



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA

PROTECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BIOPÉPTIDOS DE
ALBERJÓN (*Lupinus gredensis*), MEDIANTE LA FORMACIÓN DE
COMPLEJOS COACERVADOS

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



Presenta:

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

MIRIAM QUINTANA MORENO

Bajo la supervisión de:

CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS, Dra.

LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Dra.



Chapingo, Estado de México, enero de 2018

**PROTECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BIOPÉPTIDOS DE
ALBERJÓN (*Lupinus gredensis*), MEDIANTE LA FORMACIÓN DE
COMPLEJOS COACERVADOS**

Tesis realizada por **Miriam Quintana Moreno**, bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

Directora: 
Dra. Consuelo Silvia Olivia
Lobato Calleros

Codirectora: 
Dra. Landy Hernández Rodríguez

Asesor: 
Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	iii
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN GENERAL.....	xii
GENERAL ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1. Proteínas de leguminosas	16
2.2. Péptidos.....	18
2.3. Hidrólisis enzimática	19
2.4. Caracterización molecular	19
2.4.1. Grado de hidrólisis	19
2.4.2. Distribución de pesos moleculares.....	20
2.5. Actividades biológicas de péptidos	21
2.5.1. Actividad antioxidante	21
2.5.2. Eliminación del radical libre DPPH	22
2.6. Digestión.....	23
2.7. Entrampamiento de compuestos activos	25
2.8. Métodos de encapsulación	26
2.8.1. Secado por aspersión	26
2.8.2. Hidratación de película.....	27
2.8.3. Coacervación	27

2.9.	Materiales (biopolímeros)	29
2.9.1.	Portadores basados en proteínas	30
2.9.2.	Portadores basados en polisacáridos	32
2.10.	Potencial ζ	34
2.11.	Interacciones proteína-polisacárido	35
2.12.	Literatura citada.....	36
3.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPEPTIDOS DE ALBERJÓN (<i>Lupinus gredensis</i>), CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	44
3.1.	Introducción	46
3.2.	Materiales	47
3.3.	Métodos	47
3.3.1.	Obtención de extracto con alto contenido de proteínas	47
3.3.2.	Cuantificación de proteínas.....	48
3.3.3.	Obtención de péptidos bioactivos.....	48
3.3.4.	Determinación del grado de hidrólisis	49
3.3.5.	Distribución de pesos moleculares.....	50
3.3.6.	Determinación de la actividad antioxidante	50
3.4.	Resultados y discusión	51
3.4.1.	Grado de hidrólisis	51
3.4.2.	Distribución de pesos moleculares.....	53
3.4.3.	Actividad antioxidante	55
3.5.	Conclusiones	57
4.	FORMACIÓN DE COMPLEJOS COACERVADOS: K-CARRAGENINA- BIPÉPTIDOS-PROTEÍNA DE SOYA	58
4.1.	Introducción	60
4.2.	Materiales	61
4.3.	Métodos	62
4.3.1.	Potencial ζ	62
4.3.2.	Preparación de soluciones	62
4.3.3.	Formulación complejos coacervados	62
4.3.4.	Contenido de proteína de los coacervados	64
4.3.5.	Rendimiento y humedad de los coacervados.....	64

4.3.6.	Tamaño de partícula	65
4.3.7.	Actividad antioxidante	66
4.3.8.	Digestión gastrointestinal simulada	67
4.3.9.	Análisis estadístico	67
4.4.	Resultados y discusión	68
4.4.1.	Potencial ζ de biopéptidos y biopolímeros	68
4.4.2.	Medición de absorbancias	70
4.4.3.	Rendimiento de coacervación, humedad y cantidad de proteína..	72
4.4.4.	Tamaño de partícula	73
4.4.5.	Actividad antioxidante de los CC _x , antes y después de la DGS	75
4.5.	Conclusiones	79
5.	LITERATURA CITADA	79

DEDICATORIAS

A mis queridos padres Irene Moreno García y Teófilo Quintana Olmos por su amor, apoyo incondicional, confianza brindada, por la formación y valores que con mucho esfuerzo lograron inculcarme.

A mis maravillosos hermanis Mariela e Irving J. porque son parte fundamental en mi vida, por su cariño y confianza, gracias por permitirme compartir con ustedes alegrías y tropiezos los cuales hemos sabido superar. Los quiero mucho.

A mis abuelitos que fueron parte esencial en mi formación, los llevo en el corazón.

Sin su apoyo incondicional no sería nada, gracias infinitas familia querida, los amo.

A mis amigos y compañeros, por su apoyo, compañía, buenos consejos y agradables momentos, gracias por compartir conmigo su tiempo, vivencias y logros; ocupan un lugar muy especial en mi vida.

Y por supuesto a los integrantes de la décima cuarta generación de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por todos los momentos inolvidables que pasamos en esta gran etapa.

Miriam Quintana Moreno

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

A Dios por cuidar de mí y otorgarme la familia tan maravillosa que tengo.

Muy agradecida con mi querida Alma Mater la Universidad Autónoma Chapingo, por acogerme estos años, por la formación y conocimientos adquiridos para afrontar el campo laboral.

A la familia Quintana Moreno por su amor, confianza y apoyo incondicional.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez por el tiempo invertido en este trabajo, por sus consejos, enseñanzas y aprendizaje. Porque siempre estuvo cuando necesité apoyo, infinitas gracias Dra.

A la Dra. Blanca Hernández Rodríguez por las facilidades y el tiempo brindado a esta investigación, gracias por ser tan accesible y paciente.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por sus aportes tan importantes en esta tesis, gracias por su tiempo invertido y por compartir sus conocimientos con una servidora.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano por sus acertadas correcciones y apoyo logístico en este trabajo de investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su apoyo y facilidades otorgadas para esta investigación.

A los compañeros de laboratorio por su tiempo invertido y conocimientos compartidos en el uso de equipos, muchas gracias.

A Dulce, Frida, Sinai, Lupita, Suly, Laura, Katty, Tochi, Alex Urbina y Ulises, por su amistad, apoyo y grandes e inolvidables momentos.

Con respeto y gratitud, Miriam

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Miriam Quintana Moreno

Fecha de nacimiento: 24 de mayo de 1990

Lugar de nacimiento: Toluca de Lerdo, Estado de México

CURP: QUMM900524MMCNRR05

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Cédula profesional número: 08801281

Desarrollo académico

Bachillerato: Escuela Preparatoria Oficial número 63, Estado de México.

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

Desarrollo profesional

Docencia en nivel medio superior, impartiendo las asignaturas de química y matemáticas (2014-2015). Dirección general de educación media superior del Estado de México.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Método de acción de sustratos sobre el radical DPPH.....	23
Figura 2. Modificaciones estructurales que pueden ocurrir cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan.....	28
Figura 3. Portadores utilizados para la encapsulación de hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias.....	30
Figura 4. Tipos de carragenina.....	34
Figura 5. Cinética de GH (%).....	52
Figura 6. Distribución de pesos moleculares de proteína solubilizada, aislado y biopéptidos de alberjón.....	54
Figura 7. Potencial ζ en función del pH de biopéptidos de alberjón (0.1% p/v), κ -carragenina (0.1% p/v) y aislado de proteína de soya (0.1%).....	68
Figura 8. Distribuciones de tamaño de partícula de los complejos coacervados.....	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad antioxidante de BPA.....	55
Cuadro 2. Relaciones estequiométricas aislado de proteína de soya- κ -carragenina 1% p/v.....	63
Cuadro 3. Potencial ζ de los distintos tratamientos de CC.....	69
Cuadro 4. Absorbancias y potencial ζ de las relaciones estequiométricas de APS- κ -carragenina	70
Cuadro 5. Absorbancias y potencial ζ de las los complejos coacervados κ -carragenina-BPA-APS.....	71
Cuadro 6. Valores medios de rendimiento, humedad y cantidad de proteína de los complejos coacervados.....	73
Cuadro 7. Valores medios del diámetro hidrodinámico d_h de los péptidos entrampados.....	77
Cuadro 8. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada, sobre la actividad antioxidante de los biopéptidos coacervados.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

BPA	Biopéptidos de alberjón
GH	Grado de hidrólisis
DPM	Distribución de pesos moleculares
DGS	Digestión gastrointestinal simulada
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
APS	Aislado de proteína de soya
K-C	Kappa-carragenina
TNBS	Ácido trinitrobencensulfónico
BSA	Albúmina de suero bovino
SDS-PAGE	Gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida
SDS	Doudecil sulfato de sodio
CC _x	Complejos coacervados a cierta relación estequiométrica
PI	Punto isoelectrico
AAX	Actividad antioxidante

RESUMEN GENERAL

En la actualidad los biopéptidos son considerados como ingredientes potenciales para la formulación de alimentos funcionales, sin embargo su adición directa a los alimentos se ve afectada por sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales. En este trabajo de investigación se obtuvieron biopéptidos de alberjón (*Lupinus gredensis*) (BPA) por la acción de proteasas de Flavourzyme® 1000 L; para su caracterización molecular se determinó el grado de hidrólisis (GH), mediante el método TNBS, que correspondió al 12 % después de 7 horas de reacción. La distribución de pesos moleculares a través de la técnica SDS-PAGE, el perfil electroforético reveló que los péptidos producidos se encontraron en un intervalo de 25 a 10 kDa. La actividad antioxidante de los BPA presentó un IC₅₀ de 4.06±0.2 mg/mL determinado por el método DPPH. Los BPA fueron entrampados mediante coacervación compleja. Se utilizaron relaciones de biopolímeros 9:1, 10:1 y 12:1 proteína de soya:k-carragenina a pH 3.0. Como parte de la caracterización de los complejos se determinó cantidad de proteína, es este apartado si hubo diferencia significativa en todos los tratamientos CC_{9:1}, CC_{10:1} y CC_{12:1}. Lo mismo ocurrió para potencial ζ , mostrando que existían mayores cargas positivas en el tratamiento CC_{12:1}, mientras que el tratamiento CC_{9:1} fue el que tuvo menores cargas positivas (7.1 ± 0.4 mV) y fue justamente éste coacervado el que presentó mayor rendimiento de coacervación (77.6 ± 1.3 %). Los tratamientos fueron sometidos a una digestión gástrica simulada (DGS), la actividad antioxidante se redujo a valores de hasta IC₅₀ 6.8 ± 82.0 para los BPA sin entrampar. El tratamiento CC_{12:1} fue el que tuvo menor actividad antioxidante después de la DGS (IC₅₀ 6.1±1.4), sin embargo el tratamiento que resguardó en mayor cantidad a los BPA antioxidantes fue el CC_{9:1} (IC₅₀ 5.3±1.3). El CC_{9:1} fue el que mejor protegió la actividad de los biopéptidos. Por ello esta relación biopolimérica podría ser utilizada para la incorporación de biopéptidos encapsulados con actividad antioxidante a diversas matrices alimentarias.¹

Palabras clave: *Lupinus gredensis*, biopéptidos, actividad antioxidante, coacervación.

¹Tesis de maestría Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Miriam Quintana Moreno
Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

GENERAL ABSTRACT

Currently, biopeptides are considered as potential ingredients for the formulation of functional foods; however, their direct addition to food is affected by their physicochemical and sensory properties. In this research work we obtained biopeptides of alberjon (*Lupinus gredensis*) (BPA) by the action of proteases of Flavourzyme® 1000 L; for their molecular characterization we determined the degree of hydrolysis (GH), using the TNBS method, which corresponded to 12% after 7 hours of reaction. The distribution of molecular weights was determined using the SDS-PAGE technique, the electrophoretic profile revealed that the peptides produced were found in a range of 25 to 10 kDa, with the most marked bands in 10 kDa. The antioxidant activity of BPA presented a IC_{50} of 4.06 ± 0.2 mg/mL determined by the DPPH method. To protect the antioxidant activity of biopeptides which are susceptible to the action of various enzymes during the digestion process, they were encapsulated by the complex coacervates method. We used biopolymers ratios: 9:1, 10:1 and 12:1 soy protein: κ -carrageenan at pH 3.0. As part of the characterization of the complexes the amount of protein was determined; in this section there was a significant difference in all treatments CC_{9:1}, CC_{10:1} and CC_{12:1}. The same thing happened for potential ζ , showing that there were higher positive charges in the treatment CC_{12:1}, while the treatment CC_{9:1} was the one that had lower positive charges (7.1 ± 0.4 mV) and it was precisely this coacervado that presented higher yield ($77.6 \pm 1.3\%$). The treatments were subjected to a simulated gastric digestion with bile salts. The antioxidant activity was reduced to values of up to IC_{50} 8.2 ± 2.0 for BPA without encapsulation. The treatment CC_{12:1} was the one that had less antioxidant activity after the DGS (IC_{50} 6.1 ± 1.4), however, the treatment that protected in greater quantity to the BPA antioxidants was the CC_{9:1} (IC_{50} 5.3 ± 1.3); The CC_{9:1} was the one that best protected the activity of the biopeptides. Therefore, this biopolymer ratio could be used for the incorporation of biopeptides encapsulated with antioxidant activity to various food matrices.²

Keywords: *Lupinus gredensis*, biopeptides, antioxidant activity, coacervation.

² Master's Thesis: Universidad Autonoma Chapingo
Author: Miriam Quintana Moreno
Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad, ha surgido un gran interés en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos (Rao, Bajaj, Mann, Arora, & Tomar, 2016), los hidrolizados y péptidos de proteínas alimentarias se consideran una categoría de ingredientes funcionales prometedores (Mohan, Rajendran, He, Bazinet, & Udenigwe, 2015). Los péptidos se encuentran en forma latente dentro de la secuencia de proteína, pueden ser liberados y activados por proteólisis enzimática u otras técnicas (Ryan, Ross, Bolton, Fitzgerald, & Stanton, 2011).

La hidrólisis enzimática de los alimentos ricos en proteínas se lleva a cabo mediante proteasas, que se obtienen de plantas, microorganismos y animales, para la producción de péptidos bioactivos una de las enzimas comerciales comúnmente usada es Flavourzyme (Cian, Alaiz, Vioque, & Drago, 2013), las condiciones de reacción de hidrólisis como tiempo, temperatura, pH y la relación enzima: sustrato deben optimizarse para desencadenar la actividad de la enzima (Shahidi & Zhong, 2011).

Los péptidos bioactivos varían en tamaño de 2 a 20 residuos de aminoácidos y exhiben diferentes actividades, como antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, antihipertensivas, inmunomoduladoras, opioides y antiproliferativas (López-Expósito, Quirós, Amigo, & Recio, 2007). El potencial de estos péptidos bioactivos para reducir el riesgo de enfermedades crónicas y para promover la salud humana ha despertado un creciente interés científico y comercial en la última década (Hartmann & Meisel, 2007). Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria ya que además de sus actividades biológicas, también poseen propiedades nutricionales y funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante) (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008).

Recientemente, se ha prestado especial atención a los péptidos bioactivos derivados de proteínas vegetales, como fuente de antioxidantes. La actividad antioxidante de los péptidos bioactivos se puede atribuir a la eliminación de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica y a la quelación de iones metálicos. Aunque los péptidos tienen un excelente potencial como antioxidante, su uso práctico en los sistemas alimentarios se ve obstaculizado por el sabor amargo, sabor salado y el problema de inestabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Power, Jakeman, & Fitzgerald, 2013).

Los efectos biológicos de los péptidos dependen de su capacidad para permanecer intactos hasta alcanzar sus objetivos, (Segura-Campos, Chel-Guerrero, Betancur-Ancona, & Hernandez-Escalante, 2011). El desafío principal de la aplicación de biopéptidos derivados de proteínas alimentarias, es su susceptibilidad a la digestión gastrointestinal, con el riesgo de perder su integridad estructural y funciones biológicas cuando se someten a proteasas y peptidasas gastrointestinales; proteger los péptidos bioactivos de las modificaciones fisiológicas es esencial para traducir actividades *in vitro* a modelos *in vivo* (Picariello *et al.*, 2013).

La encapsulación como mecanismo de administración puede usarse para superar estos desafíos y mejorar así la biodisponibilidad y las propiedades sensoriales de los péptidos (Mohan *et al.*, 2015), y puede explorarse para la administración de péptidos bioactivos alimentarios; sin embargo se observa que las condiciones óptimas para la encapsulación de otros compuestos no se aplican necesariamente a los péptidos bioactivos (Molina Ortiz *et al.*, 2009).

