Estudio bibliográfico y experimental sobre la biodisponibilidad y bioactividad de péptidos de leguminosas

Sara Díaz de la Cruz

Máster en Nuevos Alimentos

MÁSTERES DE LA UAM

2019 - 2020

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Máster en Nuevos Alimentos

Estudio bibliográfico y experimental sobre la biodisponibilidad y bioactividad de péptidos de leguminosas

Sara Díaz de la Cruz

Directora: Blanca Hernández Ledesma

Co-directora: Lourdes Amigo Garrido

Tutora: Diana Martin Garcia

Lugar de realización: Instituto de investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos

Trabajo Fin de Máster. Curso 2019-2020

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN....……..1

1.1. Leguminosas: composición de las familias y propiedades nutricionales…….1

1.2. Género *Erythrina*……..6

1.2.1. *Erythrina edulis* (Pajuro andino)…….11

1.3. Péptidos bioactivos…….14

1.4. Estrategias para la liberación de péptidos bioactivos…….16

1.5. Estudios *in silico*……16

1.6. Péptidos bioactivos procedentes de proteínas de leguminosas……..17

1.7. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos en leguminosas…….19

1.8. Avances en la investigación de péptidos bioactivos en pajuro……..20

2. OBJETIVOS…….23

2.1. PLAN DE TRABAJO……24

3. MATERIALES Y MÉTODOS…….25

3.1. Reactivos……25

3.2. Péptidos sintéticos de pajuro……..25

3.3. Simulación de la digestión gastrointestinal……26

3.3.1. Simulación *in silico*…….26

3.3.2. Simulación *in vitro*……..26

3.3.3. Identificación de péptidos mediante HPLC-MS/MS……...27

3.4. Análisis de las actividades biológicas de los péptidos……...27

3.4.1. Simulación *in silico*…….27

3.4.2. Actividad antioxidante *in vitro*. Método de neutralización de radicales peroxilo……..28

3.5. Análisis de biodisponibilidad…….29

3.5.1. Ensayo de viabilidad celular……29

3.5.2. Ensayo de permeabilidad celular. Resistencia eléctrica transepitelial…29

3.6. Análisis estadístico……30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..31
4.1. Análisis *in silico* de los péptidos sintéticos de pajuro……31
4.1.1. Evaluación de su toxicidad y bioactividad……..32
4.1.2. Evaluación de la digestión gastrointestinal……35
4.2. Estudio de los péptidos sintéticos. Identificación mediante HPLC-MS/MS…….37
4.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante antes de la digestión gastrointestinal *in vitro*……...37
4.2.2. Efecto de los péptidos en la viabilidad de Caco-2……..41
4.3. Análisis de los péptidos tras la digestión gastrointestinal *in vitro*…….41
4.3.1. Análisis mediante HPLC-MS/MS……...42
4.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante……..43
4.4. Evaluación de la biodisponibilidad……44
4.4.1. Efecto sobre la viabilidad celular en Caco-2……...44
4.4.2. Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial……46
5. CONCLUSIONES……48
6. BIBLIOGRAFÍA……..49
7. ANEXOS……..55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías de las distintas subfamilias de leguminosas. A) Subfamilia Mimosoideae; B) subfamilia Caesalpinioideae; C) subfamilia Papilionoideae……..1
Figura 2. Volumen de producción de legumbres en España……...2
Figura 3. Representación del número de patentes asociadas a las distintas especies del género *Erythrina*…….9
Figura 4. Fotografías de (A) árbol de pajuro y (B) vaina y semilla……..11
Figura 5. Representación de la producción de péptidos bioactivos y sus actividades……..15
Figura 6. Diagrama representativo del montaje utilizado para las mediciones de la actividad transportadora de la monocapa de células Caco-2……30
Figura 7. Cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC-MS/MS a concentraciones de (A) 100, (B) 50, (C) 25, (D) 10, (E) 5, (F) 1 µM del péptido MFTGPY. Representación de la intensidad del ión con respecto a la concentración de los péptidos (G) MFTGPY……..38
Figura 8. Regresión lineal del área neta bajo la curva en función de los µmol de Trolox……39
Figura 9. Regresión lineal del área neta bajo la curva en función de los µmol del péptido YPSY…….....39
Figura 10. Porcentaje de células Caco-2 viables no diferenciadas en presencia de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control **p>0,05*…….....42
Figura 11. Cromatogramas obtenidos tras la digestión gástrica (A) y tras la digestión gastrointestinal (B) resultantes del análisis de HPLC-MS/MS del péptido DGLGYY……..43
Figura 12. Porcentaje de células Caco-2 viables diferenciadas en presencia de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control **p>0,05*…….....45
Figura 13. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 7 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$……...46
Figura 14. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 14 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$……...46

Figura 15. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 14 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$……...46
Figura S2. Representación de la intensidad del ión con respecto a la concentración de los péptidos (A) YPSY; (B) AALWE; (C) CCGDYY y (D) DGLGYY; (E) SQLPGW……..56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Países productores y producción de las legumbres más comunes……2
Tabla 2. Composición nutricional de macronutrientes y micronutrientes de legumbres secas por 100 g de porción comestible……5
Tabla 3. Descripción de las especies más estudiadas del género *Erythrina*……7
Tabla 4. Frecuencia de presentación de los principales metabolitos secundarios en distintos órganos de especies de *Erythrina*……8
Tabla 5. Descripción de las patentes asociadas a las distintas especies del género *Erythrina*……...10
Tabla 6. Composición nutricional de las semillas secas y crudas de pajuro, alubias, garbanzo, guisantes y soja en 100 g……...13
Tabla 7. Contenido total del perfil de aminoácidos de las semillas secas de pajuro, alubia, garbanzo, guisante y soja……..14
Tabla 8. Péptidos bioactivos procedentes de leguminosas……...18
Tabla 9. Estudios de biodisponibilidad de hidrolizados proteicos y péptidos procedentes de diferentes especies de leguminosas……...21
Tabla 10. Péptidos procedentes de *Erythrina edulis*, pajuro, seleccionados para el estudio…25
Tabla 11. Datos de las características de hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga y punto isoélectrico (pI) de los péptidos sintéticos de pajuro……31
Tabla 12. Datos de toxicidad y actividad biológica de los péptidos sintéticos de pajuro…….33
Tabla 13. Puntos de escisión y péptidos liberados tras la simulación *in silico* de la digestión gastrointestinal de los péptidos sintéticos de pajuro……36
Tabla 14. Actividad antioxidante de los péptidos sintéticos del pajuro antes de la digestión gastrointestinal *in vitro*……..40
Tabla 15. Actividad antioxidante de los péptidos sintéticos del pajuro DGLGYY, CCGDYY, MFTGPY antes y después de la digestión gástrica e intestinal *in vitro*……44

Tabla S1. Composición nutricional de las semillas secas y crudas de pajuro, alubias, garbanzo, guisantes y soja en 100 g……..55

RESUMEN

La familia de las leguminosas es una de las principales fuentes alimentarias a nivel mundial y la segunda a nivel económico. El pajuro (*Erythrina edulis*) es una leguminosa originaria de los Andes con un elevado valor nutricional por su contenido en proteínas de alta calidad, su bajo contenido en grasa y alto en fibra. El aumento de patologías asociadas a factores alimentarios ha provocado un fomento del estudio de compuestos beneficiosos entre los que destacan los péptidos bioactivos.

En este trabajo, se ha realizado una recopilación bibliográfica exhaustiva sobre péptidos bioactivos procedentes de leguminosas, centrándonos en su multifuncionalidad y biodisponibilidad. El estudio experimental se ha enfocado en estos aspectos específicos de los péptidos procedentes de proteínas de pajuro, integrando metodologías *in silico* con estudios *in vitro*. Se ha evaluado la capacidad de péptidos sintéticos para ejercer propiedades multifuncionales y su biodisponibilidad tras ser sometidos a una digestión gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas. Mediante una aproximación *in silico* se han determinado las características y el potencial tóxico y bioactivo de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW. El análisis *in vitro* ha confirmado las propiedades neutralizantes de radicales peroxilo de los péptidos YPSY, AALWE y DGLGYY, debida, posiblemente a su contenido en aminoácidos aromáticos. Tras la simulación de la digestión gastrointestinal, la actividad antioxidante de los péptidos CCGDYY y DGLGYY disminuyó, mientras que la del fragmento MFTGPY aumentó. Posteriormente, se procedió a evaluar la biodisponibilidad de los péptidos, empleando la línea celular Caco-2 diferenciadas. Se estudió el potencial efecto citotóxico de los péptidos en dichas células para llevar a cabo el ensayo de biodisponibilidad. Debido a las limitaciones del tiempo provocadas por la pandemia de COVID-19, dicho estudio quedó suspendido, sólo pudiendo realizar las primeras etapas del ensayo.

Palabras claves: leguminosas, *Erythrina edulis*, pajuro, péptidos bioactivos, actividad antioxidante, células Caco-2, digestibilidad, biodisponibilidad, multifuncionalidad.

ABSTRACT

The legume family is one of the main food sources worldwide and the second most important at economic level. The pajuro (*Erythrina edulis*) is a legume native to the Andes with a high nutritional value by its content in fiber and high quality proteins, and its low fat content. The increase in pathologies associated with dietary factors has led to the promotion of the study of beneficial compounds, including bioactive peptides.

In this work, an exhaustive bibliographic compilation on bioactive legumes-derived peptides has been made, focusing on aspects related to their multifunctionality and bioavailability. The experimental study has focused on these specific aspects of pajuro proteins-derived peptides, integrating *in silico* methodologies with *in vitro* studies. The ability of synthetic peptides to exert multifunctional properties has been evaluated, and by the other hand, their digestibility and bioavailability after being subjected to gastrointestinal digestion simulating physiological conditions has been studied. Using an *in silico* approach, the characteristics and the toxic and bioactive potential of YPSY, AALWE, DGLGYY, CCGDYY, MFTGPY and SQLPGW peptides have been determined. *In vitro* analysis has confirmed the peroxyl radical neutralizing properties of YPSY, AALWE and DGLGYY peptides, possibly due to their aromatic amino acid content. After simulation of gastrointestinal digestion, the antioxidant activity of CCGDYY and DGLDYY peptides decreased, while that of MFTGPY fragment increased. Subsequently, the bioavailability of peptides was evaluated, using the differentiated Caco-2 cells line. The potential cytotoxic effect of the peptides was studied to carry out the bioavailability assay. Due to the time limitations caused by the COVID-19 pandemic, this study was suspended, only being able to carry out the first stages of the analysis.

