

20- Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de caupí (variedad cuarentón) obtenidos por digestión enzimática

Gómez, Andrea Gisella; Gay, Claudia Carolina; Avanza, María Victoria

andreagg0@gmail.com; claudiacarolinagay@yahoo.com.ar; vavanza@yahoo.es

Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura

Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

El caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es una leguminosa cultivada en el Nordeste Argentino con un elevado contenido de proteínas (23-26%) de buena calidad nutricional. Constituye una atractiva materia prima de péptidos bioactivos para su incorporación en alimentos. El objetivo fue estudiar la actividad antioxidante de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática a partir de proteínas de caupí. Aislados proteicos se obtuvieron a diferentes pH de extracción pH 8 (A8) y pH 10 (A10). Los hidrolizados fueron generados con alcalasa (≥ 2.4 U/g; 37° C, 4 h) en relación μl enzima/mg muestra: 0,8/100 (bajo grado de hidrólisis: A8LH y A10LH) y 8/100 (alto grado de hidrólisis: A8HH y A10HH). En cuanto al grado de hidrólisis (método TNBS), A8LH presentó un valor significativamente menor respecto a A10LH (2,28 y 4,60%) mientras que A8HH y A10HH alcanzaron un mayor grado de hidrólisis (24 y 26%). Los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE-ME 15%) mostraron que en A8LH y A10LH la hidrólisis provocó desaparición de algunos polipéptidos con masas moleculares >20 kDa y un incremento de polipéptidos <20 kDa. En A8HH y A10HH se visualizaron bandas <20 kDa. A8 y A10 presentaron similar actividad antioxidante medida por ABTS^{•+} ($\text{IC}_{50\text{A}8}=23,54$ mg/mL, $\text{IC}_{50\text{A}10}=22,78$ mg/mL). La hidrólisis incrementó significativamente la actividad antioxidante con respecto al aislado: los IC_{50} de A8LH y A8HH fueron un 74% y 83% menor que A8, respectivamente. Un comportamiento similar se observó para A10LH y A10HH respecto a A10. Los resultados obtenidos brindan información relevante, mostrando un aumento de la actividad antioxidante por efecto de la hidrólisis con alcalasa. Posteriores estudios se realizarán por otros mecanismos de neutralización de radicales.

Palabras clave: *Vigna unguiculata*, péptidos bioactivos, grado de hidrólisis, alcalasa

Introducción

Las legumbres juegan un papel importante en la nutrición humana puesto que son fuentes ricas en proteínas, calorías, minerales y vitaminas (Deshpande, 1992). El caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. Syn. *Vigna sinensis* L.) pertenece a la familia Fabaceae. Es una leguminosa cuyo cultivo es de larga tradición en la cultura agronómica del Nordeste Argentino. Sus semillas poseen un elevado contenido de proteínas (23-26 %) de buena calidad nutricional y constituyen una atractiva materia prima para la preparación de aislados e hidrolizados proteicos que den origen a péptidos bioactivos (Freitas y col., 2004).

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos. La creciente preocupación por los efectos tóxicos producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la preservación de alimentos evidencia la necesidad de obtener sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en la industria alimentaria. En este sentido, las legumbres constituyen una potencial fuente de péptidos antioxidantes para limitar el daño oxidativo, tanto en alimentos preparados (como antioxidantes naturales), así como protección de la oxidación de las células del organismo cuando éstos sean ingeridos en la dieta.

Los mismos se obtienen a partir de la digestión de proteínas de origen animal o vegetal, por medio de enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana, procesamiento, y durante la digestión gastrointestinal (Smaranayaka y Li-Chan 2011). Es de interés generar nuevos conocimientos acerca de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos péptidos, a efectos de poder incorporarlos como suplemento o ingrediente en productos alimentarios que tengan un potencial efecto beneficioso en la salud.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antioxidante de péptidos provenientes de proteínas de caupí obtenidos a partir de hidrólisis con alcalasa. El estudio de propiedades biológicas de las proteínas e hidrolizados de semillas de caupí, podría ser útil para que los mismos puedan incorporarse, en un futuro, en la producción regional de complementos alimenticios con valor terapéutico.

Materiales y Métodos

Obtención de aislado proteico de *caupí*:

Se utilizaron semillas de caupí, variedad cuarentón obtenidas de la Estación Experimental El Sombrero-Corrientes (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA), cosecha 2015. Para la preparación de los aislados proteicos se adoptó el método de Qi y col., (1997),

utilizando dos pH de extracción (8 o 10) y pH 4,5 para la precipitación. Los aislados obtenidos se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Se los denominó A8 y A10 según el pH de extracción.

