo de alguna enfermedad” (*Functional Food Science in Europe –FUFOSE- ILSI EUROPA*).

e) “Un alimento que proporciona un beneficio para la salud, más allá de lo estrictamente nutricional y del que se puede hacer una declaración acerca de tales efectos” (*European Advisory Services -EAS*).

f) “Un alimento funcional es similar en apariencia, o bien constituye, un alimento convencional que se consume como parte de una dieta habitual, y que ha demostrado tener efectos fisiológicos y/o disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, más allá de sus funciones nutricionales básicas; es decir, contienen componentes bioactivos” (*Health Canada*).

En Europa, el concepto de alimento funcional solamente se aplica a alimentos que constituyen parte de la dieta y excluye su consumo en forma de cápsulas, comprimidos u otras formas farmacéuticas (Leal *et al*, 2016).

En este contexto, se ha observado que las algas marinas proporcionan protección ante enfermedades como diabetes, dislipemia, hipertensión arterial y trombosis (Gomez Ordoñez, 2012).

#### **1.4- Incorporación de algas en la dieta**

Las algas constituyen un grupo diverso que abarca tanto organismos procariotas como eucariotas, de dimensiones pequeñas (microalgas) a organismos más complejos (macroalgas), que ocupan hábitats diversos: marinos, agua dulce, terrestres, aguas termales, nieve. Las macroalgas o plantas marinas son organismos pluricelulares de diversas formas y tamaños que se clasifican en tres amplios grupos basándose en su pigmentación: algas pardas (*Phaeophyceae*), algas rojas (*Rhodophyceae*) y algas verdes (*Chlorophyceae*).

Las macroalgas marinas son organismos fotosintéticos que se han adaptado y sobrevivido en un ambiente altamente complejo y competitivo con niveles de salinidad extremadamente altos, variaciones térmicas, baja intensidad lumínica y deficiencia nutricional. Sin embargo, son productores primarios en los océanos, ya que otros organismos marinos obtienen su energía de ellos a través de la red alimentaria. Por lo tanto, es lógico pensar que las macroalgas puedan ser una buena fuente de metabolitos secundarios, incluyendo nutrientes funcionales y péptidos bioactivos (Samarakoon K y Jeon Y-J, 2012).

Las algas pueden ser incorporadas a la alimentación en diferentes platos y preparaciones. Es posible consumirlas secas, solas o combinadas con otros alimentos tanto de origen vegetal como animal; crudas o sometidas a diversas formas de cocción y preservación (ahumadas, conservadas en ácido acético en forma de encurtidos) en guisos, sopas y salsas; como condimento, fermentadas, tostadas, como postre o como infusión. En Oriente, más específicamente en Japón, China y Malasia, existe una larga tradición de consumo de algas. Los japoneses son los principales consumidores: ingieren, por año, un promedio de 1,6 kg (peso seco) de algas por persona. A diferencia de esos países asiáticos, el consumo de algas en América del Sur se registra en muy pocos lugares, tales como el sur de Chile, ciertas regiones de Perú, Ecuador, Bolivia, México, Uruguay y el sur de Argentina; particularmente en sitios cercanos al mar, como

por ejemplo la costa marítima patagónica, aunque no está muy difundido el consumo en fresco.

Algunas algas comestibles (nativas y exóticas) que se pueden encontrar en Argentina son:

- “Cochayuyo” (*Durvillaea antarctica*)
- “Kombú” (*Saccharina latissima*)
- “Wakame” (*Undaria pinnatifida*)
- “Lechuga de mar” (*Ulva rigida* y *Ulva lactuca*)
- “Luche” o “Porfira” (*Pyropia columbina*).

En general las algas utilizadas en alimentación son comercializadas secas o en conservas así como en suplementos dietéticos (cápsulas, comprimidos y gotas). Muy pocas personas en Argentina tienen la costumbre de consumir frescas algunas especies. En las dos últimas décadas una forma de consumo que ha prosperado es el sushi, en cuya preparación se utiliza el alga “Nori”, forma japonesa de *Pyropia* comestible (Alimentos Argentinos – MAGyP, 2013).

Las algas han sido utilizadas como alimento desde tiempo inmemorial en los países orientales como Japón, China y Corea así como en algunos países americanos, por ejemplo México. En Europa, las algas se han empleado y se continúan utilizando para la extracción de ficocoloides: sustancias exclusivas de estos vegetales que no tienen equivalente sintético. Los ficocoloides se emplean como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes, interviniendo en multitud de aplicaciones en la industria alimentaria, en artículos del hogar y productos biomédicos. Es interesante ver que la presencia de las algas marinas en productos de uso cotidiano como pasta dentífrica, cosméticos, champú, alimentos para animales, comidas para bebés, derivados lácteos, cremas, sopas de preparación instantánea y muchos otros productos, constituyen claros ejemplos de que las algas se utilizan desde hace muchos años a través de las industrias alimentaria y cosmética (McLachlan, 1985 en Gomez Ordoñez, 2012).

Recientemente se ha demostrado que el consumo directo de algas en los países asiáticos está asociado con una baja incidencia de distintos tipos de cáncer con 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 de la glucemia, efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y neuroprotectores, etc. Todas

estas propiedades se han atribuido a distintos compuestos bioactivos tales como: polisacáridos sulfatados, compuestos fenólicos, carotenoides, aminoácidos, proteínas/péptidos y lípidos. Cabe mencionar que las algas marinas también son una muy buena fuente de fibra, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y minerales (Cian, 2013a).

#### **1.4.1-Algas rojas**

Las algas rojas difieren de los otros grupos de algas eucariotas en varios aspectos, uno de los más importantes es la presencia de los pigmentos solubles en agua o ficobilinas, con predominancia de la ficoeritrina. La mayor parte de la pared está constituida de carbohidratos, con pequeñas cantidades de proteínas y lípidos. La porción externa de la pared es fácilmente soluble en agua, y está formada por mucílagos, agares y carragenanos. En las porciones internas prevalecen los polisacáridos cristalinos. En las células jóvenes el citoplasma es denso y viscoso, a medida que la célula aumenta en volumen el contenido se vuelve vacuolado, quedando el citoplasma y las organelas ubicados, en la célula madura, en una película delgada entre el tonoplasto (membrana que rodea a la vacuola central) y la membrana celular. También en las células jóvenes suele en general existir un solo rodoplasto (organela fotosintética), el cual a medida que la célula crece puede eventualmente dar lugar a varios plastos discoides o en forma de banda. Los rizoides de fijación pueden formar un disco o zona basal de adhesión. Las estructuras de adhesión laterales pueden ser también multicelulares y masivas (Boraso, 2013).

*Pyropia columbina* (PC) del orden Bangiales, Phylum Rhodophyta y género *Pyropia* es un alga roja que se desarrolla en abundancia en las costas patagónicas de Argentina. La misma podría ser utilizada en la alimentación humana y como fuente de ficocoloides (carragenanos, furonanos, agar y otros compuestos orgánicos). Es una macroalga bentónica (bentónica: adherida al fondo marino), talófita (no presenta tallo, raíz, hojas; su cuerpo indiferenciado se denomina talo), roja, de sabor agradable. Muestra un aspecto arrepollado en el estado juvenil y luego se asemeja a pañuelos de color pardo, violáceo o dorado (Estevao Belchior *et al*, 2003).

Su talo es monostromático (de una sola capa de células) de color pardo amarillento a púrpura, más rojizo al secarse. De bordes lisos u ondulados hasta

arrepollados, en general no superan los 15 cm de alto, aunque pueden encontrarse ocasionalmente talos hasta de 40 cm. De grosor muy variable, entre 55 y 150  $\mu\text{m}$ , generalmente entre 60 y 100  $\mu\text{m}$ , el cual depende de la edad y del grado de desecación al que están expuestas. En las zonas basales se desarrollan rizoides abundantes (Boraso, 2013).

Entre las algas de la costa patagónica argentina es la única utilizada en alimentación humana, siendo incipiente en las provincias patagónicas, donde se consume en forma semielaborada seca y molida, o también congelada o enfriada. Como alimento es apreciada por su alto contenido en proteínas, vitamina C, minerales (K y Mg) y fibra dietaria soluble e insoluble. Es muy conocida en Oriente donde constituye un recurso económico muy importante. En Japón se la cultiva y comercializa en forma de láminas llamadas Hoshi-Nori o Asakusa-Nori que se cortan de diversos tamaños y se preparan con salsa de soja o con alimentos como arroz, fideos, pescado crudo. En Occidente se ha incorporado en la alimentación formando parte de comidas exóticas y naturistas (Estevao Belchior *et al*, 2003)

Fajardo (1998) ha estudiado intensivamente la variación estacional y composición de esta macroalga autóctona de la Patagonia Argentina, destacándose su alto contenido proteico (aproximadamente 30 % de peso seco) y de fibra dietaria total (39 - 54% de peso seco), variando el porcentaje de fibra soluble entre 39 y 53 % del porcentaje de fibra total. Estos valores máximos se encontraron antes de la reproducción, en la etapa de mayor crecimiento, en la que los talos de *PC* tienen forma de láminas largas, grandes, con bordes rojos y áreas internas amarillas.

Presenta 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 contenidos en el alga *PC* son el ácido palmítico (saturado, de 16 átomos de carbono, ácido hexadecanoico) y el ácido eicosapentaenoico (poli-insaturado, de 20 átomos de carbono) (Cian, 2013a).

Si bien existen estudios de incorporación del alga en alimentos y evaluación de sus propiedades bioactivas (Cian *et al*, 2014a), hay pocos estudios del efecto de la digestión gastrointestinal en las propiedades bioactivas del alga *PC* y de las fracciones proteicas de la misma.

#### 1.4.2- Algas verdes

El Phylum *Chlorophyta* abarca numerosas especies tanto de agua dulce como marinas, con formas unicelulares, colonias, filamentos simples o ramificados, y láminas parenquimatosas de uno o dos estratos celulares. Tienen gran plasticidad en su desarrollo y metabolismo, por lo que han colonizado ambientes marinos costeros, lagos, ríos y ambientes terrestres (rocas, lodos, troncos de árboles). Algunas extremófilas crecen en desiertos donde soportan largos períodos de desecación y temperaturas extremas y otras forman asociaciones simbióticas con hongos constituyendo la parte fotosintética (ficobionte) de los líquenes, otras viven como epibiontes o endobiontes. La mayoría tiene células uninucleadas o con varios núcleos, pero otras presentan estructura cenocítica con muchos núcleos dispersos en el citoplasma. Como pigmentos fotosintéticos presentan clorofila "a" y "b", alfa, beta y gamma caroteno y diversas xantofilas. Como materia de reserva almacenan almidón asociado al cloroplasto. La pared celular está compuesta mayoritariamente por celulosa. El concepto de la clase *Ulvophyceae*, la que comprende a la gran mayoría de las especies de algas verdes marinas y es actualmente aceptada por la mayoría de los ficólogos, fue esbozado sobre la base de características de la ultraestructura. Entre los criterios ultraestructurales propuestos por estos autores se pueden mencionar los aparatos flagelares de las células móviles y el tipo de citocinesis.

El orden *Ulvales* comprende a las algas verdes que presentan un talo tubular, membranoso o filamentosos monostromático o distromático. Las células son uninucleadas con un cloroplasto parietal o cupuliforme conteniendo usualmente uno o más pirenoides. Las algas comprendidas en este orden, se reproducen sexualmente por isogamia, anisogamia u oogamia (Boraso, 2013).

El género *Ulva* (Phylum: *Chlorophyta*, clase: *Ulvophyceae*, orden: *Ulvales*, familia: *Ulvaceae*) fue identificado inicialmente por Linnaeus en 1753. Desde entonces muchos taxonomistas y ficólogos han participado en la identificación de las especies de *Ulva*, lo que es notoriamente difícil por la plasticidad morfológica de ciertos miembros y las pocas características confiables disponibles para diferenciarlas. Su apariencia es de brillantes hojas verdes, pero está influenciada por innumerables condiciones del ambiente como salinidad y concentración de nutrientes, edad del talo y estilo de vida, profundidad de agua. Estos organismos tienen crecimiento rápido y

prolífico, en variadas condiciones de hábitat y ambiente, preferentemente en agua de mar o agua salada, aunque se los ha encontrado en agua dulce (Silva *et al*, 2013).

Las especies de alga verde del género *Ulva* poseen una elevada tasa de crecimiento y de productividad en diversas condiciones geoclimáticas y con perfil bioquímico altamente explotable, aunque en algunos casos pueden ocasionar las problemáticas mareas verdes (*green tides*). Sin embargo se pueden cultivar apropiadamente para su uso como bio-remediación del agua de desecho rica en nutriente de la agricultura intensiva, y además este monocultivo de alta calidad en biomasa de *Ulva* permitiría generar bioproductos de alta calidad (Kidgell *et al*, 2019).

A pesar de su abundancia y facilidad de recolección, la composición química de las algas verdes está sub-representada en comparación con la de algas rojas y pardas. Se han reportado predominantemente terpenos, compuestos fenólicos y esteroides en varias especies de algas verdes. Lo que sí es conocido es la adaptación o modificación de sus componentes respecto a los distintos factores: ubicación geográfica, estación del año, temperatura y salinidad del agua, luz y disponibilidad de nutrientes (Silva *et al*, 2013).

*Ulva spp. (U)* corresponde a un grupo de algas verdes comestibles ampliamente distribuido en las costas del mundo entero. Posee una interesante composición química que torna atractiva su explotación comercial a los fines de producir alimentos funcionales o promotores de salud. Particularmente, contiene altos niveles de proteínas (15-33%), lo que constituye una potencial fuente de péptidos bioactivos (Cian *et al* (2018b).

### **1.5- Aprovechamiento de subproductos de la Industria Alimentaria**

Hay una gran atención política y social en la reducción de la contaminación debida a las actividades industriales. Casi todos los países desarrollados y en vías de desarrollo están adaptándose a esta realidad modificando sus residuos de manera que puedan ser reciclados. En consecuencia muchas compañías ya no consideran sus residuos como basura sino como materia prima para otros procesos. La industria cervecera genera grandes cantidades de subproductos y desechos como restos de cebada, de lúpulo y de levadura; dado que la mayoría son productos agrícolas son fácilmente reciclables y reusables (Mussatto *et al*, 2006). En la misma tesitura otro grupo de investigadores considera que los subproductos de la industria alimentaria constituyen un problema serio de residuos en gran parte del mundo. Es por ello que la

industria alimentaria, persiguiendo su desarrollo sostenible, está aplicando cada vez más medidas para aprovechar y valorizar los subproductos generados. Asimismo, este aprovechamiento crea nuevas fuentes de riqueza que aportan una mayor rentabilidad económica al proceso industrial de partida (Fernández Ginés *et al.*, 2008). Los subproductos pueden utilizarse para la extracción de sustancias de alto valor añadido, para la alimentación animal, la obtención de compost, el aprovechamiento energético y la elaboración de nuevos alimentos y obtención de materias primas.

La demanda de alimentos saludables ha aumentado significativamente en los últimos años. Esto ha empujado el rápido desarrollo de alimentos funcionales que contienen ingredientes bioactivos derivados de alimentos o nutrientes fisiológicamente activos con validados beneficios para la salud. Los hidrolizados proteicos obtenidos de productos de la agricultura, como la hez de malta (HM), han demostrado efectos bioactivos, como inmunomodulador aun luego de su digestión, por lo que se los puede utilizar como ingredientes funcionales de alimentos (Crowley *et al.*, 2015).

En este contexto, el principal subproducto de la elaboración de cerveza es un desecho del producto agrícola cebada, denominado HM. Este material consiste de cáscaras de grano de cebada, obtenido como un residuo sólido posterior a la producción del mosto, del cual se separa por filtración luego de la fase de macerado. Representa hasta el 30% p/p del grano malteado inicial, con lo que resulta un subproducto rápidamente disponible, de gran volumen y muy bajo costo dentro de la industria cervecera, y un recurso valioso para la industria. Es producido en grandes cantidades por compañías cerveceras en todo el mundo, con una producción anual de 30 millones de toneladas (del Río *et al.*, 2013). Se está reconociendo a la HM como posible fuente de componentes bioactivos promotores de la salud. asociados a aceleración del tránsito digestivo, mayor excreción de grasas y menor formación de cálculos biliares (Mussatto *et al.*, 2006).

### **1.5.1- Hez de malta**

La HM, ó bagazo de malta, también designada como BSG (por las iniciales del término inglés *Brewer's Spent Grain*) se compone primariamente de las coberturas de los granos de cebada; es decir pericarpios, envolturas de semillas, cáscaras y capas de aleurona del grano original. Contiene aproximadamente 15 a 26% de proteína en base seca, la cual se agrega a un impenetrable complejo durante las primeras etapas del proceso de fabricación de cerveza. Estos agregados proteicos son estabilizados por

puentes disulfuro intra e intermoleculares. El interés sobre la HM comenzó cuando se probaron efectos beneficiosos en la reducción de los síntomas de colitis ulcerosa, cuando fue agregada en alimentos (Connolly *et al*, 2014). Constituye el principal subproducto generado durante el proceso de elaboración de cerveza. Aproximadamente se obtienen de 15 a 20 kg de HM por hectolitro de cerveza. Está compuesta por material lignocelulósico que contiene proteína (aproximadamente 20 % de su peso seco), lignina (aproximadamente 28%), hemicelulosa (25%) y celulosa (17%) (Vieira *et al*, 2014; McCarthy *et al*, 2013). Hasta ahora es usada exclusivamente para alimentación animal, particularmente vacas, dada su riqueza en fibras y proteínas. Sin embargo, HM es un subproducto de interés biotecnológico, alimenticio y farmacéutico. Las proteínas de HM y sus hidrolizados pueden usarse como mejoradores de textura en ciertas comidas dada sus propiedades emulsificantes, y pueden presentar efectos inmunomodulatorios, antioxidantes y antimicrobianos. Además de considerarse como recurso para la producción de biocombustibles de segunda generación (Viera *et al*, 2013; Lynch *et al*, 2016).

El interesante contenido proteico de HM tiene potencial para ser explotado para la nutrición humana, particularmente a la vista de su bajo costo y alta disponibilidad (McCarthy *et al*, 2013).

#### **1.6- Compuestos bioactivos.**

Se considera componente bioactivo de un alimento a aquel que aporta un beneficio a la salud, más allá de los considerados como nutrición básica. Dentro del término global de actividad biológica se deben diferenciar tres aspectos importantes: las funciones (papel esencial), las acciones (respuestas, beneficiosas o adversas, fisiológicas o farmacológicas) y las asociaciones (correlaciones de los componentes de los alimentos con algún aspecto o finalidad fisiológica o clínica que puede o no mostrar una relación causal). Es creciente el número de compuestos bioactivos de la dieta que se utilizan con el propósito de mejorar el estado de salud o de reducir el riesgo de enfermedades crónicas de mayor incidencia en países desarrollados. De los muchos compuestos bioactivos descritos en la literatura, los péptidos bioactivos adquieren gran relevancia, ya que diversos estudios han demostrado efectos positivos para la salud, tales como: antihipertensivo, antioxidante o anticancerígeno, entre otros (Amigo y Hernández-Ledesma, 2020). En este sentido, los péptidos bioactivos tienen la capacidad de regular procesos fisiológicos, ejerciendo diversos efectos sobre el metabolismo intermedio,

control de glándulas exócrinas, presión arterial, sistema circulatorio, ciclo del sueño, memoria, dolor, apetito, etc. Esto ha conducido al desarrollo de alimentos biofuncionales con agregado de péptidos bioactivos. Por otro lado, resulta relevante que diversos estudios demuestren que cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional pueda ser empleada para generar péptidos bioactivos potenciando así el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas como las proteínas vegetales provenientes de fuentes silvestres, los residuos de pesquerías o los subproductos de la extracción de aceites entre muchos otros (Herrera Chalé *et al*, 2014)

### **1.6.1. Péptidos bioactivos**

Las proteínas en los alimentos no solo sirven como nutrientes sino que también desempeñan funciones fisiológicas que promueven la salud. La mayoría de estas funciones son llevadas a cabo por secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora (“encriptados”), las cuales son liberadas por las proteasas digestivas, pudiendo ejercer su función biológica en el organismo. Estas secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño (3 a 20 aminoácidos) se denominan péptidos bioactivos. Cabe mencionar que los péptidos bioactivos también pueden ser producidos durante el procesado industrial de los alimentos, ya sea mediante fermentaciones, hidrólisis químicas o enzimáticas, etc. (Amigo y Hernández-Ledesma, 2020). Resulta relevante que diversos estudios demuestren que cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional pueda ser empleada para generar péptidos bioactivos potenciando así el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas como las proteínas vegetales provenientes de fuentes silvestres, los residuos de pesquerías o los subproductos de la extracción de aceites entre muchos otros (Herrera Chalé *et al.*, 2014; Vizcardo-Gutierrez y Zabala González, 2016; Cian *et al*, 2012a). Si bien estos péptidos bioactivos presentan efectos menos potentes en comparación con ciertos fármacos, la probabilidad de que se acumulen en tejidos del cuerpo o que generen efectos secundarios graves es mínima, por ende, serían uno de los candidatos ideales para contrarrestar la epidemia actual de enfermedades no transmisibles.

### **1.6.2- Péptidos bioactivos de algas marinas**

El ambiente marino presenta una biodiversidad considerable, poco explorada aún en diversas regiones del mundo. Los organismos bentónicos deben competir por la luz, los nutrientes y el espacio en el que habitan, no sólo con especies propias del lugar sino también con organismos invasores que presentan una gran capacidad de

colonización y asentamiento. Además deben hacer frente a depredadores, microorganismos patógenos y alteraciones ambientales que los lleva a desarrollar diferentes estrategias de supervivencia. Como parte de tales estrategias, se destaca la biosíntesis de una gran variedad de sustancias de defensa, tanto metabolitos primarios como secundarios, los cuales son muy estudiados para un potencial aprovechamiento en la industria farmacéutica. Se ha descrito una importante diversidad de estructuras químicas, destacándose polisacáridos, proteínas, terpenos, alcaloides, cumarinas, flavonoides y otros polifenoles. Las algas representan una importante fuente de compuestos bioactivos, destacándose su potencialidad para aplicaciones farmacológicas. En este contexto, se han descrito propiedades antitumoral, antimicrobiana, anticoagulante, antiinflamatoria, antioxidante, etc. (Uhrich *et al.*, 2016).