Key words: legumes, *Erythrina edulis*, pajuro, bioactive peptides, antioxidant activity, Caco-2 cells, digestibility, bioavailability, multifunctionality.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leguminosas: composición de las familias y propiedades nutricionales

Las leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae o Leguminosae. Son plantas herbáceas, arbustivas, perennes y anuales (Llamas y Acedo, 2016). Todas ellas tienen unas características comunes: hojas compuestas, nódulos asociados a bacterias fijadoras de nitrógeno y fruto seco o legumbre. La familia Leguminosae se divide en tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae o Faboideae. Mimosoideae (Figura 1A) son árboles, arbustos o hierbas con hojas bipinnadas, consta de 82 géneros y alrededor de 3.300 especies en regiones tropicales o subtropicales. Caesalpinioideae (Figura 1B) son árboles, arbustos o hierbas trepadoras con hojas bipinnadas o pinnadas, formadas por 160 géneros y alrededor de 2.000 especies ubicadas en regiones tropicales. Por último, Papilionoideae o Faboideae (Figura 1C) es la más amplia de las tres subfamilias. Son árboles, arbustos o trepadoras con hojas pinnadas, a menudo trifoliadas o unifoliadas y comprenden 476 géneros y 1.400 especies, localizadas en climas templados (Vázquez, 2019).

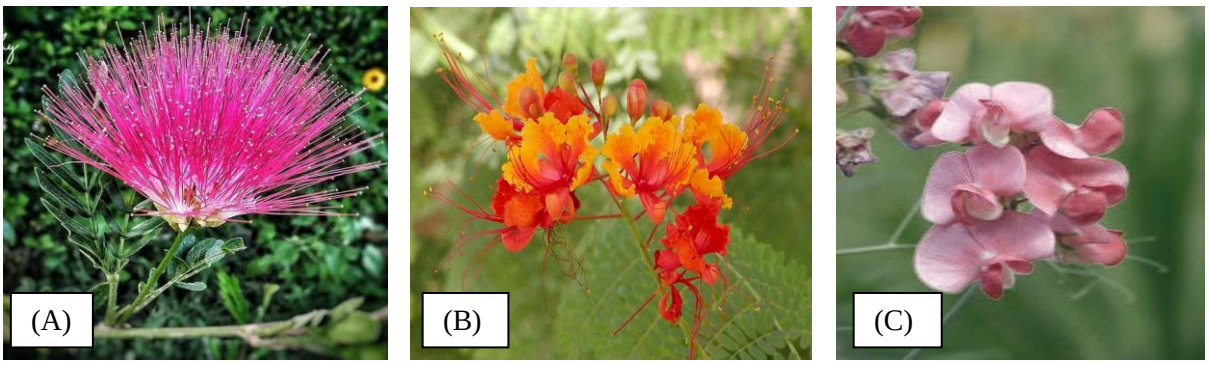


Figura 1. Fotografías de las distintas subfamilias de leguminosas. A) Subfamilia Mimosoideae; B) Subfamilia Caesalpinioideae; C) Subfamilia Papilionoideae

En Europa existen 70 géneros y alrededor de 850 especies mientras que en la Península Ibérica hay 50 géneros y 400 especies. Es la tercera familia más diversa del mundo y la segunda más importante a nivel económico (Llamas y Acedo, 2016).

Las leguminosas se pueden catalogar en diferentes tipos según su uso. Se clasifican en: leguminosas ornamentales, forrajeras y de grano. Las leguminosas ornamentales se emplean en parques y jardines, destacando la gallomba o la falsa acacia. Las leguminosas forrajeras son fuente de proteína, se aprovechan hojas, tallos, vainas o semillas para alimentación animal (Vázquez, 2019). Las leguminosas de grano, tienen mayor importancia debido a las propiedades nutricionales de sus semillas que se emplean en alimentación humana o animal.

Dentro de las especies más reconocidas se encuentran los garbanzos, judías, lentejas, soja, alubias, guisantes, etc. Las semillas de leguminosas siempre han tenido un papel importante en los hábitos alimentarios tradicionales de los países del Mediterráneo debido a su aporte nutricional (AECOSAN, 2019). Los datos más recientes sobre producción mundial de legumbres la sitúan en 73 millones de toneladas en el año 2017. El mayor productor de legumbres secas con 30 millones de toneladas fue la India, seguido de Canadá con 15,8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2017; Tabla 1).

Tabla 1. Países productores y producción de las legumbres más comunes (FAOSTAT, 2017)

Legumbres	Productores	Producción (millones de toneladas)
Soja	Estados Unidos, Brasil, Argentina.	276,4
Alubias	India, Brasil	23,1
Garbanzos	India, Australia, Pakistán	13,1
Guisantes	Canadá, Francia, Rusia, China	11,0
Lentejas	Canadá, India, Turquía	5,0

En España, según los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la producción en la campaña de 2017 para los guisantes secos fue de 194.300 toneladas, seguido de garbanzos con 39 toneladas, alubias 19,8 toneladas y lentejas con 18,5 toneladas (Figura 2). Según indica la FAO, España es uno de los países de mayor consumo de legumbres, aunque está lejos de la media mundial, estimada en 7 kg/persona/año. El consumo estimado en los hogares españoles en el año 2018 fue de 3,2 kg/persona/año. Las legumbres más consumidas son el garbanzo (1,29 kg/persona/año) y las lentejas (1 kg/persona/año) como consumo medio (MAGRAMA, 2019).

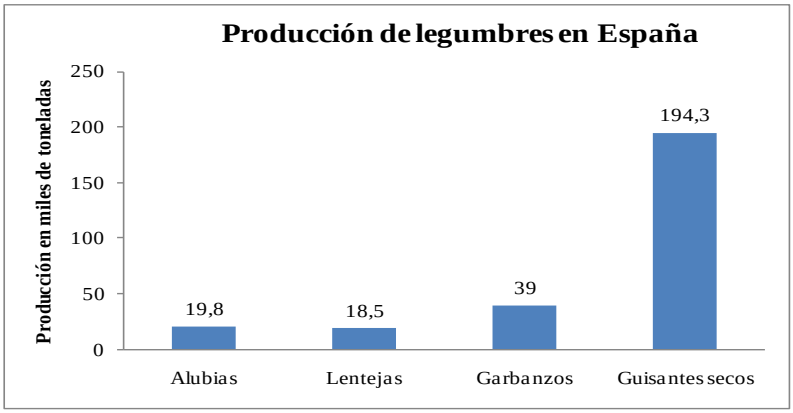


Figura 2. Volumen de producción de legumbres en España (MAGRAMA, 2019)

En lo que respecta al valor nutricional de las leguminosas, son alimentos complejos que incluyen prácticamente todos los macronutrientes y micronutrientes esenciales. Su contenido energético es de aproximadamente 350-400 Kcal/100g de porción comestible de alimento, aunque la forma de cocinado determinará el valor final. Dentro de los macronutrientes, las leguminosas son una buena fuente de proteínas de calidad, con un contenido del 19-36%, destacando la soja y la lenteja con 36 g y 23 g de proteína/100 g de legumbre, respectivamente. En el contenido de aminoácidos destacan la lisina, leucina, fenilalanina y tirosina pero es deficiente en triptófano y aminoácidos azufrados, como la metionina y la cisteína (Delgado-Andrade y col., 2016). Los hidratos de carbono se encuentran en un porcentaje variable entre el 50-60%. Alubias, lentejas, guisantes y garbanzos tienen alrededor de 50 g/100 g, pero la soja presenta un menor contenido con 16 g/100 g. Los hidratos de carbono se pueden dividir en compuestos digeribles o no digeribles por el intestino delgado. El principal compuesto es el almidón, con un contenido en garbanzos de 4,35 g/100 g y en lentejas de 7,56 g/100g. También contienen rafinosa y estaquiosa en menor concentración. Son compuestos de digestión lenta por lo que liberan glucosa a la sangre de manera paulatina (Delgado-Andrade y col., 2016). También tienen un alto contenido en fibra, entre el 12-23%. La fibra soluble se digiere a nivel de colón por la flora bacteriana, donde se liberan ácidos grasos de cadena corta como el butirato, el cual tiene un papel clave en patologías de afectación intestinal y sirve como sustrato para el colonocito. La fibra insoluble se encuentra en menor concentración que la soluble. Este tipo de fibra aumenta el volumen fecal acelerando el tránsito intestinal (AECOSAN, 2019). El contenido en grasa es bajo, con un 3% de media. Presenta un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico 18:2 n-2 y el ácido α-linolénico 18:3 n-3, y ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico 18:1 n-9 (AECOSAN, 2019). No contienen colesterol al igual que otros alimentos de origen vegetal.

Dentro de los micronutrientes, destaca el contenido en minerales como el calcio, magnesio, potasio, zinc, hierro y fósforo (Tabla 2). Sin embargo, su absorción es menor si lo comparamos con alimentos de origen animal. La soja, las alubias y los garbanzos son ricos en calcio y magnesio. Las leguminosas también contienen vitaminas como la vitamina A, vitamina B_1 o tiamina, vitamina B_3 o niacina y vitamina B_9 como folatos. La soja es la leguminosa con una mayor concentración de folatos (370 µg/100 g) (AECOSAN, 2019).

Por otro lado, cabe destacar otros compuestos de interés que se encuentran en las legumbres debido a su actividad biológica, como son los compuestos fenólicos y los fitoestrógenos, siendo los más comunes las isoflavonas (genisteína, daiszeína y glicitina) y el

coumesterol. Se pueden encontrar otros compuestos como ácidos hidroxibenzoicos, aldehídos y ácidos hidroxicinámicos (Delgado-Andrade y col., 2016).

