

Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa[®] 2.4 L

Leidy J. Gómez, Omar A. Figueroa y José E. Zapata

Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Calle 67 N° 53-108 Of. 2-103, Medellín-Colombia. (e-mail: joha965@yahoo.es, omfimo22@gmail.com, jedgar_4@yahoo.es)

Recibido Jun. 22, 2012; Aceptado Ago. 03, 2012; Versión final recibida Ago. 20, 2012

Resumen

Se ha evaluado la actividad antioxidante de hidrolizados de plasma de bovino (HPB) obtenidos con Alcalasa 2.4 L a diferentes grados de hidrólisis. Los HPB se fraccionaron a través de membranas de ultrafiltración y se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, con una posterior cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa. Los resultados mostraron que los HPB obtenidos bajo las condiciones de hidrólisis planteadas, poseen una fuerte capacidad de captación de radicales ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico y un alto poder de reducción comparado con las proteínas de plasma no hidrolizadas. Se encontró además, que la actividad antioxidante se incrementa en función del grado de hidrólisis, y que dicha actividad se mantiene después de someter los hidrolizados a condiciones de digestión *in-vitro*. Los procesos descritos permiten obtener un péptido con una actividad antioxidante similar a la presentada por algunos antioxidantes comerciales.

Palabras clave: plasma bovino, hidrólisis enzimática, péptidos antioxidantes, alcalasa

Antioxidant Activity of Bovine Plasma Enzymatic Hydrolysates Obtained by Effect of Alcalase[®] 2.4 L

Abstract

The antioxidant activity of bovine plasma hydrolysates (BPH) obtained with Alcalase 2.4 L at different hydrolysis degrees was evaluated. The hydrolysates were fractionated through ultrafiltration membranes and were purified by ion-exchange chromatography, with subsequent reverse-phase high performance liquid chromatography. The results showed that the hydrolysates of bovine plasma obtained under the established hydrolysis conditions, had strong scavenging ability on 2,2'-azino bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid free radicals and a great reduction power compared with proteins of non-hydrolyzed plasma. Additionally, it was found that the antioxidant activity increases as function of the hydrolysis degree, and that this activity remains after *in-vitro* digestion. The processes described allow obtaining a peptid with antioxidant activities similar to that of conventional commercial antioxidants.

Keywords: bovine plasma, antioxidant activity, antioxidant peptides, alcalase

INTRODUCCIÓN

La oxidación es uno de los problemas más importantes en la conservación de alimentos, por el efecto que tiene sobre la estabilidad de lípidos, proteínas y carbohidratos, debido a la rancidez que produce, y el consecuente acortamiento de la vida útil del producto (Pihlanto, 2006). Por otro lado, los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico, dado que los procesos oxidativos pueden dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades como derrame cerebral, arteriosclerosis, diabetes y cáncer (Bray, 2000). Una alternativa para reducir la oxidación la constituyen los antioxidantes sintéticos, sin embargo, el uso de estos compuestos sintéticos ha sido altamente cuestionado, debido a los riesgos que representan para la salud (Saiga *et al.*, 2003), por lo que la tendencia actual es utilizar productos naturales como antioxidantes, que potencien esta actividad en el alimento antes y después que éste haya sido ingerido.

Una posible fuente de compuestos naturales con actividad antioxidante, lo constituyen los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas (Chang *et al.*, 2007). El estudio de estos péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado buena actividad en numerosos hidrolizados de diferentes fuentes alimentarias (Bernardini *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2009; Nalinanon *et al.*, 2011; Pihlanto, 2006; Xie *et al.*, 2008). La actividad antioxidante de péptidos bioactivos puede ser atribuida a su capacidad para la eliminación de radicales, la inhibición de la peroxidación lipídica y a las propiedades de quelación de iones metálicos (Sarmadi y Ismail, 2010). Aunque se ha asociado la actividad antioxidante a la presencia de varios aminoácidos, se sabe que la presencia de estos no es suficiente para exhibir la actividad, sino que está relacionada también con la estructura primaria de los péptidos, de modo que su secuencia de aminoácidos puede afectar dichas propiedades (Saiga *et al.*, 2003), así como la enzima empleada en la reacción de hidrólisis (Bernardini *et al.*, 2011). No obstante hasta el momento el mecanismo exacto por el cual los péptidos antioxidantes ejercen su actividad y la relación estructura-actividad no está completamente esclarecido.