Las funciones de varios factores relacionados con el proceso de encapsulación de hidrolizados y péptidos de proteínas alimentarias, incluidos el tipo de sistema de la matriz, el método utilizado para la encapsulación, la pureza del material de pared, la relación núcleo-pared y las condiciones de encapsulación, dependerán de las propiedades requeridas del producto entrampado.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Proteínas de leguminosas

Un creciente interés ha surgido por la industria de alimentos en la utilización de proteínas vegetales como sustitutos de proteínas de origen animal en las formulaciones de nuevos productos, este tipo de proteínas son de especial interés debido a su valor nutricional, disponibilidad, bajo costo y los beneficios para la salud (Duranti, 2006).

Las investigaciones sobre los beneficios para la salud asociados con el consumo de leguminosas, ha aumentado el desarrollo de tecnologías innovadoras para ampliar su uso en productos alimenticios. Las leguminosas (chícharo, garbanzo, lenteja, frijol, entre otras) son una fuente importante de proteínas, contienen altas cantidades de lisina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina, los cuales proporcionan perfiles de aminoácidos esenciales bien equilibrados cuando se consumen con cereales u otros alimentos ricos en triptófano y aminoácidos azufrados (J. Boye, Zare, & Pletch, 2010).

Desde el punto de vista nutricional las leguminosas son de particular interés debido a que contienen grandes cantidades de proteínas (18-32%), además de proporcionar una fuente de aminoácidos esenciales y péptidos bioactivos (J. I. Boye *et al.*, 2010). Las principales proteínas en semillas de leguminosas son albúminas y globulinas, éstas últimas son solubles en soluciones salinas y representan cerca del 70% de la proteína (Roy, Boye, & Simpson, 2010), por su parte las albúminas son solubles en agua y constituyen el 10-20% de la proteína y pueden tener pesos moleculares variables (16-483 kDa) (Papalamprou, Doxastakis, & Kiosseoglou, 2010).

La legumina forma parte de las globulinas, se trata de una proteína hexamérica con un peso molecular de 300 a 400 kDa, las cadenas α y β están unidas por puentes disulfuro, las partes hidrófilas se encuentran en la superficie de la molécula, mientras que las secciones hidrófobas están atrapadas en el interior, reduciendo al mínimo su contacto con el agua; dentro de las albúminas está la vicilina que es una proteína trimérica con un peso molecular entre 150 y 180 kDa. La relación entre las globulinas y albúminas, y/o leguminas y vicilinas en aislados proteicos puede mostrar diferencias debidas a las especies, o su método de extracción, que podrían influir en sus propiedades fisicoquímicas (Duranti, 2006).

Entre las leguminosas la soya ha sido la más explorada, probablemente debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, sus conocidos beneficios a la salud y su extenso uso en formulaciones alimenticias (García, Puchalska, Esteve, & Marina, 2013), además de ser una fuente vegetal abundante, cuyo contenido de proteína oscila entre 36-56% (Singh, Vij, & Hati, 2014).

Otras leguminosas del género *Lupinus* han sido poco estudiadas, sin embargo se sabe que sus semillas poseen un contenido menor de los principales componentes antinutricionales que a menudo están presentes en las leguminosas como; fitatos, oligosacáridos, inhibidores de tripsina y lecitinas (El-Adawy, Rahma, El-Bedawey, & Gafar, 2001), además, las harinas de semillas *Lupinus* se han utilizado para la producción de aislados proteicos con buenas propiedades funcionales y nutricionales (Lqari, Vioque, Pedroche, & Millán, 2002).

El alberjón (*Lupinus gredensis*) contiene 23.8% de proteína y una alta digestibilidad in vitro (82.3%), este aspecto es importante debido a que muchos factores pueden perjudicar la digestibilidad, lo que daría como resultado una menor calidad de proteína. Por lo tanto, además de la composición de aminoácidos, se ha propuesto la digestibilidad proteica como otra característica proteínica que determina la calidad de la proteína; con respecto

a su composición de aminoácidos los presentes en mayor cantidad por cada 100 g de proteína son: ácido glutámico (22.4 g), ácido aspártico (16 g) y arginina (11.2 g) (Pastor-Cavada, Juan, Pastor, Alaiz, & Vioque, 2009).

Carbonaro, Maselli, & Nucara, 2015, mencionan que algunas proteínas parcialmente digeridas y pequeños péptidos de diferente longitud e incluso algunas proteínas intactas de leguminosas pueden desempeñar importantes efectos fisiológicos beneficios a la salud.

2.2. Péptidos

Numerosos estudios han demostrado que alimentos comunes de origen animal y vegetal son importantes fuentes de péptidos bioactivos, las fuentes vegetales generalmente incluyen cereales (trigo, cebada, maíz, arroz), pseudocereales (amaranto), leguminosas (soya, frijol, chícharos), especies de *Brassica* (girasol), entre otros (Malaguti *et al.*, 2014).

Los péptidos son fuentes convenientes de proteína para la nutrición humana porque son absorbidos eficientemente a través del tracto gastrointestinal en comparación con las proteínas intactas, aquellos que son derivados de alimentos y que tienen funciones biológicas se les denominan biopéptidos (Boutrou, Henry, & Sanchez-Rivera, 2015).

Los biopéptidos se consideran la nueva generación de reguladores biológicamente activos, que no solo previenen el mecanismo de oxidación y degradación microbiana en los alimentos, sino que también mejoran el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, aumentando la calidad de vida (Lemes *et al.*, 2016). Han sido definidos como fragmentos específicos de aminoácidos que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo y que finalmente pueden influenciar en la salud (Korhonen & Pihlanto, 2003); están presentes de forma natural en la matriz alimentaria o pueden originarse después de una digestión, ya sea una proteólisis *in vitro* (hidrólisis enzimática bajo condiciones controladas) o el procesamiento de alimentos (fermentación, germinación y maduración). Además se pueden fabricar mediante síntesis

química y métodos biotecnológicos (Zambrowicz, Timmer, Polanowski, Lubec, & Trziszka, 2013).

Se ha encontrado que los péptidos biológicamente activos comparten algunas propiedades estructurales comunes:

- Una longitud corta de 2 a 10 residuos de aminoácidos;
- Presencia de aminoácidos hidrofóbicos;
- Presencia de prolina, lisina y arginina (Zambrowicz *et al.*, 2013).

2.3. Hidrólisis enzimática

El uso de proteasas únicas o múltiples, específicas o inespecíficas es la forma más común para la producción de péptidos bioactivos porque requieren menos tiempo para obtener un grado similar de hidrólisis, así como un mejor control para obtener una mayor coherencia en perfiles de peso molecular y composición. Estos procesos son especialmente utilizados en las industrias alimentaria y farmacéutica, usando enzimas como: pepsina, bromelina, tripsina, quimotripsina y papaína, bajo sus respectivos pH y temperatura de funcionamiento (Agyei & Danquah, 2011), éstas enzimas suelen utilizarse en combinación para liberar péptidos bioactivos más efectivos y estables (Byun, Kofod, & Blinkovsky, 2001).

Para que el proceso de hidrólisis sea eficiente se debe tener una combinación adecuada enzima-sustrato, además de considerar la influencia de parámetros tales como pH, temperatura, tiempo de hidrólisis y sus efectos interactivos (Irshad, Kanekanian, Peters, & Masud, 2015).

2.4. Caracterización molecular

2.4.1. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados en relación con la proteína nativa, un factor importante en esta propiedad es la naturaleza de la enzima, caracterizada por una actividad específica. Los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se

pueden agrupar en: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1% y 10%, e hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10% para su uso en alimentación especializada (Benítez *et al.*, 2008).

Los métodos para medir GH se basan en la determinación de los grupos α -amino libres; el método TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) es uno de los más eficientes ya que tiene buena correlación y ha sido utilizado por diferentes autores para el análisis de hidrolizados de proteínas (Vairo Cavalli, Silva, Cimino, Malcata, & Priolo, 2008).

2.4.2. Distribución de pesos moleculares

La distribución de tamaños de los péptidos puede ser útil para predecir su capacidad antigénica, así como mostrar diferencias en la actuación de distintos pretratamientos del sustrato o enzimas utilizadas. Normalmente se utilizan métodos cromatográficos o electroforéticos.

La electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) ha sido la técnica más utilizada para la caracterización de hidrolizados y proteínas a pesar de sus limitaciones en la separación de péptidos de bajo peso molecular (Benítez *et al.*, 2008).

El termino electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo; aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través del medio gelatinoso (Soto *et al.*, 2013).

2.5. Actividades biológicas de péptidos

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos, los péptidos pueden ejercer diferentes actividades biológicas (Zambrowicz *et al.*, 2013); tales como propiedades antiproliferativas, antimicrobianas, efectos inhibitorios de la hipertensión arterial (ECA), capacidad reductora del colesterol, actividades antitrombóticas y antioxidantes, aumento de la absorción y biodisponibilidad de minerales (Malaguti *et al.*, 2014).

Además de la secuencia de aminoácidos las actividades biológicas también se basan en la composición inherente, así como en su estructura. El tamaño de las secuencias activas puede variar de dos a veinte aminoácidos, y algunos péptidos son conocidos por sus propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2003); difieren ampliamente en su estructura química, sin embargo tienen características en común: son sustancias orgánicas generalmente de baja masa molecular y tienen acción protectora en la salud cuando se encuentran en la dieta en cantidades significativas (Lemes *et al.*, 2016).

2.5.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los péptidos está relacionada con su composición, hidrofobicidad, estructura y capacidad para retrasar o prevenir los procesos oxidativos. Durante la respiración y metabolismo en organismos aeróbicos se producen radicales libres (O_2^- , OH, H_2O_2) que cuando se producen en exceso y no se eliminan pueden atacar a las moléculas más cercanas al sustraer electrones y comenzar una reacción en cadena en la que una molécula sin un electrón ataca otras moléculas, y así sucesivamente (Di Bernardini *et al.*, 2011). Los radicales libres juegan un papel crítico en los trastornos relacionados con la salud y pueden conducir a enfermedades del corazón, aterosclerosis, diabetes, cáncer y enfermedades neurológicas (Butterfield *et al.*, 2002). En los alimentos pueden dar como resultado el deterioro de los atributos de calidad, como el sabor, color y textura (Zhong, Ma, Lin, & Luo, 2011).

Las proteínas y los péptidos pueden inhibir la oxidación de lípidos a través de múltiples vías que incluyen; la inactivación de especies reactivas al oxígeno, eliminación de radicales libres, la quelación de metales de transición prooxidativos, la reducción de hidroxiperóxidos que contribuyen a la capacidad antioxidante endógena de los alimentos (Elias, Kellerby, & Decker, 2008).

La quelación de metales puede ser un componente importante en la inhibición de la formación de radicales libres y algunos péptidos son efectivos como quelantes, particularmente aquellos que contienen cisteína, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. Estos han sido identificados en hidrolizados de proteína de leguminosas (Guo *et al.*, 2014).

Los péptidos antioxidantes tienen una secuencia de aminoácidos característica, las más reactivas son cadenas laterales que contienen azufre (cisteína y metionina) o cadenas laterales aromáticas (triptófano, tirosina y fenilalanina) a partir de las cuales el hidrógeno se extrae fácilmente (Power *et al.*, 2013). En el momento de la hidrólisis de la proteína, la estructura se verá alterada y el grupo R más activo del aminoácido estará expuesto. Por lo tanto, los biopéptidos pueden tener mayor actividad antioxidante que la proteína intacta (H. M. Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto, & Nokihara, 1998).

(Medina-Godoy *et al.*, 2012) demostraron que la valina y leucina ejercen propiedades antioxidantes cuando se encuentran en el extremo N de un péptido, por lo contrario la tirosina y el triptófano ejercen propiedades antioxidantes cuando se encuentran en el C-terminal.

2.5.2. Eliminación del radical libre DPPH

Generalmente las pruebas *in vitro* para determinación de actividades antioxidantes usan trampas de radicales libres y son relativamente sencillas de realizar. Entre los métodos de eliminación de radicales libres, el método DPPH es rápido, simple (es decir, no involucra largas metodologías o diversos reactivos) y económico en comparación con otros métodos de análisis (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013).

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (α , α -difenil- β -picril-hidrazilo; DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también da lugar al color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción en una solución de etanol concentrada a aproximadamente 515 nm (Badarinath *et al.*, 2010).

Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de un sustrato (AH) que puede donar un átomo de hidrógeno, esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de color (Figura 1).

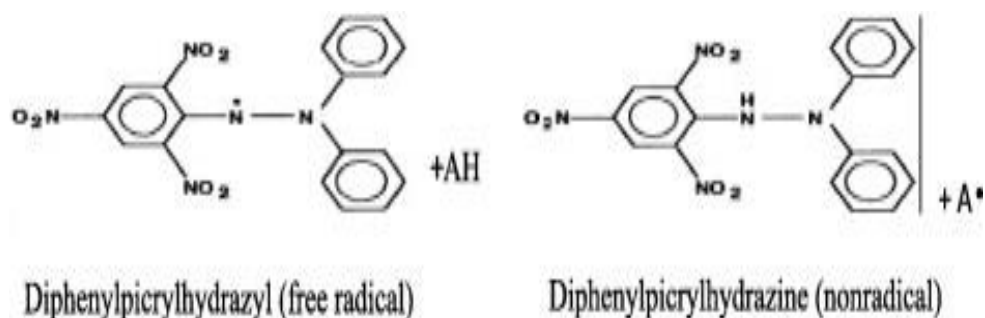


Figura 1. Método de acción de sustratos sobre el radical DPPH

Fuente: (Alam *et al.*, 2013)

2.6. Digestión

La actividad biofuncional de los péptidos *in vitro* no siempre implica un efecto *in vivo*, incluso si lo hace, es muy difícil establecer una relación directa entre la actividad *in vitro* e *in vivo*. Esto se debe principalmente a la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos para ejercer un efecto potencial. Por lo tanto, necesitan permanecer activos durante la digestión de proteasas humanas y ser transportados a través de la pared intestinal (Singh *et al.*, 2014). La ingestión oral de biopéptidos estarán expuestos a la acción de al menos 40 enzimas diferentes, antes de alcanzar la circulación sistémica (Segura-Campos *et al.*, 2011).

La biodisponibilidad y el mecanismo de su absorción, distribución, metabolismo y excreción de los péptidos siguen siendo procesos inexplorados en la mayoría de los casos. No está claro si su efecto se ejerce directamente en el intestino o solo después de su absorción y transporte a través del torrente sanguíneo. La contribución de la microflora intestinal para amplificar o suprimir sus efectos apenas ha sido explorada. Muchas perspectivas de investigación que rodean a los biopéptidos aún no se han realizado (Maestri, Marmioli, & Marmioli, 2016).

Por ello se ha usado ampliamente en muchos campos de las ciencias de la alimentación y la nutrición, la digestión gastrointestinal simulada (DGS), ya que la realización de ensayos en humanos a menudo es costosa, exige muchos recursos y es éticamente discutible. Como consecuencia las alternativas *in vitro* que determinan puntos finales como la bioaccesibilidad, o la digestibilidad de macronutrientes (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) se utilizan para detectar y construir nuevas hipótesis (Minekus *et al.*, 2014).

Se han utilizado una gran variedad de enzimas de origen porcino o humano; las diferencias en el pH, el tiempo de digestión, la fuerza iónica y el tipo de mineral alteran la actividad enzimática y otros fenómenos también pueden modificar considerablemente los resultados. Otros parámetros tales como la presencia de fosfolípidos, enzimas individuales como la lipasa gástrica y emulsionantes digestivos frente a sus mezclas (pancreatina y sales biliares) y la proporción del bolo alimenticio a fluidos digestivos también se han discutido extensamente (Minekus *et al.*, 2014).

Las actividades de los biopéptidos pueden variar debido a que durante la digestión gastrointestinal son sometidos a la acción de enzimas proteolíticas y cambios de pH debidos a los jugos gástricos. Por ello los péptidos con largas secuencias de aminoácidos o hidrolizados requieren ser incorporados a sistemas de liberación controlada tales como micro y nano encapsulación (liposomas, complejos coacervados, entre otros) (Luna-Vital, Mojica, González de Mejía, Mendoza, & Loarca-Piña, 2015).

2.7. Entrampamiento de compuestos activos

Los péptidos activos pueden degradarse durante la digestión, y con ello no podrán ser absorbidos o llegar a los tejidos destinados a una concentración necesaria para ejercer su función (Malaguti *et al.*, 2014); además de la presencia de residuos específicos, también es probable que la carga, el peso molecular, el potencial de enlaces hidrógeno y la hidrofobicidad afecten la resistencia a las proteasas y la biodisponibilidad de los péptidos. La incorporación de hidrolizados y péptidos activos en alimentos funcionales puede verse obstaculizada por varios desafíos, como sabor amargo, higroscopicidad, hidrofobicidad, reacción con la matriz alimentaria, incompatibilidad, biodisponibilidad limitada y bioestabilidad, éstas últimas características son cruciales para lograr beneficios fisiológicos ya que los péptidos necesitan alcanzar sus objetivos permaneciendo intactos para ejercer su bioactividad (Udenigwe, 2014).