Las legumbres también contienen compuestos no deseables o antinutrientes como el ácido fítico, que no permite la absorción de minerales. Los taninos se combinan con las proteínas dificultando su absorción, los inhibidores enzimáticos bloquean la pepsina y tripsina necesaria para digerir las proteínas y los oligosacáridos son compuestos que no pueden ser digeridos por la ausencia de la enzima α-galactosidasa, provocando flatulencias y distensión abdominal.

Además de por su valor nutricional, las leguminosas destacan por tener compuestos bioactivos. Se ha demostrado que la ingesta de leguminosas proporciona beneficios sobre la salud cardiovascular y gastrointestinal, el control de peso, y que previene frente al síndrome metabólico y la diabetes tipo-2 (Delgado-Andrade y col., 2016). Los efectos fisiológicos pueden variar dependiendo de la especie de legumbre. Sobre la salud cardiovascular, son numerosos los estudios que han demostrado el efecto beneficioso de la ingesta de proteínas de soja, altramuz y guisante, reduciendo un 6% los niveles de colesterol (Sirtori y col., 2012). También se ha demostrado que la ingesta de 35 mg de altramuz blanco reduce la hipertensión y los niveles de colesterol LDL (Bärh y col., 2013). Boschin y col. (2014), confirmaron, en un ensayo de intervención, la reducción de la presión arterial provocado por la liberación de péptidos antihipertensivos debido a la ingesta de concentrados de proteína de lenteja, garbanzo y judía.

El síndrome metabólico es uno de los problemas con mayor impacto en la sociedad. Se ha demostrado que la fibra de guisante incrementa el periodo de saciedad y que la ingesta de fibra soluble de legumbres durante 14 días reduce el apetito y la presencia de marcadores pro-inflamatorios (Morel y col., 2015). Además, el consumo de garbanzo provoca un aumento de la colecistoquinina, hormona intestinal que regula la sensación de apetito (Lunde y col., 2011). Otro estudio realizado por Papanikolaou y Fulgoni (2008) en 8.000 adultos con sobrepeso, confirmó que el consumo de judías disminuía la ingesta calórica y provocaba un descenso en la predisposición a padecer obesidad. También se han realizado estudios caso-control frente al cáncer colorrectal y el consumo de legumbres, sugiriendo un consumo mínimo de 100 gramos semanales como preventivo de este tipo de enfermedad (Aune y col., 2009).

Tabla 2. Composición nutricional de macronutrientes y micronutrientes de legumbres secas por 100 g de porción comestible (Moreiras y col., 2013)

COMPUESTOS	**Alubias** (*Phaseolus vulgaris*)	**Garbanzos** (*Cicer arietinum*)	**Lentejas** (*Lens culinaris*)	**Guisantes** (*Pisum sativum*)	**Soja** (*Glycine max*)
Energía (Kcal)	349	373	351	365	406
Proteínas (g)	19	19,4	23,8	21,6	35,9
Carbohidratos (g)	52,5	55	54	56	15,8
Grasas (g)	1,4	5	1,8	2,3	18,6
Minerales					
Calcio (mg)	128	145	56	72	240
Hierro (mg)	6,7	6,7	7,1	5,3	9,7
Magnesio (mg)	160	160	78	123	250
Zinc (mg)	4	0,8	3,1	3,5	4,3
Sodio (mg)	43	26	12	38	5
Potasio (mg)	1160	797	737	990	1730
Fósforo (mg)	400	375	240	300	660
Vitaminas					
Vitamina A (mg)	42	3,5	10	42	2
Vitamina B_1 (mg)	0,5	0,4	0,5	0,7	0,61
Vitamina B_2 (mg)	0,15	0,15	0,2	0,2	0,21
Eq. de Niacina (mg)	5,9	4,3	5,6	5,2	7,7
Vitamina B_6 (mg)	0,56	0,53	0,6	0,13	0,38
Folatos (µg)	---	180	35	33	370

1.2. Género *Erythrina*

El género *Erythrina* pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilinoideae. Su nombre proviene del griego "erythros" que significa rojo haciendo referencia al intenso color de las flores. Con una distribución tropical y subtropical, son árboles grandes o pequeños, ramas robustas, hojas alternas y pecioladas e inflorescencias de colores rojos o anaranjados. Su fruto es una leguminosa, vainas alargadas con semillas en su interior (Escamillo, 2012). El género tiene más de 100 especies (Escamillo, 2012). En la Tabla 3 se encuentran descritas las especies más estudiadas: *E. fusca*, *E. crista-galli*, *E. ulei*, *E. poeppigiana*, *E. edulis* y *E. variegata*.

Las especies del género *Erythrina* son una fuente importante de proteínas (25-30 g/100 g), carbohidratos (13-15 g/100 g) y fibra soluble (7 g/100 g). Por otro lado, son alimentos con un contenido en grasa muy bajo, alrededor de 0,6 g/100 g (Velásquez y col., 2019).

El género *Erythrina* se ha estudiado para alimentación animal y humana. En alimentación humana, la única especie comestible es *E. edulis*. En alimentación animal se han usado las hojas y las semillas. Existen estudios donde se utilizan las semillas de *E. poeppigiana* para la alimentación de vacas sin provocar ninguna variación en la composición de la leche (Jiménez y col., 2015). Las hojas de *E. variegata* se han empleado para inducir el crecimiento en cabras y ovejas y como sustituto de la soja en la alimentación de pequeños rumiantes debido a su buena digestibilidad (Best y col., 2017). Mamani (2014) y Sánchez (2018), usaron la harina de sus hojas para la alimentación de gallinas y conejos. En el primer caso, se evaluaron piensos con un 3% y 5% de harina para establecer como influía esta suplementación en la calidad de los huevos, comprobando que ambas harinas aumentaban la producción de huevo en un 80%, con un peso medio de 68 g y una yema de color más intenso. En el segundo caso, en los conejos se consiguió una ganancia de peso en un menor tiempo, alrededor de 29 g al día, posiblemente debido al alto contenido en fibra.

El género *Erythrina* también ha sido investigado como planta medicinal, pues es una fuente importante de metabolitos secundarios. Los países que se caracterizan por su uso con fines curativos son: Perú, India, Indonesia, Argentina, Tanzania o Senegal (Pino-Rodríguez y col., 2003). Se pueden distinguir las especies *E. variegata*, *E. crista-galli*, *E. poeppigiana* y *E. fusta* como las más estudiadas científicamente. En la última década, se han publicado más de 111 artículos siendo el área de farmacología la que más estudios científicos se han realizado (Velásquez y col., 2019).

Tabla 3. Descripción de las especies más estudiadas del género *Erythrina* (Araujo, 2005)

Especies	Imagen	Descripción botánica	Hábitat	Propagación	Usos
E. fusca		Árbol de 15-20 m de altura, hojas pinnadas trifoliadas, inflorescencias amarillas anaranjadas. Frutos y semillas contenidas en una vaina	En las partes inundables de la amazonia peruana, climas húmedos a Tª 26-30ºC	Florece de julio a agosto y fructifica desde agosto. Se propagan por semillas	Planta ornamental por sus vistosas flores y frondoso follaje
E. crista-galli		Árbol de 5-15 m de altura, hojas pinnadas trifoliadas con follaje durante todo el año. Flores color rojo carmín	Cultivada en Perú a nivel del mar y región andina entre los 1.500-2.000 m	Florece y fructifica durante todo el año. Se propaga por semillas	Planta ornamental en parques por sus vistosas inflorescencias
E. ulei		Árbol grande de 20-25 m de altura, hojas pinnadas trifoliadas. Flores rojizas. Frutos y semillas contenidas en vaina	Ubicada en el amazonas, Cuzco y Huánuco desde el nivel de mar hasta los 500 m	Florece en mayo y fructifica en julio. Se propaga por semillas	Planta ornamental, y para sistemas agroforestales por la capacidad de fijar nitrógeno
E. poeppigiana		Árbol de 25-30 m de altura, hojas grandes pinnadas trifoliadas. Flores anaranjadas. Frutos y semillas contenidas en vaina	Ubicada en el amazonas. Crece en bosques ribereños desde el nivel del mar hasta los 1.400 m	Florece en julio y fructifica en agosto. Disemina en octubre por semillas	Planta para sistemas agroforestales en Centro América y Caribe y para dar sombra en cafetales
E. edulis		Árbol mediano de 10-15 m de altura. Hojas pinnadas trifoliadas. Flores rojas anaranjadas. Frutos y semillas contenidas en vaina	En áreas montañosas entre los 1.200-3.000 m, cercano a ríos y ambientes húmedos. Tª 16-22ºC	Florece en mayo y fructifica en julio hasta diciembre. Germina por semillas	Sus semillas sirven para alimentación por ser fuente de proteínas y carbohidratos
E. variegata		Árbol de 8-10 m de altura. Hojas romboidales con inflorescencias de color rojo anaranjado. Frutos y semillas contenidas en vaina	En zonas con clima tropical entre los 800-1.200 m. Tª 20-32ºC	Florece de mayo a agosto. Se propaga por semillas	Plantas ornamentales y con usos medicinales

Las partes de la planta más utilizadas son la corteza y las hojas, seguidas de raíces, semillas y flores. Se han asociado con múltiples actividades biológicas como actividad antimicrobiana, antioxidante, citotóxica o antiviral (Velásquez y col., 2019). Esto es debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que contienen, como alcaloides, alcanos, flavonoides, esteroides, coumarinas, fenoles y taninos. En la Tabla 4 se representa la frecuencia de los principales metabolitos secundarios en los distintos órganos.