La sangre animal producida en las plantas de sacrificio es una fuente potencial de proteínas de bajo costo ya que estas constituyen uno de sus componentes principales (Hoyo *et al.*, 2008), sin embargo generalmente representa el subproducto más problemático de la industria cárnica. En Colombia, por ejemplo, según reportes de FEDEGAN (FEDEGAN, 2011), al año se sacrifican más de 4 millones de cabezas de ganado vacuno, que equivalen a aproximadamente 8.800 toneladas de proteínas de alto valor biológico y nutricional, al tiempo que se cuenta solo con 7 plantas procesadoras de subproductos legalmente reconocidas. De esta manera, la alta producción de la sangre de bovino en relación con la escasa demanda, señala su subutilización, lo que la convierte en un problema medioambiental dado que gran parte de este subproducto es arrojado a las fuentes de agua (Falla *et al.*, 2002).

Bajo este panorama el plasma de bovino representa una buena fuente de proteínas hidrolizables, no solo por la importancia de ofrecer alternativas para su utilización, sino porque la sangre y en especial el plasma sanguíneo son fuentes reconocidas de péptidos con propiedades bioactivas tales como antimicrobiana, opioide, antihipertensiva, antioxidante, entre otras (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2006). Acerca de péptidos antioxidantes en plasma no son muchas las investigaciones realizadas, existen algunos estudios con plasma proveniente de diferentes fuentes como porcino, humano y equino (Chatterjee *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2006), en cuanto al plasma de bovino, solo algunos autores como Salgado *et al.* (2011), han realizado investigaciones acerca de su actividad antioxidante, pero hasta ahora no hay reportes de las características de los péptidos que proveen dicha actividad, ni de la estabilidad frente a condiciones digestivas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades antioxidantes de los HPB, el efecto que el grado de hidrólisis (GH) tiene sobre dicha capacidad antioxidante y la persistencia de dicha propiedad luego de una digestión gástrica *in-vitro*.

MATERIALES Y MÉTODO

Reactivos y materiales

El plasma en estado líquido, se obtuvo de un proveedor comercial en Medellín-Colombia (Frigodan Ltda.), tomando muestras de 6 lotes de producción diferentes, las cuales se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. Para la hidrólisis enzimática, se utilizó alcalasa 2,4 L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Dinamarca), cuya actividad ($2,45 \pm 0,07$ AU/g) se verificó con el método de Takami, *et al.*, (1989), modificado. Los reactivos ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri-2-pyridyl-s-triazine (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

Hidrólisis del plasma

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor de vidrio durante 2 h. Se prepararon 800 mL de una solución de plasma con 8 mg/mL de proteína, la cual fue llevada a condiciones de pH 8,0 y temperatura de 60 °C, con relación enzima sustrato de 8% (p/p). El control de pH y temperatura se hizo con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrando 842 marca Metrohm, operado por un ordenador (software Tiamo 1.2.1). La reacción fue monitoreada con la determinación del GH, utilizando el método del pH-estado, que consiste en mantener constante el pH del medio de reacción por la adición de base, para neutralizar los protones que son liberados en la reacción de hidrólisis (Guadix *et al.*, 2000).

El consumo de base, puede ser relacionado con el GH según las ecuaciones 1a y 1b (Márquez y Vázquez, 1999).

$$GH = \frac{BN_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} 100 \quad (1a)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (1b)$$

Donde h_{tot} el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa, B es el volumen consumido de base en L, M_P la masa de la proteína en kg, N_B la Normalidad de la base en Eqv/L y α es el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción, valor que está dado en función del pH y la temperatura de reacción, para este experimento se empleó un α de 0.93 y un h_{tot} de 8.3 Eqv/kg que ha sido reportado para proteínas de la sangre (Adler-Nissen, 1986). Al final de cada ensayo el medio de reacción se llevó a 85 °C por 10 min para detener la hidrólisis, el hidrolizado fue luego centrifugado a 6000 rpm durante 20 min para precipitar la fracción no hidrolizada. Para evaluar si la actividad antioxidante de los hidrolizados de plasma de bovino aumenta indefinidamente con el GH, se realizó una hidrólisis por duplicado, bajo las mismas condiciones ya descritas, en la que se dejó la reacción por un tiempo prolongado (6 h) con el fin de alcanzar un GH significativamente mayor (25%), y a estos hidrolizados se les evaluó la actividad antioxidante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

En el análisis de electroforesis SDS-PAGE se usó un gel 12% en poliacrilamida (Laemmli, 1970). El proceso se desarrolló bajo condiciones no reducidas, en una cámara para electroforesis vertical. Todas las corridas fueron efectuadas a 120 V por 1 h. Se usó azul de Coomassie como colorante y ácido acético al 10% como decolorante. Los pesos moleculares de las proteínas y los péptidos fueron estimados usando un marcador de amplio rango entre 5-250 kDa (Fermentas # SM 1881, USA).