El contenido proteico de las macroalgas es muy variable respecto al tipo de especie y estación del año (3 a 47% p/p). En general, las algas rojas contienen mayores cantidades de proteínas que las algas pardas y verdes (Harnedy y FitzGerald, 2011). Este elevado contenido proteico las vuelve atractivas para la obtención de péptidos bioactivos (Cian *et al.*, 2012). Al respecto, se han obtenido péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina – I (ECA-I) a partir del alga roja *Pyropia yezoensis*, con los cuales se han elaborado productos farmacéuticos comerciales (Hayes y Tiwari, 2015). Además, se han obtenido péptidos con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorios a partir del alga roja *PC* (Cian *et al.*, 2015a).

Por otra parte, se han obtenido péptidos a partir de hidrolizados del alga verde *U* con propiedades moduladoras de la proliferación de fibroblastos humanos, antioxidantes, anti-cáncer, anti-hipertensiva, anti-ateroesclerótica y anti-inflamatoria (Cian *et al.*, 2018a).

Si bien se han obtenido diferentes hidrolizados con propiedades bioactivas a partir de distintas fracciones proteicas de las algas *PC* y *U* (Cian *et al.*, 2012c; Cian *et al.*, 2013b; Cian *et al.*, 2014b), el efecto directo de la digestión gastrointestinal sobre un alga en particular para favorecer la liberación de péptidos en el tracto gastrointestinal, no ha sido estudiado.

### **1.6.3- Péptidos bioactivos de hidrolizados del bagazo de malta**

Los hidrolizados proteicos son usados ampliamente en nutrición humana, desde la suplementación proteica en geriatría y deportes, bebidas energizantes, en dietas para

bajar de peso, y hasta en el tratamiento de Síndrome de Crohn, enfermedad hepática y colitis ulcerosa (Clemente, 2000; McCarthy *et al.*, 2013).

Diferentes hidrolizados de las proteínas de HM han demostrado poseer propiedades biofuncionales tales como: antioxidantes, antimicrobiana, antiinflamatorias, hipoglucemiantes (inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y dipeptil peptidasa IV) y antihipertensivas (inhibición de de enzima convertidora angiotensina I) (McCarthy *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2016; Connolly *et al.*, 2014; Connolly *et al.*, 2017 ; Kotlar *et al.*, 2013; Connolly *et al.*, 2015; Crowley *et al.*, 2015). Por otro lado, Viera *et al.* (2016) presentaron dos subproductos obtenidos de la elaboración de cerveza, HM y proteasas derivadas de la levadura, con actividad antioxidante. Por su parte, Connolly *et al.* (2014) demostraron que los hidrolizados de HM inhibían las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa, dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) y ECA-I pero no así la enzima  $\alpha$ -amilasa. En otros trabajos, los mismos autores observaron que los péptidos de HM inhibían a la ECA-I y DPP-IV luego de la digestión gastrointestinal simulada (DGS), siendo esto de gran interés para el tratamiento de la hipertensión y la diabetes tipo II (Conolly *et al.*, 2015; Conolly *et al.*, 2017).

Otro tipo de bioactividad descrita para los péptidos de HM es la antimicrobiana. En este sentido, Kotlar *et al.* (2013) evaluaron la actividad antibacteriana de hidrolizados de HM sobre *Escherichia coli* 0157:H7 obteniendo muy buenos resultados. Sin embargo, la actividad antitrombótica de péptidos de HM es un campo que no ha sido estudiado hasta ahora. Tampoco se dispone de información sobre el efecto de los péptidos de HM en el proceso de coagulación sanguínea ni sobre su estabilidad tras una digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando enzimas de origen porcino.

### **1.7- Propiedades bioactivas**

Las materias primas descritas anteriormente pueden proveer componentes que benefician a la salud humana. Además, con su aprovechamiento, se puede colaborar con el medio ambiente utilizando productos naturales y disminuyendo el impacto de residuos industriales. Las propiedades bioactivas de los péptidos naturales permiten abordar una nueva estrategia de tratamiento a futuro para ciertas patologías frecuentes en la población, algunas de ellas crónicas no transmisibles y prevenibles, tales como:

- ✓ Trombosis arteriales o venosas y accidentes cerebro o cardiovasculares
- ✓ Diabetes mellitus tipo II (DM II)

- ✓ Desórdenes celulares por estrés oxidativo relacionados con patologías degenerativas.
- ✓ Hipertensión arterial.

### **1.7.1- Propiedades anticoagulantes y antitrombóticas**

Es condición normal del organismo formar coágulos o trombos en situaciones que lo estimulen, como por ejemplo traumatismos o lesiones en vasos sanguíneos, e impedir la activación de los mecanismos de coagulación cuando no son necesarios (Flores-Rivera *et al.*, 2014).

El sistema hemostático, que comprende la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis, es un mecanismo de defensa que previene la integridad del sistema circulatorio cerrado y de alta presión de los mamíferos, ante daños vasculares. En condiciones fisiológicas normales, la formación de trombos es temporaria. Cuando el sistema de hemostasia se desbalancea hacia un estado pro-coagulante, la formación de coágulos en arterias, venas o en la microcirculación produce el bloqueo parcial o total de la circulación y es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en el mundo entero (Flores-Rivera *et al.*, 2014; Giménez Serrano, 2003).

La formación de los trombos es compleja e incluye adhesión, activación, secreción y agregación plaquetarias, generación de trombina iniciada por la exposición de factor tisular y colágeno, y formación de la fibrina. Los mecanismos que activan el sistema de la coagulación luego de la lesión vascular y de la agregación plaquetaria se inician por contacto (vía intrínseca) o por el factor tisular (vía extrínseca) y convergen en una vía común que inicia a nivel del factor X y lleva a la formación de trombina y a la polimerización de los monómeros de fibrina. Brevemente, en la vía intrínseca sobre el colágeno se forma el complejo de quinínógeno de elevado peso molecular (CEPM), precalicreína y factor XII, que pasa a XIIa y activa el factor XI a XIa; éste activa al factor IX y se forma el complejo tenasa: IXa + VIIIa que activan el factor X. En la vía extrínseca el factor tisular (FT) que es una proteína integral de membrana (glicoproteína unida a fosfolípidos) y receptor y cofactor del factor VII, en presencia de calcio, lo activa a la forma VIIa y ambos unidos activan los factores IX y X a las formas IXa y Xa. En la vía común Xa y Va sobre una superficie de membrana en el complejo protrombinasa activan al factor II a IIa y éste activa la conversión de fibrinógeno a fibrina (Giménez Serrano, 2003).

Los trombos arteriales se presentan en individuos con alto riesgo de enfermedad cardiovascular e infarto de miocardio; los eventos isquémicos son a causa de la

aterosclerosis y trombosis en arterias coronarias. Otros eventos relacionados son embolismo de arteria mesentérica y trombosis en miembros. Los trombos venosos son originados en la circulación venosa profunda y causan el tromboembolismo pulmonar (TEP). Los trombos generados en la microvasculatura pueden provocar coagulación intravascular diseminada o anemia hemolítica microangiopática (como en púrpura trombótica trombocitopénica o en síndrome urémico hemolítico).

Los fármacos antitrombóticos disponibles para el tratamiento de las trombosis arteriales y venosas pueden clasificarse en tres categorías mayores: i) anticoagulantes inhibidores de los factores de coagulación sanguínea (heparina, warfarina), ii) antiagregantes plaquetarios (aspirina, clopidogrel, abciximab) y iii) fibrinolíticos (estreptoquinasa, tPA: activador del plasminógeno tisular y reteplasa). Debido a que se han reportado efectos no deseados por el uso de tales compuestos (sangrado y toxicidad gastrointestinal), la búsqueda de productos naturales con propiedades antitrombóticas ha ido incrementándose en el tiempo. Al respecto, muchos de estos compuestos provienen de plantas naturales, de sus extractos, o bien de alimentos funcionales. Un aspecto relevante es que estos compuestos naturales han demostrado ejercer múltiples acciones antitrombóticas (Giménez Serrano, 2003), con efectos pleiotrópicos y sinérgicos que pueden aumentar la eficacia terapéutica. Asimismo, estos productos naturales han exhibido menores efectos sobre el sistema gastrointestinal (Chen *et al.*, 2015).

Entre las metodologías utilizadas para evaluar las propiedades anticoagulantes de péptidos bioactivos se pueden destacar: i) tiempo de trombina, ii) tiempo de protrombina, iii) tiempo de tromboplastina parcial activada y iv) formación de fibrina (Sabbione, 2015).

**i) Tiempo de trombina (TT):** es una prueba coagulométrica que se emplea en la localización de la causa de un desorden hemostático. Al producirse un trauma o injuria vascular, la trombina formada escinde al fibrinógeno soluble en monómeros de fibrina que polimerizan espontáneamente y luego son estabilizados dando lugar a la malla insoluble de fibrina. El tiempo de trombina evalúa la última etapa de la coagulación, es decir, la conversión del fibrinógeno a fibrina. Por lo tanto, la anomalía en el nivel funcional del fibrinógeno, la presencia de sustancias que interfieran en la acción de la trombina sobre el fibrinógeno (heparina, hirudina, etc.) o las que bloquean la polimerización de los monómeros de fibrina (PDF/pdf, paraproteínas, etc.) conducen a un prolongamiento del tiempo de este test. Esta determinación no detecta deficiencias del factor XIII. La alteración del tiempo de este test puede deberse a: desórdenes

cualitativos o cuantitativos del fibrinógeno, actividad fibrinolítica aumentada, terapias con anticoagulante, terapias fibrinolíticas (Sabbione, 2015).

**ii) Tiempo de protrombina (TP):** es la prueba de mayor importancia clínica en la evaluación de desórdenes de la vía extrínseca de la coagulación. Su sensibilidad a alteraciones cuali y cuantitativas de factores de la vía extrínseca y común, le permite ser empleado en: a) detección de deficiencias simples o combinadas de factores, por alteraciones hereditarias o adquiridas (hepatopatías, deficiencia de vitamina K, amiloidosis, coagulación intravascular diseminada), b) estudios prequirúrgicos, c) determinación específica de la actividad de factores (II, V, VII y X), d) monitoreo de terapia con anticoagulantes orales (Sabbione, 2015).

**iii) Tiempo de tromboplastina parcial activada (KPTT):** es una prueba sensible a la deficiencia de factores procoagulantes del plasma, así como a la presencia de ciertos inhibidores de la coagulación. Sirve para detectar anomalías en la vía intrínseca de la coagulación, como son los factores necesarios para la formación del activador intrínseco de la protrombina (VIII, IX, XI y XII). También detecta deficiencias severas de los factores II, V, X y fibrinógeno, no siendo así con los trastornos plaquetarios, las deficiencias de los factores VII y XIII, ni los problemas vasculares. La rapidez, sencillez y reproducibilidad de la prueba la hacen muy adecuada para el control de la terapéutica anticoagulante por heparina. También permite la identificación rápida de hemofílicos en potencia, a fin de poder someterlos a tratamientos preventivos prequirúrgicos y evitar problemas hemorrágicos (Sabbione, 2015).

**iv) Formación de fibrina:** es una prueba que estudia la vía común de la coagulación en forma muy simplificada, ya que sólo se evalúa la reacción entre el sustrato (fibrinógeno) y la enzima proteolítica (trombina), provocando su polimerización. Es útil para evaluar interferencias en la formación de la fibrina (Sabbione, 2015).

### **1.7.2- Propiedades hipoglucemiantes o antidiabetogénicas**

La diabetes es una enfermedad crónica cuyo diagnóstico y evolución depende de la concentración de glucosa en sangre de un individuo, es decir de la glucemia. Según OMS la prevalencia mundial de diabetes en adultos en el año 2014 era del 8,5%, mucho mayor al 4,7% de 1980, y se asocia al aumento de casos de sobrepeso y obesidad, especialmente en sectores de ingresos medios y bajos. La causa de la diabetes es la desregulación de la glucemia debido a alguna de las siguientes causas: la ausencia de la hormona insulina (diabetes tipo I ó insulino dependiente) o la resistencia de los

tejidos a su acción hipoglucemiante (diabetes tipo II o no insulino dependiente). Los valores crónicamente elevados de glucosa provocan los efectos sistémicos sobre la microvasculatura y la macroangiopatía que se manifiestan en alteraciones oculares, renales, cardíacas y cardiovasculares, epidérmicas y dérmicas, neurológicas y sensitivas (Valdés Ramos *et al.*, 2010).

La DM II es el tipo de diabetes más frecuente, su patogénesis incluye resistencia a la acción de insulina y disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas. En este contexto la concentración de glucosa se eleva (Liu *et al.*, 2019). La posibilidad de disminuir la glucemia en la DM II a través de tratamientos farmacológicos y no farmacológicos mejora el pronóstico de la enfermedad. Los puntos de acción de los tratamientos son diversos y variados en base a los múltiples puntos de regulación hormonal de la glucemia. En lo que refiere a las inhibiciones enzimáticas se pueden destacar: i) inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa, ii) inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y iii) inhibición de la enzima DPP-IV.

**i) Inhibición de  $\alpha$ -amilasa:** esta enzima hidroliza el almidón ingerido. La misma cataliza la ruptura de los enlaces  $\alpha$ 1-4 glucosídicos. Sus sitios de acción en humanos son dos: la boca ( $\alpha$ -amilasa producida por glándulas salivales) y el duodeno ( $\alpha$ -amilasa producida por el páncreas). La inhibición de esta enzima permite disminuir la generación de monosacáridos a partir del almidón presente en los alimentos consumidos y en proceso de digestión, minimizándose su absorción (Jo *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2017).

**ii) Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa:** la denominación  $\alpha$ -glucosidasa corresponde a un grupo de enzimas ubicadas en el ribete en cepillo del intestino cuya actividad incluye disacaridasas y dextrinasas. Las mismas hidrolizan los restos de oligosacáridos en la luz intestinal, favoreciéndose la absorción de monosacáridos específicos (glucosa, fructosa y galactosa). Con la inhibición de estas enzimas se logra reducir la oferta de monosacáridos al enterocito, disminuyéndose así su absorción, lo que lleva a un descenso de la glucemia (Naik y Kokil, 2013).

**iii) Inhibición de DPP-IV:** esta enzima participa en la regulación de la liberación pancreática de insulina. La misma hidroliza péptidos que contienen Pro ó Ala en su penúltima posición y es responsable de la degradación fisiológica del péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) y del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Estos dos péptidos, denominados incretinas, potencian la secreción de insulina en presencia de glucosa. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima contribuye con la acción fisiológica

de las incretinas GLP-1 y GIP, incrementándose la secreción de insulina tras la ingesta, lo que se traduce en un descenso de la glucemia (Connolly *et al.*, 2013). Al respecto, la inhibición de la enzima DPP-IV constituye un punto clave en el tratamiento de la DM II, siendo el fundamento de acción de muchos hipoglucemiantes orales utilizados a nivel mundial (Liu *et al.*, 2019).

### **1.7.3- Propiedades antioxidantes**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos, se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas (Vertuani *et al.*, 2004). Una excesiva producción de ROS puede sobrepasar la capacidad antioxidante fisiológica, ocasionando un daño oxidativo de las macromoléculas biológicas (lípidos proteínas y ácidos nucleicos), lo que se denomina estrés oxidativo (Mayor-Oxilia, 2010). Esto conduce a la pérdida de funcionalidad biológica, ya que se altera la integridad de las membranas celulares, se modifica el material genético y se pierde la actividad enzimática (Segura-Campos *et al.*, 2010). Este desbalance oxidativo conlleva a diversas enfermedades no transmisibles, tales como: cáncer, diabetes y artritis. Además, favorece el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Coronado *et al.*, 2015). Cabe señalar que además de la producción fisiológica de ROS, hay otras fuentes de radicales libres tales como: la radiación UV, los contaminantes ambientales, etc. (Torres-Fuentes *et al.*, 2011).

Los antioxidantes pueden ser definidos como compuestos que inhiben o demoran la oxidación de otras moléculas por la inhibición de la iniciación o la propagación de reacciones de oxidación en cadena. Pueden proteger además al cuerpo humano de los radicales libres y de los efectos de las ROS (Gülcin *et al.*, 2010). Al respecto, las investigaciones científicas aportan datos alentadores en cuanto al consumo de alimentos antioxidantes y su impacto en la salud (Coronado *et al.*, 2015). Conjuntamente, se ha observado que el consumo crónico de algunos antioxidantes sintéticos está asociado con la aparición de ciertas enfermedades degenerativas relacionadas a la toxicidad de los mismos (Lourenço *et al.*, 2019). En este sentido, en los últimos años, se ha potenciado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser incorporados a las matrices alimentarias con el fin de reducir la dosis de antioxidantes artificiales. Entre estos se destacan los compuestos fenólicos, carotenoides y péptidos bioactivos (Segura-Campos *et al.*, 2010).

Respecto al modo de acción, 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. Un solo ensayo *in vitro* no permite dilucidar el mecanismo por el cual los radicales libres son eliminados. Se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante, que difieren en su principio de ensayo y en las condiciones experimentales. Desde un punto de vista químico se los puede clasificar en tres grupos: i) métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT del inglés), ii) métodos basados en la transferencia de electrones (ET del inglés) y iii) métodos basados en la capacidad quelante de metales de transición (Cian *et al.*, 2014b).

La capacidad antioxidante de un producto alimenticio está determinada por interacciones entre distintos compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés), inhibición del radical DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico) y poder reductor (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

#### **1.7.4- Actividad antihipertensiva**

La presión sanguínea es una función del gasto cardíaco y de la resistencia vascular periférica, dos variables hemodinámicas influidas por múltiples factores genéticos, ambientales y demográficos. La presión arterial (PA) aumenta con el ejercicio físico y psíquico, el frío, la digestión, la carga emocional. Además, la PA no es constante a lo largo de las horas, sino que varía mucho durante el día y la noche, tanto en normotensos como en hipertensos (Hong *et al.*, 2003). El gasto cardíaco depende en gran medida de la volemia que a su vez se ve muy influida por la homeostasis del sodio. El aumento de la volemia obliga al músculo cardíaco a ejercer una fuerza mayor para la expulsión de sangre lo que se traduce en un aumento del gasto cardíaco y de la PA. La resistencia vascular periférica se determina sobre todo a nivel de las arteriolas y se ve supeditada a los factores nerviosos y hormonales. Cuando el diámetro de las mismas está disminuido aumenta la resistencia y la PA. A la inversa cuando el diámetro aumenta la resistencia disminuye y la presión sanguínea desciende.

Muchos sistemas contribuyen a mantener el control homeostático de la PA. Los reguladores principales son el sistema nervioso simpático (para el control a corto plazo) y los riñones (para el control a largo plazo). En respuesta a una caída de la PA, el sistema nervioso simpático segrega noradrenalina, un vasoconstrictor que actúa sobre las arterias y arteriolas pequeñas para aumentar la resistencia periférica y la PA. Los riñones regulan la PA mediante el control del volumen del líquido extracelular y secreción de renina, que activa el sistema renina-angiotensina (Montenegro y Sujosky, 2013). La regulación a medio y largo plazo de la PA es llevada a cabo por el sistema de control renal de los líquidos corporales mediante mecanismos hormonales de los que forman parte el sistema renina-angiotensina (RAS), el sistema quinina-caliceína, el sistema de la endopeptidasa neutra (NEP), y el sistema endotelina (ET). Estos sistemas generan diversos péptidos vasoreguladores que, de forma colectiva y a través de su unión a receptores específicos localizados en diferentes tejidos, modulan la presión, los fluidos y el balance de electrolitos. Los principales componentes de estos sistemas son las dianas para los fármacos antihipertensivos y también para los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias (Fernández Musoles, 2015).

Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva pueden provocar inhibición de la ECA-I. Esta enzima es una proteasa que actúa por un lado hidrolizando el péptido vasodilatador bradisinina mediante el sistema quininalcaliceína y por otro el decapeptido Angiotensina-I mediante el sistema RAS generando el octapéptido vasoconstrictor Angiotensina-II (Herrera Chalé *et al*, 2014). Los tratamientos farmacológicos de la hipertensión arterial están enfocados fundamentalmente en la inhibición de esta enzima.

La ECA-I (EC 3.4.15.1) es una dipeptidil carboxipeptidasa perteneciente a la familia de las  $Zn^{2+}$  proteasas, ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos. 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. Está fuertemente asociada con la regulación de la presión sanguínea mediante la modulación del RAS. 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-I. El decapeptido angiotensina-I (Asp-Arg-Val-Try-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), generado por la renina e inactivo, es activado al formar el octapeptido angiotensina II (Asp-Arg-Val-

Try-Ile-His-Pro-Phe). 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. Simultáneamente, la ECA-I degrada las bradicininas (sistema quinina-caliceína), compuestos de potente acción vasodilatadora, en fragmentos inactivos. Esta acción de la enzima favorece el incremento de la PA (Cian *et al*, 2014b).