Tabla 4. Frecuencia de presentación de los principales metabolitos secundarios en distintos órganos de especies de *Erythrina* (Pino-Rodríguez y col., 2003)

Frecuencia de presentación (%)					
Familia química	**Semillas**	**Corteza**	**Flores**	**Raíz**	**Hojas**
Flavonoides	---	70	42	96	27
Alcaloides	76	26	43	---	64
Alcano	---	5	---	---	---
Esteroides	1	15	6	---	---
Coumarina	---	1	---	8	---
Fenoles	---	6	2	---	---
Taninos	---	---	---	---	1

En la Tabla S1 se muestran las especies del género *Erythrina* y las diferentes bioactividades que poseen. Así, las plantas de la especie *E. variegata* contienen fenoles en hojas y corteza, con actividad antimicrobiana frente a la inactivación de *Streptococcus pyogenes* (Sudiono y col., 2013). También *E. crista-galli* y *E. fusca* han demostrado esta bioactividad frente a patógenos como *Bacillus subtilus*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* asociados a enfermedades periodontales o de la piel (Sarwat y Ahmad, 2012). En el caso de los extractos de *E. velutina* procedentes de la corteza, se ha observado una potente actividad inhibitoria frente a *Streptococcus pyogenes* (Santos y col., 2012).

En el caso de la actividad antioxidante, se ha estudiado la capacidad de los extractos de la corteza enriquecidos en fenoles y flavonoides de *E. variegata* para eliminar radicales libres *in vitro* (Santhiya y col, 2016). Por otro lado, el extracto etanólico de las hojas de *E. crista-galli* ha demostrado respuesta frente a radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), debido a la concentración de compuestos como flavonoides, fenoles y vitamina C (Maisuthisakul y col., 2008). Se han identificado otras actividades como la anticancerígena para el tratamiento de cáncer de mama, cuello uterino y cáncer cervical, asociándose a las concentraciones de flavonoides que se encuentran en las flores de estas especies. En

particular, se ha trabajado con extractos crudos de *E. variegata* frente a líneas celulares de cáncer de mama que presentaron una actividad citotóxica (Herlina y col., 2017). En *E. fusca* se ha estudiado la actividad de la faseolidina (pterocarpano) para tratar líneas celulares de cáncer cervical, dilucidando los mecanismos de acción y su efecto farmacológico (Sudiono y col., 2013).

En extractos obtenidos de la flor de *E. fusca* se ha observado actividad antitusiva, en los extractos de isoflavonas de la hoja de *E. poeppigiana* actividad estrogénica y en los extractos de raíz y corteza de *E. variegata* actividad anticonvulsiva, además de un efecto antiviral producido por apigenina-7-O-β-D-glucopiranósido, un compuesto obtenido de su hoja (Wardani y col., 2018).

Debido a los múltiples estudios de investigación llevados a cabo, se han obtenido resultados innovadores que han sido objeto de diferentes patentes (Tabla 5). Cabe destacar las patentes asociadas a la regulación del apetito, la inhibición de glioxalasa I, clave en la homeostasis celular, los antagonistas de los receptores de hidrocarburo de arilo, los reductores de la absorción de grasa de sodio, los promotores de la secreción salival y del sueño y los reguladores del sistema nervioso (Velásquez y col., 2019).

Como se puede observar en la Figura 3, actualmente los estudios realizados en *E. variegata* han dado lugar a 14 patentes, los de *E. crista-galli* a 4 patentes, *E. poeppigiana* a 3 patentes y por último, *E. edulis* y *E. ulei* con solo una patente.

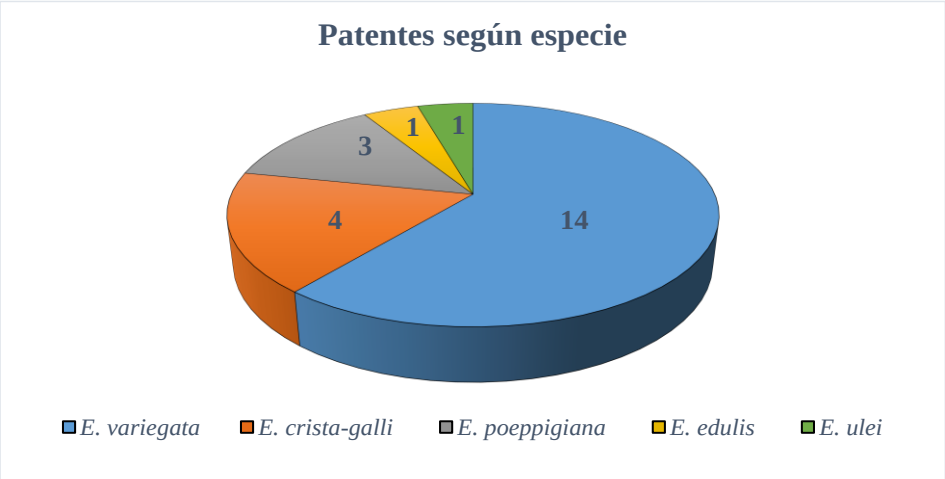


Figura 3. Representación del número de patentes asociadas a las distintas especies del género *Erythrina*

Tabla 5. Descripción de las patentes asociadas a las distintas especies del género *Erythrina*

Especie	Título	Resultados	Número publicación	Autores	Año
E. variegata	Inhibidor de la absorción de grasa	Inhibidor de absorción de grasa aislado de la semilla. Previene y mejora la obesidad y hipertrigliceridemia	JP2011173905	Innan Ake; Imada Keisuke (Taisho Pharmaceutical Co Ltd)	2011
	Agente inductor del sueño y composición medicinal y alimentos que lo contienen	La hipoforina aislada de la hojas como agente inductor del sueño no REM	JP2008024649A	Osaki Ayumi, Honda Kazuki	2008
E. crista-galli	Método de reproducción de conservación de la especie *Tetranychus cinnabrinus*	Uso de las hojas y tallos secos como abono para mejorar el crecimiento de la especie *Tetranychus cinnabrinus*	CN107466972A	Zou Zhiwen, Xia Bin, Xin Tianrong, Wang Jing	2017
E. poeppigiana	Inhibidor de la actividad de la glioxalasa I y su uso	Flavonoide con actividad antitumoral que inhibe la glioxalasa I	JP2015081251 JP2016204320A	Kaneda Norio; Tanaka Hitoshi; Asao Naoki (Meijo University)	2016
E. edulis	Antagonista del receptor de hidrocarburo de arilo	Compuesto que previene la expresión génica inducida por rayos UV. Previene contra el cáncer de piel	US20090208432A1	Herrmann, Martina Vielheber, Gabriele Krutmann, Jean Joppe, Holger	2009
E. ulei					

1.2.1. *Erythrina edulis* (Pajuro andino)

El pajuro es una leguminosa fabácea perteneciente al género *Erythrina*, siendo la única especie cultivada comestible. Se conoce también como chachafruto, sacha poroto, pisonay o balú. Es originario de los Andes tropicales peruanos, cultivado por los incas desde antes de la llegada de los europeos. Se encuentra en países como Venezuela, Perú, Bolivia, Argentina, Ecuador o Colombia. Se cultiva a altitudes de 1.200 y 2.500 metros en la cordillera de los Andes.

Es un árbol con ramas espinosas que alcanza una altura de 14 metros con un tallo de un diámetro de 37 cm. Las hojas son alternas con peciolos largos y espinas y las flores de color rojo carmín como se puede observar en la Figura 4A, con un tamaño de 2,8 por 1,2 cm dispuestas en racimos. De todas estas flores, sólo unas 14 se convierten en legumbres maduras (Solano, 2017). El fruto es una vaina de color verde de consistencia leñosa con un tamaño entre 8 y 30 cm de largo, en cuyo interior se encuentran las semillas (Figura 4A y 4B). Las semillas tienen un tamaño de 2 a 7 cm de largo, de forma ovoide, recubiertas por una cáscara gruesa, de color marrón claro en su estado inmaduro y fresco, y de color marrón brillante una vez maduras (Figura 4B).

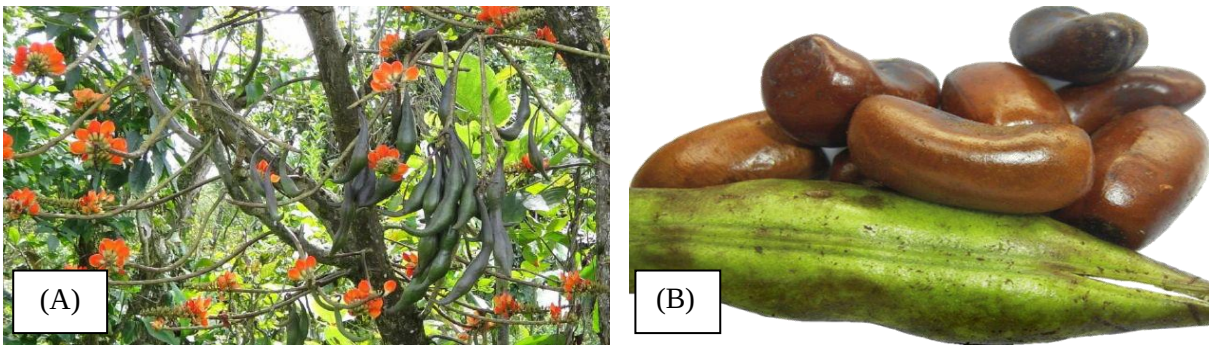


Figura 4. Fotografías de (A) árbol de pajuro y (B) vaina y semilla

El pajuro es una planta capaz de controlar la erosión del suelo, ya que se adhiere a lugares áridos pudiendo soportar largos periodos de sequía. Uno de los mayores beneficios asociados a esta planta es su capacidad de fijación del nitrógeno en el suelo debido a la presencia en sus raíces de la bacteria *Rhizobium*, aprovechando el nitrógeno del aire y enriqueciendo el suelo donde crece. Dentro de todas las variedades de origen vegetal, el pajuro es una de las especies más versátiles de su género, con un amplio espectro de usos y cuya función principal está relacionada con la alimentación humana y animal y la seguridad alimentaria (Velásquez y col., 2019).