Medición de FRAP

Se llevó a cabo con la metodología descrita por Pulido *et al.* (2000), en la que 900 μ L del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl y buffer de acetato de sodio) recién preparado y calentado a 37 °C, se mezclan con 90 μ L de agua destilada y 30 μ L de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se lee la absorbancia a 595 nm. Las soluciones acuosas de concentraciones Trolox (entre 0 y 500 M) se utilizan para la calibración. Los resultados se expresan como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína (μ molET/g).

Medición de ABTS

Se realizó siguiendo el método descrito por Re *et al.* (1999), en el cual 100 μ L de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 1 mL de la solución ABTS* e incubados a 30 °C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm. Las soluciones acuosas de concentraciones Trolox (entre 0 y 500 M) se utilizan para calibración. Los resultados son expresados como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína (μ molET/g).

Digestión in-vitro

Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la capacidad de los péptidos obtenidos en la hidrólisis de soportar condiciones similares a las que se tienen en el sistema gástrico, sin perder su capacidad antioxidante. El modelo de la digestión *in-vitro* fue adaptado de Yagoub *et al.* (2004), con algunas

modificaciones. En este 35 mg de la proteína se colocan en 3.5 mL de una solución de HCl (0.1 N), con 3 mg de pepsina (E.C. 3.4.23.1; ≥ 250 U mg^{-1} sólido; Sigma, St. Louis, USA). Se incuban a 37 °C durante 3 h, luego se ajusta el pH de la mezcla entre 7.5 a 8.0 empleando NaOH (0.2 N). Se adiciona una solución de buffer fosfato (875 μL , pH 7.4) con, 0.46 mg de pancreatina (Sigma, No. P1750), 1 mM CaCl y 0.01% NaN_3 . Esta mezcla se incubaba a 37 °C durante 24 h y finalmente la actividad antioxidante del hidrolizado se determina nuevamente mediante los métodos de FRAP y ABTS.

Purificación de péptidos con actividad antioxidante

El hidrolizado que mostró mayor actividad antioxidante, fue fraccionado en membranas de ultrafiltración (Amicon ultra-4, millipore, USA) con peso molecular de corte de 3 kDa y 10 kDa. Tres fracciones (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa) fueron separadas y almacenadas a -20 °C. La actividad antioxidante de estas fracciones fue nuevamente determinada mediante los métodos de FRAP y ABTS. Las fracciones obtenidas de la ultrafiltración con mayor actividad antioxidante fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio aniónico con una columna DEAE- sephadex (20 x 100 mm), equilibrada con buffer fosfato 0.01 M pH 7.8 y eluida con gradiente lineal de NaCl a concentraciones entre 0 y 1 M. La elución fue monitoreada por medida de la absorbancia a 280 nm. La actividad antioxidante de los picos cromatográficos fue nuevamente determinada mediante el método ABTS. El pico obtenido en la cromatografía de intercambio aniónico, que mostró mayor capacidad antioxidante, fue separado por RP-HPLC en una columna octadecilsilica (C18) (250 x 10 mm; Restek, Pennsylvania, USA), usando un gradiente de acetonitrilo que contiene 1% de ácido trifluoroacético (TFA) a un flujo de 2 mL/min. Los picos eluidos fueron detectados por UV a una absorbancia de 280 nm.

Comparación con antioxidantes comerciales

La actividad antioxidante del péptido purificado que exhibió la mayor actividad, fue comparada con los antioxidantes comerciales L- ácido ascórbico y Trolox, como parámetros de referencia.

Análisis estadístico

Los ensayos de hidrólisis se hicieron por triplicado para determinar la desviación estándar del GH. Los análisis de actividad antioxidante fueron realizados por sextuplicado con el fin de determinar su reproducibilidad. Se utilizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% para evaluar la influencia del grado de hidrólisis sobre la actividad antioxidante y un test de rango múltiple de Duncan para determinar diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hidrólisis del plasma

En la fig. 1, se reporta el GH en función del tiempo para la hidrólisis de plasma de sangre de bovino, con Alcalasa 2,4 L, durante 120 min. En los primeros 15 min, se observó un incremento en el GH de 10,1%, en los siguientes 55 min la velocidad decrece paulatinamente con un aumento en el GH cercano al 7%, después de este tiempo, la pendiente se vuelve casi nula, de modo que en los restantes 50 min el GH solo aumenta 1,9%. A las 2 h de reacción el GH alcanza un valor de 19,1% con una desviación estándar del 0,23.