El desarrollo de métodos de entrampamiento podría mejorar la estabilidad y protección de los ingredientes activos durante el procesamiento, permitiendo su entrega controlada a sitios específicos del tracto gastrointestinal (Carbonaro, Maselli, & Nucara, 2015). Las propiedades químicas de los péptidos derivados de leguminosas pueden modificarse sistemáticamente mediante métodos físicos y químicos para el desarrollo de nuevos derivados peptídicos con bioactividad potenciada. Una comprensión profunda de cómo la estructura de la proteína afecta la liberación de secuencias bioactivas, así como de la modificación estructural que ocurre durante el procesamiento tecnológico y la digestión gastrointestinal, impulsará estrategias novedosas dirigidas a la mejora del potencial nutraceutico de los alimentos vegetales ricos en proteínas (Carbonaro *et al.*, 2015).

Por lo anterior, a continuación se mencionan los principales métodos de entrampamiento usados en la protección de péptidos bioactivos.

2.8. Métodos de encapsulación

La encapsulación es el proceso utilizado para atrapar un componente (denominado material central o agente activo) dentro de otro (llamado recubrimiento, matriz o material pared). Las técnicas de encapsulación pueden contribuir a extender la vida útil del producto, protegiendo los componentes activos contra la degradación durante su almacenamiento, manteniendo su funcionalidad; enmascarando el sabor u olor no deseado (Luca, Cilek, Hasirci, Sahin, & Sumnu, 2014).

El siguiente apartado se centra en técnicas relevantes, actualmente aplicadas para la encapsulación de hidrolizados y péptidos proteicos derivados de alimentos. Aunque diferentes métodos y materiales están disponibles, su elección dependerá de las propiedades bioactivas y las características deseadas del encapsulado (Celli, Ghanem, & Brooks, 2015).

2.8.1. Secado por aspersión

Tanto la encapsulación basada en proteínas como en polisacáridos emplean con frecuencia el secado por aspersión para lograr la encapsulación debido a los costos de producción relativamente bajos y la facilidad de la técnica (Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindade, & Netto, 2010).

El proceso de secado conduce a la formación de una película delgada en la superficie de las gotitas, permitiendo la evaporación de moléculas pequeñas y retención de las grandes (Rocha, Trindade, Netto, & Favaro-Trindade, 2009). El tamaño de las gotas secas está íntimamente relacionado con las características de la solución (tensión superficial y viscosidad), configuración del equipo (tipos de boquilla, tamaño del orificio de la boquilla, presión de pulverización y velocidad de flujo) y finalmente la determinación del tiempo de secado y tamaño de partícula (Li, Anton, Arpagaus, Belleteix, & Vandamme, 2010).

El proceso es llevado a cabo durante un periodo relativamente corto (que van desde segundos a minutos dependiendo del equipo) (Anwar & Kunz, 2011),

sin embargo esta técnica produce partículas porosas con alta concentración de compuestos activos en la superficie, las concavidades en las microcápsulas se observan comúnmente debido a la rápida evaporación del disolvente (Favaro-Trindade *et al.*, 2010).

Se tiene que tener en cuenta que la alta temperatura utilizada durante el proceso de secado por aspersión puede conducir a la desnaturalización de las matrices de proteínas y posiblemente alterar la estructura del péptido debido a su reactividad. Por ejemplo, el pardeamiento no enzimático puede ocurrir si hay una cantidad de azúcares reductores en el sistema (Rocha *et al.*, 2009).

2.8.2. Hidratación de película

La encapsulación basada en liposomas de hidrolizados y péptidos proteicos de alimentos, emplea principalmente la técnica de hidratación de película. Esta opción es popular debido al mecanismo simple pero efectivo en el que los fosfolípidos se autoensamblan en respuesta al aporte de energía en forma de calor, agitación y sonicación, atrapando así el núcleo acuoso que contiene los péptidos. La formación de una bicapa en liposomas no requiere el uso de ningún equipo sofisticado, excepto la aplicación de energía para impulsar el autoensamblaje. La desventaja de la formación de liposomas es que el mecanismo de formación no controlado puede conducir a una baja reproducibilidad y una eficiencia de encapsulación variable. Además, los solventes orgánicos utilizados en el proceso de encapsulación liposomal deben eliminarse antes de su aplicación en alimentos funcionales, lo que introduce pasos adicionales que pueden afectar la calidad y la eficiencia de encapsulación (Mohan *et al.*, 2015).

2.8.3. Coacervación

Esta técnica se considera eficaz para la encapsulación, ya que se basa en la atracción electrostática entre el núcleo y los materiales de la pared, implicando la separación de fases y la deposición de la fase coacervada en el núcleo (Gouin, 2004).

Cuando se mezclan dos biopolímeros diferentes pueden formar un sistema de una o dos fases dependiendo de la naturaleza de los biopolímeros implicados, la composición de la solución y las condiciones ambientales prevalecientes (Figura 3). En un sistema de una fase, los dos biopolímeros pueden existir como moléculas individuales o como complejos solubles que se distribuyen uniformemente en todo el sistema. En un sistema de dos fases, la solución se separa (McClements, 2006).

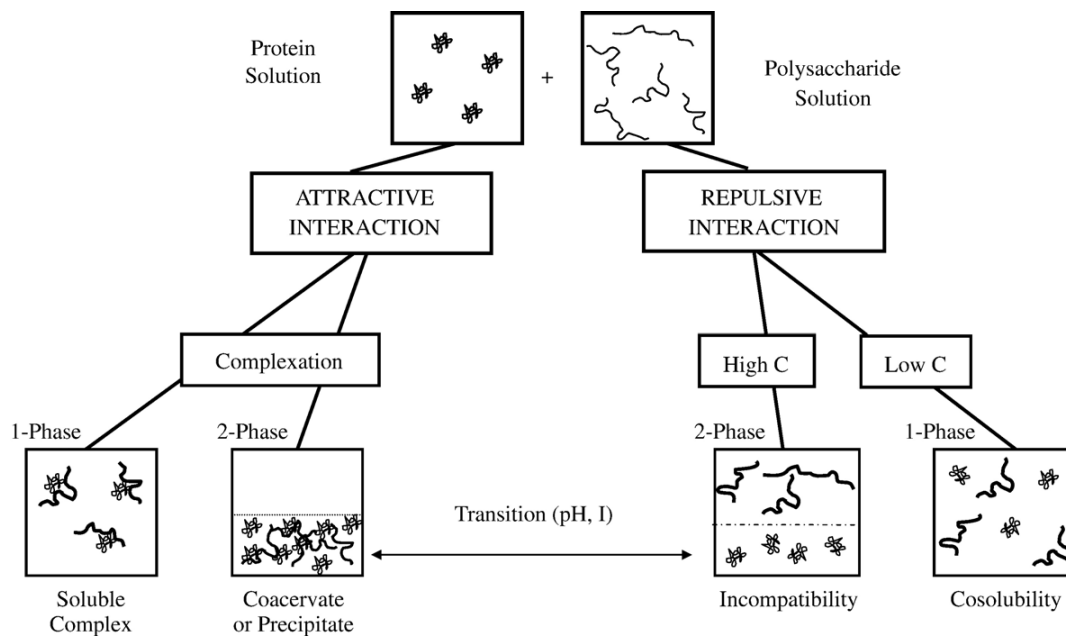


Figura 2. Tipos de disposiciones estructurales que pueden ocurrir cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan.

Fuente: (McClements, 2006)

La separación de fases puede ocurrir a través de dos mecanismos fisicoquímicos diferentes: en la separación asociativa, hay una fuerte atracción entre los dos tipos diferentes de biopolímeros que hace que se asocien entre sí, el sistema bifásico resultante consiste en una fase con una cantidad de ambos biopolímeros y una fase que se agota en ambos biopolímeros; en la separación segregativa, hay una fuerte repulsión entre los dos tipos diferentes de biopolímeros, el origen molecular de este efecto suele ser el efecto de exclusión estérica, este tipo de separación de

fases a menudo ocurre cuando uno o ambos biopolímeros no están cargados, o cuando ambos biopolímeros tienen cargas eléctricas similares (McClements, 2006).

A diferencia de otros métodos de encapsulación, la coacervación se ha utilizado para lograr eficiencias de encapsulación de hasta 91.6% usando cantidades similares de núcleo y materiales de pared, la afinidad entre el núcleo y la pared debido a las propiedades de la superficie contribuye a la alta eficiencia resultante (Mendanha *et al.*, 2009). Una advertencia al lograr una afinidad tan alta entre el núcleo y la pared es que los péptidos pueden estar estrechamente ligados en la medida en que se hace difícil liberarlos cuando sea necesario. El material de la pared debe tener carga compatible (opuesta) con el núcleo para poder coacervarse. Se pueden usar polisacáridos aniónicos tales como goma arábica o alginato para coacervar péptidos catiónicos, y *viceversa* (Zhang & Zhang, 2013).

Las microcápsulas producidas por coacervación son insolubles en agua y resistente al calor, poseen excelentes características de liberación controlada con base en la tensión mecánica, temperatura y liberación sostenida. Un creciente número de investigadores han centrado su atención en el estudio de este sistema, especialmente en la mezcla de proteínas y polisacáridos (Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements, 2006).

2.9. Materiales (biopolímeros)

Las proteínas, los polisacáridos y los lípidos son los tres sistemas transportadores que se han utilizado en la encapsulación de péptidos. Los sistemas basados en lípidos están destinados a ser utilizados para mejorar la biodisponibilidad y bioestabilidad de los péptidos encapsulados, mientras que los sistemas proteína-polisacárido apuntan principalmente a enmascarar el sabor amargo y reducir la higroscopicidad de los hidrolizados de proteínas (Mohan *et al.*, 2015).

La industria alimentaria está restringida al uso de matrices portadoras que son comestibles, biodegradables, no tóxicas y de bajo costo (Fathi, Martín, & McClements, 2014), por lo cual existe la necesidad de analizar los diferentes portadores con un enfoque particular en su uso para encapsular hidrolizados y péptidos alimentarios (Figura 3).

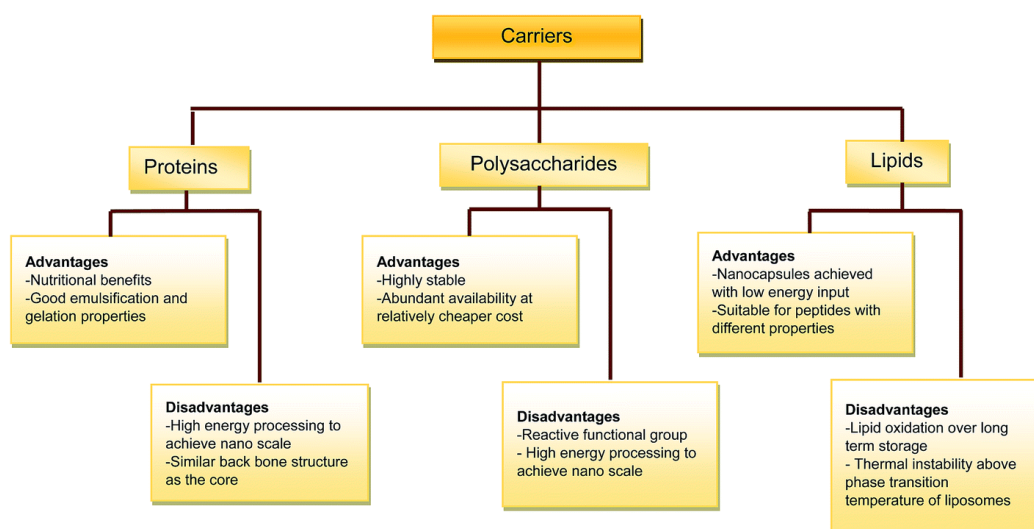


Figura 3. Portadores utilizados para la encapsulación de hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias.

Fuente: (Mohan *et al.*, 2015)

2.9.1. Portadores basados en proteínas

La preferencia hacia el uso de proteínas para la liberación de compuestos bioactivos es debida a sus propiedades funcionales tales como: capacidades para formar geles, solubilidad y capacidad de emulsificación, además de su beneficio nutricional como fuente de aminoácidos esenciales (Mohan *et al.*, 2015).

A pesar de la popularidad de los portadores basados en proteínas para suministrar otros compuestos bioactivos alimentarios como flavonoides, vitaminas o β -caroteno, el uso de proteínas en la encapsulación de péptidos es limitado. Proteger la sustancia del núcleo bioactivo con un material químicamente similar es desafiante, debido a la similitud estructural; es decir,

se predice que la matriz de encapsulación enfrentará problemas de inestabilidad similares al compuesto bioactivo encapsulado (Molina Ortiz *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los portadores de proteína reducen la higroscopicidad de los péptidos, además los polisacáridos se pueden combinar con las proteínas para proporcionar estabilidad estructural en la encapsulación (Mohan *et al.*, 2015). Entre las fuentes de proteínas, la soya ha sido la elección predominante para la encapsulación de péptidos bioactivos, mientras que las proteínas de la leche se usan ampliamente en la encapsulación de otros compuestos bioactivos no peptídicos (Tavares, Croguennec, Carvalho, & Bouhallab, 2014).

Proteínas de soya

Las proteínas vegetales tienden a ser más abundantes y económicas; se han probado varias proteínas de leguminosas, especialmente proteínas de soya, como materiales de encapsulación para incorporar fitoquímicos y otros nutraceuticos (vitaminas, minerales, péptidos bioactivos), lo que permite su liberación controlada. La proteína de soya se ha utilizado sola o en combinación con polisacáridos aniónicos, dependiendo de su aplicación (Maltais, Remondetto, & Subirade, 2008).

Las proteínas de soya se componen de una mezcla de albúminas y globulinas, 90% de las cuales son proteínas de almacenamiento con estructura globular, que consisten principalmente en globulinas: 7S (β conglucina) y 11S (glicina) (Nishinari, Fang, Guo, & Phillips, 2014). Las globulinas son fracciones de proteína en las cuales las subunidades se asocian a través de enlaces hidrófobos, enlaces hidrógeno y disulfuro (Shan *et al.*, 2015). Las proteínas de soya se componen de 20 aminoácidos diferentes, incluyendo lisina, leucina, fenilalanina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, entre otros (Félix, Martín-Alfonso, Romero, & Guerrero, 2014).

Las ventajas de la proteína de soya son:

- 1.- Proporciona un buen equilibrio en la composición de aminoácidos, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales.
- 2.- Contiene componentes fisiológicamente benéficos que han mostrado disminuir el contenido de colesterol y reducen el riesgo de la hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares.
- 3.- Tiene excelentes propiedades funcionales, tales como; gelificación, capacidad emulsionante, de retención de agua y aceite (Nishinari *et al.*, 2014).

La proteína de soya está disponible comercialmente en tres formas diferentes provenientes de la industria de procesamiento: la harina de soya (54% de proteína), concentrado de proteína de soya (65-72% de proteína) y aislado de proteína de soya (APS, $\geq 90\%$ de proteína) (Saenghirunwattana, Noomhorm, & Rungsardthong, 2014).

Con respecto a su potencial como vehículo de ingredientes activos de liberación controlada, la proteína de soya presenta varias ventajas, ya que los materiales de pared de la cápsula podrían ser formuladas dependiendo del tipo de encapsulación, para ser sensibles a pH (coacervación compleja), temperatura (desnaturalización térmica) o enzimas (proteasas) (L. Chen, Remondetto, & Subirade, 2006).

2.9.2. Portadores basados en polisacáridos

Los polisacáridos son generalmente ideales para usar como agentes de encapsulación porque son estructuralmente estables, de naturaleza abundante y bajo costo. Los grupos funcionales reactivos de polisacáridos los convierten en una de las mejores opciones como matrices portadoras (Fathi *et al.*, 2014). En condiciones extremas (alta temperatura), la pared del polisacárido es susceptible de reaccionar con el núcleo peptídico para formar productos complejos (por ejemplo, productos derivados de la reacción de Maillard), que pueden ser potencialmente tóxicos y también agotan los péptidos bioactivos. Con el fin de eludir este desafío los grupos funcionales

reactivos de polisacáridos se han modificado por procesos como carboximetilación para producir vehículos relativamente inertes (Ruiz, Segura, Betancur, & Chel, 2013).