La composición nutricional del pajuro y la comparativa con la de otras leguminosas se muestra en la Tabla 6. El macronutriente mayoritario en el pajuro son los carbohidratos, con un porcentaje del 31,5%, superior al presente en la soja (15,8%). El contenido en fibra del pajuro es de 7,5%, inferior al presente en otras leguminosas. El contenido en proteínas varía entre el 18 y el 21%, siendo similar al encontrado en alubias, garbanzos y guisantes. En cuanto al contenido de lípidos, alubias, garbanzos, guisantes y pajuro presentan una cantidad bastante pequeña comparada con la soja que contiene un 18,6%.

Respecto a las vitaminas y minerales, el mineral que se encuentra en mayor concentración es el fósforo con 78 mg/100 g, pero es una cantidad bastante inferior a la que albergan la soja (660 mg/100 g) y la alubia (400 mg/100 g). El segundo mineral más abundante en el pajuro es el potasio con una concentración de 57,3 mg/100 g, al igual que en alubias, garbanzos, guisantes y soja. En el caso de vitaminas, comparado con las otras leguminosas, el pajuro tiene una concentración bastante elevada de vitamina C (42 mg/100 g). Sin embargo, el pajuro no contiene folatos, a diferencia de la soja, los garbanzos y los guisantes, en los que el contenido es bastante destacable.

El pajuro también es una fuente importante de aminoácidos. Como toda legumbre, es deficiente en metionina y triptófano, pero para lograr que sea un alimento completo en aminoácidos se puede consumir junto con otros cereales ricos en estos aminoácidos como el arroz, el maíz o la semilla de sésamo (Tingal, 2019). En la Tabla 7 se muestra el contenido de aminoácidos en comparación con otras legumbres. El contenido en aminoácidos de pajuro estaba expresado en el trabajo de Tingal (2019) en g AA/16 g N, pero para realizar la Tabla se ha hecho la conversión a g/100 g de semilla seca para facilitar la comparación con las otras legumbres. Dentro de los aminoácidos no esenciales, los que se encuentran en mayores cantidades en las semillas de pajuro son el ácido glutámico y el ácido aspártico con concentraciones de 3,48 y 3,89 g/100 g, respectivamente, 4,06 y 3,02 g/100 g en las alubias, 3,95 y 2,52 g/100 g en garbanzos, 2,29 y 4,69 g/100 g en guisantes y 7,13 y 4,56 g/100 g en soja, respectivamente. Entre los aminoácidos esenciales, se observa que el pajuro, la alubia y el garbanzo tienen prácticamente la misma concentración en lisina y fenilalanina. Los aminoácidos esenciales que se encuentran en mayor concentración en el pajuro son la leucina (1,64 g/100 g), lisina (1,38 g/100 g) y la treonina (1,17 g/100 g).

Tabla 6. Composición nutricional de las semillas secas y crudas de pajuro, alubias, garbanzo, guisantes y soja en 100 g. Tomado de la Fundación Universitaria Iberoamericana (FUNIBER), (2020) y de Moreira y col., (2013).

COMPUESTOS	**Pajuro** *(Erythrina edulis)*	**Alubias** (*Phaseolus vulgaris*)	**Garbanzos** (*Cicer arietinum*)	**Guisantes** (*Pisum sativum*)	**Soja** (*Glycine max*)
Energía (kcal)	120	340	373	365	406
Proteínas (g)	18-21	19,0	19,4	21,6	35,9
Carbohidratos (g)	31,5	52,5	55	56	15,8
Grasa Total (g)	0,6	1,4	5	2,3	18,6
Fibra (g)	7,5	19,0	13,6	16,7	15,7
Calcio (mg)	25	115	145	72	240
Hierro (mg)	1,2	8,5	6,7	5,3	9,7
Potasio (mg)	57,3	1160	797	990	1730
Fósforo (mg)	78	400	375	300	660
Vitamina A (mg)	---	42	3,5	42	2
Vitamina C (mg)	42	4	4,3	2	Trazas
Folatos (µg)	---	---	185	33	370

Tabla 7. Contenido total del perfil de aminoácidos de las semillas secas de pajuro, alubia, garbanzo, guisante y soja (Tingal, 2019).

Aminoácido (g/100 g)	**Pajuro** *(Erythrina edulis)*	**Alubia** (*Phaseolus vulgaris*)	**Garbanzo** (*Cicer arietinum*)	**Guisante** (*Pisum sativum*)	**Soja** (*Glycine max*)
Esenciales					
Lisina	1,38	1,56	1,51	1,85	2,56
Treonina	1,17	1,06	0,81	0,98	1,56
Metionina	0,26	0,22	0,29	0,25	0,55
Triptófano	0,13	0,28	0,22	0,23	0,53
Fenilalanina	1	1,21	1,29	1,24	2,01
Valina	1,11	1,15	0,96	1,23	1,87
Leucina	1,64	1,77	1,66	1,87	2,97
No esenciales					
Histidina	1,17	0,70	0,62	0,63	1,05
Alanina	1,55	1,17	0,99	1,16	1,72
Glicina	1,08	1,08	0,86	1,15	1,71
Ácido Glutámico	3,48	4,06	3,95	2,29	7,13
Arginina	1,11	1,15	0,96	1,23	1,87
Ácido Aspártico	3,89	3,02	2,52	4,69	4,56

Por consiguiente, debido al alto contenido de proteínas aportando más del 20% del valor energético del alimento, y por su bajo contenido en grasa siendo menor del 3%, el pajuro ha podido presentar alegaciones nutricionales que se encuentran en el anexo del Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Actualmente, el pajuro es considerado un alimento funcional por sus propiedades medicinales con actividades diuréticas, hipoglucemiantes y preventivas de la osteoporosis, empleando principalmente los extractos de hojas, flores o semillas (Intiquilla y col., 2016), y como ya se ha mencionado está siendo objeto de muchos estudios debido a su importancia en medicina y en farmacología.

1.3. Péptidos bioactivos

Además de su valor nutricional como fuente de energía y aminoácidos, las proteínas pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos, por sí mismas o como fuente de péptidos bioactivos. Estos péptidos son secuencias de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos que se encuentran inactivos dentro de la proteína nativa de la que proceden, y que, tras sufrir un proceso de hidrólisis enzimática, digestión gastrointestinal o fermentación microbiana, se

liberan, pudiendo ejercer efectos a nivel intestinal o ser absorbidos por los enterocitos, alcanzando el torrente sanguíneo y los órganos diana donde ejercen una acción sistémica (Vizcardo y Zavala, 2016). La actividad de un péptido va a depender de su estructura química, hidrofobicidad y de la composición y posición de los aminoácidos que lo forman.

Los péptidos bioactivos pueden tener múltiples actividades beneficiosas en nuestro organismo como se muestra en la Figura 5.

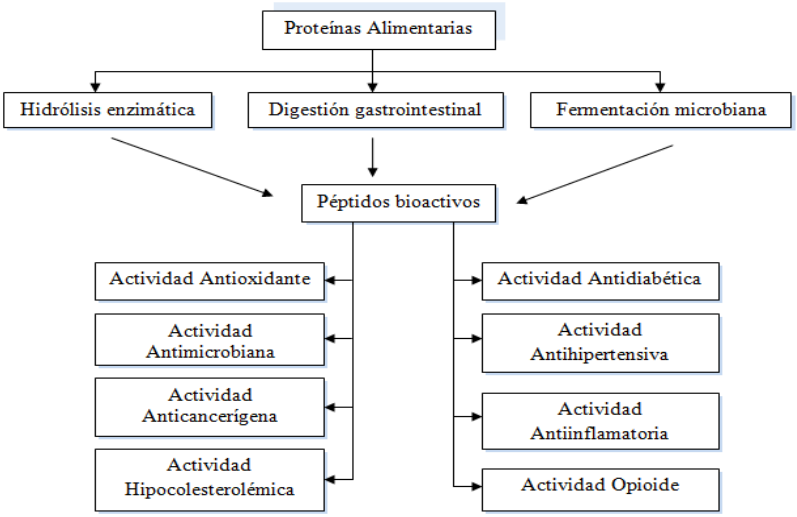


Figura 5. Representación de la producción de péptidos bioactivos y sus actividades

Los péptidos antioxidantes son secuencias peptídicas capaces de participar en la inhibición de reacciones de oxidación en las que están involucradas radicales libres, evitando un estado de estrés oxidativo. Se ha demostrado que aminoácidos azufrados, metionina, lisina, tirosina o triptófano tienen por sí mismos actividad antioxidante, pudiendo, además, contribuir en la actividad de los péptidos que contengan estos aminoácidos (Sánchez y Vázquez, 2017). Los primeros péptidos fueron identificados en proteínas animales, en los últimos años, los estudios se han enfocado en la búsqueda y caracterización de péptidos bioactivos procedentes de fuentes vegetales. Las proteínas de origen vegetal son una buena alternativa para la obtención de hidrolizados proteínicos o péptidos debido a su mayor disponibilidad y menor costo, como es el caso de la soja, trigo, arroz y maíz.

Actualmente, en el mercado ya existe una diversidad de productos a los cuales se le han incorporado péptidos bioactivos. Suponen una alternativa natural a los tratamientos farmacológicos en la prevención y/o tratamiento de distintas enfermedades crónicas, evitando o minimizando así las dosis de dichos tratamientos y en consecuencia, sus efectos secundarios.

1.4. Estrategias para la liberación de péptidos bioactivos

Existen tres tipos de estrategias para la liberación de los péptidos a partir de su proteína nativa, hidrólisis enzimática, fermentación y digestión gastrointestinal, centrando la atención en esta última.