### **1.8- Biodisponibilidad de péptidos bioactivos**

Los alimentos no solo aportan nutrientes, también modulan funciones fisiológicas del cuerpo, siendo el intestino el órgano más comprometido dado el contacto permanente con las sustancias ingeridas. El intestino delgado presenta varias capas y está cubierto por vellosidades en su membrana interior. Se estima una superficie de 200 m<sup>2</sup>, que absorbe eficiente y rápidamente altas cantidades de nutrientes. Esta absorción está a cargo de las células epiteliales (IEC) que cubren la superficie interior. Estas IEC además participan en el metabolismo de algunos alimentos y en el sistema inmunológico intestinal. La membrana celular apical de las IEC posee transportadores para glucosa, aminoácidos, péptidos, ácidos carboxílicos, minerales, e inclusive a veces transporta componentes no alimentarios como los xenobióticos. Estas sustancias absorbidas son luego excretadas de las células hacia la circulación sanguínea por otros transportadores similares o diferentes ubicados en la membrana basolateral. El transporte paracelular es un sistema de difusión pasiva que ocurre en los espacios de las uniones intercelulares, regulado por la permeabilidad de la unión estrecha, que es particularmente usado para el transporte de minerales. Las sustancias lipofílicas utilizan la difusión pasiva transcelular por su facilidad para penetrar en las membranas celulares. Un sistema de transporte intracelular mediado por vesículas es el denominado transcitosis. Ocurre también en las IEC y permite transportar moléculas de alto peso molecular como las proteínas (Shimizu M., 2010)

La funcionalidad de los péptidos bioactivos depende del sitio donde deben actuar y esto condiciona la necesidad de que sufran el proceso de absorción o que actúen sin absorberse. Por ejemplo, los péptidos anorexigénicos, que participan en la conducta alimentaria regulando el apetito, desarrollan su función en la luz intestinal. Del mismo modo, péptidos con actividad antitumoral frente a cáncer de colon, podrían también

ejercer su acción sin absorberse. Otros en cambio, requieren no solamente ser absorbidos por el intestino sino, atravesar el epitelio intestinal, pasar a la circulación sistémica y dirigirse a los sitios en los que manifiesten su acción. Como ejemplos de este tipo de péptidos, podemos mencionar los antioxidantes y los antihipertensivos (Amigo y Hernández-Ledesma, 2020).

Los péptidos antitrombóticos deben ser capaces de atravesar la barrera intestinal y llegar a la circulación sistémica intactos. Para eso deberán resistir a diferentes barreras fisiológicas tales como: acción de la pepsina y pH estomacal, acción de las proteasas pancreáticas vertidas en el intestino delgado (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasas A y B), protéolisis de las peptidasas de los enterocitos y la de las peptidasas séricas. Para estudiar la resistencia de los péptidos a la digestión gastrointestinal, usualmente se los somete a una digestión *in vitro*, para luego determinar su bioactividad una vez digeridos. En la literatura hay ejemplos que demuestran que la digestión puede reducir, incrementar o bien no afectar la bioactividad de los mismos (Cian *et al.*, 2018).

Hace años se describió y estudió la ruta PepT1 (Peptide transporter 1), a través de la cual pequeños péptidos pueden absorberse a través del epitelio intestinal. PepT1 es un transportador de oligopéptidos que funciona como un co-transportador y se ubica en las membranas del borde de cepillo del epitelio intestinal. Esta proteína juega un rol importante en la absorción y digestión de proteínas dietarias, ya que media el transporte de oligopéptidos desde el lumen hacia los enterocitos. Además de la ruta PepT1, los péptidos pueden ser absorbidos paracelularmente. Este mecanismo serviría para péptidos altamente hidrosolubles que sean capaces de atravesar las uniones estrechas entre enterocitos, sin pasar por dentro de las células. Otra vía posible, la difusión pasiva, podría ser utilizada por péptidos suficientemente hidrofóbicos como para atravesar la bicapa lipídica. Por último, otro mecanismo que puede involucrar la entrada de los péptidos es la transcitosis. La transcitosis o transporte transcelular consiste en el pasaje de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro mediante la formación de vesículas (Miner-Williams *et al.*, 2014). Así, la estructura particular de cada péptido determinará en última instancia la ruta preferencial de transporte (Sabbione, 2015).

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo general es evaluar las propiedades bioactivas del alga roja *PC*, de una fracción proteica obtenida (FP) de ella, del alga verde *U*, y de hidrolizados de HM, luego de una simulación de digestión gastrointestinal, a fin de poder estimar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en estas matrices.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1- Evaluar capacidad anticoagulante y antitrombótica de los péptidos bioactivos procedentes del alga roja (*PC*), de una fracción proteica (FP) de la misma y del alga verde (*U*), luego de un tratamiento de digestión gastrointestinal simulada (DGS).

2.2.2- Evaluar otras propiedades biológicas de los péptidos procedentes de macroalgas tales como actividad antidiabetogénica, actividad antioxidante y actividad antihipertensiva.

2.2.3- Evaluar la capacidad anticoagulante de hidrolizados de la proteína de HM, luego de un proceso de DGS.

2.2.4- Evaluar las capacidades: hipoglucemiante, antioxidante y antihipertensiva de los péptidos obtenidos por hidrólisis de la proteína de hez de malta.

2.2.5- Estimar la bioaccesibilidad de compuestos con capacidad anticoagulante y antitrombótica, hipoglucemiante, antioxidante y antihipertensiva.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Estudio de las propiedades bioactivas de algas luego de una DGS**

Se describen los procedimientos efectuados para la preparación de las muestras de algas *PC* y *U*, la obtención de la FP y las pruebas realizadas para caracterizarlas y estudiar sus propiedades bioactivas.

##### **3.1.1- Materia prima: ALGAS**

Las macroalgas *PC* y *U* fueron recolectadas en Punta Maqueda. Dicha localidad se ubica a 30 km al sur de Comodoro Rivadavia (Prov. de Chubut), en la costa noreste de la provincia de Santa Cruz (46° 01' L.S. y 67° 34' L.O.), en una pequeña península del golfo de San Jorge. Se caracteriza por ser un espacio prístino, alejado de la actividad antropogénica y por poseer una restinga rocosa con piletas de marea de poca extensión y profundidad. La recolección se llevó a cabo en el período primaveral de los años 2016-2017.

##### **3.1.2- Procesamiento de las muestras de algas *PC* y *U***

###### **3.1.2.1-Acondicionamiento de las muestras**

Las algas se lavaron *in situ* con abundante agua de mar para eliminar cuerpos extraños y restos de otras algas. Posteriormente se guardaron por separado en bolsas de polietileno identificadas convenientemente y se transportaron refrigeradas a temperatura de 4 °C hasta el 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, se lavaron por separado cada muestra de alga con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. El material seco se almacenó en bolsas plásticas herméticamente cerradas e identificadas. Se transportó al laboratorio de Extrusión del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe. Las porciones de alga seca se molieron con un molino de laboratorio (Molab, Decalab S.R.L, Argentina), y el producto obtenido se tamizó con un tamiz de 0,85 mm. El material se almacenó, debidamente rotulado, en envases plásticos a -20°C. Llegado el momento de utilizarlas, se retiraron del freezer, se pesó la cantidad necesaria, se mantuvieron en reposo en envase cerrado hasta lograr la temperatura ambiente y se repartieron para su procesamiento.

### **3.1.2.2- Determinación de la composición centesimal**

La composición centesimal se determinó de acuerdo con los métodos de la A.O.A.C., (1995). Se midieron los contenidos de humedad, lípidos (extracto etéreo), proteínas (el factor para la conversión de nitrógeno a proteína utilizado fue 6,25), cenizas y fibra dietaria total (utilizando el kit de Megazyme). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

### **3.1.3- Obtención de la FP a partir del alga roja PC**

La FP se obtuvo de acuerdo a Cian *et al* (2012a). Sobre una alícuota de muestra del alga roja PC, se realizó un proceso de extracción con agua destilada en proporción 32 g/kg, a pH 7 y temperatura ambiente (25°C), con agitación durante 2 h, contadas desde el momento en que se ajustó el pH. A los fines de garantizar la constancia de las condiciones de extracción, se controló el pH cada 15 minutos con peachímetro, manteniendo el valor de  $7,0 \pm 0,1$  y se controló la temperatura ambiente con termómetro. Finalizado el tiempo de extracción, se filtró con bomba de vacío usando tamiz de malla 50 (0,297 mm) de modo de separar sólidos de líquido. El extracto (fracción líquida) se centrifugó durante 20 minutos a 3000 xg, fue fraccionado en frascos estériles y conservado a -20°C hasta su análisis.

#### **3.1.3.1- Cuantificación de sólidos de la FP**

Los sólidos del extracto soluble se cuantificaron en una alícuota del extracto obtenido, por secado en estufa a 105 °C durante 24 horas. El resultado se expresó en g de sólidos/ 100 g extracto soluble.

#### **3.1.4- Digestión gastrointestinal simulada (DGS)**

Las muestras de las algas PC y U, y la FP fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro* de acuerdo a Cian *et al.* (2015b). Las muestras molidas y tamizadas de alga roja y de alga verde se dispersaron con agua destilada a temperatura ambiente a 10 g/100 g de agua y la FP fue utilizada directamente. Luego se tomaron alícuotas de 12,5 g, se colocaron en vasos colectores y se ajustó el pH a 2,0 con HCl (4 mol /L). Posteriormente, se agregó a cada vaso 0,4 mL de una solución de pepsina (P-7000 Sigma-Aldrich) de 16 g /100 mL en HCl 0,1 mol /L y se incubó durante 2 h a 37 °C. Cumplido el tiempo de la digestión gástrica se agregó a cada vaso una bolsita de diálisis de 14 cm de longitud con un diámetro de poro de 6 a 8 kDa (Spectra/Pore), conteniendo 10 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub>, cuya molaridad se calculó de manera que el pH del sistema alcanzase un valor final de  $6,5 \pm 0,2$ , luego de la doble digestión, de acuerdo a Van de Velde *et al.* (2018). Luego de 50 minutos de incubación, se

agregaron 3,125 mL de una solución de pancreatina (P-1750 Sigma-Aldrich) al 0,4 g /100 mL en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L y nuevamente se incubó durante 2 h 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 fueron fraccionados en tubos cónicos con tapa y almacenados a -20 °C. Por otro lado, se centrifugaron los digeridos a 3500 *xg* por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue pesado, fraccionado en tubos cónicos, y almacenado a -20 °C hasta los análisis correspondientes. Además, se realizaron blancos de digestión utilizando agua destilada en lugar de muestra, siguiendo todos los pasos del proceso anteriormente mencionado. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.1.5- Análisis de la composición de las fracciones digeridas y dializadas**

Sobre las fracciones solubles de los digeridos y dializados de *PC*, *U* y *FP* se determinaron el contenido de proteínas solubles (Lowry *et al*, 1951) y los aminos libres (AL) (Nielsen *et al*, 2001). Además, se calculó la longitud media de cadena peptídica (PCL) según Adler-Nissen, (1986) como sigue:

$$\text{PCL (fracción soluble)} = S / (\text{h/h totales})$$

Donde: h: Representa el número de enlaces peptídicos escindidos en la hidrólisis (mEq/L), h totales: es el número de enlaces peptídicos en una proteína (mEq/g proteína), siendo para *PC* 8,60 mEq/g proteína (Cian *et al*, 2012b) y para *U* 8,04 mEq/g proteína (Cian *et al*, 2018a), y S: es la concentración de proteínas solubles (g/L).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.1.6- Estudio de las propiedades bioactivas de *PC*, *U* y *FP* del alga *PC* luego de una DGS**

Sobre las fracciones solubles de los digeridos y/o dializados de *PC*, *U* y *FP* se midieron las siguientes propiedades bioactivas:

#### **3.1.6.1- Evaluación de actividades anticoagulante y antitrombótica**

La actividad antitrombótica fue medida de acuerdo a Sabbione *et al* (2015). Para las pruebas de coagulación TT, TP y KPTT se utilizaron plasmas humanos a los que se agregó, antes del correspondiente análisis, la proporción correspondiente de dializado de alga roja o de alga verde o de dializado de la *FP*, de buffer (control) o de heparina (control de inhibición).

Para obtener el pool de plasma normal, se recolectaron muestras de sangre entera de individuos sanos (personas que se conocía que no padecían enfermedades

relacionadas con la coagulación sanguínea ni estaban tratadas con agentes o fármacos anticoagulantes o antitrombóticos, que concurrieron al laboratorio para realizar rutina de análisis). Se utilizaron tubos nuevos precargados de fábrica con anticoagulante citrato de sodio 3,2 % p/v marca Tecnon que se completaron hasta la marca provista en el tubo, con sangre entera recién obtenida; lo que resultó en una proporción 1:9 (citrato de sodio: sangre), homogeneizando inmediatamente. En un lapso de tiempo no mayor a 30 minutos desde la extracción de sangre, se centrifugaron los tubos a 2500 xg durante 10 minutos y se separaron inmediatamente los plasmas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**a) TT:** Se prepararon las muestras a ensayar con 150 µl de plasma y 50 µl de dializado de *PC*, *U* ó *FP*, o heparina (control de inhibición) o solución fisiológica (control) en tubos de hemólisis. Se incubaron por 2 minutos a 37°C (en baño termostático) e inmediatamente se comenzó la medición del tiempo induciendo la formación del coágulo por el agregado de 200 µL de trombina bovina reconstituida (2,7 NIH/mL) marca Wiener Lab. El TT se determinó cronometrando el tiempo, en segundos, transcurrido desde el agregado de trombina hasta la visualización de los primeros vestigios de la formación del coágulo.

**b) TP:** La mezcla de plasma y dializado de *PC* de *U* o de *FP*, o heparina o solución fisiológica, preparada en el momento en la proporción 3 + 1 (75 µL de plasma + 25 µL de dializado) en sus correspondientes tubos de hemólisis de vidrio y el reactivo Soluplastín (marca Wiener Lab) reconstituido en su frasco original, fueron preincubados durante 2-3 minutos a 37 °C en baño termostático. Se agregaron rápidamente sobre los 100 µL de mezcla a ensayar en el tubo de hemólisis, los 200 µL de reactivo Soluplastín con micropipeta automática, y se registró el tiempo, medido en cronómetro, en el que se observó la formación del coágulo de fibrina.

**c) KPTT:** se mezcló plasma (75 µL) con 25 µL de muestra (dializados de *PC*, de *U* y *FP*), o solución fisiológica o heparina en tubos de hemólisis de vidrio y se incubó durante 1 minuto a 37 °C. El reactivo APTTest (marca Wiener Lab) fue agregado (100 µL) a la mezcla e incubado a 37 °C durante 3 minutos. El tiempo de formación del coágulo se determinó luego de adicionar 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 25 mM, preincubado a 37 °C a cada tubo, de a uno por vez, que se homogenizó inmediatamente y se mantuvo en el baño termostático los primeros 20 segundos sin mover y luego retirándolo cada 5 segundos para observarlo, volviendo al baño cuidadosamente y alternativamente, esperando la observación del coágulo, y midiendo con cronómetro el tiempo, que fue

inmediatamente registrado al observar los primeros indicios de formación de los hilos de fibrina.

**d) Formación de Fibrina:** se siguió el método propuesto por Yang *et al* (2007), que estudia la vía común de la coagulación midiendo la turbidez asociada a la formación del coágulo y producida debido a la polimerización de los monómeros de fibrina. Para ello, se colocaron 140  $\mu\text{L}$  de solución de fibrinógeno bovino (Sigma) 0,1 g/ 100 mL en el buffer del ensayo (Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 7,2, NaCl 0,12 mmol/L) y 40  $\mu\text{L}$  de muestra ó heparina sódica 5000 UI/mL (control positivo de inhibición), o de buffer Tris (control negativo). Se agitó y se realizó la primera lectura de absorbancia a 405 nm. Luego, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de Trombina humana (Wiener lab, solución 12 UI/ml en el buffer del ensayo), se incubó nuevamente a 37°C durante 10 minutos, y se realizó la medida de la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas ASYS UVM 340 (Biochrom, Inglaterra). Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron las correspondientes a las muestras y a los controles. El grado de inhibición de la coagulación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(C-CB) - (M-MB)] / (C-CB) \times 100$$

Donde, C es la absorbancia del pocillo con el control negativo, sin inhibición de la coagulación, con trombina, CB es la absorbancia del pocillo con el control blanco negativo, sin inhibidores de la coagulación, sin trombina, M es la absorbancia del pocillo con la muestra, con trombina, y MB es la absorbancia del pocillo con la muestra, sin la trombina.

### 3.1.6.2- Evaluación de capacidad hipoglucemiante

En las fracciones digeridas de las muestras se determinó la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, mientras que sobre las fracciones dializadas, se evaluó la actividad inhibidora de la enzima DPP-IV.

**a) Ensayo de inhibición de  $\alpha$ -amilasa:** se llevó a cabo de acuerdo a a Donkor *et al* (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, 150  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilasa (6 U/mL) fueron mezclados con 100  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio 0,1 mol/L, pH 6,8 y 100  $\mu\text{L}$  de muestra de digeridos. Luego de pre-incubar 5 minutos a 37 °C, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del sustrato: solución de almidón 1,0 g/100 mL. Se esperó el desarrollo de la reacción enzimática durante 10 minutos a 37 °C. Luego se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de color: ácido dinitrosalicílico (DNS) (3,5-ácido dinitrosalicílico 10 g /L, tartrato de sodio y potasio 120 g /L en 0,4 mol /L de NaOH). Se incubó en ebullición por 15 minutos para favorecer el desarrollo de color. Posteriormente, las muestras se llevaron a baño de

hielo y se adicionaron 750  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La absorbancia se determinó a 540 nm en espectrofotómetro. La actividad de la  $\alpha$ -amilasa se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición } \alpha - \text{amilasa (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{A_{MES} - A_{BME}}{A_{ES} - A_{BES}} \right) \times 100 \right]$$

Donde:  $A_{MES}$ : es la absorbancia del ensayo con  $\alpha$ -amilasa, muestra y sustrato;  $A_{BME}$  es la absorbancia del blanco de muestra (sin el sustrato);  $A_{ES}$  es la absorbancia de la enzima con el sustrato;  $A_{BES}$  es la absorbancia de la enzima con el sustrato sin dejar reaccionar.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

**b) Ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa:** se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kim *et al* (2011), con algunas modificaciones. Para esto, 40  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -glucosidasa 0,8 U /mL (Sigma, G5003) y 110  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio (0,1 mol /L, pH 6,8) se mezclaron con 50  $\mu\text{L}$  de muestra. Luego de una pre-incubación a 37 °C por 10 minutos, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de sustrato 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopyranosa 5 mmol /L (pNPG, Sigma N1376), y se inició la reacción enzimática a 37 °C por 30 minutos. La reacción fue frenada por adición de 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol/L. La absorbancia del 4-nitrofenol fue medida a 405 nm en espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se determinó como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición } \alpha - \text{glucosidasa (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{A_{MES} - A_{BME}}{A_{ES} - A_{BES}} \right) \times 100 \right]$$

Dónde:  $A_{MES}$ : es la absorbancia en el ensayo con  $\alpha$ -glucosidasa, la muestra y el sustrato;  $A_{BME}$ : es la absorbancia con  $\alpha$ -glucosidasa y la muestra (blanco de muestra);  $A_{ES}$ : es la absorbancia con  $\alpha$ -glucosidasa y el sustrato;  $A_{BES}$ : es la absorbancia con  $\alpha$ -glucosidasa y el sustrato sin dejar reaccionar (blanco del sistema E/S).

Las muestras fueron evaluadas a una concentración de proteína de 4 g/L.

Posteriormente, se determinó la concentración de la muestra que consigue la inhibición del 50% de la actividad enzimática ( $\text{IC}_{50}$ ). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con el modelo matemático Exponential (software OriginPro® 8.0), según las siguientes ecuaciones:

$$y = y_0 + A e^{(R_0 x)}$$

Donde:  $y$ : es la inhibición (%);  $y_0$ ,  $R_0$  y  $A$ : son parámetros de la regresión; y  $x$ : es la concentración proteica en mg/mL.

A partir de la ecuación anterior y haciendo  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ :

$$IC_{50} = \ln(50 - y^0/A)/R_0$$

**c) Ensayo de inhibición de enzima DPP-IV:** se siguió la metodología propuesta por Wang *et al.* (2017). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, y se midió el incremento de la absorbancia a 385 nm usando como sustrato Gly-Pro-p-nitronilina (pNGly-Pro). A cada muestra (25  $\mu$ L) se adicionaron 25  $\mu$ L de pNGly-Pro (Sigma G0513) 1,6 mmol/L, en 100 mmol/L de buffer Tris, pH 8,0. Cada mezcla se pre-incubó por 20 minutos a 37 °C, seguido de la adición de la DPP-IV (Sigma D4943) (50  $\mu$ L, diluida en buffer tris a 0,01 U /mL). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 60 minutos, y la reacción fue frenada por adición de 100  $\mu$ L de buffer acetato de sodio (1 mol /L, pH 4,0). La absorbancia de la solución resultante fue medida a 385 nm utilizando un lector de placas (Biochrom Asys UVM340 Microplate Reader, Cambridge, UK). El porcentaje de inhibición de la DPP-IV se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición DPP - IV (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{A_{MES} - A_{BME}}{A_{ES} - A_{BES}} \right) \times 100 \right]$$

Donde:  $A_{MES}$ : es la absorbancia del ensayo con DPP-IV, muestra y sustrato;  $A_{BME}$ : es la absorbancia del blanco de muestra (sin el sustrato);  $A_{ES}$ : es la absorbancia de DPP-IV con el sustrato;  $A_{BES}$ : es la absorbancia de la enzima y el sustrato sin dejar reaccionar.

Las muestras fueron evaluadas a una concentración de proteína de 4 g/L.

Posteriormente, se determinó la concentración de la muestra que consigue la inhibición del 50% de la actividad enzimática ( $IC_{50}$ ). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con el modelo matemático Exponential (software OriginPro® 8.0), según las siguientes ecuaciones:

$$y = y_0 + A e^{(R_0 x)}$$

Donde:  $y$ : es la inhibición (%);  $y_0$ ,  $R_0$  y  $A$ : son parámetros de la regresión; y  $x$ : es la concentración proteica en mg/mL.

A partir de la ecuación anterior y haciendo  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ :

$$IC_{50} = \ln(50 - y^0/A)/R_0$$

### 3.1.6.3- Evaluación de actividad antioxidante

En las fracciones digeridas de las muestras se determinó se determinaron las siguientes propiedades antioxidantes: poder reductor (PR), inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> e inhibición del radical DPPH.