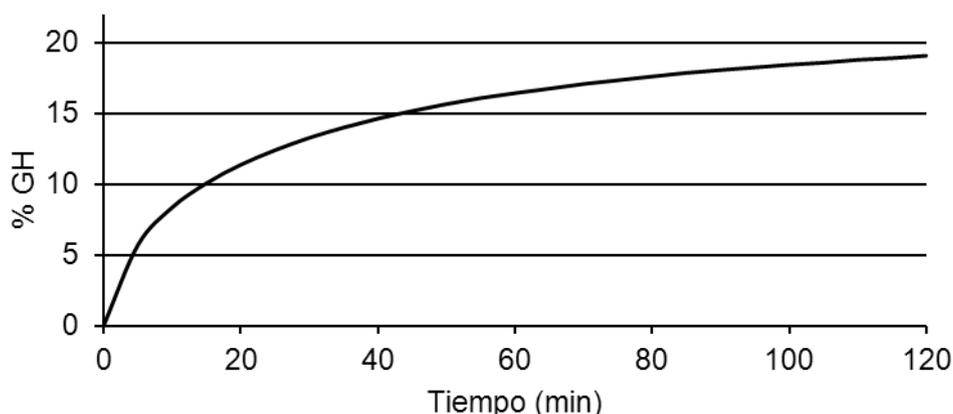


Fig. 1: Grado de hidrólisis del plasma de sangre de bovino hidrolizado con Alcalasa 2,4L a 8 mg/mL de proteína, pH 8,0 y 60 °C.

La curva de hidrólisis obtenida es típica en la hidrólisis enzimática de proteína alimentarias (Lamsal *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), y muestra que la reacción alcanza una fase de estado estacionario. Investigaciones anteriores (Márquez y Vázquez, 1999) indican que la disminución en la velocidad de hidrólisis de la reacción responde generalmente a tres factores: (a) Disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas, (b) Posible inhibición de las enzimas causada por el sustrato de hidrólisis; (c) Desnaturalización térmica de la enzima. Siendo el primero de estos, el factor que posiblemente actúa con mayor intensidad en este caso, dado que la concentración de sustrato no se incrementa en el transcurso de la reacción y la temperatura utilizada es la recomendada por el proveedor. Adicionalmente se puede estar presentando una desactivación de la enzima, como se ha demostrado en estudios previos de este grupo (Figuroa *et al.* 2012).

Efecto del grado de hidrólisis en la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos, el ABTS y el FRAP, ambos catalogados entre los métodos de transferencia de electrones, los cuales se distinguen por ser simples, rentables, fáciles de interpretar y reproducibles (Arnao, 2000). Para analizar la precisión de los métodos de análisis de actividad antioxidante, se evaluó la desviación estándar relativa de 6 muestras de HPB con GH 19,1%. Los valores promedio de actividad antioxidante fueron de 1343,5 y 118,1 $\mu\text{molTE/g}$ para los métodos ABTS y FRAP, con desviación estándar relativa de 0,030 y 0,053 respectivamente.

En la tabla 1 se muestra la actividad de captación de radicales ABTS* y el poder reductor de HPB, en relación con el grado de hidrólisis (GH). Como se puede apreciar, la actividad antioxidante aumenta en función del GH, manifestando incrementos de hasta 6 veces para el hidrolizado con GH de 19,1%, con respecto al plasma no hidrolizado. La alta actividad antioxidante presentada por los hidrolizados puede ser atribuida, en parte, a los cambios estructurales de las proteínas, dado que la hidrólisis enzimática promueve la apertura y exposición de residuos de aminoácidos activos y capaces de reaccionar con oxidantes (Kong y Xiong, 2006), este mismo comportamiento ha sido reportado en investigaciones realizadas a plasma de porcino (Liu *et al.*, 2009).

Se puede observar, que el incremento de la actividad antioxidante se detiene cuando el GH llega a valores cercanos al 19%, por encima del cual no se observan incrementos significativos de dicha actividad (véase tabla 1). Es posible que para este GH, la mayor parte de los aminoácidos activos estén expuestos, por lo que un incremento en el GH no se manifiesta como un aumento significativo en la actividad antioxidante. Se ha reportado incluso, que una hidrólisis excesiva de proteínas alimentarias puede disminuir la actividad antioxidante (Kong y Xiong 2006; Salgado *et al.*, 2011), dado que conllevan a una disminución de péptidos y un aumento de aminoácidos libres, los cuales no son efectivos como antioxidantes por si solos, en tanto que son necesarias las propiedades químicas y físicas conferidas por la secuencia aminoacídica, especialmente la estabilidad de los radicales peptídicos que no inician o propagan más reacciones oxidativas (Elias *et al.*, 2008).