Cuando los alimentos son ingeridos sufren la digestión gastrointestinal que engloba un conjunto de reacciones por las cuales se produce la degradación de los alimentos y su transformación en moléculas de menor tamaño, siendo un proceso esencial para los seres vivos. Se inicia en la boca donde por fuerzas mecánicas el alimento es triturado y parcialmente degradado por las enzimas de la saliva, siendo la enzima amilasa responsable de catalizar la hidrólisis del almidón en azúcares. El bolo salival es conducido al estómago donde se liberan los jugos gástricos que contienen pepsina, la primera enzima responsable de degradar las proteínas del alimento. Con ayuda de las contracciones musculares del estómago, el bolo salival es triturado y mezclado con los jugos gástricos en un medio ácido, dando lugar a la formación de polipéptidos, oligopéptidos y algunos aminoácidos. Todo el bolo, denominado ahora quimo, es conducido al intestino delgado, donde se incorporan los jugos pancreáticos y las sales biliares procedentes del páncreas e hígado. Allí, la acidez del estómago es neutralizada y se inicia la actividad de otras enzimas presentes en el jugo pancreático, como la tripsina y la quimotripsina (Segura-Campos y col., 2010). Algunos fragmentos que han sido parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y alcanzar intactos la circulación sanguínea y los órganos diana donde ejercen sus propiedades bioactivas.

Por tanto, durante el proceso de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales como pepsina y tripsina del estómago y las endopeptidasas pancreáticas del lumen intestinal liberan péptidos a partir de su proteína de origen donde se encontraban inactivos. Por otro lado, los péptidos bioactivos pueden ser degradados durante el proceso de digestión gastrointestinal liberándose péptidos de menor tamaño y con escasa o nula actividad.

1.5. Estudios *in silico*

Los estudios *in silico* permiten la simulación, modelado y visualización de distintos procesos biológicos por medio de un programa informático. De esta manera se pueden realizar simulaciones, con la máxima precisión, de un proceso biológico real en un entorno virtual.

En el campo de los péptidos bioactivos los estudios *in silico* son una eficaz herramienta para realizar un análisis previo sin que sea necesaria la experimentación animal. Se pueden utilizar para la obtención de péptidos bioactivos a partir de una proteína de interés, optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática e identificar los péptidos generados, así como sus posibles actividades biológicas descritas por otros autores. También, para simular la digestión gastrointestinal escogiendo el péptido y la enzima precursora para obtener, seguidamente las secuencias peptídicas teóricas liberadas durante dicho proceso digestivo.

Actualmente, existen varios programas bioinformáticos para el desarrollo *in silico* como PeptideCutter, desarrollado por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), que ofrece la posibilidad de simular la digestión gastrointestinal determinando parámetros químicos, enzimáticos o mixtos. En la misma línea, Entrez, portal donde se encuentran todas las bases de datos biomédicas proporcionadas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), ofrece información sobre la secuenciación de proteínas y el estudio de dominios de proteínas funcionales y sitios activos. La misión de la base de datos Universal Protein Resource (Uniprot) es proporcionar a la comunidad científica un recurso integral y de libre acceso a secuencias de proteínas e información funcional. Del mismo modo, BIOPEP-UWM (Minikiewicz y col., 2019), permite desde la simulación de digestiones hasta la determinación de las secuencias proteicas y peptídicas junto con su bioactividad.

En cuanto a la simulación del potencial tóxico, ToxinPred (Gupta y col., 2013), permite utilizar diferentes métodos predictivos mediante dos bases de datos registradas en UniProt, creado por el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), el SIB y el Recurso de Información de Proteínas (PIR) (The UniProt Consortium, 2018). Por otro lado, PeptideRanker, es la base de datos donde se encuentra información del potencial de los péptidos para ser activos y conocer su bioactividad teórica. En consecuencia, el uso de este tipo de bases de datos ha supuesto una gran ventaja por permitir la realización de análisis previos de una manera rápida, sencilla y de bajo costo, frente los métodos más tradicionales.

1.6. Péptidos bioactivos procedentes de proteínas de leguminosas

A partir de legumbres como las semillas de soja, garbanzos, guisantes o alubias se han aislado péptidos vegetales con actividad antihipertensiva, anticolesterolémica, antiobesidad, antioxidante o anticancerígena. En la Tabla 8 se muestran ejemplos de estas semillas y sus diferentes actividades biológicas. En guisantes, mediante hidrólisis de las proteínas con termolisina o alcalasa se han identificado péptidos con actividad antioxidante e inhibidora de

la ECA. La hidrólisis del aislado proteico con termolisina produjo el dipéptido IR, antioxidante muy potente comparado con el glutatión en los ensayos *in vitro*. En un hidrolizado de proteína de guisante con Alcalasa® se identificaron tres péptidos, IR, KF y EF, que mostraron actividad inhibitoria de la ECA (Pownall y col., 2011). Las alubias, lentejas y garbanzos también destacan por tener capacidad antioxidante e inhibidora de ECA. En aislados proteicos de alubia hidrolizados con alcalasa, Rui y col. (2013) y Mojica y col. (2014) identificaron tres péptidos PVNNPQIH, YAGGS y YAAGS, todos ellos con actividad inhibitoria de la ECA, con un IC_{50} alrededor de 206,7 ± 3,9 μM. Lammi y col., (2019), a partir de un aislado proteico de lenteja digerido por la enzima savinase detectaron los péptidos antioxidantes: LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPILRYL y TLEPNSVFLPVLLH.

En el garbanzo se han hallado péptidos inhibidores de ECA como ALEPDHR y SAEHGSLH a partir de aislado de proteínas con pepsina y pancreatina y el péptido YZDCM con actividad antimicrobiana, protegiendo las semillas contra patógenos microbianos (Yili y col., 2012).

Por otro lado, péptidos de la soja como la lunasina junto con el inhibidor de proteasa Bowman Birk (BBI), pueden internalizarse en la célula y localizarse en el núcleo después de la digestión y tener un efecto anticancerígeno (Park y col. 2007). Además tras la ingesta oral, la lunasina forma péptidos más pequeños, que contribuyen al efecto quimiopreventivo y antiinflamatorio de la lunasina (Indiano-Romacho y col., 2019). Destaca también como fuente de péptidos con actividad antihipertensiva la β-conglicinina de la soja y los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis con proteasa, LD3, que presentaron actividad hipocolesterolémica.

1.7. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos en leguminosas

La digestión gastrointestinal *in vitro* es una herramienta muy útil para poder evaluar la estabilidad y viabilidad de los péptidos bioactivos. Se puede determinar la biodisponibilidad de los péptidos e incluso determinar si la actuación de la barrera epitelial intestinal no reduce, sino que incrementa dicha actividad biológica.

La biodisponibilidad de los péptidos depende de la actividad enzimática de las diferentes zonas del tracto gastrointestinal. Como ya se ha mencionado, la primera barrera que se encuentran los péptidos bioactivos es el lumen del intestino delgado y la segunda barrera son las proteasas del borde cepillo de las células intestinales, las cuales tienen una alta especificidad pudiendo degradar los péptidos.

Tabla 8. Péptidos bioactivos procedentes de leguminosas

Leguminosa	Proteína precursora	Enzimas hidrolíticas	Péptido responsable	Actividad biológica	Referencia
Alubias *(Phaseolus vulgaris)*	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	GLTSK, LSGNK, GEGSGA, MPACGSS y MTEEY	Anticancerígena	Luna-Vital y col., 2014
	Aislado proteico	Alcalasa y papaína	PVNNPQIH	Inhibidor ECA	Rui y col., 2013
	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	YAGGS y YAAGS	Inhibidor ECA	Mojica y col., 2014
Frijol alado (*Psophorcarpus tetragonolobus* L.)	Aislado proteico	Alcalasa	YPNQKV y FDIRA	Inhibidor ECA	Yea y col., 2014
Garbanzo *(Cicer arietinum)*	Hidrolizado de albúmina	Alcalasa	RQSHFANAQP	Antioxidante y Antiproliferativo	Xue y col., 2015
	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	ALEPDHR, SAEHGSLH	Antioxidante	Torres-Fuentes y col., 2015
	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	YZDCM	Antimicrobianos	Yili y col., 2012
Guisante *(Pisum sativum)*	Aislado proteico	Termolisina	Fracción <3kDa	Antioxidante	Pownall y col., 2011
	Aislado proteico	Termolisina	Dipéptido (Ile-Arg)	Inhibidor de renina y endotelina	Udenigwe y Mohan, 2014
	Aislado proteico	Alcalasa	IR, KF y EF	Inhibidor ECA	Li y Aluko, 2010
	Aislado proteico	Termolisina	LTFPG, IFENLQN y FEGTVFENG	Inhibidor ECA	Pownall y col., 2010
Lenteja *(Lens culinaris)*	Globulinas	Pepsina y pancreatina	KLRT, TLHGMV, VNRLM	Inhibidor ECA	Jakubczyk y Baraniak, 2013
	Aislado proteico	Savinase	LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPILRYL y TLEPNSVFLPVLLH	Antioxidante e inhibidor ECA	Lammi y col., 2019
Soja *(Glycine max)*	Aislado proteico	Pepsina y papaína	β-conglicinina	Antihipertensivo	Margatan y col., 2013
	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	Inhibidor de Bowman Birk y Lunasina	Anticancerígeno	Park y col., 2007
	Aislado proteico	Proteasa	(SCP)-LD3	Hipocolesterolémico	Inoue y col., 2011

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de los estudios de biodisponibilidad llevados a cabo con péptidos de diferentes leguminosas. Amigo-Benavent y col. (2014), realizaron un ensayo de biodisponibilidad a partir de la β-conglicinina glicosilada/deglicosilada de la soja. Durante la digestión *in vitro* se liberan péptidos biodisponibles y con actividad antioxidante. Del mismo modo, se han realizado investigaciones con péptidos procedentes de concentrados proteicos de la soja y del péptido lunasina, para el cual se ha estudiado además la capacidad inhibitoria de la proliferación de células de cáncer de colon ejercida por los digeridos (Fernández-Tomé y col., 2018).

También se han realizado estudios de biodisponibilidad en garbanzo. A partir de un aislado proteico se ha determinado que la digestión *in vitro* libera péptidos con actividad inmunomodulante aumentando la proliferación de las células THP-1. Por otro lado, destacan diferentes variedades de judías como la judía pinta o la variedad Controne. En el estudio de la judía pinta se usó el extracto proteico sometido a una digestión *in vitro*, donde se obtuvieron resultados favorables ya que se incrementó la actividad inhibitoria de la ECA tras la digestión (Gül Akıllıoglu y Karakaya, 2009). En el estudio de biodisponibilidad del extracto proteico de la variedad Controne, empleando células Caco-2 diferenciadas, se observó una reducción de la permeabilidad de la monocapa celular (Schisano y col., 2019).