**a) Ensayo de PR:** se determinó de acuerdo a Ahmadi *et al.* (2007). Las muestras (a un volumen de 100 µL) se incubaron con 100 µL de ferricianuro potásico 1 g/100 mL y 100 µL de buffer fosfato por 20 min a 50 °C. Luego se añadieron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA), se agitó y se centrifugó 5 min a 8000 xg. En placa se colocaron 100 µL del sobrenadante, 100 µL de agua bidestilada y 20 µL de cloruro férrico y se mezcló. Se tapó con una hoja de aluminio, aplicándola suavemente en la superficie de la policubeta y se incubó en estufa a 50°C durante 10 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 700 nm en lector de placas. El PR se expresó como mg de ácido ascórbico (AA) equivalente /g b.s., utilizando para ello una curva de calibrado de AA de 0,00 a 0,05 mg /mL en búfer fosfato. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

**b) Inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> y capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC):** se utilizó el ensayo propuesto por Cian *et al.* (2012). La reacción se llevó a cabo en placa (policubeta), colocando 10 µL de muestra y 190 µL de reactivo ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethyl benzotiazolin -6-ácido sulfónico) diluido. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, a los 6 minutos de la mezcla inicial. El porcentaje de inhibición del radical se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_{bco} - A_{mtra \text{ o estándar}}}{A_{bco}} \times 100$$

Donde A<sub>bco</sub>: es la absorbancia del blanco de reacción; A<sub>mtra o estándar</sub>: es la absorbancia de la muestra o estándar, respectivamente.

Para calcular la TEAC, se utilizó como estándar al Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethichromano-2-carboxílico). Para esto, se construyó una curva de Inhibición (%) vs. concentración de Trolox en PBS 0,01 mol /L pH 7,4. El rango de concentración del estándar fue de 0 a 2,5 mmol /L. Los valores de inhibición de las muestras fueron expresados como mmol de Trolox/g de proteína.

Posteriormente, se determinó la concentración de la muestra que consigue la IC<sub>50</sub>. Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una

curva de regresión que ajustó con el modelo matemático Exponential (software OriginPro® 8.0), según las siguientes ecuaciones:

$$y = y_0 + A e^{(R_0 x)}$$

Donde:  $y$ : es la inhibición (%);  $y_0$ ,  $R_0$  y  $A$ : son parámetros de la regresión; y  $x$ : es la concentración proteica en mg/mL.

A partir de la ecuación anterior y haciendo  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ :

$$IC_{50} = \ln(50 - y_0/A)/R_0$$

**c) Inhibición del radical DPPH<sup>+</sup>:** se utilizó la técnica propuesta por Brand-Williams *et al.*, (1995) con algunas modificaciones. Se dispensaron 10  $\mu$ L de las muestras en los pocillos de una placa de microcubetas, se mezclaron con 190  $\mu$ L de radical DPPH (0,08 mmol/L en etanol) y se incubaron en oscuridad durante 30 min. Se midió la absorbancia de las muestras a 517 nm. La diferencia entre blanco y muestra se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición, de acuerdo a la ecuación que se detalla abajo.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_{bco} - A_{mtra \text{ o estándar}}}{A_{bco}} \times 100$$

Donde  $A_{bco}$ : es la absorbancia del blanco de reacción;  $A_{mtra \text{ o estándar}}$ : es la absorbancia de la muestra o estándar, respectivamente.

La capacidad antioxidante se expresó como AEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico) para lo que se construyó la curva de inhibición vs. concentración de ácido ascórbico en metanol para un rango de concentraciones de 0 a 123 mg/L.

#### **3.1.6.4- Evaluación de las propiedades anti-hipertensivas**

Las propiedades anti-hipertensivas fueron evaluadas mediante la inhibición de la enzima ECA-I. Para tal fin, se utilizó la técnica propuesta por Hayakari *et al.*, (1978). Este método se basa en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con 2,4,6 triclora 1,3,5 triazina. Esto se llevó a cabo en un volumen total de 1995  $\mu$ L conteniendo: 175  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio pH 8,3 (0,1 mol /L), 15  $\mu$ L de cloruro de sodio (5 mol /L), 20  $\mu$ L del sustrato sintético N-Hippuryl-His-Leu (3,3 g /L) y 20  $\mu$ L de extracto enzimático. Se incubó a 37 °C por 45 min. La reacción fue terminada por la adición de 665  $\mu$ L de triazina (30 g /L) en dioxano seguido por 1,1 mL de buffer fosfato de potasio pH 8,3 (0,1 mol /L). Se esperó 5 min para la formación de color y se centrifugó a 10000

yg durante 10 min. Luego se midió la absorbancia a 382 nm. La inhibición de la ECA-I se calculó como se detalla en la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición ECA - I (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{A_{MES} - A_{BME}}{A_{ES} - A_{BES}} \right) \times 100 \right]$$

Donde:  $A_{MES}$ : es la absorbancia en el ensayo con ECA-I, la muestra y el sustrato;  $A_{BME}$ : es la absorbancia con ECA-I y la muestra (Blanco de muestra);  $A_{ES}$ : es la absorbancia con ECA-I y el sustrato;  $A_{BES}$ : es la absorbancia con ECA-I y el sustrato, sin dejar reaccionar (Blanco del sistema E/S).

Todas las determinaciones se procesaron por triplicado.

Posteriormente, se determinó la concentración de la muestra que consigue la  $IC_{50\%}$ . Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con el modelo matemático Exponential (software OriginPro® 8.0), según las siguientes ecuaciones:

$$y = y_0 + A e^{(R_0 x)}$$

Donde:  $y$ : es la inhibición (%);  $y_0$ ,  $R_0$  y  $A$ : son parámetros de la regresión; y  $x$ : es la concentración proteica en mg/mL.

A partir de la ecuación anterior y haciendo  $y = 50\%$ , se obtuvo el valor de  $IC_{50}$ :

$$IC_{50} = \ln(50 - y_0 / A) / R_0$$

### **3.2- Estudio de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM, luego de una DGS.**

#### **3.2.1- Materia prima**

El subproducto cervecero denominado HM fue proporcionado por la Cervecería Santa Fe – Compañías Cerveceras Unidas (CCU), Calchines 1401 – Santa Fe, Argentina. Esta materia prima fue caracterizada de acuerdo al contenido de proteínas por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000), en cuanto a la presencia y cuantificación de compuestos fenólicos por Folin-Ciocalteu (Schanderl, 1970), y la medida del contenido de humedad (AOAC, 2000).

#### **3.2.2- Obtención de los hidrolizados de HM**

La HM fue dispersada a 10 g/kg en una mezcla etanol: agua (80:20) en un recipiente con agitación durante 1 h, en un baño de agua a 80 °C. Luego el residuo de HM fue filtrado a través de un tamiz de malla 50 (0.297 mm) y re-extraído 4 veces más

en las mismas condiciones. El proceso de extracción de los compuestos fenólicos fue monitoreado aplicando el método de Folin-Ciocalteu. Para eliminar el solvente restante, el residuo final fue secado en un horno de vacío Arcano DFZ-6020 (China) a 40°C durante 3 horas. Para facilitar la liberación de los péptidos bioactivos de HM, el residuo seco de la extracción de los compuestos fenólicos fue hidrolizado con Xilanasa (Optimase® CX 255L) de acuerdo a Niemi *et al* (2013). Las condiciones de trabajo para esta enzima fueron: temperatura 55 °C, pH 5,3, y relación enzima/sustrato (E/S) 5g/100g. La hidrólisis de los carbohidratos catalizada por Xilanasa fue controlada usando el método de Dubois *et al* (1956). El residuo de HM fue filtrado a través de un tamiz de malla 50 (0.297 mm), secado como se detalla anteriormente (horno 40°C, 3 h) y usado como sustrato para la hidrólisis proteica.

Los hidrolizados proteicos de HM fueron obtenidos usando un sistema batch termostaticado de 800 mL. El pH de la reacción fue continuamente controlado usando un peachímetro IQ Scientific Instruments y ajustado adicionando base (NaOH 2 mol/L) o ácido (HCl 2 mol/L) en cantidades necesarias. La concentración de sustrato (HM) fue de 1 g/ 100 g de la dispersión.

Las condiciones de trabajo para cada enzima fueron:

Proteasa alcalina (A)	temperatura 55 °C	pH 9,5	E/S 5g/100g
Proteasa Neutra (P)	temperatura 50 °C	pH 7,0	E/S 5g/100g,
Flavourzyme (F)	temperatura 55 °C	pH 7,0	E/S 5g/100g.

Los distintos hidrolizados de HM fueron preparados usando los siguientes sistemas:

- Hidrolizado AF: hidrólisis con enzima A 2 h + hidrólisis con enzima F 2 h
- Hidrolizado PF: hidrólisis con enzima P 2 h + hidrólisis con enzima F 2 h.

Las condiciones de pH, temperatura y E/S en cada caso ajustadas según lo indicado anteriormente. Una vez finalizada la hidrólisis las enzimas fueron inactivadas por tratamiento térmico según indicaciones del fabricante. Los hidrolizados fueron centrifugados a 2000 xg durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron liofilizados.

### 3.2.3- Digestión gastrointestinal de los hidrolizados de HM

Los hidrolizados AF y PF fueron dispersados en agua a una concentración de 4 g/L de proteína. Alícuotas de 25 mL fueron ajustadas a pH 2,0 con HCl 4 mol/L. Luego se adicionaron 0,8 mL de una solución de pepsina (16 g/100 mL en HCl 0,1 mol/L) y se

incubaron a 37 °C durante 2 h en un baño de agua con agitación constante. Finalizada la hidrólisis con pepsina se aumentó gradualmente el pH a 7,0 con NaHCO<sub>3</sub> 1 mol/L en un lapso no mayor a 10 min. Se agregaron 6,25 mL de solución de pancreatina (0,4 g/100 mL en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L) y se incubó durante 2 h a 37 °C en baño de agua con agitación. Cumplido el tiempo, los digeridos se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 4 min para inactivar las enzimas. Posteriormente se centrifugaron a 3500 *xg* durante 30 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron liofilizados. Las muestras digeridas obtenidas a partir de AF y PF fueron denominadas AFD y PFD, respectivamente. En la Figura 3.1 se presenta el esquema de obtención de hidrolizados y su digestión gastrointestinal.

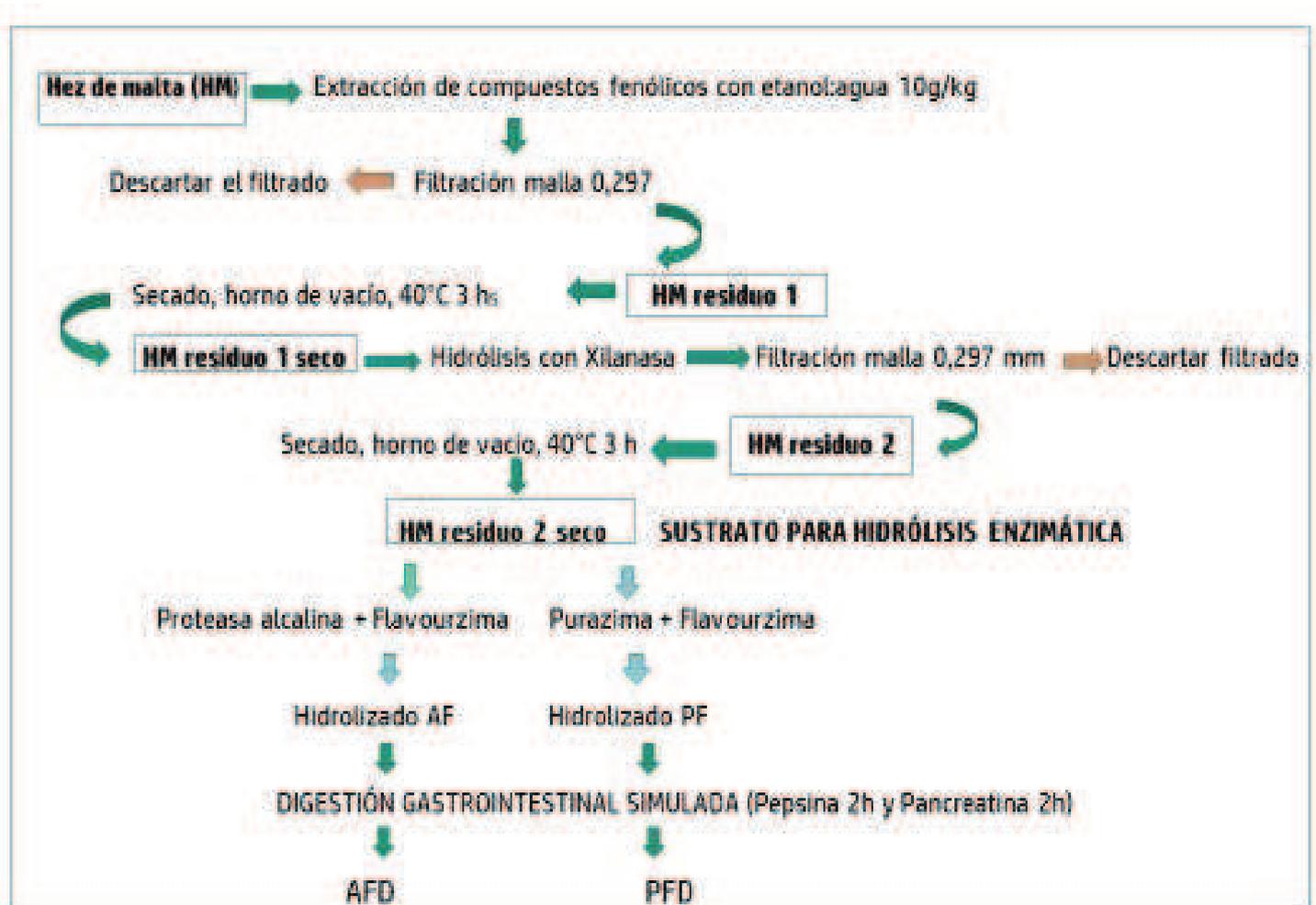


Figura 3.1- Esquema de obtención de hidrolizados de HM y su digestión gastrointestinal (Elaborada por C.Botto en base a esquema realizado por R.Cian)

### 3.2.4– Fraccionamiento de los hidrolizados y de los hidrolizados digeridos

Los hidrolizados y los digeridos de hidrolizados fueron ultrafiltrados a través de una membrana de cut-off 1kDa (Microsep™ Advanced Centrifugal Device), para obtenerlos en fracciones separadas por su peso. Las muestras obtenidas fueron luego centrifugadas a 3000 *xg* durante 1 h a 4 °C con el objeto de purificarlas. De esta manera se obtuvieron hidrolizados de peso molecular mayor y menor a 1 kDa. En la Figura 3.2 se muestra un esquema del proceso de ultrafiltración.

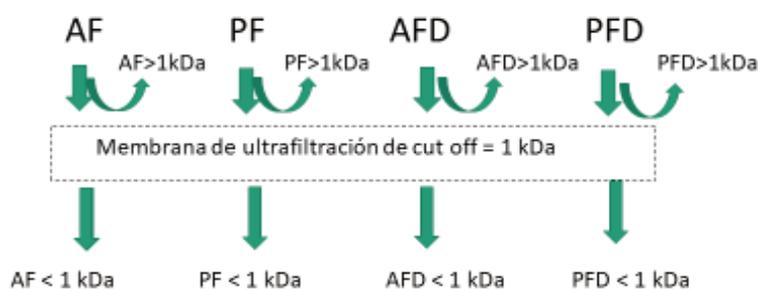


Figura 3.2. Esquema del proceso de ultrafiltración de los hidrolizados (AF y PF) y sus digeridos (AFD y PFD). (Elaborada por C.Botto en base a esquema realizado por R.Cian)

### 3.2.5– Análisis de los hidrolizados proteicos de HM

Sobre las muestras obtenidas por hidrólisis y luego de su ultrafiltración a partir de los productos de la DGS de HM, se determinaron composición elemental y contenido de proteínas, de aminos libres, y del grado de hidrólisis.

#### 3.2.5.1- Composición elemental y contenido proteico

Los contenidos de C, H y N fueron determinado usando CHN628 (Leco® Corporation, USA). El contenido proteico fue estimado usando el contenido de N y el factor de conversión 6,25 g proteína/g N.

#### 3.2.5.2-Determinación de AL

Se utilizó la técnica de Nielsen *et al* (2001) de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.5.

#### 3.2.5.3- Determinación del grado de hidrólisis (GH).

El GH fue calculado como sigue:

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

Donde:  $h_{\text{tot}}$ : es el número de enlaces peptídicos del sustrato proteico (7,81 mEq/g de proteína),  $h$ : es el número de enlaces peptídicos escindidos durante la hidrólisis,

$h_0$ : es el contenido de grupos amino libres del sustrato.

### **3.2.6- Determinación de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM**

#### **3.2.6.1- Evaluación de actividad anticoagulante**

Se utilizó un pool de plasma humano preparado como se indicó previamente. Las muestras AF, PF, AFD, PFD y las correspondientes fracciones ultrafiltradas fueron dispersadas en solución fisiológica y evaluadas a 2,00 g/L de proteína. A los fines de determinar el efecto de la concentración sobre la actividad antitrombótica fueron realizadas distintas diluciones de las muestras desde 1,00 a 2,00 g/L de proteína.

Para las determinaciones de TT, TP y KPTT se usaron kits comerciales Wiener Lab.

**a) TT** : se prepararon las muestras a ensayar mezclando 150  $\mu$ L de plasma humano y 50  $\mu$ L de hidrolizado, digerido de hidrolizado, ultrafiltrado o buffer (blanco) en tubos de hemólisis. Se realizó la técnica indicada en punto 3.1.6.1.

**b) TP** : se prepararon las muestras a ensayar mezclando 75  $\mu$ L de plasma humano y 25  $\mu$ L de hidrolizado, digerido de hidrolizado, ultrafiltrado o buffer (blanco) en tubos de hemólisis. Se realizó la técnica indicada en punto 3.1.6.1.

**c) KPTT** : se mezcló plasma humano (75  $\mu$ L) con 25  $\mu$ L de sobrenadante obtenido luego de disolver cada muestra (hidrolizado, hidrolizado digerido, fracciones ultrafiltradas) en el buffer de ensayo, o el mismo volumen de buffer sin muestra (blanco) y se incubó por 1 min a 37 °C. Luego se procedió según lo indicado en el punto 3.1.6.1.

#### **3.2.6.2- Actividad hipoglucemiante de péptidos de HM**

**Ensayos de inhibición de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa:** se realizó de acuerdo a Donkor *et al* (2012) y Kim *et al* (2011), respectivamente. Las muestras fueron evaluadas a una concentración de proteína de 4 g/L. Como control se utilizó una solución sin agregado de muestra y como blanco se usó una solución sin el agregado de sustrato. La inhibición de cada enzima fue calculada como se describió en el punto 3.1.6.2.

Para determinar la concentración de muestra que causa una inhibición del 50% de la actividad de cada enzima se realizaron diluciones seriadas de 0 a 4 g/L de proteína y se procedió como se describió en el punto 3.1.6.2. Todas las determinaciones se procesaron por triplicado.

### **3.2.6.3-Actividad antioxidante de hidrolizados de HM**

a) **Ensayo de PR** : fue determinado de acuerdo a lo descrito en el punto 3.1.6.3. El poder reductor de AF, PF, AFD y PFD fue expresado como mg de equivalentes de AA/g proteína, usando una curva de diferentes soluciones de concentraciones de AA (0 – 0,0564 mg/mL) en buffer fosfato. Las muestras fueron evaluadas a 3,00 g/L de proteína. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

b) **Inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> y TEAC**: Se utilizó la técnica que se describe en el punto 3.1.6.3. Para determinar la concentración que logra la inhibición IC<sub>50</sub> se practicaron diluciones seriadas de las muestras desde 0,00 a 2,00 g/L de proteína. Todas las determinaciones se procesaron por triplicado.

### **3.2.6.4 - Evaluación de capacidad anti-hipertensiva**

La actividad inhibitoria de la ECA-I fue determinada de acuerdo al procedimiento indicado en el punto 3.1.6.4. Para determinar la concentración IC<sub>50</sub> se practicaron diluciones seriadas de la muestra desde 0,00 a 7,00 g/L de proteína. Todas las determinaciones se procesaron por triplicado.

## **3.3- Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de ANOVA de un factor, y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de LSD (*least significant difference*) ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el software Statgraphic Centurion XV 15.2.06, excepto en las determinaciones de propiedades anticoagulantes de las macroalgas y de la FP donde se utilizó además, inicialmente, el software Minitab 14.

## 4 - RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1-Estudio de las propiedades bioactivas de algas *PC* y *U* luego de una DGS.

#### 4.1.1- Composición de las macroalgas

En la Tabla 4.1 se muestra la composición centesimal de las macroalgas estudiadas. Los valores obtenidos están dentro de lo informado por Cian *et al*, (2013a) y (2018a) para *PC* y para *U* respectivamente.

Tabla 4.1-Composición centesimal de *PC* y *U*

Composición (g /100g bs)	<i>Pyropia columbina</i>	<i>Ulva spp</i>
Proteínas (N x 6,25)	24,61 ± 0,21	27,90 ± 1,40
Cenizas	6,46 ± 0,09	11,00 ± 0,11
Fibra dietaria total	48,02 ± 1,13	28,40 ± 1,16
Lípidos (extracto etéreo)	0,25 ± 0,06	2,10 ± 0,09
Humedad	12,79 ± 0,07	8,80 ± 0,50

X ± DE, bs: base seca.

(Elaborada por C.Botto)

El contenido de proteínas del alga verde (*U*) fue mayor que el del alga roja (*PC*). Es conocido que el contenido proteico es variable entre las diferentes especies de macroalgas. Harnedy *et al* (2011) informaron para algas rojas contenidos variables de proteínas de 11 a 47 g/100 g, siendo para *Pyropia sp* de 24 a 50 g/100 g bs. En algas verdes, informaron contenidos entre 9 y 26 g/ 100 g bs, mientras que para *U* se reportó de 15 a 25 g/100 g bs, valores que resultan distintos a los hallados en este estudio. Fajardo (1998) informó un contenido de 30 g/100 g bs para las proteínas de algas del género *Pyropia*.

Otros investigadores indicaron que en general, las algas marrones presentan de 3–15 g/100 g bs de proteínas, un valor menor que el encontrado para algas verdes y rojas (10–47 g/100 g bs). Además agregan que es sabido que el contenido de proteínas tiene variación estacional, y se han reportado para *Palmaria palmata* (alga roja) valores

máximos de aproximadamente 21 g/100 g bs en los períodos de invierno-primavera y menores niveles (12 g/100 g bs) durante el verano-otoño (Lordan *et al*, 2011).