La estructura molecular de los polisacáridos contribuye a su estabilidad como vehículos durante la producción y el procesamiento de productos encapsulados. Los polisacáridos derivados de plantas, animales y fuentes microbianas, tales como la goma arábiga, quitosano, ciclodextrina, maltodextrina y carrageninas se han utilizado para la encapsulación de proteínas alimentarias y péptidos (Celli *et al.*, 2015).

Carragenina

La carragenina es un carbohidrato natural (polisacárido) obtenido de algas rojas comestibles, se usan en una variedad de aplicaciones comerciales como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes, especialmente en productos alimenticios y salsas. Aparte de estas funciones, también se usan en medicina experimental, formulaciones farmacéuticas, cosméticos y aplicaciones industriales (Necas & Bartosikova, 2013).

La carragenina es una poligalactosa sulfatada que contiene de 15 a 40% de grupos éster-sulfato y un promedio de masa molecular muy por encima de 100 kDa. Está formada por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa unidas por enlaces glucosídicos α -(1→3) y β -(1→4) alternadamente. La carragenina se clasifica en varios tipos, tales como; λ , κ , ι (Figura 4). Esta clasificación está considerada con base en su solubilidad en cloruro de potasio. Las principales diferencias que influyen en sus propiedades son el número y la posición del grupo éster-sulfato, así como el contenido de anhidro-galactosa. Los nombres reflejan diferencias generales en la composición y grado de sulfatación en lugares específicos en el polímero (Barbeyron, Michel, Potin, Henrissat, & Kloareg, 2000).

Los niveles más altos de éster-sulfato significan una menor temperatura de solubilidad y una menor resistencia del gel. El tipo Kappa tiene un contenido

de éster sulfato de aproximadamente 25 a 30% y un contenido de 3,6-AG de aproximadamente 28 a 35%. El tipo Iota tiene un contenido de éster sulfato de aproximadamente 28 a 30% y un 3,6-AG contenido de aproximadamente 25 a 30%. El tipo Lambda tiene un contenido de éster sulfato de aproximadamente 32 a 39% y ningún contenido de AG (Barbeyron *et al.*, 2000).

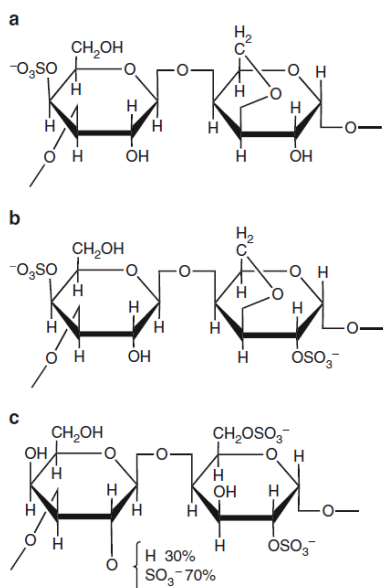


Figura 4. Tipos de carragenina: a (κ), b (ι) y c (λ)

Fuente: (Necas & Bartosikova, 2013).

2.10. Potencial ζ

El potencial ζ es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas. Sus unidades son los milivoltios (mV). La carga superficial es una de las propiedades que transmiten la estabilidad de los productos encapsulados. El hidrolizado de proteína encapsulada y los productos peptídicos con baja magnitud de potencial zeta tienen la tendencia a agregarse en un entorno acuoso (da Rosa Zavareze *et al.*, 2014).

Aunque existe un conocimiento limitado sobre la dinámica de carga superficial de los hidrolizados y péptidos proteicos de alimentos encapsulados (Mohan *et al.*, 2015), se ha reportado que el aumento simultáneo de la concentración de componentes, tanto del núcleo como de la pared, reduce el potencial zeta (Mosquera *et al.*, 2014).

La carga neta del péptido depende del pH del medio durante la encapsulación, y esto puede influir en la eficiencia de encapsulación debido a los efectos electrostáticos (Favaro-Trindade *et al.*, 2010). Ruíz *et al.*, 2013 informaron que se observó una eficiencia de encapsulación máxima a pH 10 con una solución de CaCl₂ diluida, mientras que se observó la menor eficiencia a pH neutro y alta concentración de CaCl₂ (Ruiz *et al.*, 2013). Por el contrario, se ha encontrado que la formación de liposomas produce una mayor eficiencia cuando se realiza a pH neutro (Mosquera *et al.*, 2014).

Tomados en conjunto, el tamaño del producto encapsulado está determinado por los parámetros de producción, las propiedades inherentes de la pared y los materiales del núcleo, como la entrada de energía por unidad de masa, la tensión superficial y la densidad (Mohan *et al.*, 2015).

2.11. Interacciones proteína-polisacárido

El conocimiento del origen y la naturaleza de las interacciones involucradas a menudo se pueden utilizar para diseñar nuevas estructuras y propiedades fisicoquímicas en los sistemas alimentarios. Las principales interacciones no covalentes entre proteínas y polisacáridos son: exclusión estérica, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y las más comunes, interacciones electrostáticas; éstas interacciones son importantes para los biopolímeros que tienen cierta carga eléctrica en las condiciones en que se usan (pH y fuerza iónica). Pueden ser atractivos o receptivos dependiendo si los grupos de carga involucrados tienen signos diferentes o similares. La fuerza y el alcance de estas interacciones disminuyen con el aumento de la fuerza iónica (McClements, 2006).

Se pueden fabricar partículas de biopolímeros con estructuras específicas a través del ensamblaje controlado de proteínas y moléculas de polisacáridos. Uno de los métodos más comúnmente utilizado se basa en la atracción electrostática entre grupos cargados opuestamente bajo condiciones de solución apropiadas (Norton & Frith, 2001). Las proteínas poseen una red de carga negativa por encima de su punto isoelectrico (PI) y una red de carga

positiva por debajo de ese pH. En su PI no tienen carga, pero hay regiones localizadas en la superficie de la proteína que presentan carga positiva o negativa a ciertas condiciones, lo que tiene consecuencias para su interacción con polisacáridos iónicos (Cooper, Dubin, Kayitmazer, & Turksen, 2005).

En ciertos valores de pH se localizan regiones catiónicas en la superficie de la proteína, que interactúan con grupos aniónicos de la cadena de polisacáridos, lo que conduce a la formación de complejos electrostáticos débiles y la formación de complejos solubles. La reducción adicional del pH aumenta la cantidad de grupos catiónicos, lo que induce una mayor atracción electrostática, que finalmente da como resultado la neutralización de carga del complejo proteína-polisacárido formando una separación de fases, a ese proceso se le conoce como coacervación (De Kruif & Tuinier, 2001).

A valores de pH más bajos, la interacción electrostática entre la proteína y las moléculas de polisacáridos pueden conducir a la formación de precipitados que tienden a sedimentarse. Si el pH se reduce por debajo del pKa de los grupos aniónicos en la cadena de polisacáridos, entonces las interacciones atractivas entre las moléculas de la proteína y el polisacárido pueden debilitarse y el complejo se disocia (Jones & McClements, 2011).

2.12. Literatura citada

- Agvei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Anwar, S. H., & Kunz, B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.047>

- Badarinath, A. V., Mallikarjuna Rao, K., Madhu Sudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on In-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276–1285.
- Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B., & Kloareg, B. (2000). ι -Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ -carrageenases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35499–35505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003404200>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237. <https://doi.org/1851-6114>
- Boutrou, R., Henry, G., & Sanchez-Rivera, L. (2015). On the trail of milk bioactive peptides in human and animal intestinal tracts during digestion: A review. *Dairy Science and Technology*, 95(6), 815–829. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0210-0>
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing , characterization , functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Pocernich, C. B., Drake, J., Scapagnini, G., & Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(8), 444–461. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00205-X)
- Byun, T., Kofod, L., & Blinkovsky, A. (2001). Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 2061–2063. <https://doi.org/10.1021/jf001091m>
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76(P1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods—a Review of Methods and Current Limitations. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), 1825–1837. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1559-z>

- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49–53. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17(5), 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011>
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1–2), 52–78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>
- da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., Mello El Halal, S. L., da Rocha, M., Colussi, R., Marques de Assis, L., ... Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.013>
- De Kruif, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 555–563. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5)
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedaway, A. A., & Gafar, A. F. (2001). Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, 74(4), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00163-7)
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 39). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>

- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>
- Félix, M., Martín-Alfonso, J. E., Romero, A., & Guerrero, A. (2014). Development of albumen/soy biobased plastic materials processed by injection molding. *Journal of Food Engineering*, 125(1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.018>
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15(7–8), 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Guo, L., Harnedy, P. A., Li, B., Hou, H., Zhang, Z., Zhao, X., & FitzGerald, R. J. (2014). Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science and Technology*, 37(2), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.007>
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein-polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5540–5547. <https://doi.org/10.1021/jf052860a>
- Irshad, I., Kanekanian, A., Peters, A., & Masud, T. (2015). Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0920-8>
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.006>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060950>

- Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F., & Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.113>
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Millán, F. (2002). Lupinus angustifolius protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76(3), 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00285-0)
- Luca, A., Cilek, B., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2014). Storage and Baking Stability of Encapsulated Sour Cherry Phenolic Compounds Prepared from Micro- and Nano-Suspensions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 204–211. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1048-1>
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76(P1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
- Maestri, E., Marmiroli, M., & Marmiroli, N. (2016). Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *Journal of Proteomics*, 147, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.048>
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. G., & Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21120–21135. <https://doi.org/10.3390/ijms151121120>
- Maltais, A., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2008). Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.026>
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.003>
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1974–1981. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5570>
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Adv.*, 5(97), 79270–79278. <https://doi.org/10.1039/C5RA13419F>
- Molina Ortiz, S. E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 919–923. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.004>
- Mosquera, M., Giménez, B., Da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, 156, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011>
- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, 58(4), 187–205.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Norton, I. T., & Frith, W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 543–553. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00062-5)
- Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., & Kiosseoglou, V. (2010). Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 304–313. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3816>
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2009). Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chemistry*, 117(3), 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.039>
- Rocha, G. A., Trindade, M. A., Netto, F. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization, and application in protein bars. *Food Science and Technology International*, 15(4), 407–413. <https://doi.org/10.1177/1082013209346042>
- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43(2), 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.002>

- Ruiz, J. C., Segura, M. R., Betancur, D., & Chel, L. A. (2013). Encapsulation of Phaseolus lunatus Protein Hydrolysate with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *ISRN Biotechnology*, 2013, 341974. <https://doi.org/10.5402/2013/341974>
- Saenghirunwattana, P., Noomhorm, A., & Rungsardthong, V. (2014). Mechanical properties of soy protein based “green” composites reinforced with surface modified cornhusk fiber. *Industrial Crops and Products*, 60, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.010>
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Hernandez-Escalante, V. M. (2011). Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, 27(3), 213–226. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563395>
- Shan, H., Lu, S. W., Jiang, L. Z., Wang, L. K., Liao, H., Zhang, R. Y., ... Sun, X. D. (2015). Gelation property of alcohol-extracted soy protein isolate and effects of various reagents on the firmness of heat-induced gels. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 627–637. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.850508>
- Singh, B. P., Vij, S., & Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.022>
- Soto, C., Guillermo, J., Plata, C., Sepúlveda, L., Efraín, R., Eligio, E. O., ... Antonio, J. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 1(1), 19–26.
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 37(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.008>
- Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science and Technology*, 36(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004>
- Vairo Cavalli, S., Silva, S. V., Cimino, C., Malcata, F. X., & Priolo, N. (2008). Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from Silybum marianum flowers. *Food Chemistry*, 106(3), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.015>
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., & Trziszka, T. (2013). Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44(2), 315–320. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1379-7>
- Zhang, B., & Zhang, X. (2013). Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from Spirulina platensis. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1230–1238. <https://doi.org/10.1002/btpr.1769>

Zhong, S., Ma, C., Lin, Y. C., & Luo, Y. (2011). Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 126(4), 1636–1642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.046>

3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPEPTIDOS DE ALBERJÓN (*Lupinus gredensis*), CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

RESUMEN

Se obtuvieron y caracterizaron biopéptidos de alberjón (*Lupinus gredensis*) usando el preparado enzimático comercial Flavourzyme®, debido a que en general las leguminosas son una excelente fuente de proteínas y aminoácidos esenciales; diversas investigaciones coinciden sobre la potencial bioactividad de péptidos derivados de leguminosas, como al actividad antioxidante. Para la producción de biopéptidos, se solubilizó la proteína de la harina a pH 12 y 25°C, posteriormente se determinó la cantidad de proteína mediante el método Lowry (11.77 ± 0.42 mg/mL). Se ajustaron a las condiciones de catálisis (pH 7 y 50 °C) y se adicionó Flavourzyme® a razón de 125 LAPU g⁻¹proteína, después de 7 horas de reacción se inactivo la enzima y la muestra fue liofilizada. Dentro de la caracterización molecular se determinó el grado de hidrólisis, durante cada hora de reacción, se aplicó el método TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico), después del tiempo de reacción se obtuvo un GH de 12%; la parte de distribución de pesos moleculares se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE (gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida), mostrando que los péptidos obtenidos se encontraron en un peso molecular de entre 25 y 10 kDa. Se determinó la actividad antioxidante de los péptidos mediante el método DPPH, con un valor IC₅₀ de 4.06 ± 0.2 mg/mL.³

Palabras clave: flavourzyme, GH, SDS-PAGE, DPPH, *Lupinus gredensis*.

³ Tesis de maestría Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Miriam Quintana Moreno

Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

ABSTRACT

They were obtained and characterized by biopeptides of alberjon (*Lupinus gredensis*) using the commercial enzymatic preparation Flavourzyme®, because in general legumes are an excellent source of proteins and essential amino acids; Several researches agree on the potential bioactivity of peptides derived from legumes, antioxidant activity. For the production of biopeptides, the protein of the flour was solubilized at pH 12 and 25 ° C, later the amount of protein was determined by the Lowry method (11.77 ± 0.42 mg / mL). They were adjusted to the catalysis conditions (pH 7 and 50 ° C) and Flavourzyme® was added at 125 LAPU g⁻¹protein, after 7 hours of reaction the enzyme was inactivated and the sample was lyophilized. Within the molecular characterization the degree of hydrolysis was determined, during each hour of reaction, the TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) method was applied, after 7 hours a GH of 12% was obtained; The molecular weight distribution part was carried out by SDS-PAGE electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel), showing that the obtained peptides are in a molecular weight between 25 and 10 kDa with respect to the standard. The antioxidant activity of the peptides was determined by the DPPH method, with an IC₅₀ value of 4.06 ± 0.2 mg/mL.⁴

Keywords: flavourzyme, GH, SDS-PAGE, DPPH, *Lupinus gredensis*

⁴ Master's Thesis: Universidad Autonoma Chapingo
Author: Miriam Quintana Moreno
Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

3.1. Introducción

Actualmente, se ha ido acrecentando el interés por los alimentos funcionales que promueven un efecto benéfico en la salud, como suplementos dietéticos y preparaciones farmacéuticas que contienen péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias. A pesar de la gran cantidad de literatura sobre péptidos derivados de proteínas animales, recientemente la comunidad científica solo ha investigado la posibilidad de obtener péptidos bioactivos a partir de fuentes vegetales, evidenciando características funcionales novedosas incluyendo actividades antihipertensiva, antioxidante, antitumoral, antiproliferativa, hipocolesterolémica y antiinflamatoria (Rizzello *et al.*, 2016).

Muchas de las propiedades fisiológicas y funcionales de las proteínas se atribuyen a péptidos biológicamente activos que son a menudo encriptados en la secuencia nativa (Gobbetti, De Angelis, Corsetti, & Di Cagno, 2005; Shahidi & Zhong, 2011). Biogénico o bioactivo los péptidos se pueden producir a partir de precursores de proteínas, ya sea por digestión gastrointestinal, por el procesamiento de alimentos (maduración, fermentación, cocción), almacenamiento o por hidrólisis *in vitro* por enzimas proteolíticas (Carrasco-Castilla, Hernández-Álvarez, Jiménez-Martínez, Gutiérrez-López, & Dávila-Ortiz, 2012).

El proceso enzimático se basa en el uso de una o diferente combinaciones de proteinasas como pepsina, tripsina, quimotripsina, bromelina, papaína, alcalasa, neutrasa, flavourzyme y muchos otras. Los parámetros críticos de hidrólisis (temperatura, pH, solución acuosa o buffer) deben ser optimizados para cada sustrato y cada enzima seleccionada o combinación de enzimas, y deben mantenerse durante proteólisis para asegurar la liberación eficiente de péptidos (Aluko, 2015).