Tabla 1: Capacidad antioxidante ABTS y FRAP de los HPB en función del GH. Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

GH	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
0	174,0 \pm 6,7 ^a	18,5 \pm 2,5 ^a
3,8	783,4 \pm 7,6 ^b	68,3 \pm 3,2 ^b
6,7	887,2 \pm 9,6 ^c	80,1 \pm 1,9 ^c
10,8	1032,6 \pm 9,0 ^d	91,6 \pm 4,2 ^d
15,3	1126,7 \pm 20,2 ^e	96,8 \pm 5,5 ^d
19,1	1389,0 \pm 19,5 ^f	122,6 \pm 4,4 ^e
25,0	1413,3 \pm 20,3 ^f	125,7 \pm 4,0 ^e

En general las diferencias en los resultados de la actividad antioxidante evaluadas con diferentes métodos a un mismo sustrato, se deben al mecanismo de acción antioxidante que se mide y a las condiciones usadas en los diferentes análisis. El pH del medio y la solubilidad del antioxidante, por ejemplo, juegan un papel importante en la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto (Samaranayaka, 2010). En este caso, la capacidad reductora de los hidrolizados, es menor a la capacidad para captar radicales ABTS* (tabla 1), situaciones similares han sido repostadas por otros autores para hidrolizados de proteínas

alimentarias (Chang *et al.*, 2007). Estos resultados pueden deberse, entre otras cosas, a que las condiciones de trabajo del método FRAP (pH de 3,6) no son favorables para los hidrolizados proteicos y puede verse disminuida su actividad, cuando se compara con el método ABTS que trabaja a pH neutro. Para las posteriores etapas de fraccionamiento y purificación de los péptidos, se utilizará el hidrolizado con GH de 19,1%, por ser el GH para el que se tiene actividad antioxidante significativamente mayor.

Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

En la fig. 2 se muestran los perfiles electroforéticos del plasma completo y el HPB con GH de 19,1%. Como se puede observar para HPB (línea 3), los compuestos de alto peso molecular (>50 kDa) como albumina, globulina y fibrinógeno desaparecen y aparecen especies de bajo peso molecular (<50 kDa) como es de esperarse, dado que la hidrólisis implica la ruptura de los enlaces peptídicos por acción enzimática en este caso, lo cual produce cambios de las características y disminución en el pesos moleculares de las proteínas (Benitez *et al.*, 2008).

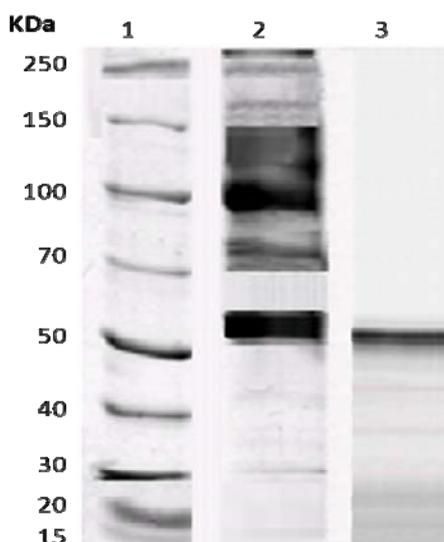


Fig. 2: SDS-PAGE gel 12%. Marcadores de alto peso molecular (línea 1), plasma de bovino completo (línea 2) y HPB 19,1% GH (línea 3).

Estabilidad de la actividad antioxidante bajo condiciones de digestión in-vitro

En la tabla 2 se presentan los resultados del análisis antioxidante de los HPB sometidos al proceso de digestión *in-vitro*. En esta tabla se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los HPB con GH 19,1% antes y después de la digestión *in-vitro*, estos resultados podrían ser atribuidos a limitaciones en los enlaces péptidos disponibles para la pepsina y la pancreatina, dado que se trata una muestra previamente hidrolizada con Alcalasa, con un GH alto. Con esta prueba se pone de manifiesto, la estabilidad del hidrolizado de plasma de bovino frente a las enzimas digestivas, lo cual sugiere que el hidrolizado podría ser resistente a una digestión fisiológica después de ser ingerido (Matsui *et al.*, 2002).