Gómez Ordoñez (2013) estudió las macroalgas de la costa española (Porto-Muiños, Cambre, Coruña, España), e informó valores de proteínas para algas rojas y pardas entre 10,9 y 25,7 g/100 g bs, indicando que el alto contenido proteico de las algas rojas las ubican como una importante fuente de proteínas.

El contenido proteico del alga roja es comparable con el de los granos de soja (Cian *et al*, 2015a).

Los valores de fibra dietaria total se encuentran dentro de los rangos reportados para otras especies de algas. La fibra es la fracción mayoritaria tanto en las algas pardas (30,23-37,42 g/100 g peso seco) como en las rojas (29,31-31,7 g/100 g). Valores similares de fibra total se han obtenido en otras especies de algas pardas como Wakame (33,58 g/100 g) y Laminaria spp. (36,12 g/100 g) e incluso valores mayores de hasta un 50% en *Fucus* spp. o en *Himanthalia* spp. (50,3 g/100 g bs) y de 60,0 g/100 g bs en el alga roja *Grateloupia turuturu* (Gomez Ordoñez, 2013). Otros autores informaron que el contenido de fibra dietaria total de las algas varía entre 29,3-62,3 g/100 g bs, porcentaje mayor que el contenido de fibra de la mayoría de las frutas y vegetales (Lordan *et al*, 2011). Fajardo (1998) informó un contenido de fibra dietaria total de 39 a 54% para algas del género *Pyropia* siendo un 39 a 53 % de éstas con la característica de fibra soluble.

El contenido de cenizas resultó la tercera fracción mayoritaria, continuando en orden a fibra alimentaria y proteínas. Cabe destacar que estas algas fueron lavadas con agua potable previo a su secado, eliminando de esta manera el agua de mar. El contenido de cenizas totales en las algas rojas y pardas puede constituir la segunda fracción mayoritaria después de la fibra alimentaria (de 25 a 36 g/100 g bs). Otros vegetales terrestres tienen un contenido de cenizas que no supera el 10 % en peso seco. Altos valores se han reportado para otras especies de algas marinas comestibles como por ejemplo en el alga Wakame (39,8 g/100 g bs) o en Nori (21 g/100 g bs). El elevado contenido de cenizas en las algas marinas es debido a su gran riqueza mineral. La presencia tanto de cationes (sodio, potasio, calcio, magnesio), como de aniones (cloruro, sulfato, fósforo, etc.) les permiten crecer en un medio con una elevada fuerza iónica, como es el medio marino. Los procesos de osmorregulación en las algas marinas se

deben principalmente al intercambio iónico de sodio, potasio y cloro (Gómez Ordoñez, 2013).

Respecto al contenido de lípidos, los valores de grasa bruta hallados para *PC* fueron menores que los de *U* y fueron coincidentes con los bajos valores reportados para macroalgas. Es conocido que el contenido de lípidos de las macroalgas es reducido, alrededor de 0,3 a 0,9 g/100 g bs, excepto en *Bifurcaria* (alga marrón) que presentó un contenido de 5,6 g/100 g bs (Gomez Ordoñez, 2013). Se ha reportado que la fracción lipídica de macroalgas representa sólo el 1-5 %, por lo que su contribución como fuente de energía alimentaria pareciera ser baja (Lordan *et al.*, 2011).

#### 4.1.2- Caracterización de fracciones digeridas de algas

El contenido de sólidos y proteínas de FP fue  $1,21 \pm 0,01$  g/100g y  $0,47 \pm 0,00$  g/100g, respectivamente. Además, la relación proteínas/sólidos fue de  $38,7 \pm 0,2$  %. Al respecto, Cian *et al.* (2015b) reportó una relación proteínas/sólidos similar, siendo la misma de  $36,4 \pm 0,1$  %. El contenido de proteínas de las fracciones solubles de los digeridos y de los dializados se muestra en el Tabla 4.2.

Tabla 4.2-Contenido de proteínas de las fracciones digeridas y dializadas

<b>Fracciones digeridas</b>	<b>Contenido de proteínas (mg/mL)</b>
<i>PC</i>	$6,56 \pm 0,84$
<i>U</i>	$3,57 \pm 0,82$
FP	$2,48 \pm 0,09$
<b>Fracciones dializadas</b>	<b>Contenido de proteínas (mg/mL)</b>
<i>PC</i>	$2,63 \pm 0,32$
<i>U</i>	$2,81 \pm 0,09$
FP	$2,18 \pm 0,12$

X ± DE.

(Elaborada por C.Botto)

Teniendo en cuenta el contenido de proteínas de las algas, luego de la DGS se solubilizaron y dializaron el  $8,67 \pm 1,34 \%$ , el  $8,14 \pm 0,19 \%$ , y el  $11,8 \pm 1,9 \%$  de las proteínas del alga roja, verde y la FP, respectivamente. Respecto a los digeridos, se solubilizaron  $74,2 \pm 9,1 \%$ ;  $28,9 \pm 7,3 \%$  y  $88,2 \pm 3,0 \%$  de las proteínas del alga roja, verde y la FP. Puede observarse que el contenido de proteínas de la fracción soluble del digerido y del dializado de FP fue mayor que el obtenido para PC y U. Esto podría estar asociado con el tipo de matriz sometida a la DGS. Para el caso de las algas, la fibra presente en las mismas podría estar afectando el proceso proteolítico de las enzimas gastrointestinales, lo que se traduce en una menor solubilización peptídica respecto a FP.

El contenido de AL y la estimación del PCL de las fracciones digeridas y dializadas se muestran en la Tabla 4.3

Tabla 4.3- Contenido de AL y PCL de las fracciones digeridas y dializadas

<b>Fracciones digeridas</b>	<b>Aminos libres (mEq/L)</b>	<b>PCL</b>
PC	$44,02 \pm 4,83^a$	$3,44 \pm 0,92^b$
U	$37,83 \pm 1,88^a$	$2,49 \pm 0,81^{ab}$
FP	$24,71 \pm 0,71^b$	$0,86 \pm 0,03^a$
<b>Fracciones dializadas</b>	<b>Aminos libres (mEq/L)</b>	<b>PCL</b>
PC	$19,71 \pm 2,48^b$	$1,14 \pm 0,02^a$
U	$11,80 \pm 0,75^a$	$1,92 \pm 0,11^b$
FP	$16,90 \pm 0,19^b$	$1,11 \pm 0,03^a$

X  $\pm$  DE. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por C.Botto)

Respecto al contenido de AL, el dializado de U presentó los menores niveles de grupos AL, aunque para los digeridos de U y PC no hubo diferencias significativas. Al considerar el PCL que es una medida muy amplia de la distribución de péptidos de diferentes tamaños, los valores de la fracción dializada de U fueron mayores que el resto

y la fracción digerida de FP fue menor que la fracción digerida de PC. Esto indicaría que en principio las proteínas del alga roja PC serían más digeribles que las del alga verde U y a su vez que las proteínas de la FP son más digeribles que las del alga roja PC.

Por otra parte, las algas rojas poseen aminoácidos relacionados a micosporinas (Harnedy y Fitzgerald, 2011), lo que también podría estar relacionado con el mayor contenido de grupos AL de la FP y de algas rojas en relación al alga verde.

#### 4.1.3- Propiedades bioactivas luego de la DGS

Las propiedades se estudiaron sobre las fracciones dializadas de las muestras, que representan la fracción bio-accesible y potencialmente absorbible, y en las fracciones remanentes (digeridas) cuando la actividad se ejerce a nivel intestinal.

##### 4.1.3.1- Propiedades anticoagulantes y antitrombóticas

En la Figura 4.3 se muestran los resultados de la prueba TT en dializados de PC, U y de la FP. Se observaron diferencias significativas entre las muestras ( $P = 0,0113$ ). La FP y el alga verde presentaron mayores TT respecto al control. Esta prueba mide la vía común de la coagulación, y corresponde a los últimos pasos de la cascada proteica donde la trombina estimula el paso de fibrinógeno a fibrina.

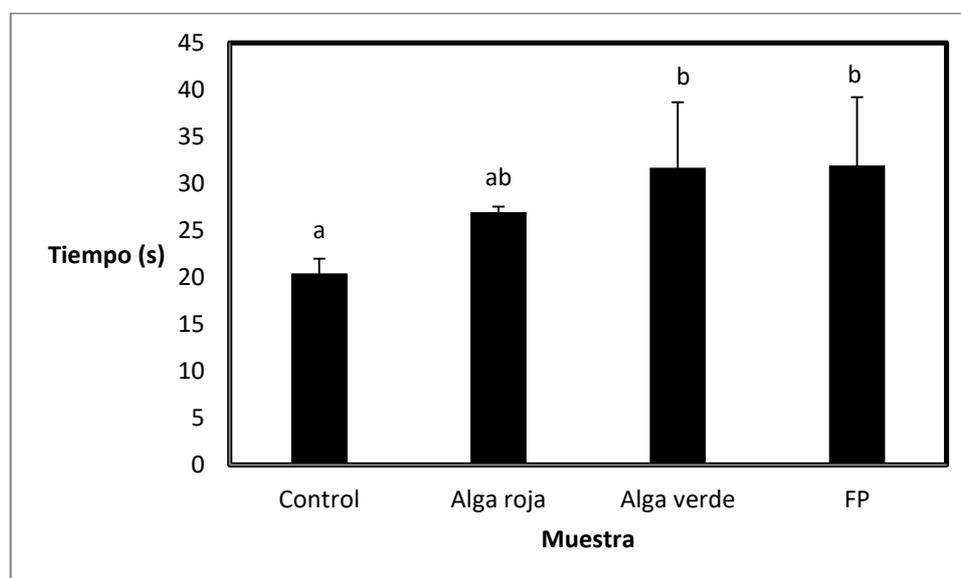


Figura 4.3- Prueba TT ensayada con pool de plasma preincubado con dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Muestras control: plasma normal al que se agregó solución fisiológica en la misma proporción que fueron agregadas los dializados. Distintas letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por: C. Botto)

Los péptidos de los dializados del alga verde y de la FP podrían prolongar este tiempo y esta acción se realizaría a nivel sistémico. Sabbione (2014) también demostró TT prolongados en ensayos con el agregado de diferentes hidrolizados proteicos de amaranto luego de una DGS.

En la Figura 4.4 se muestran los resultados de la prueba TP. Puede observarse que hubo diferencias significativas de todas la muestras con respecto al control ( $P = 0,0060$ ), pero no entre las muestras evaluadas. Las fracciones bioaccesibles (dializados) evaluadas prolongaron el TP. Sabbione (2014) también observó que diferentes péptidos e hidrolizados proteicos de amaranto lograron prolongar el TP.

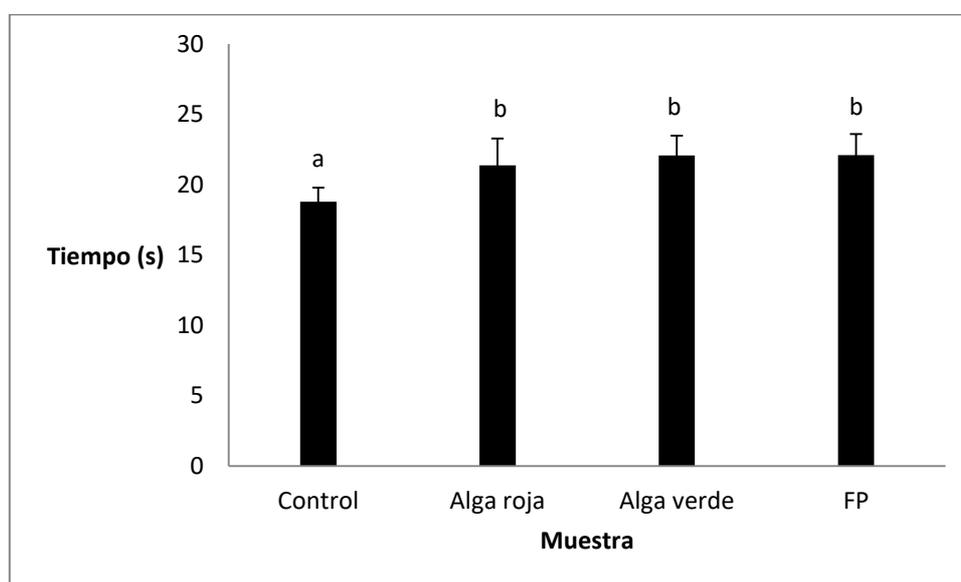


Figura 4.4- TP ensayada con pool de plasma preincubado con dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Muestras control: plasma normal al que se agregó solución fisiológica en la misma proporción que fueron agregadas los dializados. Distintas letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por: C. Botto)

En la Figura 4.5, que se presenta a continuación, se muestran los resultados de la prueba KPTT. Se observaron diferencias significativas entre las muestras de FP y de alga verde respecto a la muestra control ( $P = 0,0200$ ). Los dializados de alga roja no obtuvieron valores de P significativos. Por lo tanto se observa entonces que la FP y el alga verde prolongaron el KPTT respecto al control. También Sabbione (2014), observó prolongación de KPTT en hidrolizados de amaranto luego de DGS (utilizando pepsina y pancreatina).

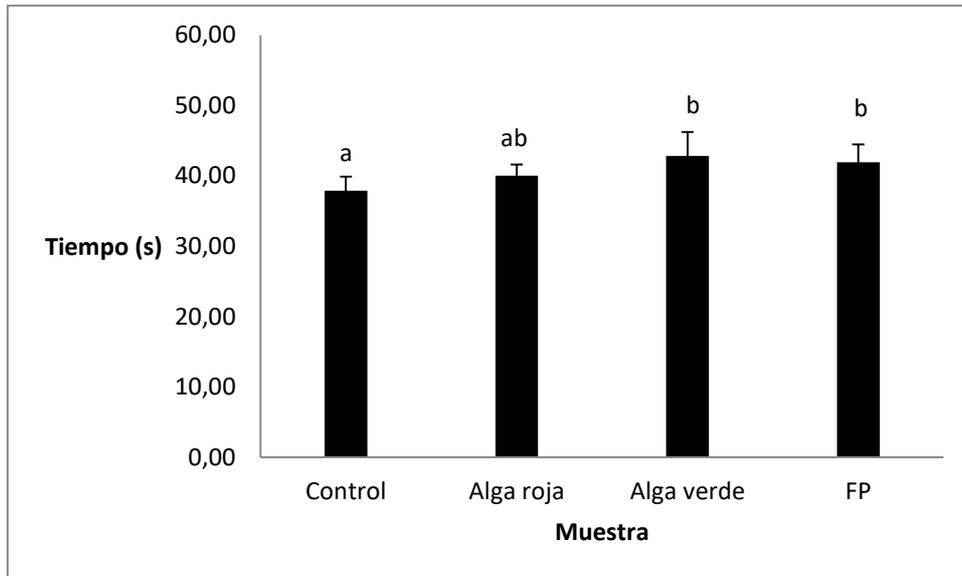


Figura 4.5- Prueba KPTT ensayada con pool de plasmas preincubado con dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Muestras control: plasma normal al que se agregó solución fisiológica en la misma proporción que fueron agregadas los dializados. Distintas letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por C. Botto)

Respecto a la prueba de inhibición en la formación de Fibrina (Figura 4.6), se observaron diferencias significativas en las muestras de alga verde y FP ( $P = 0,0002$ ).

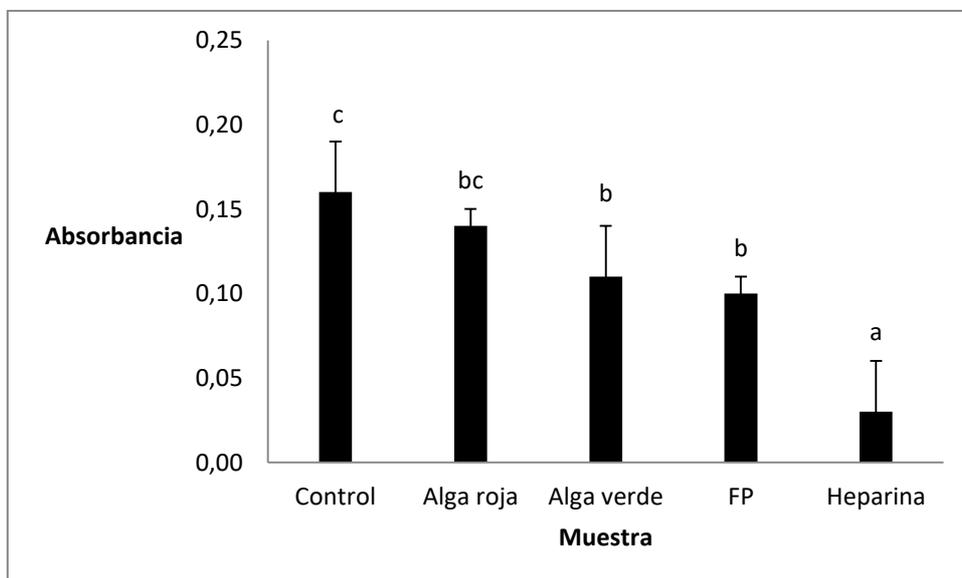


Figura 4.6- Formación de Fibrina en microplaca ensayada con pool de plasma preincubado con dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Muestras control: plasma normal al que se agregó solución fisiológica en la misma proporción que fueron agregadas los dializados; H: muestra con agregado de heparina. Distintas letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por C. Botto)

Las muestras FP y alga verde inhibieron la formación de fibrina respecto al control, pero su efecto fue menor al efecto logrado por el anticoagulante heparina. Esta prueba demuestra la posibilidad de formación del coágulo de fibrina y se pone en evidencia a través de la disminución de absorbancia que provoca el coágulo. Estos resultados se corresponden con aquellos del TT, prueba que también valora las reacciones finales de la formación de fibrina.

A través de los diferentes ensayos se pudo determinar que luego de una DGS las muestras de alga verde y la FP presentaron péptidos bio-accesibles con propiedades antitrombóticas.

Las macroalgas están siendo estudiadas en cuanto a su capacidad anticoagulante y antitrombótica con los fines de conseguir reemplazos para las actuales terapias anticoagulantes (heparina, anticumarínicos). Pandian (2016) estudió la actividad de extractos de cloroformo a partir del alga roja *Acanthaphora spicifera* logrando valores de tiempos prolongados en las pruebas de TT, TP y KPTT. De Lara-Isassi *et al*, (2004) determinaron la actividad anticoagulante de 49 especies de algas recolectadas en el Golfo de México y Mar Caribe Mexicano. Las pruebas TT y TP se realizaron con plasmas humanos adicionados con fracciones solubles de extractos de las algas estudiadas. Cuatro especies, *Anadyomene stellata*, *Caulerpa cupressoides* (Chlorophyta), *Lobophora variegata* (Phaeophyta) y *Liagora farinosa* (Rhodophyta), mostraron potente acción anticoagulante, con valores comprendidos en el rango obtenido con heparina, en las dos pruebas estudiadas (TT y TP). Sin embargo, en dicho estudio no se indicó las potenciales moléculas responsables de dicha actividad.

#### **4.1.3.2- Propiedades hipoglucemiantes o antidiabetogénicas**

La evaluación de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa se realizó sobre los digeridos, mientras que la inhibición de la DPP-IV se realizó sobre los dializados, obtenidos luego de la DGS.

Los resultados indicaron que los péptidos obtenidos de la fracción soluble de los digeridos del alga roja, del alga verde y de la FP no ejercieron inhibición sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Cabe aclarar que esta enzima actúa a nivel digestivo en la boca (durante la masticación) y en el duodeno, por ello esta prueba se realizó con las fracciones digeridas de las muestras.

En la Figura 4.7 se muestra la gráfica de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por parte de los péptidos estudiados. Los resultados indicaron una alta actividad inhibitoria de más del 50%, para todas las muestras evaluadas.

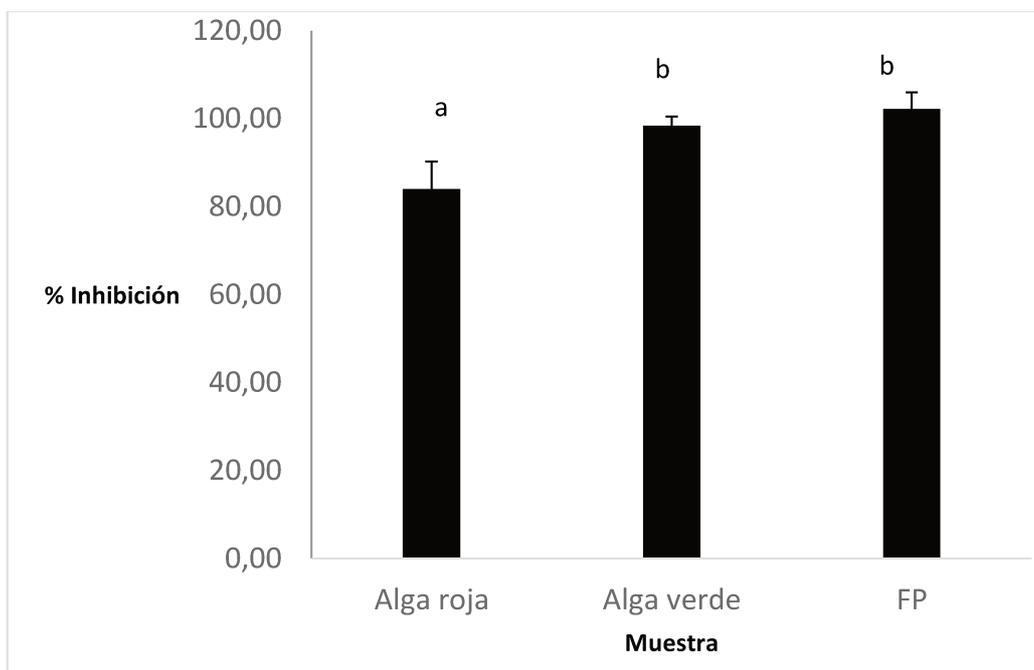


Figura 4.7- Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Ensayo realizado con la fracción soluble de digeridos luego de la DGS del alga roja, de la FP del alga roja y del alga verde. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por C. Botto)

Tabla 4.4-Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa

Digeridos	$IC_{50}$ (mg/mL)
PC	$2,76 \pm 0,19^c$
U	$0,52 \pm 0,01^b$
FP	$0,33 \pm 0,01^a$

$X \pm DE$ . Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ).