Hidrólisis enzimática con alcalasa: una suspensión de 1 g de aislado en 100 ml de NaOH 1 mM (pH 10) se agitó durante 1 hora a 37 °C manteniendo el pH constante. Se adicionó alcalasa en relación 8 µl/100 mg de muestra para obtener un alto grado de hidrólisis (HH) y en relación 0,8 µl/100 mg para alcanzar un bajo grado de hidrólisis (LH). Se incubaron las mezclas (4 horas, 37 °C, agitación constante). Se detuvo la reacción enzimática por calentamiento a 85 °C por 10 minutos (Tironi y Añón, 2010). Las suspensiones fueron liofilizadas y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

Obtención de fracciones y determinación de la concentración de proteínas solubles: Se prepararon dispersiones de las muestras liofilizadas (10 mg/ml) en buffer fosfato de potasio 35 mM de pH 7,8 agitando (300 rpm) a 37 °C durante 30 minutos. Se centrifugaron (temperatura ambiente, 10 minutos, 10400 x g) y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Lowry y col., 1951. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

Determinación del grado de hidrólisis:

El grado de hidrólisis fue determinado mediante el análisis de la concentración de grupos aminos libres por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (Adler – Nissen, 1979).

Electroforesis de aislados e hidrolizados proteicos:

Se utilizó SDS-PAGE al 15% (p/v) en condiciones reductoras según técnica descrita por Laemmli (1970) utilizando una cuba electroforética Miniprotean Tetra Cell (BIO-RAD). Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Actividad antioxidante: método ABTS.

El método de decoloración del catión radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin 6-sulfónico)) se llevó a cabo según Siddhuraju (2006) con algunas modificaciones.

Se midió la absorbancia a 734 nm a tiempo 0 y a 10 minutos. Con las medidas efectuadas para cada dilución de las muestras y del blanco (buffer) se calculó el % de inhibición del radical a través de la ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[(Abs_{B0min} - Abs_{M10min}) - (Abs_{B0min} - Abs_{B10min})]}{Abs_{B0min}} \times 100$$

donde: Abs_{B0min} y Abs_{B10min} se refieren a la absorbancia del blanco a los 0 y 10 minutos respectivamente, y Abs_{M10min} se refiere a la absorbancia de la muestra a dicho tiempo.

Cada medida fue realizada por triplicado y se graficó el % de inhibición respecto a la concentración proteica, a fin de calcular la concentración de proteína que es capaz de provocar el 50 % de inhibición (IC 50%).

Análisis Estadístico. Se evaluaron las diferencias mediante análisis ANOVA con test de Tuckey ($p=0,05$).

Resultados y Discusión

Grado de hidrólisis: Se realizó la extracción de proteínas a dos pH diferentes, 8 y 10, para obtener los aislados proteicos A8 y A10 respectivamente. Luego de ser sometidos a hidrólisis con alcalasa se obtuvieron las siguientes muestras que se nombraron de acuerdo al grado de hidrólisis alcanzado como: A8LH, A8HH, A10LH y A10HH (Tabla 1). Con un bajo grado de hidrólisis A10LH presentó un valor de 4,60% respecto a A8LH que mostró un valor significativamente ($p<0,05$) menor de 2,28%. Esta diferencia podría atribuirse al mayor grado de desnaturalización de las proteínas extraídas a pH 10 (Peyrano *et al.*, 2017). Sin embargo, en los aislados digeridos con la mayor proporción de alcalasa (A8HH y A10HH), no hubo diferencia significativa en el grado de hidrólisis alcanzado; a alta concentración de alcalasa el estado de desnaturalización inicial no influiría.

Tabla 1. Grado de hidrólisis y actividad antioxidante de aislados e hidrolizados de caupí. A8: aislado extraído a pH 8. A10: aislado extraído a pH 10. SH: sin hidrolizar. LH: bajo grado de hidrólisis. HH: alto grado de hidrólisis. NC: No corresponde. IC₅₀: concentración de proteína capaz de provocar el 50 % de inhibición. a, b, c: letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

		Grado de Hidrólisis (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
A8	SH	NC	23,54 ± 2,34a
	LH	2,28 ± 0,17a	5,62 ± 0,36b
	HH	25,80 ± 1,75c	3,79 ± 0,53c
A10	SH	NC	22,78 ± 1,45a
	LH	4,60 ± 0,43b	6,17 ± 0,44b
	HH	24,09 ± 1,15c	3,15 ± 0,23c

Perfil electroforético de aislados e hidrolizados proteicos: El análisis por electroforesis SDS-PAGE al 15% (p/v) en condiciones reductoras de los aislados A8 (Fig.1. A) y A10 (Fig.1. B) sin hidrolizar muestra perfiles similares a los reportados por Avanza y col. (2013) y Peyrano y col. (2016). En ambos se observan los polipéptidos pertenecientes a la: fracción vicilina (rango de 42-80 kDa), la más abundante, y a la fracción albúmina que comprende las proteínas de masas moleculares 94, 33, 25, 20 y 14 kDa.