En guisantes, se realizaron dos estudios con aislados proteicos. En el primero, se evaluó la actividad de los péptidos formados tras la digestión *in vitro* con pepsina y pancreatina, observándose un incremento en la actividad inhibitoria de la ECA (Vermeirssen y col., 2003), mientras que en el segundo se realizó un ensayo para comprobar la biodisponibilidad de los péptidos con células Caco-2 donde se observó que existía transporte intestinal *in vivo*, lo que favorecería el potencial efecto antihipertensivo *in vivo* (Vermeirssen y col., 2009).

Tabla 9. Estudios de biodisponibilidad de hidrolizados proteicos y péptidos procedentes de diferentes especies de leguminosas

Fuente vegetal	Sustrato estudio	Estudio simulación digestión	Ensayo biodisponibilidad	Resultados	Referencia
Altramuz	Péptido YDFYPSSTKDQQS	---	Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Absorción del péptido a través de la monocapa de células	Lammi y col., 2018
Garbanzo	Aislado proteico	Pepsina (E/S=1/20, 72 min) + pancreatina (E/S=1/20, 108 min)	Co-cultivo Caco-2 + THP-1	* Incremento del crecimiento de THP-1 (potencial efecto inmunomodulante)	Girón-Calle y col., 2010
Guisante	Aislado proteico	Pepsina + pancreatina (E/S=1:250, 2h)	---	* Incremento de la actividad inhibitoria ECA tras la digestión *in vitro*	Vermeirssen y col., 2003
	Aislado proteico	Pepsina (2 h) + pancreatina (2 h)	Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Absorción de los péptidos a través de la monocapa celular	Vermeirssen y col., 2009
Judía Caupí	Péptido MELNAVSVVHS	Pepsina + pancreatina (E/S =1:1000, 2 h)	Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Absorción del péptido a través de la barrera de monocapa de células	Rodrigues-Marques y col., 2018
Judías variedad "Controne"	Extracto proteico	---	Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Reducción de la permeabilidad de la monocapa de células	Schisano y col., 2019
Judías, judías pintas, lentejas	Extracto proteico sometido a tratamiento térmico (121°C-15, 30, 50 min)	Pepsina (2 h) + pancreatina-sales biliares (2 h)	---	* Incremento de la actividad IECA tras la digestión *in vitro*	Gül Akıllıoglu y Karakaya, 2009
Soja	β-conglicinina glicosilada/deglicosilada	Pepsina (E/S=1/50, 1 h) + pancreatina-sales biliares (E/S=1/40, 2 h)	Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Liberación de péptidos antioxidantes durante la digestión * Mayor efecto de los péptidos liberados de la proteína glicosilada * Péptidos liberados biodisponibles	Amigo-Benavent y col., 2013
	Péptidos procedente de proteínas de soja germinada	Pepsina (2 h) + pancreatina (2 h)	Caco-2 + HT-29 + HCT-116	* Péptidos liberados de la digestión inhibieron la proliferación de las células de colon humano	González-Montoya y col., 2018
	Lunasina	Pepsina + pancreatina (relación lunasina: IBB1 de 1:2, w:w)	HT-29 + Caco-2 diferenciadas (21 días)	* Absorción de los péptidos a través de la monocapa de células * Péptidos liberados biodisponibles con actividad protectora frente al cáncer gástrico y colorrectal	Fernández-Tomé y col., 2018

1.8. Avances en la investigación de péptidos bioactivos en pajuro

Actualmente, hay un evidente interés por profundizar en la investigación de los péptidos bioactivos del pajuro. En los últimos años, se ha demostrado que los péptidos de pajuro muestran actividades preventivas diuréticas, hipotónicas y contra la osteoporosis (Banan-Mwine y col., 2017) pero también otras actividades biológicas como actividad antioxidante, antidiabética e inhibidora de la ECA.

La actividad antioxidante se puede llevar a cabo a través de diferentes métodos como la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), neutralizando radicales peroxilo. También existen otros métodos de transferencia de electrones como el ensayo TEAC que se basa en la inhibición de la absorción del catión radical de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). Intiquilla y col. (2016), a partir de un concentrado de proteínas investigó la obtención de péptidos antioxidantes mediante hidrolisis con Alcalasa®, Neutrasa® y Flavourzyma® presentando dichos hidrolizados actividad antioxidante. Se encontraron valores de ORAC y TEAC de 2,51 y 0,91 μmol equivalentes de Trolox/mg de proteína, respectivamente, y que la fracción inferior a 3 kDa, rica en aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos era la principal responsable de dicha actividad. Posteriormente, en 17 péptidos procedentes del pajuro se confirmó no sólo su actividad para prevenir el estrés oxidativo sino también la hipertensión y la diabetes siendo por tanto péptido con carácter multifuncional (Intiquilla y col., 2018b). Recientemente, Guerra-Almonacid y col. (2019), en un aislado proteico de pajuro hidrolizado con Flavourzyma® y Alcalasa® y pretratado con ultrasonidos, han observado actividad inhibidora de la ECA siendo el porcentaje de inhibición de la ECA, un 57,3% mayor en la muestras pre-tratadas con ultrasonidos.

Por otra parte, en el área de alimentación se ha utilizado el pajuro para obtener hidrolizados proteicos bajos en fenilalanina indicados para personas que sufren fenilcetonuria, debido a su deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa. La harina de pajuro se ha hidrolizado mediante pepsina y proteasa de *Streptomyces griseus* (Villafuerte y col., 2019). También se han hecho ensayos para reemplazar parte de la carne en la elaboración de productos cárnicos por diferentes aislados proteicos de trigo, quinoa y pajuro, destacando este último por su mayor capacidad emulsionante (Delgado, 2014). Por tanto, los resultados de los diferentes estudios realizados hasta la fecha indican que los hidrolizados de proteína de pajuro contienen una mezcla compleja de péptidos, pudiéndose considerar una buena fuente peptídica para aplicaciones alimenticias y nutracéuticas. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios sobre el efecto de la digestión gastrointestinal sobre dichos péptidos y sobre su potencial actividad *in vivo*.

2. OBJETIVOS

Actualmente, existe un interés por la investigación de la familia Leguminosae, adquiriendo un gran protagonismo debido a su perfil nutricional. En España, el consumo de legumbres forma parte del patrón de dieta Mediterránea y en países en desarrollo es fuente de proteínas y de compuestos bioactivos. A causa de la enorme amplitud de esta familia, existen especies poco estudiadas como es el caso del pajuro, resultando novedosas las investigaciones en dichas especies.

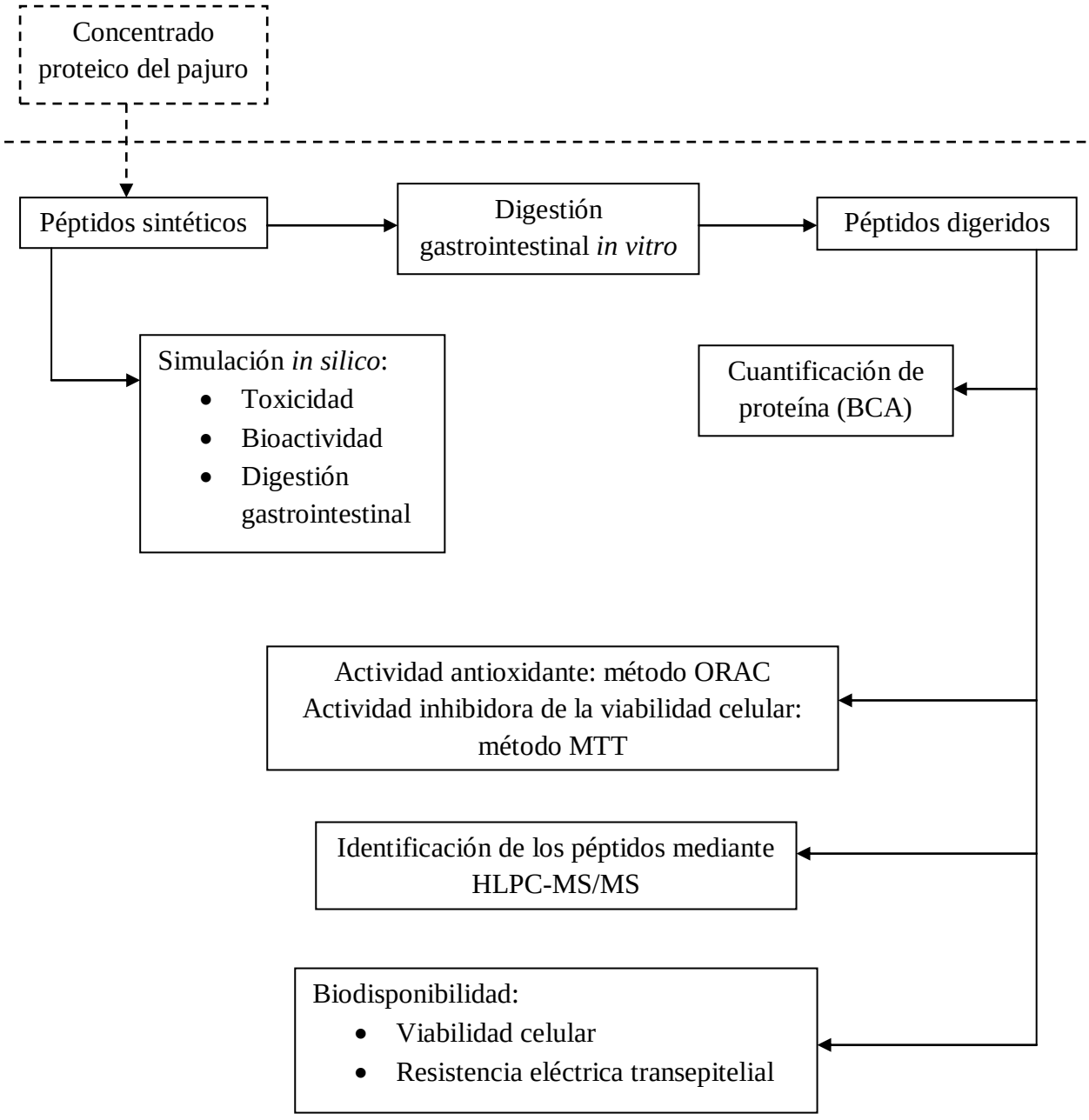
Los péptidos bioactivos han demostrado tener propiedades beneficiosas promoviendo la salud, pudiendo ser ingredientes de alimentos funcionales y/o nutracéuticos para prevenir enfermedades cardiovasculares, cancerígenas e inflamatorias. Aspectos como la multifuncionalidad y la biodisponibilidad de los péptidos es fundamental para ejercer sus efectos beneficiosos en los órganos diana, actuando sobre distintos sistemas del organismo.