(Elaborado por C. Botto)

Los péptidos de la FP mostraron la mayor capacidad de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa respecto al alga roja y al alga verde, según lo observado en Tabla 4.4.

El ensayo de inhibición de la enzima DPP-IV se realizó sobre los dializados de las muestras digeridas. Como se mencionó anteriormente, esta enzima participa en la regulación de la glucosa plasmática, actuando en diferentes tejidos del organismo. Por lo tanto, los péptidos dializados durante la DGS serían bio-accesibles y potencialmente absorbibles, pudiendo pasar a circulación sanguínea para ejercer su actividad sobre dicha enzima, modificando indirectamente la glucemia. Los resultados de la inhibición de la enzima DPP-IV se muestran en la Figura 4.8

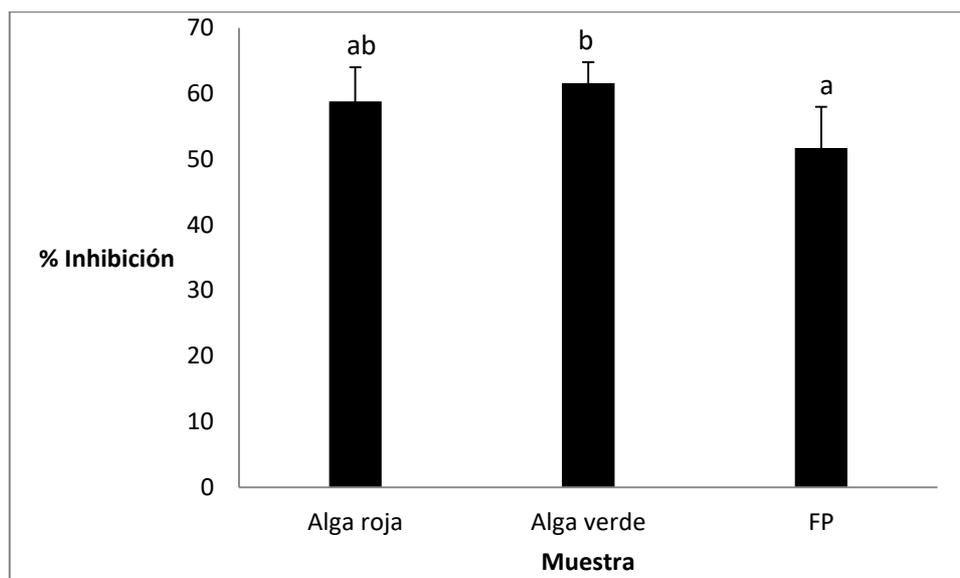


Figura 4.8- Inhibición de la enzima DPP-IV. Ensayo realizado con la fracción de dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborado por C. Botto)

Los valores hallados estuvieron en torno al 50% de la inhibición de la enzima. Por este motivo, no se realizó la cuantificación de  $IC_{50}$ , correspondiendo para dichas inhibiciones valores de concentración proteica de 4,16; 4,38 y 3,61 mg/mL para alga roja, alga verde y FP, respectivamente. Harnedy y FitzGerald (2011) reportaron péptidos obtenidos por hidrólisis con efecto hipoglucemiante provenientes del alga *Pyropia yesoensis*. Asimismo, se ha informado que los polisacáridos obtenidos de algas rojas y verdes, tales como carragenanos y porfiranos, poseen actividad hipoglucemiante e hipolipemiante (Pereira, 2018).

Los hipoglucemiantes orales se encuentran agrupados según su principal mecanismo de acción en: secretagogos de insulina, reductores de la producción hepática de glucosa, sensibilizadores de la insulina e inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (Herrera Chalé, 2014). En el caso de los péptidos obtenidos de muestras de

algas se pudo observar que ejercen su efecto hipoglucemiante a través de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y DPP-IV, disminuyendo la absorción intestinal de glucosa y favoreciendo la secreción de insulina, respectivamente.

#### 4.1.3.3- Propiedades antioxidantes

Esta actividad fue evaluada en los digeridos y dializados que se obtuvieron luego de la DGS de muestras de algas. Podría considerarse que los efectos antioxidantes de los digeridos se ejercerían a nivel local o tracto gastrointestinal, mientras que aquellos de los dializados, que corresponden a compuestos de menor peso y tamaño molecular, podrían ejercerse a nivel sistémico. En la Figura 4.9 se muestran los resultados obtenidos para el PR.

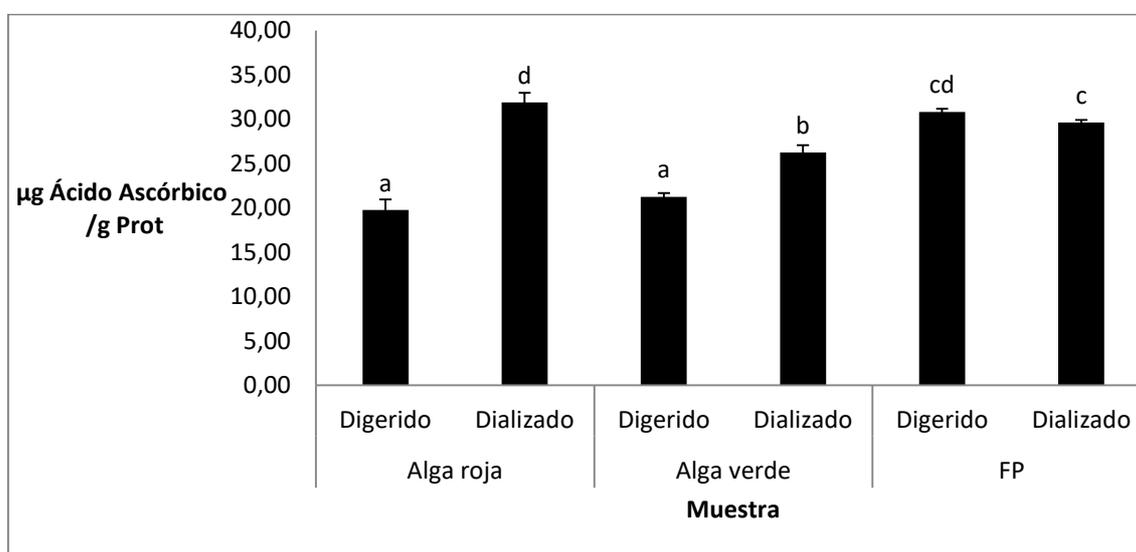


Figura 4.9- PR. Ensayo realizado con la fracción soluble de digeridos y con los dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborado por C. Botto)

La fracción dializada del alga roja presentó mayor poder reductor que la correspondiente de la FP y del alga verde. Sin embargo, el digerido de la FP presentó mayor PR que los digeridos de las algas. Al respecto, Cian *et al* (2015b) reportaron valores elevados de actividad reductora de péptidos de PC ( $53,8 \pm 0,1 \mu\text{gAA/g prot}$ ). Los autores observaron una mayor actividad reductora en los péptidos obtenidos enzimáticamente a pH alcalino y atribuyeron la misma a un mayor contenido de los aminoácidos Met y Cys, los cuales proveen a los péptidos del par redox S-S/- SH.

Los dializados y la fracción soluble de los digeridos de las muestras de algas no presentaron capacidad de inhibición del radical DPPH. Sin embargo, esta capacidad ha

sido observada por otros investigadores. Al respecto, Sheih *et al.* (2009) purificaron un péptido antioxidante de 1,3 kDa, inhibidor de la actividad del radical DPPH, de un hidrolizado obtenido por tratamiento con pepsina a partir de la porción residual en la fabricación de esencias de la microalga *Chlorella vulgaris* (IC<sub>50</sub> 58 µM). Cian *et al* (2015b) publicaron valores de IC<sub>50</sub>-DPPH de 1,0 ± 0,1 y 1,60 ± 0,1 mg/mL para péptidos obtenidos a partir de *PC* con Alcalasa y Alcalasa + Flavourzyme, respectivamente. Además, reportaron valores de IC<sub>50</sub>-DPPH de 2,1 ± 0,1 mg/mL para una fracción proteica obtenida a partir de *PC*.

En la Figura 4.10 se muestran los resultados de inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>. Puede observarse que la FP presentó menor actividad que el alga verde (*U*) y el alga roja (*PC*), tanto en los dializados como en los digeridos. Esta diferencia podría deberse a la presencia de otros compuestos con propiedades antioxidantes en los dializados y digeridos de las algas, tales como compuestos fenólicos, vitaminas, etc.

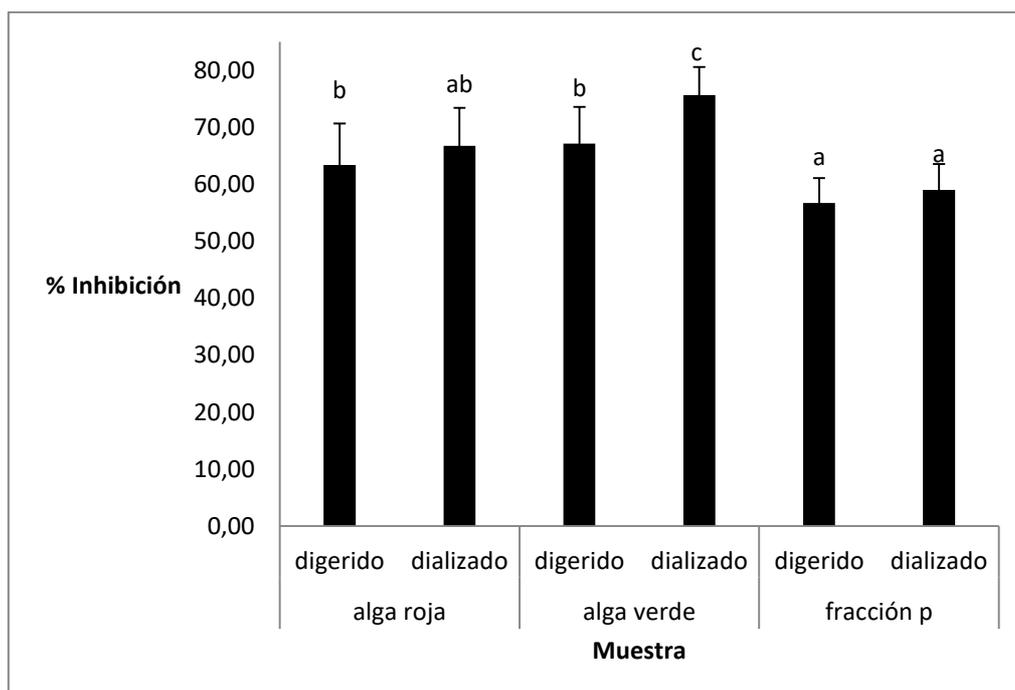


Figura 4.10- Inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>. Ensayo realizado con la fracción soluble de digeridos y con los dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (P < 0.05). (Elaborado por C. Botto)

Dado que todas las muestras presentaron inhibición superior al 50% se realizó la determinación de la IC<sub>50</sub> (Tabla 4.5)

Tabla 4.5-Valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>

<b>Dializados</b>	<b>IC50 (mg/mL)</b>
<i>PC</i>	1,37 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>U</i>	0,81 ± 0,01 <sup>a</sup>
FP	1,62 ± 0,03 <sup>c</sup>
<b>Digeridos</b>	<b>IC50 (mg/mL)</b>
<i>PC</i>	3,11 ± 0,13 <sup>d</sup>
<i>U</i>	0,86 ± 0,04 <sup>a</sup>
FP	1,55 ± 0,01 <sup>c</sup>

X ± DE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (P < 0.05).

(Elaborada por C. Botto)

Se observa que el alga verde en sus fracciones dializadas y digeridas presentó la mayor capacidad antioxidante (menor valor de IC<sub>50</sub>) seguida por la fracción potencialmente bioaccesible (dializado) de alga roja.

Cian *et al* (2015b) han reportado actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup> de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática simple (A) y secuencial (A+ F) a partir de *PC*. Sheih *et al* (2009) también informaron inhibición de ABTS<sup>+</sup> por parte de hidrolizados obtenidos con pepsina a partir de residuos proteicos del alga *Chlorella vulgaris*. Estos autores identificaron el péptido más activo frente al radical, siendo su secuencia VECYGPNRPF. Además, se han aislado péptidos inhibidores del radical ABTS<sup>+</sup> a partir de hidrolizados de algas rojas obtenidos con distintas proteasas (Admassu *et al*, 2018).

#### 4.1.3.4- Propiedad antihipertensiva

La propiedad antihipertensiva se estimó a través de la inhibición de la enzima ECA-I. Este ensayo se realizó sobre las fracciones dializadas de las muestras evaluadas. En la Figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos para los dializados de alga roja, alga verde y FP.

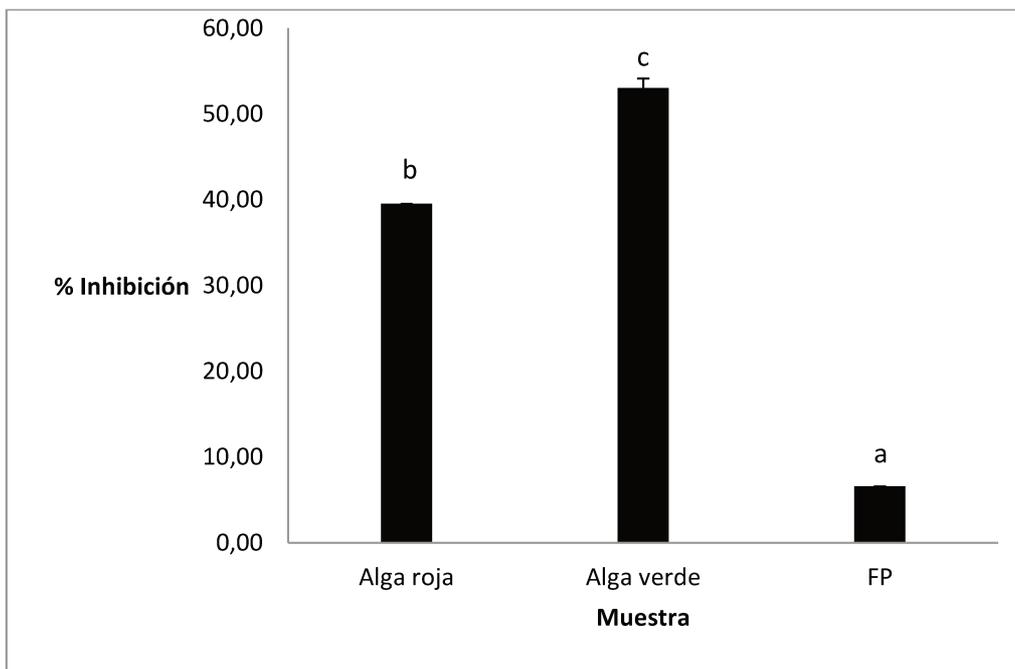


Figura 4.11- Actividad inhibidora de la ECA-I. Ensayo realizado con los dializados luego de la DGS del alga roja, de la FP y del alga verde. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Figura elaborada por C. Botto)

Como se puede observar, las fracciones dializadas del alga roja y del alga verde mostraron mayor capacidad inhibitoria frente a ECA-I. Por tal motivo, se evaluó la  $IC_{50}$  de dichos dializados (Tabla 4.6). Sorprendentemente, el alga roja mostró mayor potencia inhibitoria frente a ECA-I, pese a mostrar menor inhibición que el alga verde. Esto puede estar asociado al mecanismo de inhibición de los compuestos presentes en cada dializado.

Tabla 4.6-Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la ECA-I

Dializados	$IC_{50}$ ( $\mu g$ )
<i>PC</i>	$94,3 \pm 0,2^b$
<i>U</i>	$73,3 \pm 1,4^a$
FP	NA

$X \pm DE$ . Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). NA: no activa. (Tabla elaborada por C. Botto)

Si bien los productos de digestión bioaccesibles del alga roja presentaron inhibición de la ECA-I, no se observó esta actividad para los péptidos generados por la digestión gastrointestinal de su fracción proteica. Sin embargo, Cian *et al* (2015b)

observaron altos valores de inhibición de ECA-I por parte de péptidos de *PC* obtenidos por hidrólisis de la fracción proteica de esta alga con A y Neutrasa, siendo más activos los péptidos generados por la proteasa alcalina. Estas diferencias podrían deberse a las distintas especificidades de corte de las enzimas digestivas frente a las comerciales provenientes de microorganismos, lo que se traduce en la generación de péptidos con secuencia y tamaño diferentes.

Asimismo, Sheih *et al* (2009) obtuvieron péptidos del alga verde *Chlorella vulgaris* usando diferentes proteasas (pepsina, papaína, A y F) y observaron mayor inhibición de ECA-I con los hidrolizados obtenidos con la enzima A. Hayes y Brijesh (2015) reportaron al pentapéptido AKYSY proveniente del alga roja *Pyropia yezoensis* como el responsable de la inhibición de ECA-I en su estudio sobre las propiedades bioactivas de péptidos obtenidos de fuentes alimenticias.

#### 4.1.4- Conclusiones parciales, muestras de algas.

Los péptidos bio-accesibles obtenidos de la DGS de *U* y de la FP prolongaron los parámetros de coagulación medidos en las pruebas TT, TP y KPTT, mientras que los péptidos solubles obtenidos de la DGS de *PC* prolongaron sólo el TP. Los péptidos bio-accesibles obtenidos de *U* y de la FP mostraron además actividad inhibitoria de la formación de fibrina en placa. Estos resultados indicarían que la digestión gastrointestinal podría generar compuestos bioactivos y bio-accesibles con actividad anticoagulante a partir del consumo de estas algas.

Respecto a la actividad hipoglucemiante no pudo demostrarse actividad inhibitoria de los productos de digestión sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, se observó actividad inhibitoria en los digeridos de las algas *PC* y *U*, y de la FP, sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, presentando mayor actividad los digeridos del alga verde y los de la FP. Estos resultados sugieren una potencial actividad hipoglucemiante ejercida en el tracto digestivo. En relación a la inhibición de la enzima DPP-IV, se observó una actividad inhibitoria por parte de los compuestos potencialmente absorbibles de las tres muestras evaluadas, de alrededor del 50%.

Respecto a la actividad antioxidante, se observó una marcada inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> por parte de las fracciones digeridas y dializadas del alga verde. Las restantes muestras estudiadas también presentaron actividad antioxidante, aunque en menor medida.

Los compuestos bioactivos potencialmente absorbibles de *PC* y *U* consiguieron inhibir la actividad de ECA-I en aproximadamente 50%. Sin embargo, no se demostró actividad inhibitoria por parte de la fracción potencialmente absorbible de FP.

## 4.2- Estudio de las propiedades bioactivas de hidrolizados de HM, luego de una DGS.

### 4.2.1-Composición de la HM

En la Tabla 4.7 se muestra la composición centesimal de la HM utilizada. Los valores obtenidos están dentro de lo informado por Proaño *et al* (2020), para otra partida de HM provista por la cervecería Santa Fe. Además, el contenido de proteínas de HM fue similar al reportado por Robertson *et al* (2010).

Tabla 4.7-Composición centesimal de HM

Composición (g /100g bs)	
Proteínas (N x 6,25)	24,64 ± 0,82
Cenizas	4,20 ± 0,01
Fibra dietaria total	60,77 ± 2,39
Lípidos (extracto etéreo)	8,57 ± 0,02
Humedad	81,08 ± 0,45

X ± DE, bs: base seca. (Elaborado por C. Botto)

### 4.2.2- Caracterización de los hidrolizados y sus fracciones

El GH de AF y PF fue  $17,1 \pm 0,5 \%$  y  $11,4 \pm 0,7 \%$  respectivamente. Valores semejantes de GH fueron hallados por Connolly *et al* (2014b) en su estudio de las propiedades tecno-funcionales de hidrolizados de HM obtenidos con diferentes sistemas enzimáticos (A, CorolasaPP, F, y Promod 144MG). Niemi *et al.* (2013) reportaron que la enzima A (una proteasa alcalina) fue más eficiente al solubilizar 35% de las proteínas de la HM a pH 9.5 durante 4 h, mientras que con proteasas neutras y ácidas, la solubilización alcanzó sólo un 14%.

La composición elemental correspondiente a las diferentes fracciones: hidrolizados AF y PF y sus digeridos AFD y PFD, se muestra en la Tabla 4.8.

Los mayores niveles de contenido proteico y GH del sistema AF pueden ser atribuidos a la enzima A y al pH en el que se realizó la hidrólisis.

Tabla 4.8-Composición elemental correspondiente a las diferentes fracciones (hidrolizados AF y PF) y sus digeridos (AFD y PFD)

Componentes (g 100/ g bs)	AF	PF	AFD	PFD
C	40,6 ± 0,3b	40,8 ± 0,3b	29,5 ± 0,2a	28,9 ± 0,1a
H	10,4 ± 0,1b	10,1 ± 0,1b	6,9 ± 0,1a	7,0 ± 0,1a
N	8,6 ± 0,2 c	8,0 ± 0,2b	5,9 ± 0,1a	5,8 ± 0,2a
Proteína (N x 6,25 g protein/ g N)	48,3 ± 1,0c	45,0 ± 1,0b	33,2 ± 0,3a	32,6 ± 1,0a

X ± DE, bs: base seca. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por C. Botto)

Además, se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas entre las muestras hidrolizadas y sus correspondientes digeridos (fracción soluble), indicando que no toda la proteína es solubilizada por el proceso de DGS.