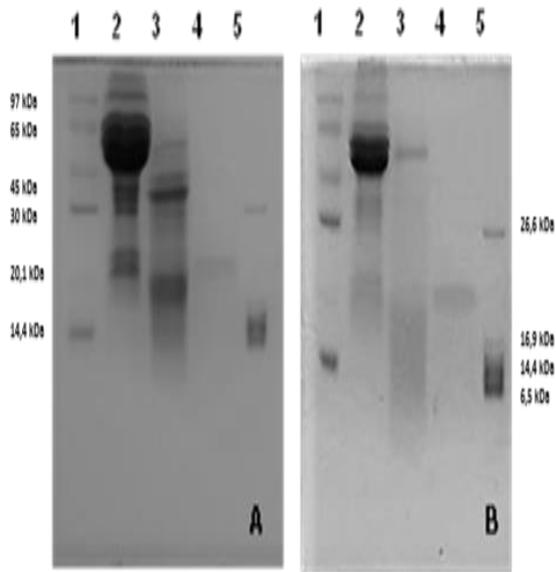


Fig. 1. SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras de aislados e hidrolizados con alcalasa de *caupí*. 1) Marcadores de masa molecular: fosforilasa (94 kDa); albúmina de suero bovino (67 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa); β -lactoalbúmina (14,4 kDa); 2) Aislado sin hidrolizar; 3) LH; 4) HH; 5) Marcadores de muy bajo peso molecular: triosa fosfato isomerasa (26,6 kDa); mioglobina (16,9 kDa); α -lactoalbúmina (14,4 kDa); aprotinina (6,5 kDa); cadena oxidada insulina b (3,4 kDa); bacitracina (1,423 kDa). Líneas 2-4: 40 μ g de proteína. **A)** A partir de aislado extraído a pH 8. **B)** A partir de aislado extraído a pH 10.

Las muestras A8LH y A10LH presentaron perfiles polipeptídicos similares con ligeras diferencias. En ambos la hidrólisis provoca la desaparición de algunos de los

polipeptidos, principalmente de la fracción vicilina. En A8LH aún se observan polipéptidos con masas moleculares entre 64 y 40 kDa y un incremento de bandas menores a 20 kDa (productos de la hidrólisis), mientras que, en A10 se observa sólo la presencia de la banda de 56 kDa y un incremento de bandas menores a 20 kDa.

Por otro lado, las muestras A8HH y A10HH presentan un perfil similar, donde se observa la desaparición de los polipeptidos de las fracciones vicilina y albúmina y la presencia de polipéptidos con masas moleculares menores a 20 kDa, productos de la extensa hidrólisis producida por alcalasa.

Actividad antioxidante

Un valor IC_{50} de 23,54 mg/mL de proteína se obtuvo para A8 y 22,78 mg/mL de proteína para A10 (Tabla 1). La hidrólisis con alcalasa incrementó significativamente ($p < 0,05$) la actividad antioxidante con respecto al aislado: el IC_{50} de A8LH fue 74% menor respecto a A8 y el IC_{50} de A8HH fue 83% menor. Resultados similares se observan para las muestras A10 LH y A10 HH.

Conclusiones

Los resultados obtenidos brindan información relevante, mostrando el aumento de la actividad antioxidante medida por $ABTS^+$ por efecto de la hidrólisis con alcalasa, y si bien no hay

diferencia significativa entre los aislados (A8 y A10), se realizarán posteriores estudios de esta actividad por otros mecanismos de neutralización de radicales. Los hidrolizados de caupí se muestran como potenciales antioxidantes naturales los cuales puede ser una opción a tener en cuenta en la preparación de formulaciones para usos específicos por parte de la industria alimentaria.

Bibliografía

- Adler-Nissen J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256-1262
- Avanza, M.V. Acevedo B.A., Chaves M.G., Aphalo P.; Añón M.C. (2015). Physicochemical and Structural Properties of Major Protein Fractions of Two Varieties of Nea-Cowpea (*Vigna Unguiculata* L.): A Comparative Study. *Int. J. Food Nut. Sci.*, 4, 240-247
- Avanza M.V.; Acevedo B.; Chaves M. G.; Añón M C. (2013) Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. *Food Sci. Tech.*, 51, 148-157.
- Deshpande, S. S. (1992). Food legumes in human nutrition: a personal perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 333–363.
- Freitas, R. L.; Texeira, A. R.; Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1682-1687.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Peyrano F., Speroni F., Avanza M.V. (2015). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 33, 38-46
- Peyrano, F., de Lamballerie M.; Avanza M.V.; Speroni F. (2017). Calorimetric Study of Cowpea Protein Isolates. Effect of Calcium and High Hydrostatic Pressure. *Food Bioph.*, 12, 1-9.
- Qi, M., Hettiarachchy, N.S. y Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolate modified by pancreatin. *J. Food Sci.*, 62, 1110–1115.
- Samaranayaka, A.G.P., & Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J. Func. Foods*, 3(4), 229-254.
- Siddhuraju P. (2006). The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chem.*, 99, 149-157.
- Tironi V., Añón M. C. (2010). Amaranth as a source of antioxidant peptides. Effect of proteolysis. *Food Res. Int.*, 43, 315-322.

Financiamiento

Estudio de propiedades funcionales y biológicas de proteínas de cuapí cultivado en el NEA-Argentina. PIP 2015-2017. Entidad: CONICET. Res. Nº: 0111/16 D. Monto: \$150.000. Período de ejecución: 2017-2020.