Tabla 2: Análisis ABTS y FRAP realizados al HPB con GH 19,1% antes y después de la digestión *in-vitro*. Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Muestra (GH: 19,1%)	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
Sin Digestión	1389,0 \pm 19,5 ^a	122,6 \pm 4,7 ^a
Con Digestión	1380,6 \pm 12,5 ^a	119,8 \pm 4,4 ^a

Fraccionamiento de péptidos con actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las tres fracciones de ultrafiltración con diferente peso molecular (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa) se muestran en la tabla 3. Los péptidos con peso molecular de menos de 3 kDa exhiben actividad con valores de 1692 y 137 $\mu\text{molTE/g}$ para el análisis ABTS y FRAP respectivamente. Este valor es mayor que el de las demás fracciones y el del hidrolizado completo ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren que

la actividad antioxidante de los péptidos de plasma de bovino depende de su peso molecular, lo cual ha sido reportado en otras investigaciones donde se relaciona la actividad antioxidante con el peso molecular de los péptidos, en dichas investigaciones se evidencia además, que la mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes alimentarias tienen un peso molecular entre 500 y 1800 Da (Guo *et al.*, 2009; Je *et al.*, 2005; Nalinanon *et al.*, 2011).

Tabla 3: Actividad antioxidante de los péptidos del HPB (GH: 19,1%) con diferentes pesos moleculares. Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Fracción	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
>10 kDa	905,0 \pm 17,9 ^a	89,1 \pm 3,6 ^a
3-10 kDa	1379,1 \pm 21,8 ^b	128,4 \pm 3,8 ^b
<3 kDa	1692,3 \pm 15,0 ^c	137,6 \pm 4,4 ^c

La fracción menor 3 kDa fue separada por medio de cromatografía de intercambio aniónico en tres picos: I, II y III (fig. 3). El pico I mostró el mayor poder antioxidante (ABTS 1677 $\mu\text{molTE/g}$), dicho pico eluyó a 0% de B, de modo que la mayor actividad la tienen los aminoácidos o péptidos básicos (cargados positivamente) presentes en la fracción de menos de 3 kDa del HPB con GH de 19,1%.

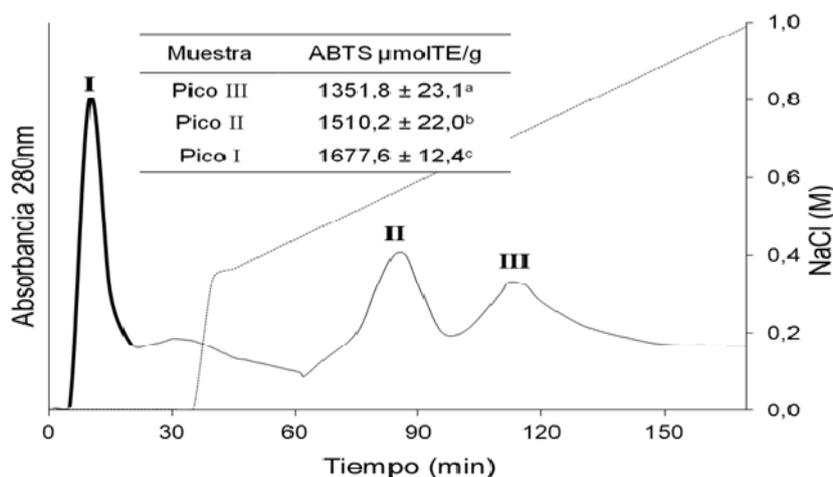


Fig. 3: Perfil de elución de los HPB (GH: 19,1%, <3 kDa) en cromatografía de intercambio aniónico columna DEAE, y actividades antioxidantes de los picos medidas por el método ABTS.

El pico I fue luego separado por medio de RP-HPLC, y se evaluó la actividad antioxidante de las tres fracciones más representativas (I_a , I_b y I_c) (fig. 4). La fracción I_a mostró la más alta actividad antioxidante incrementándose 25 veces respecto a la que presentaba el plasma de bovino sin hidrolizar. La gran actividad captadora de radicales ABTS[•] mostrada por el pico I_a , sugiere que dicho pico contiene péptidos o aminoácidos donadores de electrones y pueden reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables y terminar la reacción en cadena del radical (Binsan *et al.*, 2008).

Comparación con antioxidantes comerciales

En la tabla 4 se presenta la capacidad captadora de radicales ABTS[•] de dos antioxidantes comerciales L-ácido ascórbico y Trolox, con el fin de compararlos con la actividad presentada por el pico I_a purificado por RP-HPLC (fig. 4). Como se puede observar, la capacidad antioxidante presentada por el pico I_a tiene valores que están en el mismo orden de magnitud que la actividad presentada por los antioxidantes comerciales.