#### 4.2.3- Propiedades bioactivas de los hidrolizados

##### 4.2.3.1- Actividad anticoagulante y antitrombótica

En la Figura 4.12 se muestra comparativamente los TT de los hidrolizados y sus digeridos. Los resultados obtenidos indican que todas las muestras tuvieron el efecto de retrasar el TT respecto al control. La digestión gastrointestinal aumentó el TT de AFD y PFD en 98 y 90% respectivamente, siendo significativamente diferentes a los obtenidos con AF y PF (42 y 34%), respectivamente.

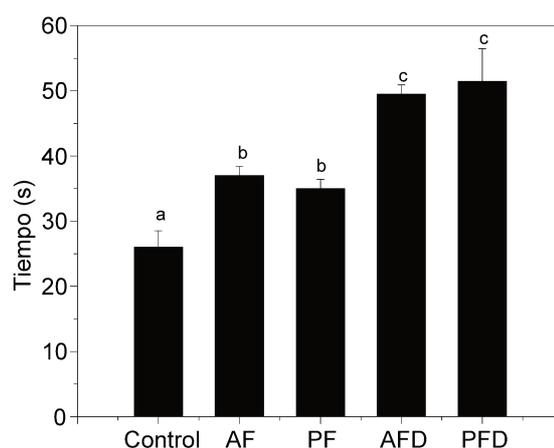


Figura 4.12-Prueba TT de hidrolizados (AF, PF) y de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados (AFD, PFD). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R. Cian)

Rojas-Ronquillo *et al* (2012) estudiaron el efecto de las enzimas gástricas pepsina y tripsina sobre la propiedad antitrombótica de los péptidos liberados de la caseína bovina por *Lactobacillus casei* Shirota. Descubrieron que cuatro de los siete péptidos evaluados mantuvieron su actividad inhibidora de trombina después de la digestión gastrointestinal. Además, Jung y Kim (2009) determinaron la actividad anticoagulante de los hidrolizados de bivalvos marinos y encontraron que el tetrapéptido Met-Glu-Ala-Pro prolongaba el TT.

En la Figura 4.13 se muestra el gráfico que corresponde a la prueba TT para las fracciones ultrafiltradas de hidrolizados y de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados. Se observó que la actividad anticoagulante evaluada por este test se debe a las fracciones hidrolizadas de peso molecular < 1 kDa, siendo más prolongados los TT de los hidrolizados luego de la DGS.

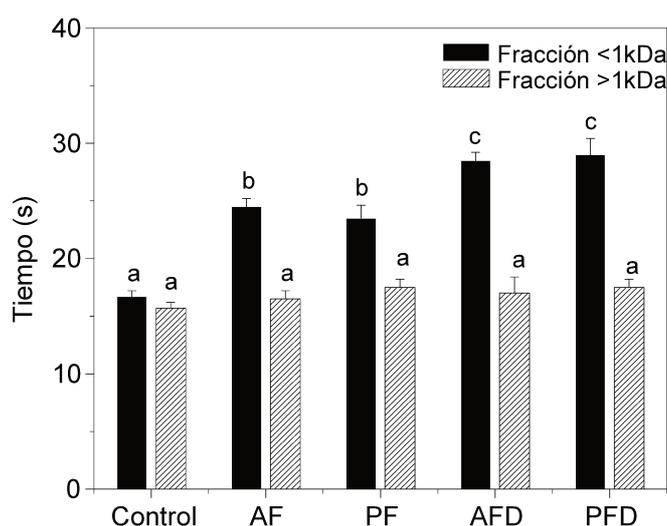


Figura 4.13-TT de las fracciones ultrafiltradas de hidrolizados (AF, PF) y la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados (AFD, PFD). Distintas letras implican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R.Cian).

En la Figura 4.14 se muestra la gráfica para la prueba del TP de los hidrolizados y sus digeridos. Las muestras evaluadas (a 2,00 g/L de proteína) no provocaron cambios en los TP comparativamente con los TP del control. Estos resultados no se contradicen a los obtenidos para el TT, ya que evalúan diferentes vías de la coagulación.

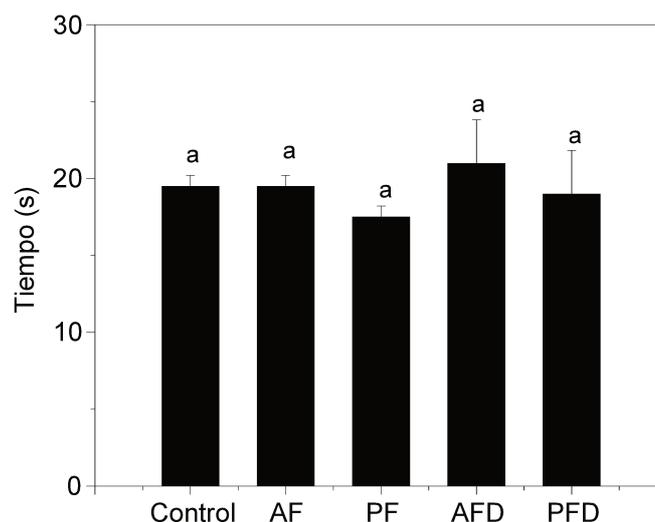


Figura 4.14- TP de hidrolizados AF, PF y la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados (AFD, PFD). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R.Cian).

En concordancia con estos resultados, Sabbione *et al* (2015) reportaron una prolongación del TT producida por hidrolizados proteicos del amaranto pero no observaron efectos sobre el TP a una concentración de proteína de 2,22 g/L.

En la Figura 4.15 se muestran los resultados para el KPTT de los hidrolizados y sus digeridos

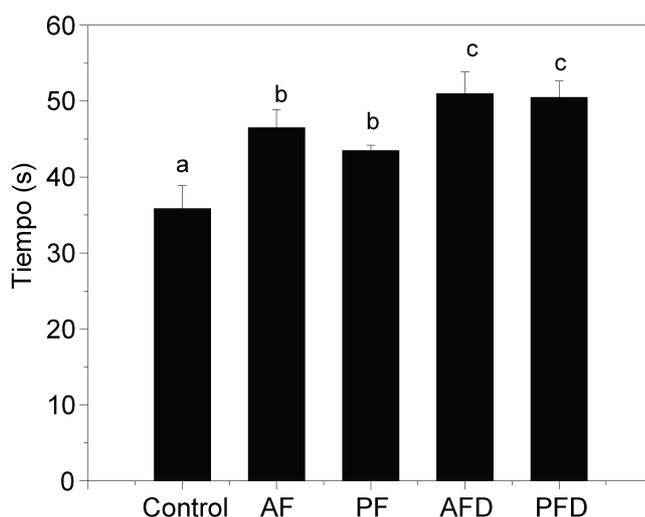


Figura 4.15- Prueba de KPTT de hidrolizados (AF, PF) y la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados (AFD, PFD). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R. Cian)

Las muestras produjeron un alargamiento del KPTT respecto al control. Tanto AFD como PFD mostraron mayor actividad que AF y PF respectivamente ( $p > 0.05$ ). Estos resultados indican que la digestión gastrointestinal con pepsina y pancreatina promueve la generación de nuevos péptidos capaces de prolongar el KPTT.

En la Figura 4.16 se muestra el KPTT de las fracciones ultra-filtradas de hidrolizados y de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados. Se observa que son las fracciones de péptidos con peso molecular menor a 1 kDa las que serían mayormente responsables de esta bioactividad.

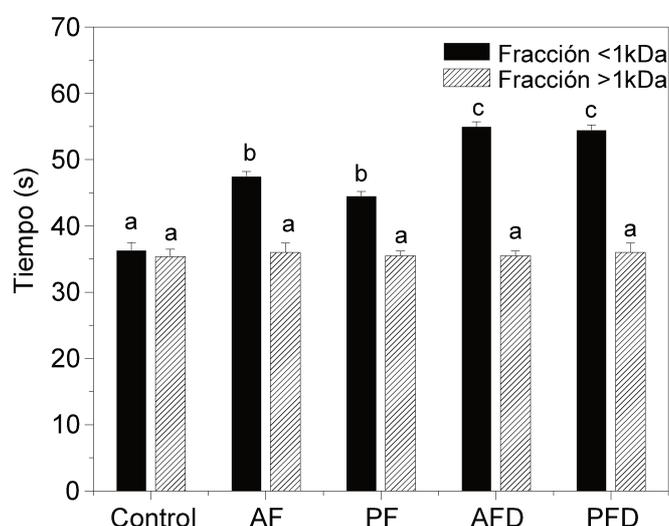


Figura 4.16- Prueba KPTT de las fracciones ultra-filtradas de hidrolizados (AF, PF) y la fracción soluble del digerido gastrointestinal (AFD, PFD). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R. Cian)

Kong *et al.* (2014) aislaron 3 péptidos antitrombóticos a partir de hidrolizados de ciempiés (*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch). La estructura primaria de estos péptidos fue: Phe-Ser-Ala-Pro-Ala-Val-Tyr (753 Da), Ile-Arg-Asp-Leu (515 Da), y Asp-Leu-Asp-His-Tyr-Ser-Phe (985 Da). Estos péptidos aislados prolongaron potentemente el KPTT.

Teniendo en cuenta los tamaños peptídicos mencionados anteriormente y aislados a partir de distintas fuentes proteicas, se podría asumir que la mayor prolongación de los tiempos de TT y KPTT para AFD y PFD se debe a especies de bajo peso molecular (aproximadamente 500 Da), generadas durante la DGS por la acción de la pepsina y pancreatina. Esto se corroboró evaluando las fracciones peptídicas

ultrafiltradas. En este caso, las fracciones de peso molecular menor a 1 kDa tuvieron tiempos de TT y KPTT más largos que aquellos obtenidos con péptidos de peso mayor a 1 kDa.

Los tiempos de coagulación también fueron evaluados utilizando muestras a 1,00 g proteína/L en los ensayos de TT y KPTT. Los resultados fueron similares o idénticos a los obtenidos con 2,00 g de proteína/L, lo que indica una respuesta independiente de ambas concentraciones de proteína.

#### 4.2.3.2– Actividad hipoglucemiante

Los hidrolizados de HM no presentaron capacidad de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, luego de la DGS ambas muestras presentaron actividad. En la Figura 4.17 se muestran los valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados y sus fracciones ultrafiltradas.

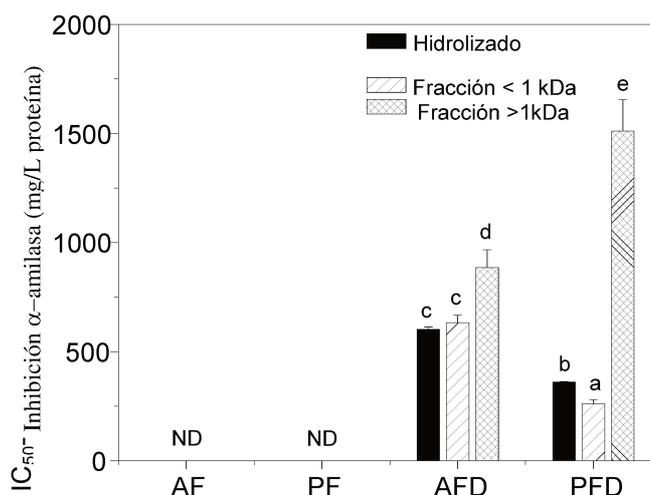


Figura 4.17-Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de los hidrolizados (AFD, PFD) y sus fracciones ultrafiltradas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0.05$ ). (Elaborada por R. Cian).

La pobre actividad inhibitoria de los hidrolizados de HM sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa también fue observada por Connolly *et al* (2014). Estos autores no encontraron diferencias significativas para la inhibición de  $\alpha$ -amilasa entre la HM y sus hidrolizados. Sin embargo en nuestro estudio, los hidrolizados digeridos mostraron actividad inhibitoria. Estos resultados sugieren que la digestión con pepsina y pancreatina

promueve la obtención de nuevos péptidos activos con masa molecular menores a 1 kDa.

Respecto a inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, todas las muestras exhibieron actividad inhibitoria. En la Figura 4.18 se muestran los valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por los hidrolizados, por la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados y sus fracciones ultrafiltradas. Puede observarse que los valores de  $IC_{50}$  para AFD y PFD fueron significativamente menores que los hallados para AF y PF, lo que indica mayor actividad. Entonces, la digestión gastrointestinal *in vitro* incrementó la capacidad de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

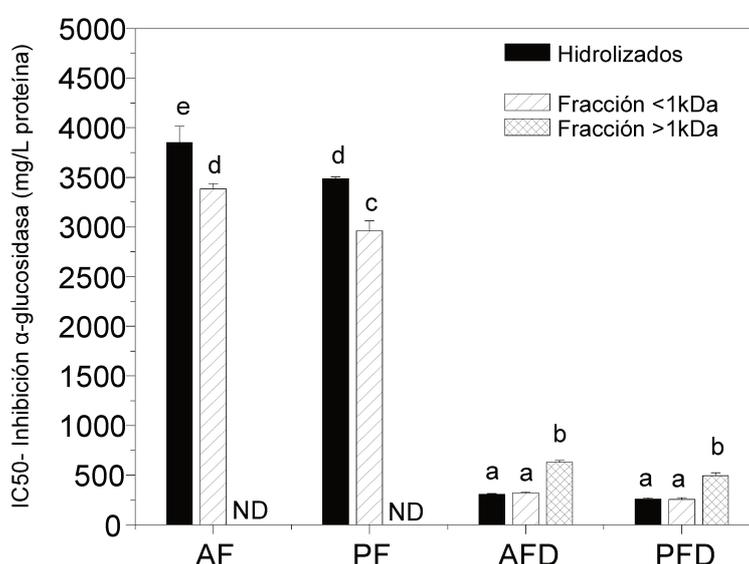


Figura 4.18- Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de los hidrolizados (AF, PF), la fracción soluble del digerido gastrointestinal de dichos hidrolizados y sus fracciones ultrafiltradas (AFD, PFD). Diferentes letra indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ). (Elaborada por R. Cian)

Connolly *et al* (2014) encontraron que digeridos trópticos de las proteínas aisladas de HM produjeron la mayor inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, y atribuyeron dicho efecto a una proteasa específica que libera péptidos con un residuo Arg en el extremo C-terminal. En este trabajo se utilizó pancreatina obtenida de páncreas porcino, la cual contiene diferentes enzimas tales como: tripsina, amilasa, lipasa, ribonucleasa y proteasa. Luego, el efecto positivo de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa puede asociarse a la presencia de nuevos péptidos de bajo

peso molecular generados por la acción de pancreatina sobre los hidrolizados AF y PF. Esto se ve reflejado en los valores de IC<sub>50</sub> hallados para la fracción menor a 1 kDa.

#### 4.2.3.3– Actividad antioxidante

En la Figura 4.19 se muestra la capacidad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup> (expresada como TEAC) y el PR de los hidrolizados y sus digeridos. Como se puede apreciar, todas las muestras exhibieron actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup> y presentaron cifras significativas de PR. Los valores más altos se hallaron para los péptidos obtenidos luego de la DGS (AFD y PFD). Por lo tanto, la digestión gastrointestinal promovió la generación de nuevos péptidos con mayor actividad antioxidante que los hidrolizados.

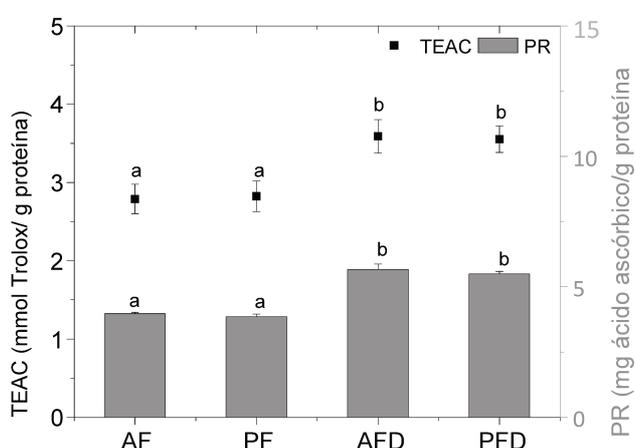


Figura 4.19-Inhibición del radical ABTS (expresada como TEAC) y PR expresado en mg AA/g proteína) de los hidrolizados (AF, PF) y la fracción soluble de los digeridos gastrointestinales de dichos hidrolizados (AFD, PFD). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (P < 0,05). (Elaborado por R. Cian)

En la Figura 4.20 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> por los hidrolizados, la fracción soluble de los digeridos gastrointestinales de dichos hidrolizados y sus fracciones ultra-filtradas.

De acuerdo con estos resultados, los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de ABTS<sup>+</sup> de los digeridos AFD y PFD fueron significativamente menores que los hallados para AF y PF. En consecuencia, los hidrolizados sometidos a digestión gastrointestinal exhibieron su mayor potencia (menor cantidad de péptidos para logra alcanzar un 50% de inhibición de ABTS<sup>+</sup>).

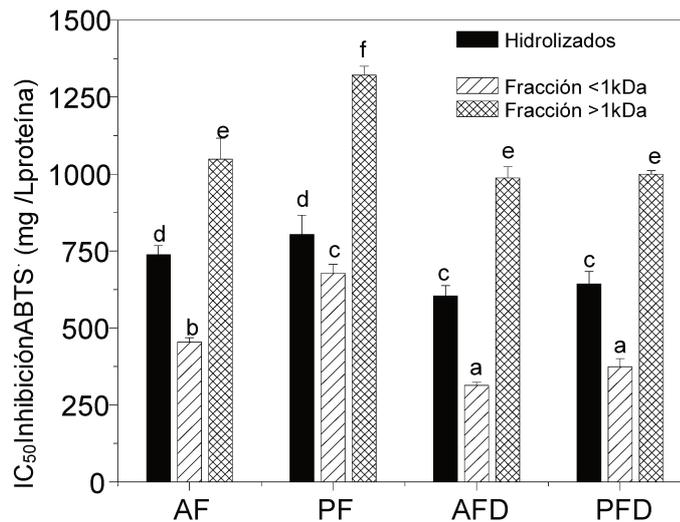


Figura 4.20-Valores de  $IC_{50}$  para la inhibición del radical  $ABTS^+$  de los hidrolizados (AF, PF), la fracción soluble de los digeridos gastrointestinales de dichos hidrolizados (AFD, PFD) y sus fracciones ultra-filtradas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ( $P < 0,05$ ). (Elaborada por R. Cian).

Estos resultados podrían deberse a la secuencia y al tamaño de los nuevos péptidos generados por acción de las proteasas pepsina y pancreatina. Como se sabe, las propiedades antioxidantes de los péptidos están influenciadas por la composición, la secuencia y la masa molecular (Kim y Wijesekara, 2010). La mayoría de los péptidos con actividad antioxidante reportados son de bajo peso molecular (Karaś *et al*, 2015). En este sentido, las fracciones con peso molecular menores a 1 kDa mostraron un valor menor de  $IC_{50}$  para la inhibición de  $ABTS^+$  que los de péptidos de peso molecular mayor a 1 kDa. Teniendo en cuenta que la digestión gastrointestinal incrementó la proporción de péptidos de bajo peso molecular, el mayor poder antioxidante de AFD y PFD pudo deberse a la fracción de aproximadamente 500 Da obtenida de las muestras digeridas (Cian *et al*, 2018).

Khiari *et al* (2014) aislaron un tetrapéptido con elevada actividad antioxidante de hidrolizados de gelatina de la piel de caballa. El péptido His-Gly-Pro-Leu demostró potentes actividades de bloqueo de los radicales FRAP y DPPH. Atribuyeron este efecto a los aminoácidos hidrofóbicos no aromáticos. Estudios previos indicaron que la actividad antioxidante de péptidos está habitualmente asociada a la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos tales como Tyr, Phe, Val, Ile y Leu (Cian *et al* 2015). Los aminoácidos más abundantes en AFD y PFD fueron Val, Tyr y Phe. Entonces, la alta actividad antioxidante de AFD y PFD podría deberse a la presencia de

estos aminoácidos en la secuencia de sus péptidos de bajo peso molecular (Cian *et al*, 2018).

#### 4.2.3.4 – Actividad antihipertensiva.

Todas las muestras exhibieron inhibición de la ECA-I. Los valores de IC<sub>50</sub> de inhibición de la enzima ECA-I por los hidrolizados AF y PF y sus digeridos AFD y PFD se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.9 - Inhibición de enzima ECA-I, valores de IC<sub>50</sub> para las fracciones hidrolizadas y digeridas de HM (AF, PF, AFD y PFD)

Inhibición ECA-1 IC <sub>50%</sub> (g/L prot)	AF	PF	AFD	PFD
	1,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,2 ± 0,2

(Elaborada por C. Botto)

El aumento de los valores de IC<sub>50</sub> para AFD y PFD indica que la digestión gastrointestinal degradó los péptidos bioactivos que se encontraban en los hidrolizados. En contraste, Connolly *et al* (2015) reportaron que los péptidos con actividad inhibitoria de ECA-I obtenidos de hidrolizados de HM por acción de las enzimas A, Corolasa PP, F y Promod 144 MG mantuvieron la actividad luego de la DGS usando pepsina y Corolasa PP, debido a la generación de nuevos péptidos con elevado contenido de Pro. Corolasa PP es un preparado de proteinasa pancreática porcina de amplia especificidad, que posee actividad de tripsina, quimiotripsina y elastasa (Mullally *et al*, 1994). Esta amplia especificidad unida al elevado contenido en Pro del extracto proteico de HM podría resultar en la liberación de péptidos ricos en Pro. Sin embargo, AFD y PFD mostraron menor contenido de Pro que AF y PF (Cian *et al*, 2018), lo que podría haber afectado la actividad inhibitoria de ECA- I luego de la digestión gastrointestinal de los péptidos. Por otra parte, los péptidos derivados de proteínas alimentarias con la más efectiva actividad inhibitoria de ECA-I fueron descriptos por su contenido en Tyr, Phe, Trp y/o Pro en su extremo C-terminal (Connolly *et al*, 2014).

#### 4.2.4- Conclusiones parciales, hidrolizados de HM

Se ha demostrado que los hidrolizados de proteínas de HM (AF y PF) presentaron actividad antitrombótica, antidiabetogénica, antioxidante y antihipertensiva. Además, los hidrolizados con actividad antitrombótica, antioxidante, inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, aunque específicamente no hubo inhibición por parte de éstos péptidos sobre  $\alpha$ -amilasa, particularmente aumentaron la bioactividad después de la digestión gastrointestinal, probablemente debido a la generación de nuevos péptidos más activos a partir de hidrolizados de bajo peso molecular; aunque se redujo la inhibición de la ECA-I.