La actividad antioxidante parece estar fuertemente correlacionada con la composición, conformación e hidrofobicidad de los aminoácidos; habitualmente, los péptidos antioxidantes están constituidos por 2-20 restos

de aminoácidos y tienen masas moleculares menores de 6 kDa (Coda, Rizzello, Pinto, & Gobbetti, 2012). Los péptidos antioxidantes actúan como inhibidores de la peroxidación lipídica, eliminadores directos de radicales libres y/o como agentes para quelar iones de metales de transición que catalizan la generación de especies radicales (Shimada, Fujikawa, Yahara, & Nakamura, 1992).

En este sentido, el objetivo de esta sección fue obtener y caracterizar biopéptidos de alberjón (*Lupinus gredensis*) con actividad antioxidante, usando el combinado enzimático Flavourzyme®. Una vez caracterizados y comprobada su actividad antioxidante, en la segunda parte de esta investigación fueron sometidos a un proceso de entranpamiento (coacervación) y a una digestión gastrointestinal simulada.

3.2. Materiales

La semilla de alberjón fue adquirida en el mercado local de Texcoco de Mora, Estado de México, para la hidrólisis se usó la mezcla de proteasas Flavourzyme® 1000 L de BIOTECOSA S.A. de C.V. (Tlalnepantla, Estado de México, México). Durante todo el trabajo de investigación se utilizó agua destilada y desionizada. Los reactivos Folin-ciocalteu-fenol (2 N), Ácido 2, 4, 6-trinitrobenzensulfónico (TNBS), 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) fueron obtenidos de Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, EUA) y los reactivos empleados para la electroforesis fueron de la marca Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EUA).

3.3. Métodos

3.3.1. Obtención de extracto con alto contenido de proteínas

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por (Alsohaimy, Sitohy, & El-Masry, 2007) con algunas modificaciones. En 1 L de agua destilada a temperatura ambiente se adicionaron 75 g de harina de alberjón, manteniendo agitación moderada y monitoreando el pH (12), ajustándose con HCl (1.0 N) y NaOH (6.0 y 1.0 N), durante 30 minutos. Una

vez transcurrido el tiempo de solubilización, la suspensión con alto contenido de proteína se centrifugó a 6000 *g* por 15 minutos a 4 °C en una centrífuga (5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se recuperó todo el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína.

3.3.2. Cuantificación de proteínas

Para poder adicionar la enzima fue necesario determinar la cantidad de proteína solubilizada, y con ello calcular la relación enzima:sustrato. La cuantificación de proteína se determinó mediante la metodología propuesta por (Peterson, 1977) con algunas modificaciones. Se elaboró una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (0 - 0.1 mg/mL); a 1 mL de muestra se adicionó 1 mL de solución A (carbonato de sodio (33.4 mg/mL), sulfato de cobre (0.33 mg/mL), tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (0.66 mg/mL), hidróxido de sodio (10.7 mg/mL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (33.3 mg/mL)), se agitó en vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, EUA) y se dejó en reposo 10 min, una vez transcurrido el tiempo se adicionó 0.5 mL del reactivo B (Folin-Ciocalteu, 0.3 N), se agitó nuevamente y se dejó en reposo 30 minutos en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Por último se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, MA, Waltham, EUA).

3.3.3. Obtención de péptidos bioactivos

Una vez determinada la cantidad de proteína solubilizada, se calculó la relación enzima:sustrato a razón de 125 LAPU $\text{g}^{-1}_{\text{proteína}}$, se ajustaron las condiciones de catálisis de la enzima Flavourzyme® 1000L (BIOTEC SA. de C.V., Tlalnepantla, Estado de México, México) (pH 7 y 50 °C), manteniendo agitación baja y monitoreado el pH durante 7 horas. Transcurrida la reacción, la enzima fue inactivada mediante ebullición durante 15 minutos, se centrifugó a 10000 *g* por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se ultracongeló a -80 °C y se liofilizó en una liofilizadora (Lyph Lock® 6, Labconco, MS, Kansas, EUA). Los péptidos deshidratados fueron colectados en un frasco ámbar y almacenados a -20 °C.

3.3.4. Determinación del grado de hidrólisis

Dentro de la caracterización molecular fue determinado el grado de hidrólisis mediante una cinética de liberación de grupos α -amino, de acuerdo a la metodología propuesta por (Adler-Nissen, 1979) con algunas modificaciones. Durante la reacción de catálisis, se tomaron alícuotas cada hora, para inactivar la enzima fueron sometidas a ebullición por 15 minutos y se aplicó el método TNBS, el cual consistió en adicionar a la muestra de hidrolizados 1mL de buffer de fosfatos (0.2 M) pH 8.2 y 0.5 mL de TNBS al 0.01% v/v. La reacción se llevó a cabo a 50 °C por 30 minutos en baño térmico (OVAN, México), una vez transcurrido el tiempo se adicionó sulfito de sodio (Na_2SO_3) 0.1 M con el fin de detener la reacción. Las muestras reposaron durante 10 min, enseguida se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 420 nm, las absorbancias obtenidas fueron interpoladas al modelo de regresión lineal de la curva estándar L-leucina (0-6 mM).

El GH se calculó mediante la Ecuación (1):

$$\% GH = \frac{NH_{2tx} - NH_{2t0}}{NH_{2HT} - NH_{2t0}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

NH_{2tx} = cantidad de grupos α - amino al tiempo x de hidrólisis

NH_{2t0} = cantidad de grupos α - amino al tiempo 0 de reacción

NH_{2HT} = cantidad de grupos α - amino totales

Para determinar la cantidad de grupos α - amino totales se pesaron 0.5 g de péptidos en una ampolla de vidrio y se adicionó HCl (6 N) para posteriormente sellarla, la ampolla permaneció 24 horas en una estufa de secado convectivo (Riossa Digital HCF-62, Monterrey, México) a 100 °C, concluido el tiempo de hidrólisis ácida, se añadió NaOH (6 N) para neutralizar la reacción, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 41 y se aplicó el método TNBS al filtrado obtenido.

3.3.5. Distribución de pesos moleculares

Se aplicó la metodología descrita por (Soto *et al.*, 2013) para la técnica electroforética SDS-PAGE. Se prepararon dos tipos de geles con 12 % de entrecruzamiento (debido a la polimerización de la acrilamida); el gel separador y el gel concentrador estaban constituidos por los mismos reactivos: agua desionizada, acrilamida/Bis-acrilamida, Tris-HCl pH 8.8, SDS (10 % p/v), persulfato de amonio (10 % p/v) y TEMED (tetrametiletilendiamina), variando las cantidades para cada tipo de gel.

Se usó una cámara de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad® Hercules, CA, EUA), aplicando un voltaje constante de 90 Volts por 2 horas aproximadamente hasta que el frente de la corrida alcanzó el borde inferior del gel, concluida la corrida electroforética se inició la tinción (revelado) del gel empleando una solución compuesta por metanol (50 %), ácido acético (10 %), agua destilada (40 %) y azul de Coomassie (0.05 % p/v), mientras que la solución para desteñirlo consistió de la misma mezcla con excepción del colorante. Se realizaron tres lavados con la solución desteñidora hasta que el gel se observó lo más transparente posible. Posteriormente el gel fue escaneado con ayuda de separadores de hojas transparentes y se realizó la comparación con el estándar que incluye el equipo Bio-Rad®, el cual se encuentra en un intervalo de 10-250 kDa.

3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante

Para poder determinar la actividad antioxidante de los péptidos se determinó su cantidad de proteína mediante el método Lowry descrito anteriormente. Posteriormente se aplicó el procedimiento descrito por (De Castro & Sato, 2014), usando el método del radical libre DPPH para lo cual se prepararon disoluciones seriales en un intervalo de 0 a 6 mg/mL de proteína, enseguida se adicionó 1.5 mL de solución de DPPH 0.08 mM, simultáneamente con la muestra fueron preparados un blanco (agua destilada y metanol (MeOH) al 80 % v/v), y un control (agua destilada en sustitución de la muestra). Las muestras fueron agitadas en un vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, EUA) y se

mantuvieron en reposo por una hora, concluida la reacción se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 515 nm. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó de acuerdo a la Ecuación (2):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{515\text{control}} - A_{515\text{muestra}}}{A_{515\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

$A_{515\text{control}}$ = absorbancia del control a 515 nm

$A_{515\text{muestra}}$ = absorbancia de la muestra a 515 nm

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición, se graficaron contra la concentración de proteína para obtener el modelo de regresión lineal, con el cual se determinó el valor IC_{50} , que es definido como la concentración necesaria de péptidos para inhibir el 50 % del radical DPPH.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Grado de hidrólisis

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas su composición final (GH alcanzado en la reacción) dependerá principalmente de la fuente proteica, tipo de proteasa usada y condiciones de hidrólisis. El GH es la propiedad fundamental de péptidos e hidrolizados y va determinar en gran medida sus características (peso molecular, actividades biológicas y funcionales), y por tanto su posible uso (Benítez *et al.*, 2008).

En la figura 5 se muestra la cinética del porcentaje de grado de hidrólisis con respecto al tiempo de catálisis de Flavourzyme®.

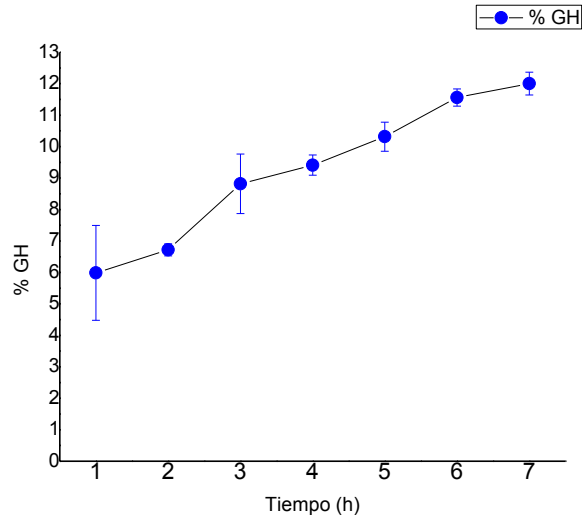


Figura 5. Cinética de grado de hidrólisis (%)

Se aprecia en la figura anterior que a las 7 horas de reacción el GH máximo fue de 12 %. La tendencia fue progresiva, ya que transcurrida una hora de reacción ya se tenía casi el 6%, ocurridas 2 h se proyecta el disparo del GH pues aumenta hasta 9%.

El GH es el parámetro clave para el seguimiento y control de la reacciones de hidrólisis de proteínas porque representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces.

(Evangelho *et al.*, 2017) determinaron el GH usando el método TNBS en hidrolizados de proteína de frijol negro, mediante las enzimas Alcalasa® y pepsina para producir los hidrolizados, después de 360 minutos de reacción concluyeron que el GH por pepsina fue de 27.7%, mientras que por Alcalasa fue de 23.6%, estos valores corresponden al doble de lo obtenido en esta investigación. Sin embargo, uno de los factores que influyen en el GH es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica o tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima no solo va a influir en el GH, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.*, 2008).

Por su parte Ciau-Solís *et al.*, 2017, produjeron hidrolizados de *phaseolus lunatus* L., mediante dos sistemas enzimáticos secuenciales (pepsina-

pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme®) para GH encontraron valores de 77.30% para el sistema A-F, mientras que para el sistema P-P obtuvieron el 32.33%, mencionan que el GH más alto se debió a que el sistema A-F poseen endopeptidasas y exopeptidasas, lo que permitió atacar la mayoría de los enlaces peptídicos de la proteína, los valores encontrados en esta investigación son aproximadamente 6 veces menos en comparación con el GH del sistema A-F, sin embargo la diferencia de grado de hidrólisis entre diferentes materias primas puede estar relacionado con la disposición de aminoácidos presentes en la proteína y la diferente actividad de la enzima.

(Betancur-Ancona, Sosa-Espinoza, Ruiz-Ruiz, Segura-Campos, & Chel-Guerrero, 2014) obtuvieron hidrolizados de proteína de frijol negro variedad Jamapa, empleando Flavourzyme® los valores de GH estuvieron en un intervalo de 8 a 14%, después de 15 minutos de reacción el GH permaneció constante hasta transcurridos 120 minutos, los hidrolizados obtenidos fueron usados para evaluar sus propiedades funcionales, sin embargo cuando se usó la combinación Flavourzyme®-Alcalasa®, el GH se disparó hasta 30% y también se mantuvo constante después de 15 min de reacción, hasta transcurridos 120 minutos. Los valores obtenidos en este trabajo (12% GH), coinciden con los reportados por los autores.

(Su, Manuscritos, & Sobral, n.d.), clasificaron los productos según el grado de hidrólisis como; parcialmente hidrolizada (GH <10%) y altamente hidrolizada (GH > 10%). Por lo tanto, los péptidos obtenidos en esta investigación son considerados altamente hidrolizados y pueden usarse en alimentos como nutrientes y compuestos bioactivos.

3.4.2. Distribución de pesos moleculares

En la figura 6 se muestra la DPM de la proteína solubilizada de la harina de alberjón como primeras columnas (control) se encuentra el extracto alto en proteína a pH 12 y por último los BPA, donde se aprecia claramente la disminución del peso molecular de los péptidos en comparación con las proteínas intactas.

Las bandas de la proteína solubilizada (extracto) están marcadas desde 150 kDa sin embargo, las más evidentes se encuentran entre 37 y 50 kDa, pero también poseen proteínas de bajo peso molecular (10-20 kDa).

Se evidencia la proteólisis efectuada por Flavourzyme®, ya que las bandas de los péptidos producidos comienzan desde 25 kDa, sin embargo las secciones más marcadas se encuentran en 10 kDa.

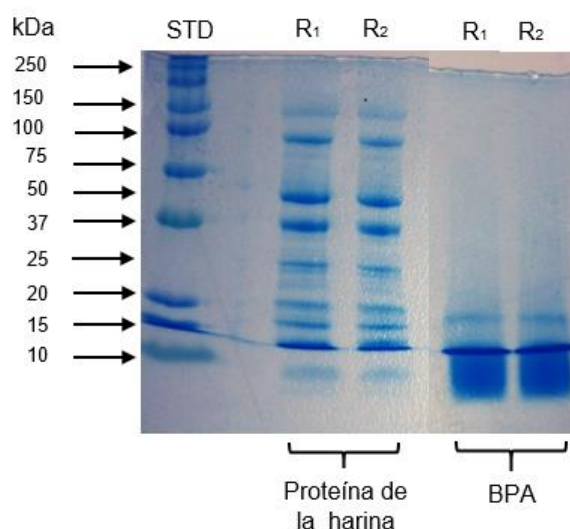


Figura 6. Perfil electroforético del extracto alto en proteína y biopéptidos de alberjón. STD indica los pesos moleculares del estándar (Bio-Rad®)

(García-Mora *et al.*, 2015) obtuvieron hidrolizados de frijol pinto usando Alcalasa® y Savinase, para la liberación simultánea de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos, en la determinación de pesos moleculares emplearon la técnica electroforética SDS-PAGE, su control mostró bandas intensas con pesos moleculares entre 97 y 10 kDa. Después de 30 minutos de catálisis se mostraron fracciones más pequeñas (<15 kDa). La degradación completa de las proteínas se observó después de 120 min de digestión con Alcalasa®. En este trabajo también se evidenciaron péptidos menores a 15 kDa con bandas marcadas intensamente en 10 kDa.

(González-Montoya, Hernández-Ledesma, Silván, Mora-Escobedo, & Martínez-Villaluenga, 2018) investigaron el potencial de las proteínas de soya

germinada, como fuente de biopéptidos, después de una digestión gastrointestinal simulada. El concentrado de proteína de soya germinada se hidrolizó con pepsina y pancreatina. Los efectos antiproliferativos y antiinflamatorios fueron generalmente más altos en fracciones de 5-10 kDa.

(Thi, Hoa, Thi, Dao, & Nam, 2017), estudiaron la acción de Alcalasa® y Protamex, sobre las proteínas de soya, determinaron el peso molecular mediante la técnica SDS-PAGE. Los patrones electroforéticos mostraron que los hidrolizados de Alcalasa® estaban compuestos por diversos péptidos con pesos moleculares por debajo de 8.5 kDa. El patrón electroforético también indicó que los hidrolizados de Protamex comprendían péptidos de mayor peso molecular (<20 kDa). En este caso los hidrolizados obtenidos por Flavourzyme® son de menor peso molecular que los producidos por Protamex en proteínas de soya. En esta investigación las proteínas de alberjón fueron hidrolizadas con Flavourzyme® y se obtuvieron pesos moleculares menores a 10 kDa muy parecidos a los reportados por Thi *et al.*, 2017.