Dada la tendencia actual a utilizar productos naturales antioxidantes cuya actividad se lleve a cabo no sólo en los alimentos envasados, sino también una vez que el alimento ha sido ingerido, los péptidos bioactivos han tenido un enorme apogeo y son incluso componentes fundamentales de muchos productos o ingredientes comercializados como alimentos funcionales. En efecto, varios hidrolizados de proteínas vegetales, pueden ser incorporados en alimentos específicos como aditivos alimentarios (FDA, 2011). Los resultados mostrados en la tabla 4, ponen de manifiesto la potencial aplicación de este péptido como un

conservante natural, que puede incluso sustituir antioxidantes sintéticos, con la ventaja de que por tratarse de un péptido, puede presentar propiedades nutricionales y funcionales, además de su actividad antioxidante (Xie *et al.*, 2008), además por ser obtenido a partir de proteínas alimentarias de origen natural, su aplicación en alimentos, posee menos restricciones que los antioxidantes sintéticos, cuya utilización es regulada por el posible riesgo para la salud (Saiga *et al.*, 2003).

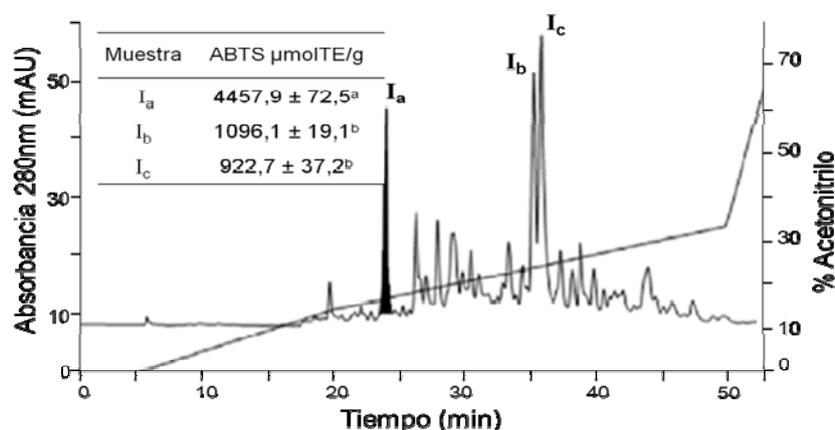


Fig. 4: Perfil de elución RP-HPLC en una columna C-18 de la fracción I eluida en cromatografía de intercambio aniónico, y actividades antioxidantes de los picos medidas por el método ABTS.

Tabla 4: Comparación de capacidad de captación de radicales ABTS* entre el pico I_a y diferentes antioxidantes comerciales.

	L-acido ascórbico	Trolox	Pico I _a
ABTS (IC ₅₀ mg/mL)	0,029 \pm 0,0001	0,04 \pm 0,001	0,032 \pm 0,0002

CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante del plasma de bovino puede ser incrementada por hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4 L a 8 mg/mL de proteína, pH 8 y 60 °C, alcanzando valores máximos cuando el GH se encuentra alrededor del 19%.

Se logró determinar que la capacidad antioxidante del hidrolizado de plasma bovino con GH 19,1%, obtenido a las condiciones de hidrólisis del presente estudio, no sufre modificaciones significativas cuando es sometido a un proceso de digestión *in-vitro*.

A las condiciones del presente trabajo se pueden obtener péptidos provenientes de plasma de bovino, con alta capacidad captadora de radicales ABTS*, similar a la encontrada en el L-ácido ascórbico e incluso superior a la actividad presentada por el Trolox.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero de este trabajo fue proporcionado por CODI, Universidad de Antioquia (MDC 09-1-05) y COLCIENCIAS (programa de becas Joven Investigador modalidad Virginia Gutiérrez de Pineda 2011). Agradecemos al Programa de Ofidismo/Escurpionismo y todos sus integrantes por el apoyo brindado, igual que al Dr. José Contreras (Universidad de Antioquia).

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J., Enzymic hydrolysis of food proteins, 116-124. Elsevier, Londres, Inglaterra (1986).
- Arnao, M.B., Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, Trends Food Sci. Technol.: 11, 419-421 (2000).
- Benítez, R., A. Ibarz, y J. Pagan, Protein hydrolysates: processes and applications, Acta Bioquím Clín Latinoam.: 42, 227-36 (2008).