La simulación de la digestión fisiológica es una herramienta muy útil para estudiar la estabilidad de péptidos bioactivos frente a enzimas digestivas y al ambiente gastrointestinal. De encontrarse que la digestión reduce la bioactividad, se deben desarrollar estrategias de protección de péptidos tales como la encapsulación. Finalmente, se deben realizar estudios *in vivo* para confirmar estos resultados obtenidos *in vitro*.

## 5- CONCLUSIONES GENERALES

La utilización de algas en la alimentación se remonta a la antigüedad. En este trabajo se demostró que las macroalgas *PC* y *U* podrían proveer compuestos bioactivos que serían liberados por la digestión gastrointestinal, particularmente péptidos. Estos péptidos podrían ejercer su efecto a nivel local, como sería el caso de la actividad inhibitoria sobre enzimas involucradas en la absorción de carbohidratos (como la enzima  $\alpha$ -glucosidasa) o actividad antioxidante, o a nivel sistémico una vez absorbidos, por sus propiedades antioxidantes, antihipertensivas, anticoagulantes, e inhibitorias de la enzima DPP-IV (actividad antidiabetogénica).

Asimismo, a partir de la utilización de residuos generados en la industria alimentaria se podrían obtener proteínas y péptidos bioactivos como es el caso del subproducto de la elaboración de cerveza conocido como HM, utilizado mayormente para alimentación animal. Particularmente se ha observado que estos péptidos presentaron actividad anticoagulante, hipoglucemiante y antihipertensiva. Se observó que la actividad está concentrada en la fracción de peso molecular  $< 1$  kDa y que se mantiene en gran medida luego de la DGS. Esos péptidos podrían utilizarse como ingredientes para elaborar alimentos funcionales o como suplementos dietarios.

Cabe destacar que estos estudios de actividad bioactiva y digestión gastrointestinal se han llevado a cabo de manera *in vitro*, con lo cual sería indispensable continuar las evaluaciones con estudios *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos.

El aprovechamiento de recursos naturales como las macroalgas que proveen compuestos bioactivos, y de subproductos de la industria alimentaria, como es el caso del bagazo de malta, para la obtención de péptidos bioactivos, que puedan ser utilizados como ingredientes en el desarrollo de alimentos funcionales, impactaría positivamente sobre la salud humana y sobre el medioambiente.

## 6- BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Ahmadi F., Kadivar M., Shahedi M. (2007). Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. *Food Chemistry*. 105, 1, 57-64.
- Amigo L., Hernández-Ledesma B. (2020). Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. *Molecules*. 25, 4479. doi: 10.3390.
- A.O.A.C. (1995). *Official Methods of Analysis*, (16th ed.), Horowitz, Washington DC, USA.
- Boraso A. (2013) *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*. 1ª.ed. Comodoro Rivadavia: Editorial Universitaria de la Patagonia EDUPA.
- Chen C., Yang F., Zhang Q., Wang F., Hu Y., Xia Z. (2015). Natural products for antithrombosis. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 876426, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/876426>.
- Chin Y., Lim Phaik E., Maggs C., Phang Siew M., Sharifuddin Y., Green B. (2014). Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 27, 2137–2148.
- Cian R., López-Posadas R., Drago S., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin A. (2012a). Immunomodulatory Properties of the Protein Fraction from *Porphyra columbina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (33), 8146–8154.
- Cian R., López-Posadas R., Drago S., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin A. (2012b). *Pyropia columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF- $\kappa$ B, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chemistry*. 134 (4), 15-20.
- Cian R., Martínez-Augustín O., Drago S. (2012c). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Pyropia columbina*. *Food Research International*. 49, 364–372.
- Cian R. (2013a). Tesis Doctoral. Aprovechamiento integral del alga *Pyropia columbina*. Procesos de extracción de ficocomponentes (proteínas y polisacáridos). Estudio de sus propiedades bio y tecno-funcionales. Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.
- Cian R., Alaiz M., Vioque J., Drago S. (2013b). Enzyme proteolysis enhanced extraction of ACE inhibitory and antioxidant compounds (peptides and polyphenols) from *Pyropia columbina* residual cake. *Journal of Applied Phycology*. 25 (4), 1197-1206.
- Cian R., Caballero M., Sabbag N., González R., Drago S. (2014a). Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Pyropia columbina*. *LWT - Food Science and Technology*. 55, 51-58.
- Cian R., Fajardo M., Alaiz M., Vioque J., González R., Drago S. (2014b). Chemical composition, nutritional and antioxidant properties of red edible seaweed

- Pyropia columbina*. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 65 (3), 299-305.
- Cian R., Drago S., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin O. (2015a). Proteins and carbohydrates from red seaweeds: evidences for beneficial effects on gut function and microbiota. Marine Drugs. 13, 5358-5383.
- Cian R., Garzón A., Betancur Ancona D., Chel Guerrero L., Drago S. (2015b). Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion.. LWT - Food Science and Technology. 64, 881-888.
- Cian R., Hernández-Chirlaque C., Gámez-Belmonte R., Drago S., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin O. (2018a). Green Alga *Ulva spp.* Hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NFκB/MAPK pathways. Marine Drugs. 16 (7), 235-250.
- Cian R., Garzón A., Martínez-Augustin O., Botto C., Drago S. (2018b). Antithrombotic Activity of Brewers' Spent Grain Peptides and their Effects on Blood Coagulation Pathways. Plant Foods for Human Nutrition. 73, 241–246.
- Clemente A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Science Technology. 11, 254–262.
- Connolly A., Piggott C., FitzGerald R. (2013). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. Food Research International. 56, 100-107.
- Connolly A., Piggott C., FitzGerald R. (2014) Technofunctional properties of a brewers' spent grain protein-enriched isolate and its associated enzymatic hydrolysates. LWT-Food Science Technology. 59, 1061–1067.
- Connolly A., O'Keeffe M., Piggott C., Nongonierma A., FitzGerald R. (2015). Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate. Food Chemistry. 176, 64-71.
- Connolly A., O'Keeffe M., Nongonierma A., Piggott C., FitzGerald R. (2017). Isolation of peptides from a novel brewers spent grain protein isolate with potential to modulate glycaemic response. International Journal of Food Science and Technology. 52, 146-153.
- Coronado H., Vega y León S., Gutiérrez T., Vázquez F., Radilla V. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista Chilena de Nutrición. 42 (2), 206-212.
- Crowley D., O'Callaghan Y., McCarthy A., Connolly A., Piggott C., FitzGerald R., O'Brien N. (2015). Immunomodulatory potential of a brewers' spent grain protein hydrolysate incorporated into low-fat milk following *in vitro* gastrointestinal digestion. International Journal of Food Science and Nutrition. 66, 672-676.
- De Lara-Isassi G., Alvarez-Hernández S., Quintana-Pimente A. (2004). Screening for anticoagulant substances in some marine macroalgae. Hidrobiológica. 14 (1), 47-54.

- del Rio J., Prinsen P., Gutierrez A. (2013) Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*. 58, 248-254.
- de Titto E., Benítez R., Riviera S., Digón A., Rodríguez E. (2014). Boletín virtual Programa Nacional Municipios y Comunidades saludables. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Argentina Año 1(5), 2-4.
- Donkor O., Stojanovska L., Ginn P., Ashton J., Vasiljevic T. (2012). Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*. 135, 950-959.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3), 350–356.
- Estevo Belchior S., Gallardo A., Risso S., Fajardo M. (2003). Evaluación microbiológica del alga comestible *Pyropia columbina* de la costa patagónica argentina. *Revista FABICIB*. 7, 55-64.
- Fajardo M. (1998). Tesis Doctoral. Estudio de las algas patagónicas del género *Pyropia* para su aprovechamiento en la alimentación. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
- Fernández Ginés J., Tudela Carrasco M., Caballero Santos B., González Moreno M., Madera Bravo E. (2008). Generación de subproductos de la industria agroalimentaria: situación y alternativas para su aprovechamiento y revalorización. *Especial Alimentaria*. 39-42.
- Fernandez Musoles R. (2015) Tesis doctoral. Péptidos derivados de lactoferrina bovina contra la hipertensión arterial: inhibición de los sistemas angiotensina y endotelina. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Valencia, España.
- Flores-Rivera O., Ramírez-Morales K., Meza-Márquez J., Nava-López J. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 37 (2), 5382-5386.
- Giménez Serrano S. (2003). Trombosis, clínica y farmacoterapia. *Farmacia profesional*. 17 (5), 54-64.
- Gómez Ordoñez E. (2012). Tesis doctoral. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios *in vitro* e *in vivo*. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
- Gülçin I., Huyut Z., Elmatas M., Aboul-Enein H. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3, 43–53.
- Harnedy P., FitzGerald R. (2011). Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *Journal of Phycology*. 47, 218–232.
- Hayakari M., Kondo Y., Izumi H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*. 84, 361-369.
- Hayes M., Brijesh T. (2015). Bioactive Carbohydrates and Peptides in Foods: An Overview of Sources, Downstream Processing Steps and Associated Bioactivities. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 22485-22508.
- Herrera Chalé F., Betancur Ancona D., Segura Campos M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas

- con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*. 29:10-20.
- Hong F., Ming L., Yi S., Zhanxia L., Yongquan W., Chi L. (2003). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs. *Peptides*. 29, 1062-1071.
- Jo S-H., Ha K-S., Moon K-S., Lee O-H., Jang H-D., Kwon Y-I. (2011). In vitro and in vivo antihyperglycemic of Omija (*Schizandra Chinensis*) fruit. *International Journal of Molecular Science*. 12, 1359-1370.
- Juárez M., Olano A., Morais F. (2005). *Alimentos Funcionales*. Ed. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid.
- Karaś M., Baraniak B., Rybczyńska K., Gmiński J., Gawel-Bezben K., Jakubczyk A. (2015). The influence of heat treatment of chickpea seeds on antioxidant and fibroblast growth-stimulating activity of peptide fractions obtained from proteins digested under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. 50, 2097-2103.
- Kidgell J., Magnussonb M., de Nysa R., Glassonb C. (2019). Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Research*. 39, 101422.
- Khiari Z., Ndagijimana M., Betti M. (2014). Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry Science*. 93, 2347–2362.
- Kim S., Wijesekara I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2 (1), 1-9.
- Kim I., Yang M., Lee O., Kang S. (2011). Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *International Journal of Molecular Sciences*. 2 (6), 4120-4131.
- Kong Y., Li S., Shao Y., He Z., Chen M., Ming X., Wei J. (2014). Antithrombotic peptides from *Scolopendra subspinipes mutilans* hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* quartile. 20, 245–252.
- Kotlar C., Ponce A., Roura S. (2013). Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery by product hydrolysed enzymatically. *LWT-Food Science and Technology*. 50, 378-385.
- Leal M., Guagliano M., Sanchez Rico A. (2016). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: alimentos funcionales. 1ª. edición - Buenos Aires. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Libro digital, PDF - CDD 664.
- Liu R., Cheng J., Wu H. (2019). Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. *International Journal of Molecular Science*. 20, 463.
- Lourenço S., Moldão-Martins M., Alves V. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 24(22), 4132.

- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1), 265-275.
- Lynch K., Steffen E., Arendt E. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*. 122, 553-568.
- Martín Peña G. (2010). Hábitos alimentarios y salud. En: Gil A. *Tratado de Nutrición*. Tomo III Nutrición humana en el estado de salud. Editorial Médica Panamericana. 2<sup>da</sup>. Ed. Madrid, España. Tomo III. Capítulo 1.
- Mayor-Oxilia R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*. 5: 23-29.
- McCarthy A., O'Callaghan Y., Connolly A., Piggott C., FitzGerald R. O'Brien N. (2013). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of brewers' spent grain protein rich isolate and its associated hydrolysates. *Food Research International*. 50, 205-212.
- Mercado-Mercado G., de la Rosa Carrillo L., Wall-Medrano A., López Díaz J., Álvarez-Parrilla E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*. 28 (1), 36-46.
- Miner-Williams W., Stevens B., Moughan P. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews*. 27, 308-329.
- Montenegro R., Sujovsky G. (2013). Tesina de grado: Evaluación del aporte de sodio de productos procesados en la alimentación habitual y propuesta de selección para una población hipertensa de la ciudad de Santa Fe en el año 2012. FCB-UNL. Santa Fe, Argentina.
- Mulero Cánovas J., Zafrilla Rentero P., Martínez-Cachá Martínez A., Leal Hernández M., Abellán Alemán J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arterioesclerosis*. 23 (5), 219-227.
- Mullally M., O'Callaghan D., FitzGerald R., Donnelly W., Dalton J. (1994). Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 2973-2981.
- Mussatto S., Dragone G., Roberto I. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*. 43, 1-14.
- Naik S., Kokil G. (2013). Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics. En: *Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics*. Elsevier. Chap. 12(39), 431-466.
- Nielsen P., Petersen D., Dambmann C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66, 642-646.
- Niemi P., Martins D., Buchert J., Faulds C. (2013). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology*. 136, 529-534.
- Pérez-Llamas F., Larqué Daza E., Zamora Navarro S. (2010). Calidad nutritiva de los alimentos. En: Gil A. *Tratado de Nutrición*. Tomo II. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2<sup>da</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana, España, cap. 21, 563-612.

- Pereira L. (2018). Biological and therapeutic properties of the seaweed Polysaccharides. *International Biology Review*. 2(2), DOI:10.18103/ibr.v2i2.1762.
- Piriz M., Casas G. (1996). Macroalgas de interés comercial en las costas del sur de Chubut y norte de Santa Cruz. GEF / PNUD - FPN / WCSISSN N° 0328 – 462X
- Portela MLPM. (2006). Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI. La Prensa Médica Argentina.
- Proaño J., Salgado P., Cian R., Mauri A., Drago S. (2020). Physical, structural and antioxidant properties of brewer's spent grain protein films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100 (15), 5458-5465.
- Robertson J., I'ason K., Treimo J., Faulds C., Brocklehurst T., Eijsink V., Waldron K. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *Food Science and Technology*. 43, 890-896.
- Sabbione A. (2015). Tesis doctoral: Actividad antitrombótica de proteínas de amaranto. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas.
- Sabbione A., Scilingo A., Añón M. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*. 60, 171–177.
- Samarakoon K., Jeon Y-J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Research International*. 48, 948–960.
- Segura-Campos M., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90, 2512-2518.
- Sheih C., Tung-Kung W., Fang Tony J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*. 100, 3419–3425.
- Shimizu M. (2010). Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74 (2), 232–241.
- Silva M., Vieira L., Almeida A., Kijjoa A. (2013) The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potential Applications. *Oceanography*. 1: 101. doi:10.4172/2332-2632.1000101
- Torres-Fuentes C., Alaiz M., Vioque J. (2011). Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 129, 485-490.
- Udenigwe C., Aluko R. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*. 71 (1), 11-24.
- Uhrich A., Córdoba O., Flores M. (2016). Especies de *Ulva* del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina: variaciones bioquímicas estacionales - espaciales y su relación con la producción de metabolitos bioactivos. *Ars Pharmaceutica*. 57(2), 67-75.

- Valdes Ramos E., Camps Arjona M., Verdecia Saborit R. (2010). Risk factors and cardiovascular disease in recently diagnosed type 2 diabetics. *Revista cubana de investigaciones biomedicas*. 33 (2), 177-185.
- Van de Velde F., Pirovani M., Drago S. (2018). Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Journal of Food Composition and Analysis*. 72, 22-31.
- Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*. 10 (14), 1677-1694.
- Vieira E., Angélica M., Rocha M., Coelho E., Pinho O., Saraivab J., Ferreira I., Coimbra M. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*. 52, 136-143.
- Vieira E., das Neves J., Vitorino R., Dias da Silva D., Carmo H., Ferreira I. (2016). Impact of *in Vitro* Gastrointestinal Digestion and Transepithelial Transport on Antioxidant and ACE-Inhibitory Activities of Brewer's Spent Yeast Autolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 7335-7341.
- Vieira E., Teixeira J., Ferreira I. (2016). Valorization of brewers' spent grain and spent yeast through protein hydrolysates with antioxidant properties. *European Food Research Technology*. 242, 1975-1984.
- Vizcardo-Gutierrez D., Zabala González J. (2016). Péptidos bioactivos, pequeños gigantes en salud. *Revista Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 29 (4), 150-155.
- Wang T., Hsieh C., Hung C., Jao C., Lin P., Hsieh Y., Hsu K. (2017). A study to evaluate the potential of an *in silico* approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity *in vitro* of protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 234, 431-438.
- Xia E., Zhu S., He M., Luo F., Fu C., Zou T. (2017). Marine Peptides as Potential Agents for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus-A Prospect. *Marine Drugs*. 15, 88.
- Yang W., Wang Z., Xu S. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*. 18, 449-451.
- Yang H., Wang Y. (2009). Effects of concentration on nanostructural images and physical properties of gelatin from channel catfish skin. *Food Hydrocolloids*. 23, 577-584.

## 7- Anexos

### 7.1 - Índice de figuras

Figura 3.1- Esquema de obtención de hidrolizados de HM y su digestión gastrointestinal .....	48
Figura 3.2. Esquema del proceso de ultrafiltración de los hidrolizados (AF y PF) y sus digeridos (AFD yPFD). .....	49
Figura 4.3. TT en dializados de PC, U y FP .....	56
Figura 4.4- TP en dializados de PC, U y FP .....	57
Figura 4.5- KPTT en dializados de PC, U y FP .....	58
Figura 4.6- Formación de Fibrina en dializados de PC, U y FP .....	58
Figura 4.7- Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa, por PC, U y FP .....	60
Figura 4.8- Inhibición de la enzima DPP-IV por PC, U y FP .....	60
Figura 4.9- Poder reductor de productos de la DGS de algas .....	62
Figura 4.10- Inhibición del radical ABTS <sup>+</sup> de digeridos y dializados de algas .....	63
Figura 4.11- Actividad inhibidora de la ECA-I .....	65
Figura 4.12-TT de hidrolizados AF, PF, AFD,PFD .....	69
Figura 4.13-TT de las fracciones ultrafiltradas .....	70
Figura 4.14-TP de hidrolizados .....	71
Figura 4.15- Prueba de KPTT de hidrolizados .....	71
Figura 4.16- Prueba KPTT de las fracciones ultra-filtradas de hidrolizados .....	72
Figura 4.17-Valores de IC <sub>50</sub> para la inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa de la fracción soluble del digerido gastrointestinal de los hidrolizados (AFD, PFD) y sus fracciones ultrafiltradas. ....	73
Figura 4.18- Valores de IC <sub>50</sub> para la inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de los hidrolizados de HM .....	74
Figura 4.19-Inhibición del radical ABTS (expresada como TEAC) y PR .....	75
Figura 4.20-Valores de IC <sub>50</sub> inhibición del radical ABTS de los hidrolizados .....	76

### 7.2 - Índice de tablas

Tabla 4.1-Composición centesimal de PC y U .....	52
Tabla 4.2-Contenido de proteínas de las fracciones digeridas y dializadas de PC, U y FP .....	54
Tabla 4.3- Contenido de AL y PCL de las fracciones digeridas y dializadas de PC,	

U y FP .....	55
Tabla 4.4-Valores de IC <sub>50</sub> para la inhibición de $\alpha$ -glucosidasa por PC, U y FP .....	60
Tabla 4.5-Valores de IC <sub>50</sub> para la inhibición del radical ABTS <sup>+</sup> por PC, U y FP .....	64
Tabla 4.6-Valores de IC <sub>50</sub> para la inhibición de la ECA I .....	65
Tabla 4.7-Composición centesimal de HM .....	68
Tabla 4.8-Composición elemental fracciones:AF y PF, AFD y PFD.....	69
Tabla 4.9 - Inhibición de ECA-I, valores de IC <sub>50</sub> para hidrolizados .....	77

### 7.3 - Abreviaturas y símbolos

A : proteasa alcalina

AA: ácido ascórbico

ABTS<sup>+</sup>: radical 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico

AEAC : capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico

AF : hidrolizado de HM obtenido por acción de enzimas A y F

AFD : hidrolizado digerido de HM obtenido con enzimas A y F y luego de DGS

AL : aminos libres

b.s. : base seca

CaCl<sub>2</sub> : cloruro de calcio

DE : desvío estándar

DGS: digestión gastrointestinal simulada

DM II : Diabetes Mellitus tipo II

DPP-IV : enzima dipeptidil peptidasa-IV

DPPH: radical óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ECA-I : enzima convertidora de angiotensina-I

E/S : relación enzima/sustrato

F: Flavourzima

FP: Fracción proteica obtenida por extracción acuosa a pH 7 a partir de PC

GH : grado de hidrólisis

GIP : péptido insulínico dependiente de glucosa

GLP-1: péptido similar a glucagón-1

HCl : ácido clorhídrico

h: horas

kDa: kilodalton

HM: Hez de Malta  
IC<sub>50</sub>: inhibición del 50% de la actividad enzimática  
IEC: células epiteliales  
K: potasio  
KPTT: Tiempo de tromboplastina parcial activada  
Mg: magnesio  
NaCl: cloruro de sodio  
NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonato de sodio (ó carbonato ácido de sodio)  
NaOH: hidróxido de sodio  
NIH : Instituto Nacional de Salud de los EEUU  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
P : proteasa neutra  
PA: Presión Arterial  
*PC : Pyropia columbina*  
PCL: longitud media de cadena peptídica  
PDF: péptidos de degradación de fibrina  
PepT1: Peptide transporter 1  
PF : hidrolizado de HM obtenido por acción de enzimas P y F  
PFD : hidrolizado de HM obtenido con enzimas P y F y luego de DGS  
PR: poder reductor  
RAS : sistema renina-angiotensina  
ROS: Especies reactivas del Oxígeno  
TEAC: capacidad antioxidante equivalente Trolox  
TP: Tiempo de protrombina  
TT: Tiempo de trombina  
*U: Ulva spp*