3.4.3. Actividad antioxidante

En esta investigación se evidenció que los péptidos derivados de proteína de alberjón poseen actividad antioxidante, demostrada mediante el método del radical libre DPPH y expresada como IC₅₀ (mg/mL).

Cuadro 1. Actividad antioxidante de biopéptidos de alberjón.

Muestra	IC ₅₀ (mg/mL)
BPA	4.06 ± 0.2

Varios investigadores han intentado mostrar y explicar la relación entre el peso molecular y la actividad antioxidante (Kasera, Singh, Lavasa, Prasad, & Arora, 2015). En fracciones de hidrolizados de proteína de frijol pinto utilizando ultrafiltración de membrana con límites de peso molecular de 100, 50, 30, 10 y 3 kDa, la fracción de péptidos <3 kDa exhibió las actividades antioxidantes más elevadas. Por lo tanto, un peso molecular apropiadamente bajo puede

ejercer un efecto significativo sobre las actividades antioxidantes de los péptidos (García-Mora *et al.*, 2015).

Los péptidos antioxidantes tienen una secuencia de aminoácidos característica, generalmente las más reactivas son cadenas laterales que contienen azufre (cisteína y metionina) o cadenas laterales aromáticas (triptófano, tirosina y fenilalanina) a partir de las cuales el hidrógeno se extrae fácilmente (Power *et al.*, 2013). El contenido de aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina) en *Lupinus gredensis* es bajo (1.3 g y 0.9 g respectivamente, por cada 100 g de proteína), sin embargo en aminoácidos con cadena lateral aromática (triptófano, tirosina y fenilalanina) las proporciones aumentan (3.0 g, 2.4 g y 3.4 g respectivamente) y esos aminoácidos son los responsables de la propiedad antioxidante en los BPA producidos por Flavourzyme®.

Para aprovechar las proteínas provenientes de la pasta residual de almendra de palma, se obtuvieron hidrolizados empleando siete diferentes proteasas: Alcalasa®, quimotripsina, papaína, tripsina, Flavourzyme® y bromelaína. La actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo de captación de radical DPPH, siendo el hidrolizado generado a partir de papaína el que mostró la actividad más elevada, la cual estuvo relacionada con la presencia de más residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, revelando la importancia de este tipo de residuos de aminoácidos en las secuencias peptídicas para presentar dicha actividad (Zarei *et al.*, 2014).

(Herrera Chalé, Ruiz Ruiz, Acevedo Fernández, Betancur Ancona, & Segura Campos, 2014) produjeron hidrolizados y fracciones de péptidos a partir del concentrado proteico de *Macuna pruriens*, demostrando las propiedades antioxidantes mediante el ensayo del radical libre DPPH. Los biopéptidos <1 kDa tuvieron las mejores propiedades antioxidantes que los de 1-3 kDa, los valores IC₅₀ fueron de 1.23±0.6 µg/mL, comprobando que se necesita muy poca cantidad de fracciones de péptidos para inhibir el 50% del radical DPPH. En comparación con los autores el valor IC₅₀ de ésta investigación se

encuentra en mg/mL, sin embargo Herrera *et al.*, 2014 utilizaron hidrólisis secuencial Alcalasa-Flavourzyme® y Pepsina-Pancreatina, posteriormente efectuaron una ultrafiltración lo que produjo mayor especificidad en los péptidos generados.

3.5. Conclusiones

La desaparición de bandas de alto peso molecular fue indicativo del efecto de hidrólisis enzimática de las proteínas del albarjón, ya que las bandas más marcadas se encuentran en 10 kDa, el grado de hidrólisis fue de 12% después de 7 h de reacción.

La proteína de albarjón hidrolizada por Flavourzyme® tuvo una capacidad antioxidante con valor IC₅₀ de 4.06 ± 0.2 mg/mL. Con base en los resultados obtenidos, los péptidos de proteína de albarjón podrían usarse como ingredientes proteicos con actividad antioxidante.

Además, los resultados de este estudio potencializan el desarrollo de nuevas investigaciones con el objetivo de ultrafiltrar y purificar los BPA hidrolizados con Flavourzyme® para obtener mayor actividad antioxidante, o realizar una hidrólisis secuencial con otras enzimas (Alcalasa®, pepsina o pancreatina).

4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS COACERVADOS: K-CARRAGENINA-BIPÉPTIDOS-PROTEÍNA DE SOYA

RESUMEN

Biopéptidos de alberjón (BPA) (*Lupinus gredensis*) fueron atrapados mediante coacervados complejos, formados por κ -carragenina y aislado de proteína de soya (APS). El potencial ζ determinó la ventana de interacción (mayor diferencia de cargas entre biopolímeros), se fijó el pH a 3.0; las relaciones estequiométricas en peso de biopolímeros fueron establecidas a través de mediciones potencial ζ y absorbancias. Se hizo interaccionar la κ -carragenina y los BPA, se mostraron las primeras disminuciones en cargas negativas de la κ -carragenina, lo que demostró la formación de las primeras interacciones electrostáticas entre biopéptidos-polisacárido para su posterior coacervación con APS. A los tres tratamientos se les adicionó la misma cantidad de biopéptidos (0.12 g, con respecto a la actividad antioxidante). En los complejos coacervados con relaciones en peso de biopolímeros de 10:1 y 12:1 no existió diferencia significativa en la actividad antioxidante pero para el tratamiento 9:1 sí, después de que fueron sometidos a una digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, el tratamiento que preservó mejor la actividad antioxidante fue el CC_{9:1}, (IC₅₀ 5.3 $\pm$ 1.3), mientras que los biopéptidos sin atrapar mostraron un valor IC₅₀ 6.8 $\pm$ 2.0. Una mayor actividad antioxidante se produjo en los complejos coacervados que presentaron menor carga y proteína del sobrenadante, así como menor absorbancia (tratamiento 9:1). La eficiencia de atrapamiento fue hasta del 90% con el tratamiento 9:1, mientras que 12:1, obtuvo la menor eficiencia (86%).⁵

Palabras clave: coacervados, proteína de soya, carragenina, digestión, actividad antioxidante.

⁵ Tesis de maestría Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Miriam Quintana Moreno

Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

ABSTRACT

Alberjon biopeptides (BPA) (*Lupinus gredensis*) were encapsulated by complex coacervates, formed by κ -carrageenan and soy protein isolate (APS). The interaction window that led to the formation of κ -carrageenan-BPA-APS complexes at different weight ratio of biopolymers, was established through zeta potential measurements and turbidimetric analysis. In the coacervate complexes obtained at pH 3.0 with weight ratios of biopolymers of 9:1, 10:1 and 12:1 there was no significant difference with respect to the antioxidant activity, however, after they were subjected to a simulated gastric digestion with bile salts, the activity decreased slightly, and the treatment that best preserved the antioxidant activity was CC_{9:1}, ($IC_{50} 5.2 \pm 0.8$) compared to the unencapsulated biopeptides ($IC_{50} 6.7 \pm 0.6$). Greater antioxidant activity occurred in the coacervate complexes that presented lower load of the supernatant, determined by the potential ζ , as well as lower amounts of protein in it. With the κ -carrageenan-BPA potential measurement, the first decreases in negative charges of κ -carrageenan were shown, demonstrating the formation of the first electrostatic interactions between biopeptides and polysaccharide.⁶

Key words: coacervates, soy protein, carrageenan, digestion, antioxidant activity.

⁶ Master's Thesis: Universidad Autonoma Chapingo
Author: Miriam Quintana Moreno
Director: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

4.1. Introducción

La investigación ha proporcionado evidencia que apoya el uso de alimentos como agentes activos relacionados con la prevención de enfermedades y mejora de la calidad de vida o mejora de la nutrición. Esto ha contribuido a un aumento de la demanda de alimentos funcionales que contiene ingredientes bioactivos que han demostrado beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (Celli *et al.*, 2015). Un claro ejemplo son las propiedades antioxidantes de los hidrolizados que han sido demostradas mediante la hidrólisis de varias proteínas, empleando enzimas gastrointestinales o hidrólisis ácida. El mecanismo exacto de la actividad antioxidante no se conoce bien, pero varios estudios muestran que los hidrolizados son inhibidores de la oxidación lipídica, ya que son capaces de atrapar radicales libres (Qian, Jung, & Kim, 2008).

Los efectos biológicos de los péptidos dependen de su capacidad para permanecer intactos hasta alcanzar sus objetivos, (Segura-Campos *et al.*, 2011). El desafío principal de la aplicación de biopéptidos derivados de proteínas alimentarias, es su susceptibilidad a la digestión gastrointestinal, con el riesgo de perder su integridad estructural y funciones biológicas cuando se someten a proteasas y peptidasas gastrointestinales; proteger los péptidos bioactivos de las modificaciones fisiológicas es esencial para traducir actividades *in vitro* a modelos *in vivo* (Picariello *et al.*, 2013).

Además, la incorporación de compuestos bioactivos típicos (péptidos) en diferentes matrices está limitado por sus características inherentes, como el sabor y la incompatibilidad con la formulación, ingredientes y el procesamiento posterior que puede afectar la retención (Augustin & Hemar, 2009). En general, los antioxidantes están sujetos a degradación por ello su encapsulación se puede utilizar para proteger la calidad nutricional y sensorial de los alimentos y/o para proteger al cuerpo contra las enfermedades crónicas (Castañeda, Heriberto; Gemio, Romulo; Yapu, 2011).

Dentro de los métodos de encapsulación, se encuentra la coacervación compleja, la cual se basa en la interacción electrostática entre los biopolímeros, implicando una separación de fases. Se considera una técnica eficaz ya que puede lograr hasta 90% de eficiencia de encapsulación (Mendanha *et al.*, 2009), además los coacervados producidos son resistentes al calor y poseen excelentes características de liberación controlada (Harnsilawat *et al.*, 2006).

Generalmente en la coacervación se utilizan interacciones proteína-polisacárido, esos biopolímeros deben cumplir ciertas especificaciones para su uso, por ejemplo la κ -carragenina es un polisacárido (sulfatado) natural, proveniente de algas rojas, estructuralmente estable, abundante y de bajo costo (Fathi *et al.*, 2014). Por su parte la proteína de soya posee excelentes propiedades nutricionales, pues contiene todos los aminoácidos esenciales, también posee propiedades funcionales (gelificación, emulsificante natural, entre otros), es abundante y económica (Nishinari *et al.*, 2014).

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el objetivo de esta investigación fue proteger la actividad antioxidante de biopéptidos de alberjón (*Lupinus gredensis*) mediante complejos coacervados con κ -carragenina y aislado de proteína de soya (APS), sometidos a una digestión gastrointestinal simulada, para evaluar protección de la actividad biológica.

4.2. Materiales

El aislado de proteína de soya (P-590, 90% proteína base seca) fue adquirida en Bekarem® (Ciudad de México, México), mientras que la Kappa-carragenina se obtuvo de Danisco® Du Point™ (K; Grindsted® Carrageenan CH 407, Dinamarca). Los reactivos Folin-ciocalteu-fenol (2 N) y Ácido 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y las sales biliares porcinas (B8756) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). Ácido clorhídrico (HCl) grado analítico e hidróxido de sodio (NaOH) en hojuelas grado analítico fueron adquiridos en JT. Baker (Xalostoc, México). En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada.

4.3. Métodos

4.3.1. Potencial ζ

Usando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, RU) se midió el potencial ζ de las dispersiones de BPA (0.1% p/v), APS (0.1% p/v) y κ -carragenina (0.1% p/v) en un intervalo de pH de 2 a 7 con variaciones de 0.5 para obtener un panorama de la ventana de interacción entre las muestras. El pH de las dispersiones fue ajustado con HCl (0.1 N) e NaOH (0.1N) en un autotitulador MPT-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

4.3.2. Preparación de soluciones

La κ -carragenina y el aislado de proteína de soya (APS) se dispersaron con agua destilada con agitación moderada para preparar soluciones al 1% p/v. Una vez obtenidas las dispersiones se refrigeraron por 24 horas a 4°C para concluir la hidratación.

Como primera etapa para la elaboración de los coacervados, se indujo el acomplejamiento entre los BPA y κ -carragenina, manteniendo agitación constante a 500 rpm por 30 minutos, los péptidos fueron adicionados poco a poco, su dispersión fue rápida debido a que son muy hidrosolubles, en una segunda etapa se formó el complejo entre APS-BPA- κ -carragenina.

4.3.3. Formulación complejos coacervados

Se prepararon mezclas binarias de APS: κ -carragenina (1% p/v) y se determinó el valor de potencial ζ con el fin de confirmar formación de complejos también se midió la absorbancia de acuerdo a lo descrito por (Ramírez-Santiago, Lobato-Calleros, Espinosa-Andrews, & Vernon-Carter, 2012) con el fin de identificar las relaciones en peso, dónde ocurre la mayor coacervación, es decir, cuando el sobrenadante exhibió la menor absorbancia (308 nm) en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, MA, Waltham, EUA). La formulación del complejo coacervado compuesto por κ -carragenina-APS se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por (Spada, Marczak,

Tessaro, & Cardozo, 2015), en el cuadro 2 se muestran las relaciones estequiométricas evaluadas.

Cuadro 2. Relaciones estequiométricas aislado de proteína de soya- κ -carragenina 1% p/v.

Relación en peso
5:1
9:1
10:1
11:1
12:1
13:1
14:1
15:1
20:1
25:1
30:1

El valor de pH para la formación de los complejos coacervados se fijó en 3.0, de acuerdo a la ventana de interacción del potencial ζ , debido a que en ese valor de pH existió la mayor diferencia en cargas de los biopolímeros (κ -carragenina-APS), sin embargo no solo es pH afecta el acomplejamiento entre biopolímeros, sino también la cantidad de biopolímeros empelados, por ello se realizó la determinación de las relaciones estequiométricas donde ocurrió la mayor coacervación (9:1, 10:1 y 12:1), las cuales mostraron menores resultados de absorbancia y menores cargas (mV) en el potencial zeta. A la dispersión de κ -carragenina se adicionaron los BPA que poseían una actividad antioxidante de IC_{50} de 4.06 ± 0.2 mg/mL, se ajustó el pH a 3.0 con un potenciómetro (HANNA®, HI-221, Hanna Instruments Inc, Woonseket, RI, EUA) usando HCl 0.1 N e NaOH 0.1 N. Posterior a ello se concluyó el proceso de coacervación con la adición del APS. Las mezclas κ -carragenina-BPA-APS se dejaron en reposo a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h para asegurar la formación completa de los complejos coacervados, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm 15 min (centrífuga 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para separar las fases.

Los complejos insolubles obtenidos (CC_x), donde “x” representa las relaciones en peso de los biopolímeros utilizados (9:1, 10:1 y 12:1), fueron sometidos nuevamente a análisis turbidimétrico (368 nm) y se determinó el potencial ζ , con el fin de verificar en qué tratamiento ocurrió el máximo rendimiento de coacervación, caracterizado por absorbancias bajas y valores de potencial ζ cercanos a la neutralidad.

4.3.4. Contenido de proteína de los coacervados

La cuantificación de proteína de los complejos coacervados se determinó mediante la metodología propuesta por (Peterson, 1977) con modificaciones. Se elaboró una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (0 - 0.1 mg/mL); a 1 mL de dispersión de CC_x 1% p/v se adicionó 1 mL de solución A (carbonato de sodio (33.4 mg/mL), sulfato de cobre (0.33 mg/mL), tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (0.66 mg/mL), hidróxido de sodio (10.7 mg/mL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (33.3 mg/mL)), se agitó en un vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, EUA) y se dejó en reposo 10 min, una vez transcurrido el tiempo se adicionó 0.5 mL del reactivo B (Folin-Ciocalteu, 0.3 N), se agitó nuevamente y se dejó en reposo 30 minutos. Por último se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific™, MA, Waltham, EUA).

4.3.5. Rendimiento y humedad de los coacervados

A los complejos obtenidos mediante las metodologías previamente descritas se les determinó el contenido de humedad por el método de secado en estufa (AOAC, 1995). En recipientes de peso conocido y constante fueron adicionados los CC_x en base húmeda y fueron pesados en una balanza electrónica (Pioneer™ Ohaus, PA214, Estados Unidos). Posteriormente se sometieron a secado en una estufa de secado convectivo (Riossa Digital HCF-62, Monterrey, México) a una temperatura de 38°C por 48 h.