- Bernardini, R.D., y otros seis autores, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and byproducts: Review, *Food Chem*: 124, 1296-1307 (2011).
- Binsan, W., y otros 5 autores, Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Food Chemistry*: 106 (1), 185-193 (2008).
- Bray, T.M, Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress, *Nutrition*: 16, 578-81 (2000).
- Chang, C.Y., K.C. Wu y S.H. Chiang, Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*: 100(4), 1537-1543 (2007).
- Chatterjee, S., T. Poduval, J. Tilak y T. Devasagayam, A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*), *Clinica Chimica Acta*: 352, 155-163 (2005).
- Elias, R.J., S.S., Kellerby y E.A. Decker, Antioxidant activity of proteins and peptides, *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*: 48, 430-441 (2008).
- Falla, L.H., Desechos de Matadero como Alimento Animal en Colombia, Frigorífico Guadalupe S.A., Seminario Industrias Cárnicas, residuos, su tratamiento y prevención de la contaminación, Santafé de Bogotá, Colombia, (2002).
- FDA, (2011). Listing of food additive status part II (en línea), <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm>, acceso: 1 de mayo (2011).
- Federación Nacional de Ganaderos de Colombia (FEDEGAN). Estadísticas producción (en línea), http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1760323&_dad=portal&_schema=PORTAL. Acceso: 9 de agosto (2012).
- Figuroa O.A, J.E. Zapata y G.A. Gutiérrez, Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino, *Revista EIA*: 17, 71-84 (2012).
- Guadix, A., E. Guadix, M. Páez, P. González y F. Camacho, Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*: 41(1), 79-89 (2000).
- Guo, H., Y. Kouzuma y M. Yonekura, Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein, *Food Chemistry*: 113, 238-245 (2009).
- Hoyo, P., M. Rendueles y M. Diaz, Effect of processing on functional properties of animal blood plasma, *Meat Science*: 78, 522-528 (2008).
- Je, J.Y., S.Y. Kim y S.K. Kim, Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes, *European Food Research and Technology*: 221, 157-162 (2005).
- Kong, B.H. y Y.L. Xiong, Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 54, 6059-6068 (2006).
- Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*: 227, 680-685 (1970).
- Lamsal, B.P., S. Jung, y L.A. Johnson, Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*: 40, 1215-1223 (2007).
- Liu, Q., B. Kong, L. Jiang, X. Cui y J. Liu. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer, *LWT-Food Science and Technology*: 42, 956-962 (2009).
- Márquez, M. y M. Vázquez, Modeling of enzymatic protein hydrolysis, *Process Biochemistry*: 35(1), 111-117 (1999).

- Martinez, S., L. Valek, J. Resetic y D. Ferenec, Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods, *Journal of Electroanalytical Chemistry*: 588, 68-73 (2006).
- Matsui, T., y otros cinco autores, Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR, *J. Nutr. Biochem*: 13, 80-86 (2002).
- Nalinanon, S., S. Benjakul, H. Kishimura y F. Shahidi, Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna, *Food Chem*: 124, 1354-1362 (2011).
- Nedjar-Arrume, N. y otros ocho autores, Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial Peptides, *peptides*: 29, 969-977 (2008).
- Pihlanto, A., Antioxidative peptides derived from milk proteins, *International Dairy Journal*: 16, 1306-1314 (2006).
- Pulido, R., L. Bravo y F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 48, 3396-3402 (2000).
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A.S. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*: 26, 1231-1237 (1999).
- Saiga, A., S. Tanabe y T. Nishimura, Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, 3661-3667 (2003).
- Salgado, P.R., G.B. Fernández y S.R. Drago, A.N. Mauri, Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films, *Food Hydrocolloids*: 25, 1433-1440 (2011).
- Samaranayaka, A.G.P., Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysates with antioxidative properties. Doctor of Philosophy in The Faculty of Graduate Studies (Food Science), The University of British Columbia (Vancouver) (2010).
- Sarmadi, B.H. y A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides*: 31(10), 1949-1956 (2010).
- Takami, H., T. Akiba y K. Horikoshi, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101, *Applied Microbiology and Biotechnology*: 30, 120-124 (1989).
- Wang, J., B. Sun, Y. Cao y C. Wang, Wheat bran feruloyl oligosaccharides enhance the antioxidant activity of rat plasma, *Food Chemistry*: 123(2), 472-476 (2010).
- Xie, Z., J. Huang, X. Xu y Z. Jin, Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate, *Food Chem*: 111, 370-376 (2008).
- Yagoub, A.A., E.B. Mohamed, A.H.R. Ahmed y A.H. El Tinay, Study on fururndu, a Traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins, *J. Agric. Food Chem*: 52, 6143-6150 (2004).
- Yu, Y., J. Hu, Y. Miyaguchi, X. Bai, Y. Du y B. Lin, Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin, *peptides*: 27, 2950-2956 (2006).