Concluido el proceso de secado, el rendimiento de coacervación fue calculado mediante la Ecuación (3) (Jun-xia, Hai-yan, & Jian, 2011).

$$\% RC = \frac{mC}{mBT} * 100 \quad (3)$$

Donde:

% RC = rendimiento del coacervación

mC = peso de coacervado en base seca

mBT = peso total de biopolímeros utilizados en base seca

4.3.6. Tamaño de partícula

Para determinar el tamaño de partícula de los complejos coacervados, fue necesario determinar el índice de refracción en un refractómetro Abbe 5 (Bellingham + Stanley Ltd, Reino Unido) así como la densidad de cada tratamiento y ésta se determinó con un picnómetro.

En un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), cuyo funcionamiento se basa en la difracción de rayo láser, fueron adicionadas las muestras hasta lograr el índice de oscuración requerido por el equipo, para ello con anterioridad se dispersaron los tratamientos en agua destilada ajustada a pH 3.0 con HCl 0.25 N, el agua de recirculación para las mediciones también fue ajustada para evitar la disociación de los biopolímeros.

El diámetro hidrodinámico de los complejos coacervados 40 h, después de su formación se calculó mediante la Ecuación 4 (Thomas, 1987).

$$d_h = \frac{d_{(3,2)}}{(1+IPD)^2} \quad (4)$$

Donde:

IPD= índice de polidispersidad, determinado durante la medición de tamaño de partícula.

La media del tamaño de la distribución de partículas en la superficie $d_{(3,2)}$, representa el tamaño medio de una superficie específica por unidad de volumen.

4.3.7. Actividad antioxidante

Se dispersaron 2 g de coacervados (base húmeda) de cada tratamiento en 8 mL de agua desionizada pH 7 y se mantuvieron en agitación por 2 h. Posteriormente se aplicó el procedimiento descrito por (De Castro & Sato, 2014), usando el método del radical libre DPPH, para lo cual se prepararon disoluciones seriales en un intervalo de 0 a 6 mg/mL de proteína, enseguida se adicionó 1.5 mL de solución de DPPH 0.08 mM, simultáneamente con las muestras fueron preparados un blanco (agua destilada y metanol (MeOH) al 80 % v/v), y un control (agua destilada en sustitución de la muestra). Las muestras fueron agitadas en un vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., NY, EUA) y se mantuvieron en reposo por una hora, concluida la reacción se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 515 nm. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó de acuerdo a la Ecuación (2):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{515\text{control}} - A_{515\text{muestra}}}{A_{515\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

$A_{515\text{control}}$ = absorbancia del control a 515 nm

$A_{515\text{muestra}}$ = absorbancia de la muestra a 515 nm

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición, se graficaron contra la concentración de proteína para obtener el modelo de regresión lineal, con el cual se determinó el valor IC_{50} , que es definido como la concentración necesaria de péptidos para inhibir el 50 % del radical DPPH. Los complejos formados por κ -carragenina-APS fueron sometidos a actividad antioxidante por el método DPPH descrito anteriormente, con el objetivo de detectar o descartar actividad que pudiera influir en la actividad antioxidante de los BPA. Además de lo anterior al sobrenadante (complejos solubles) de cada uno de los CC_x también se les midió actividad antioxidante para comprobar si los BPA realmente interaccionaron con la κ -carragenina para formar los complejos insolubles.

4.3.8. Digestión gastrointestinal simulada

Para determinar la protección de la actividad antioxidante de los BPA entrampados se sometieron a una digestión gastrointestinal simulada (DGS), como primera etapa fueron expuestos a jugo gástrico simulado, es decir, a 1.2 g de CC_{9:1}, CC_{10:1} y CC_{12:1} se les adicionó 9 mL de solución de jugo gástrico simulado (HCl 0.1 N, pH 3.0). Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h en una estufa de secado convectivo (Riossa Digital HCF-62, Monterrey, México). Posteriormente las muestras fueron filtradas; el filtrado se lavó con agua destilada y se depositó en 9 mL de una solución (1 g 100 mL⁻¹) de extracto de bilis porcina (B8756, Sigma-Aldrich Chemical, Co., St. Louis, Missouri, EUA) a pH 6.5. Los CC_x se incubaron nuevamente a 37 °C por 3 h (Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García-Galindo, Alvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, 2010). Concluido el periodo de incubación los CC_x se determinó nuevamente la cantidad de proteína y la actividad antioxidante mediante el método del radical libre DPPH, como ya se describió anteriormente, el valor se expresó en valores IC₅₀.

4.3.9. Análisis estadístico

Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado de manera independiente, usando un diseño completamente al azar, los valores informados corresponden a las medias y desviación estándar. Los resultados se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes a prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de datos se realizó con el software Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, EUA).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Potencial ζ de biopéptidos y biopolímeros

Al obtener las cargas parciales de los biopolímeros y del ingrediente bioactivo a entrapar en un intervalo de pH, se puede determinar el punto en el que ocurre una equivalencia con las cargas opuestas de los componentes que interactúan en la coacervación. Para la formación de complejos coacervados se necesita que los biopolímeros que participan sean electrostáticamente neutros para que sean insolubles, por lo que una manera precisa de determinarlo es mediante el parámetro de potencial zeta.

En la figura 7 se muestra la ventana de interacción que se determinó mediante un barrido de pH vs potencial ζ en un intervalo de pH (2-7) en el que cada biopolímero y los biopéptidos de alberjón (BPA) mostraron la máxima diferencia entre cargas.

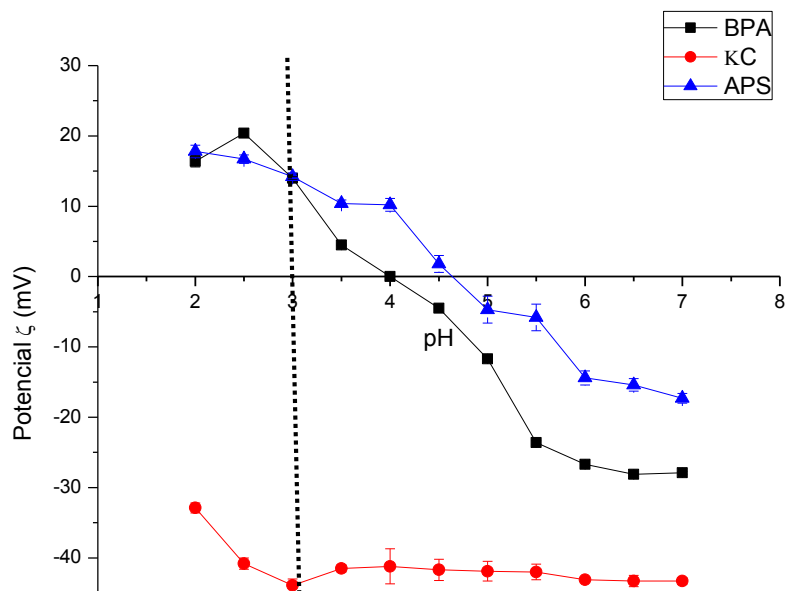


Figura 7. Potencial ζ en función del pH de biopéptidos de alberjón (0.1% p/v, ■), κ -carragenina (0.1% p/v, ●) y aislado de proteína de soja (0.1%, ▲).

Para lo BPA el comportamiento del potencial ζ es muy parecido a reportado por otras proteínas de leguminosas, de hecho como se aprecia en la figura, sigue la misma tendencia que la proteína de soja sus valores de potencial ζ

variaron desde 20 ± 0.2 mV hasta -28 ± 0.4 mV. El punto isoelectrico fue a pH 3.93. El PI del APS se dio a pH 4.6. Por su parte la κ -carragenina mantuvo valores negativos en todo el intervalo de pH (-35 a -43 mV).

En las proteínas los valores de potencial ζ negativos se debe a la ionización de los grupos carboxílicos (-COOH) a grupos carboxilato (-COO). Mientras que los valores positivos son debidos a la protonación de restos de aminoácidos (-NH₂), dando lugar a grupos amonio (-NH₃⁺). Las proteínas poseen una red de carga negativa por encima de su punto isoelectrico (PI) y una red de carga positiva por debajo de ese pH. En su PI no tienen carga, pero hay regiones localizadas en la superficie de la proteína que presentan carga positiva o negativa a ciertas condiciones, lo que tiene consecuencias para su interacción con polisacáridos iónicos (Cooper *et al.*, 2005).

Las interacciones electrostáticas juegan un papel muy importante durante la formación de complejos coacervados entre proteínas y polisacáridos. De hecho, la fuerza de las interacciones electrostáticas que se controlan principalmente por la densidad de carga de los biopolímeros, se impone directamente por el pH de las dispersiones mixtas (Schmitt, Aberkane, & Sanchez, 2009a).

En el cuadro 3 se muestra el potencial ζ de κ -carragenina-BPA y el potencial ζ final de los CC de κ -carragenina-BPA-APS.

Cuadro 3. Potencial ζ de los distintos tratamientos de CC_x

Tratamientos	K-carragenina-APS (mV)	κ -carragenina-BPA (mV)	K-carragenina-BPA-APS (mV)
9:1	$-8.6 \pm 0.1c$	$-38.8 \pm 0.9b$	$7.1 \pm 0.4c$
10:1	$-1.2 \pm 0.9b$	$-37.9 \pm 0.6a$	$9.75 \pm 0.3b$
12:1	$0.0 \pm 0.1a$	$-35.7 \pm 1.1a$	$20.64 \pm 0.6a^z$

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas, son significativamente diferentes ($p=0.05$).

En la segunda columna del cuadro anterior se muestran las relaciones estequiométricas del coacervado APS-κ-carragenina que obtuvieron valores cercanos a la neutralidad, inclusive en el tratamiento CC_{12:1} se logró la exclusión total de cargas parciales. Por ello fue que se decidió emplear esas relaciones estequiométricas para la encapsulación de los BPA (9:1, 10:1 y 12:1).

En la formación de complejos generados electrostáticamente se involucran varios parámetros fisicoquímicos que influyen en la carga global y local de la proteína y el polisacárido, están compuestos principalmente por el pH, la fuerza iónica, relación proteína-polisacárido y la concentración total de biopolímeros (Schmitt, Aberkane, & Sanchez, 2009b).

4.4.2. Medición de absorbancias

El cuadro 4 muestra los valores de absorbancia y potencial zeta de los coacervados (κ-carragenina-APS), se aprecia que tal como describen (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012), donde ocurrió la mayor formación de complejos insolubles es donde el valor de las absorbancias del sobrenadante es menor, en este caso los tratamientos 9:1, 10:1, 11:1 fue más marcada esta diferencia.

Cuadro 4. Absorbancias y potencial ζ de las relaciones estequiométricas de APS-κ-carragenina.

Relación en peso	Absorbancia	Potencial ζ (mV)
9:1	0.02 ± 0.0e	-9.6 ± 1.1f
10:1	0.07 ± 0.0d	-1.2 ± 0.e
11:1	0.08 ± 0.0d	-0.2 ± 0.1d
12:1	0.12 ± 0.0c	0.0 ± 0.1d
13:1	0.14 ± 0.0c	2.5 ± 0.6c
14:1	0.17 ± 0.0b	16.4 ± 0.4b
15:1	0.19 ± 0.0a	22.6 ± 2.1a ^z

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas, son significativamente diferentes (p=0.05).

Sin embargo para el potencial ζ , la relación en peso 12:1 se encontró en condiciones de neutralidad, mientras que 10:1 y 9:1 poseían cargas negativas, por lo que por ello se decidió emplear estos tratamientos, ya que en la ventana de interacción se aprecia que los BPA tiene carga positiva a pH 3.0, para asegurar el acomplejamiento primero los BPA (cargas positivas) y la κ -carragenina (cargas negativas).

Cuadro 5. Absorbancias y potencial ζ de las los complejos coacervados κ -carragenina-BPA-APS

Relación en peso	Absorbancia	Potencial ζ (mV)
9:1	$0.19 \pm 0.0c$	$7.1 \pm 0.4c$
10:1	$0.26 \pm 0.0b$	$9.75 \pm 0.3b$
12:1	$0.38 \pm 0.0a$	$20.64 \pm 0.6a^z$

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas, son significativamente diferentes ($p=0.05$).

En el caso de los complejos coacervados que contenían a los biopéptidos, todos los tratamientos quedaron con cargas positivas, sin embargo CC_{9:1}, mostró la menor cantidad de cargas (7.1 ± 0.4 mV), mientras que con el CC_{12:1} las cargas positivas aumentaron hasta 20.64 ± 0.6 mV.

La carga superficial es una de las propiedades que transmite la estabilidad de los productos entrampados. La estabilidad permite la predicción del comportamiento del producto entrampado en una matriz de alimentos. Sin embargo, el acomplejamiento con el propósito de enmascarar el sabor amargo de los hidrolizados de proteínas y péptidos no se ha enfocado en esta propiedad superficial. Los estudios de encapsulación basados en liposomas, reportan un elevado potencial zeta neto negativo (carga superficial) debido a la presencia de fosfolípidos, que tienen cabezas hidrófilas cargadas negativamente. Una disminución en la magnitud del potencial zeta, disminuiría la estabilidad del producto encapsulado. El hidrolizado de proteína encapsulada y los productos peptídicos con baja magnitud de potencial zeta

tienen la tendencia a agregarse en un entorno acuoso (*da Rosa Zavareze et al.*, 2014).

Por ejemplo, la encapsulación de péptidos usando quitosano, mediante coacervación compleja formó un producto con alta carga superficial positiva de +41.5 mV (Zhang & Zhang, 2013), estos valores son mayores a los obtenidos en este trabajo de investigación.

Aunque existe un conocimiento limitado sobre la dinámica de carga superficial de los hidrolizados y péptidos proteicos de alimentos encapsulados (Mohan *et al.*, 2015). La mayoría de los estudios entre las interacciones entre polisacáridos y proteínas no reportan el potencial zeta de los hidrolizados y péptidos proteicos entrampados. Esta información es particularmente útil para evaluar los efectos de las técnicas de procesamiento sobre la estabilidad del producto entrampado (Mosquera *et al.*, 2014; Zhang & Zhang, 2013).

4.4.3. Rendimiento de coacervación, humedad y cantidad de proteína

Los complejos proteína-polisacárido se originan principalmente por las interacciones electrostáticas entre macromoléculas con carga opuesta. Para reducir aún más la energía libre del sistema, estos complejos solubles se agregan más hasta que su tamaño y propiedades superficiales conducen a la insolubilización. En el equilibrio termodinámico, se obtiene un sistema de dos fases que comprende una fase coacervada que coexiste con una sub fase rica en disolvente (Cooper *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que algunos otros parámetros, como el peso molecular, la flexibilidad del biopolímero, densidad de carga, agitación, presión, o la temperatura también influyen en la formación del complejo (Schmitt *et al.*, 2009a).

(Weinbreck, Nieuwenhuijse, Robijn, & De Kruif, 2004) demostraron la importancia de la densidad de carga del polisacárido en la formación del complejos entre el aislado de proteína de suero y λ carragenina (polisacárido

sulfatado), debido a que esta mezcla estaba conduciendo a precipitados, debido a la alta densidad de carga del polisacárido.

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para rendimiento, humedad y cantidad de proteína de cada uno de los complejos coacervados obtenidos a diferente relación de biopolímeros.

Cuadro 6. Valores medios de rendimiento, humedad y cantidad de proteína de los complejos coacervados

Parámetro (%)	Relación en peso		
	9:1	10:1	12:1
Rendimiento	77.6 ± 1.3a	65.8 ± 2.1b	57.4 ± 1.5c
Humedad	88.2 ± 2.6b	90 ± 1.9a	91 ± 2.1a
Proteína CC _x	78 ± 2.7b	80 ± 1.9a	72 ± 2.1c
Proteína sobrenadante	9.2 ± 1.1b	9.0 ± 0.9b	15.2 ± 2.2a ^z

^z Medias sin una letra en común, dentro de filas, son significativamente diferentes ($p=0.05$).

El tratamiento que obtuvo mayor rendimiento de coacervación fue el CC_{9:1}, con casi 78%, por su parte el tratamiento CC_{12:1}, obtuvo el 57% de rendimiento debido a que existía una proporción mayor de proteína y lo comprobó la cantidad de proteína de sobrenadante (15%) y los valor de potencial ζ , ya que todos los grupos sulfato de la carragenina interaccionaron con los grupos amonio de la proteína disponible, sin embargo existió un grado de saturación marcado, posiblemente a los grupos amonio que no interaccionaron.

4.4.4. Tamaño de partícula

En el cuadro 7 se muestra la variación de tamaños de partícula en las diferentes relaciones estequiométricas de los coacervados, a 48 h de formación, para ello se determinó el diámetro hidrodinámico (d_h).

Cuadro 7. Valores medios del diámetro hidrodinámico d_h de los péptidos encapsulados

Tratamiento	Diámetro hidrodinámico (d_h) (nm)	SPAN
9.1	129.05 $\pm$ 1.59c	37.39 $\pm$ 2.11
10.1	165.20 $\pm$ 0.45b	33.24 $\pm$ 1.92
12.1	271.65 $\pm$ 1.59a ^z	25.82 $\pm$ 1.74

^z Medias sin una letra en común, dentro de filas, son significativamente diferentes ($p=0.05$).

Existió diferencia estadística en todos los tratamientos, el tratamiento 9:1 mostró el menor tamaño de partícula, por su parte el tratamiento 12:1 tiene el mayor tamaño de partícula, incluso dos veces más que el tratamiento 9:1.

(Mekhloufi, Sanchez, Renard, Guillemin, & Hardy, 2005), menciona que antes de que ocurra una coacervación compleja se forman complejos solubles, es ese caso la interacción proteína-polisacárido el tamaño aumento simultáneamente con el grado de neutralización de la carga. En esa investigación describieron un diámetro hidrodinámico de 50 nm para complejos solubles de β -lactoglobulina-goma acacia. Luego se formaron complejos intermoleculares con un diámetro de 400 nm hasta que se produjo la separación de fase macroscópica. En éste trabajo de investigación los tamaños de partícula de los coacervados κ -carragenina-BPA-APS de los tres tratamientos se encuentran muy por arriba de lo reportado por el autor, sin embargo con respecto a la naturaleza de los biopolímeros, el tamaño pudiese deberse a que la soya contiene hasta 70% de globulinas, y por lo regular su peso molecular oscila en 300 y 400 kDa, por tanto son moléculas muy pesadas (Nishinari *et al.*, 2014), la κ -carragenina comercial tiene un peso molecular aproximado entre 400-560 kDa, entonces también se trata de un biopolímero de alto peso molecular (Necas & Bartosikova, 2013).

En la figura 8 se muestran las distribuciones de tamaño de partícula de los complejos coacervados, todos los tratamientos presentan un comportamiento unimodal lo que indica uniformidad en la distribución del tamaño de partícula, confiriendo a los coacervados cierto grado de estabilidad, vale la pena señalar

que la distribución del tamaño de los complejos se hace muy estrecha, lo que representa la homogeneidad de la composición de los complejos dentro del sistema.

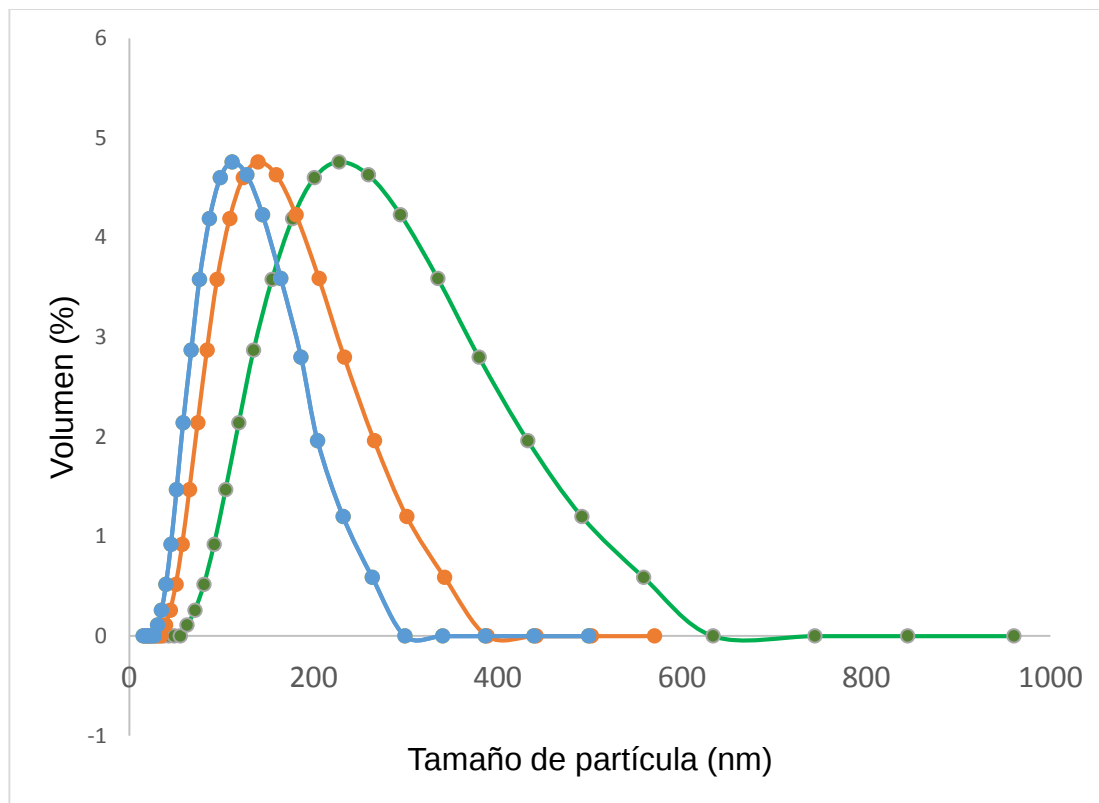


Figura 8. Distribuciones de tamaño de partícula de los complejos coacervados, CC9:1 (●), CC10:1(●) y CC12:1(●).

4.4.5. Actividad antioxidante de los CC_x, antes y después de la DGS

Una vez determinada la cantidad de proteína de los CC_x se sometieron a un proceso de digestión simulada y se determinó la actividad antioxidante (AAX). En el cuadro 8, se muestran los valores IC₅₀ de la actividad antioxidante una vez formados los CC_x, y después de la DGS.

Cuadro 8. Efecto de la digestión gastrointestinal simulada, sobre la actividad antioxidante de los biopéptidos coacervados

Actividad		Relación en peso		
antioxidante		9:1	10:1	12:1
(IC ₅₀)				
Antes de la digestión		4.8 ± 2.7a	5.2 ± 1.9b	5.3 ± 2.1b
Después de la digestión		5.3 ± 1.3a	5.9 ± 2.2a	6.1 ± 1.4a ^z
Eficiencia de entrapamiento		90 ± 1.2	88 ± 2.0	86 ± 1.8
(%)				

^z Medias sin una letra en común, dentro de columnas, son significativamente diferentes ($p=0.05$).

Como se aprecia en el cuadro anterior, después de una DGS es muy notorio como disminuye la actividad antioxidante de los BPA sin encapsular, existe una reducción del valor IC₅₀ de los complejos después de haber sido sometidos a una DGS debido a que las sales inducen la disociación de complejos electrostáticos (Yeo, Bellas, Firestone, Langer, & Kohane, 2005), por tanto hubo una desestabilización de los coacervados, sin embargo la actividad de los BPA prevaleció aun después del proceso de digestión, no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos 10:1 y 12:1.

El tratamiento 9:1, que fue el que mejor protegió la actividad los BPA, con una eficiencia de entrapamiento del 90%, debido a que presentó la mayor actividad antioxidante IC₅₀ 5.3 ± 1.3. Por su parte la actividad antioxidante de BPA sin acomplejar fue de IC₅₀ 6.8 ± 2.0 mg/mL, por tanto si existió un efecto negativo en la actividad antioxidante de los BPA libres.

La mayoría de las investigaciones sobre entrapamiento y encapsulación de hidrolizados y péptidos proteicos van orientados a mejorar las propiedades sensoriales y aumentar su estabilidad durante el almacenamiento, por ejemplo

(Kurozawa, Park, & Hubinger, 2009) evaluaron el efecto de la maltodextrina y goma arábica sobre la absorción de agua, de la proteína hidrolizada de carne de pollo sometida a secado por aspersión, encontrando que la adición de agentes portadores (maltodextrina y goma arábica) ayudaron a la disminución de la higroscopicidad esto por consiguiente aumento la estabilidad de hidrolizado en el almacenamiento. Por su parte el hidrolizado puro sin ningún biopolímero adquirió hasta el 70% más actividad de agua durante su almacenamiento.

(Rocha *et al.*, 2009) encapsularon hidrolizado de caseína mediante secado por aspersión, usando maltodextrinas (10 y 20%) con el objetivo de atenuar el sabor amargo del hidrolizado, se utilizó un panel sensorial entrenando para evaluar muestras no encapsuladas frente a muestras encapsuladas. Ambos hidrolizados de caseína encapsulados tuvieron higroscopicidad similar, pero valores menores que los hidrolizados libres. El panel sensorial consideró que las barras de proteína producidas con ambos materiales encapsulados eran menos amargas ($p < 0.05$) que las producidas con los hidrolizados de caseína libres. La microencapsulación por secado por pulverización con maltodextrina DE 10 y 20 fue exitosa para atenuar el sabor amargo y la higroscopicidad de los hidrolizados de caseína.

(Gulão, De Souza, Andrade, & Garcia-Rojas, 2015) evaluaron las interacciones entre un polipéptido (leucina) (0.2% p / p) y goma arábica (0.03, 0.06, 0.09, 0.12 y 0.15% p / p), fueron examinadas a concentraciones de NaCl (0, 0.01, 0.25, 0.3, 0.5 mol/L) y a diferentes valores de pH (de 1.0 a 12.0). La formación de coacervados complejos insolubles fue máxima a pH 4,0. A pH 2,0, que es el pKa de la goma arábica, se produjo la disociación del precipitado. Las muestras que contenían 0,2% de leucina y 0,03% de goma arábica sin sal tenían una mayor turbidez y una mayor formación de precipitados. La espectroscopía infrarroja transformada de Fourier confirmó la formación de coacervados complejos de leucina-goma arábica. En general, el estudio sugiere que los coacervados complejos de polipéptidos podrían ser

una forma factible de incorporar aminoácidos en los productos alimenticios. Es decir, la formación de complejos coacervados la investigación de Gulão y colaboradores se direcciono por mejorar la nutrición con la adición de aminoácidos esenciales en alimentos, más que proteger alguna actividad biológica de los péptidos.

(Calderón-Oliver, Pedroza-Islas, Escalona-Buendía, Pedraza-Chaverri, & Ponce-Alquicira, 2017) evaluaron varias condiciones de encapsulación para la coacervación compleja de nisin (péptido antimicrobiano) y un extracto antioxidante de la corteza de aguacate, se evaluaron los efectos de tres factores: dos sistemas de pared (colágeno-alginato y colágeno-pectina), dos métodos de secado (liofilización y secado por aspersión) y dos sistemas de dispersión central (emulsión W/O o en suspensión). Se obtuvo una carga superficial mayor con el núcleo no emulsionado; mayor eficiencia y rendimiento de la encapsulación se lograron combinando secado por aspersión con un núcleo emulsionado. Alta A_w y humedad fueron derivadas con el método de liofilización y un núcleo emulsionado. Los métodos de secado modificaron la morfología, forma y estructura final de las microcápsulas. En este trabajo de investigación Calderón-Oliver y colaboradores lograron el entrapamiento de nisin y extracto de cáscara de aguacate por el método de coacervación compleja, sin embargo no fueron evaluadas las propiedades antimicrobianas de la nisin para corroborar si la coacervación compleja influyó en la actividad del péptido.

En general, es escasa la literatura donde se evalúen las actividades biológicas de los péptidos entrapados mediante distintos métodos de encapsulación, sin embargo con ésta investigación se comprobó que la coacervación compleja está bien adaptada para aplicaciones alimentarias ya que esta técnica no utiliza disolventes orgánicos ni requiere temperaturas drásticas. Las condiciones de encapsulación deben ser suaves para los compuestos sensibles y la liberación puede controlarse mediante variaciones de pH

(condiciones ácidas en el estómago, neutras en el intestino) o acción enzimática.

4.5. Conclusiones

Fue posible desarrollar un sistema de entrapamiento usando los biopolímeros APS-κ-carragenina y BPA como compuesto activo, con un rendimiento de coacervación de hasta 77.6% para el tratamiento CC_{9:1}.

Los complejos coacervados mantuvieron la actividad antioxidante de los BPA después de haber sido sometidos a una DGS, hasta un 90% en el coacervado 9:1. Por lo tanto, los hidrolizados producidos a partir de proteína de alberjón (*Lupinus gredensis*) por Flavorzyme® que mostraron mayor actividad antioxidante pueden ser empleados como ingredientes funcionales atrapados, para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

5. LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Alsohaimy, S. a., Sitohy, M. Z., & El-Masry, R. a. (2007). Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins.pdf. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 123–129.
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 235–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237. <https://doi.org/1851-6114>
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12267>

- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, 62, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224–243. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9058-8>
- Castañeda, Heriberto; Gemio, Romulo; Yapu, W. N. J. (2011). Microencapsulacion, Un Metodo Para La Conservacion De Propiedades Fisicoquimicas Y Biologicas De Sustancias Quimicas. *Boliviana de Química*, 28, 135–140.
- Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods—a Review of Methods and Current Limitations. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), 1825–1837. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1559-z>
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D., & Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087–1096. <https://doi.org/10.1128/AEM.06837-11>
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1–2), 52–78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>
- da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., Mello El Halal, S. L., da Rocha, M., Colussi, R., Marques de Assis, L., ... Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.013>
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.012>
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>

- Evangelho, J. A. do, Vanier, N. L., Pinto, V. Z., Berrios, J. J. De, Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>
- Fathi, M., Martín, Á., & McClements, D. J. (2014). *Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. Trends in Food Science and Technology* (Vol. 39). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>
- Garcia-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.013>
- González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.035>
- Gulão, E. D. S., De Souza, C. J. F., Andrade, C. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2015). Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: Formation and characterization. *Food Chemistry*, 194, 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.062>
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Stabilization of model beverage cloud emulsions using protein- polysaccharide electrostatic complexes formed at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5540–5547. <https://doi.org/10.1021/jf052860a>
- Herrera Chalé, F. G., Ruiz Ruiz, J. C., Acevedo Fernández, J. J., Betancur Ancona, D. A., & Segura Campos, M. R. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10), 1691–1698. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.021>
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4), 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>

- Kasera, R., Singh, A. B., Lavasa, S., Prasad, K. N., & Arora, N. (2015). Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 76, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.023>
- Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2009). Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.09.006>
- Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S., & Hardy, J. (2005). PH-induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir*, 21(1), 386–394. <https://doi.org/10.1021/la0486786>
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.007>
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Adv.*, 5(97), 79270–79278. <https://doi.org/10.1039/C5RA13419F>
- Mosquera, M., Giménez, B., Da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, 156, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011>
- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, 58(4), 187–205.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2009). Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chemistry*, 117(3), 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.039>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P., Fierro, O., Gianfrani, C., ... Addeo, F. (2013). Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from in vitro digestion of bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 139(1–4), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.063>

- Power, O., Jakeman, P., & Fitzgerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797–820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>
- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6), 1690–1698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005>
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92(4), 383–398. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0077-2>
- Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D. L., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549–569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Rocha, G. A., Trindade, M. A., Netto, F. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Microcapsules of a casein hydrolysate: Production, characterization, and application in protein bars. *Food Science and Technology International*, 15(4), 407–413. <https://doi.org/10.1177/1082013209346042>
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.010>
- Schmitt, C., Aberkane, L., & Sanchez, C. (2009a). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, 12, 420–476. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.420>
- Schmitt, C., Aberkane, L., & Sanchez, C. (2009b). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, 167(1–2), 420–476. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.420>
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Hernandez-Escalante, V. M. (2011). Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, 27(3), 213–226. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563395>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2011). Bioactive Peptides. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 91(4), 879–886. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00351-4>

- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945–948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a005>
- Soto, C., Guillermo, J., Plata, C., Sepúlveda, L., Efraín, R., Eligio, E. O., ... Antonio, J. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 1(1), 19–26.
- Spada, J. C., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C., & Cardozo, N. S. M. (2015). Interactions between soy protein from water-soluble soy extract and polysaccharides in solutions with polydextrose. *Carbohydrate Polymers*, 134, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.075>
- Su, V., Manuscritos, E. D. E., & Sobral, P. J. A. (n.d.). Issn 1517-7645 of Food Technology Preprint Serie.
- Thi, N., Hoa, Q., Thi, D., Dao, A., & Nam, V. (2017). Release Bioactive Peptides From Enzymatic Hydrolysed Soybean By Alcalase and Protamex Using Response Surface Methodology, 55(2), 137–149. <https://doi.org/10.15625/0866-708X/55/2/7778>
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & De Kruif, C. G. (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3550–3555. <https://doi.org/10.1021/jf034969t>
- Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., & Kohane, D. S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7518–7525. <https://doi.org/10.1021/jf0507947>
- Zhang, B., & Zhang, X. (2013). Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1230–1238. <https://doi.org/10.1002/btpr.1769>