El **objetivo general** del presente trabajo fue abordar, mediante la integración de datos *in silico* e *in vitro*, la multifuncionalidad y biodisponibilidad de péptidos sintéticos identificados previamente en un hidrolizado de un concentrado proteico de pajuro.

Para alcanzar este objetivo general, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de las características de los péptidos sintéticos y estudio *in silico* de su toxicidad y multifuncionalidad.
2. Evaluación del comportamiento de los péptidos de pajuro frente a un proceso de digestión gastrointestinal simulada mediante una aproximación *in silico*.
3. Estudio de la digestibilidad de los péptidos tras ser sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.
4. Determinación de la actividad antioxidante e inhibidora de la proliferación de células de cáncer de colon de los péptidos antes y después de la digestión gastrointestinal simulada.
5. Evaluación de la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos en un modelo de células Caco-2.

2.1. PLAN DE TRABAJO



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

El ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), la fluoresceína disódica (FL), el dihidrocloruro de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) fue suministrado por Aldrich (Milwaukee, WI, USA). El fosfato dipotásico, el fosfato monosódico y el metanol ≥ 99.8% fueron adquiridos a VWR Chemicals (Briare, Francia). La pancreatina de la mucosa gástrica bovina (EC 4 x USP, EC 232-468-9), la pepsina de la mucosa gástrica bovina (3200 – 4500 U/mg proteína, EC 3.4.23.1), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT), la seroalbúmina bovina (BSA), el dimetilsulfóxido (DMSO), el etanol y la solución Trypan Blue se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). El suero fetal bovino (FBS), los aminoácidos no esenciales (NEAA) y el antibiótico-antimicótico compuesto por penicilina, estreptomicina y anfotericina (PSA) fueron obtenidos de Biowest (Nuaillé, Francia). El medio Dulbecco Eagle modificado alto en glucosa (DMEM) fue adquirido en Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Alemania) y la solución tripsina-EDTA fue obtenida de GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, PA, USA).

3.2. Péptidos sintéticos de pajuro

Los péptidos utilizados para el estudio habían sido previamente identificados en un hidrolizado de concentrado de proteína de pajuro (*Erythrina edulis*) (Intiquilla y col., 2018a). Los péptidos fueron sintetizados por Chengdu KaiJie Biopharm Co., Ltd (Chengdu, Sichuan, R. P. China) mediante el método Fmoc de síntesis en fase sólida. La pureza, determinada mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masa (HPLC-MS), fue superior al 98% (Tabla 10).

Tabla 10. Péptidos procedentes del pajuro (*Erythrina edulis*) seleccionados para el estudio

Secuencia Peptídica	Peso Molecular (Da)	Pureza (%)
YPSY	528,60	98,92
AALWE	588,72	99,89
DGLGYY	686,80	98,07
SQLPGW	686,85	99,74
MFTGPY	714,91	99,25
CCGDYY	722,85	98,05

3.3. Simulación de la digestión gastrointestinal

3.3.1. Simulación *in silico*

Se utilizó el software PeptideCutter, perteneciente al portal bioinformático de Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (https://web.expasy.org/peptide_cutter/). Los parámetros para la simulación de la digestión se eligieron en función a las características del ensayo *in vitro*, seleccionando como enzimas, pepsina a pH mayor de 2, y quimiotripsina de alta y baja especificidad.

3.3.2. Simulación *in vitro*

El método *in vitro* utilizado para simular digestión de los péptidos es una adaptación del protocolo descrito por Quirós y col. (2005) y Minekus y col. (2014). Aunque el método consensuado internacionalmente comprende las tres etapas de digestión oral, gástrica y pancreática, nuestra digestión se ha llevado a cabo simulando sólo las etapas gástrica e intestinal. Inicialmente, el péptido (20 mg) se disolvió en agua Milli-Q a una concentración del 0,7% (p/v). Se pesaron 20 mg de péptido y se disolvieron en 2 mL de agua, y el pH se ajustó a pH 3,0 con HCl 1 M. A continuación se añadió la pepsina a una relación enzima y sustrato (E:S) de 1:10 (p/p) y el volumen de reacción se enrasó hasta 2,86 mL con agua Milli-Q. Se incubó dos horas a 37ºC con agitación orbital a 150 rpm, controlándose el pH cada media hora. La simulación de la fase gástrica se realizó por duplicado. Tras la fase gástrica, la enzima fue inactivada en una de las muestras (digerido gástrico) mediante incremento del pH a 7,0 con NaOH 1 M, calentando a 95ºC durante 10 minutos y posterior congelación. En la segunda de las muestras, el pH se ajustó a 7,0 con NaOH 1 M. Se calculó la cantidad de pancreatina necesaria para 400 U de tripsina y un volumen final de 4 mL, que fue de 73 mg de pancreatina por muestra**.** A continuación, se incubaron durante 2 horas a 37ºC con agitación orbital a 150 rpm, midiendo cada media hora el pH. Transcurridas las 2 horas, se inactivó la enzima por calentamiento a 95ºC durante 10 minutos y posterior congelación, obteniendo así los digeridos gastrointestinales. Finalmente, tanto de los digeridos gástricos como gastrointestinales se liofilizaron para su posterior utilización.

La técnica utilizada para la cuantificación de la proteína total en los digeridos fue el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA), usando el test comercial de diagnóstico de Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA). Para el ensayo se emplearon placas de 96 pocillos, transparentes y con fondo plano. Primeramente, se prepararon las disoluciones de la curva patrón a partir del BSA, con concentraciones finales de 1.500, 1.000, 750, 500, 250, 125 y 25 µg/mL. Seguidamente, se añadieron 25 µL de las soluciones de cada muestra en cada pocillo

y se añadieron 200 µL del reactivo. Se incubó la placa a 37ºC durante 30 minutos y por último, se determinó la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro FLUOstar Optima (BGM Labtech, Offenburg, Alemania). Una vez obtenidas las absorbancias de las muestras, se compararon con la curva patrón para poder cuantificar la concentración de proteína que contienen las distintas muestras, expresado en mg/mL.

3.3.3. Identificación de péptidos mediante HPLC-MS/MS

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de los péptidos liberados tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, se procedió a analizar como primer paso los péptidos sintéticos mediante HPLC-MS/MS, usando un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Walbron, Alemania) acoplado a una IT Esquire 3000 (Bruker, Daltonik, Bremen, Alemania), equipado con una fuente de ionización por electrospray. Se usó una columna de tipo Mediterranean Sea_{18} (150 x 2.1 mm, Teknokroma, Barcelona, España). El volumen de inyección de las muestras fue de 50 µL a concentraciones de 100, 50, 25, 10, 5, 1 µM. Los péptidos eluyeron con un gradiente lineal del solvente B (acetonitrilo 99,9% y ácido fórmico 0,1%) en el solvente A (99,9% agua y 0,1% ácido fórmico) en diferentes tiempos. Los péptidos se diluyeron en el solvente a una concentración 1/10. Los datos espectrales obtenidos del análisis se procesaron y se transformaron a valores de masa utilizando el programa Data Analysis™ (versión 4, Bruker, Daltonik) y también el programa Biotools (versión 3.2, Bruker, Daltonik) sirvió para poder interpretar los espectros MS/MS obtenidos. Se elaboró una curva patrón para cada uno de los péptidos de intensidad del ión correspondiente al péptido con respecto a su concentración.

3.4. Análisis de las actividades biológicas de los péptidos

3.4.1. Simulación *in silico*

Los péptidos sintéticos fueron sometidos a un análisis *in silico* empleando la base de datos BIOPEP-UWM (http://www.uwm.edu.pl/biochemia), siguiendo la metodología de Minkiewicz y col. (2019). El potencial de los péptidos para ser activos se predijo mediante el programa PeptideRanker (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php) y su bioactividad teórica se expresó en valores entre 0 y 1, siendo 1 el más probable de ser bioactivo. Además, la toxicidad de los péptidos se evaluó mediante el programa ToxinPred (http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/).

3.4.2. Actividad antioxidante *in vitro*. Método de neutralización de radicales peroxilo

Este método, también denominado Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), es uno de los métodos más utilizados para evaluar la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos y péptidos. Se fundamenta en la capacidad de generación de radicales peroxilo por descomposición térmica de un radical iniciador, el AAPH, generando un radical peroxilo (ROO·). Una vez generado el radical, el antioxidante cede un hidrógeno a los radicales peroxilos libres que se han formado. Los radicales reaccionan degradando la molécula de FL y formando un compuesto no fluorescente, suponiendo un descenso en la fluorescencia. Por lo tanto, se lleva a cabo una comparación entre el descenso en la fluorescencia producido en presencia y en ausencia del antioxidante a lo largo del tiempo (Ou y col., 2001). El resultado se obtiene calculando el área bajo la curva (AUC) que representa la cinética de la reacción, incluyendo el tiempo de latencia, la velocidad inicial y el alcance total de la inhibición y permite la comparación entre los antioxidantes con o sin fase de latencia (Magalhães y col., 2008). El descenso de la fluorescencia a lo largo del tiempo producida por el compuesto antioxidante se compara con el producido por el Trolox, que se utiliza como patrón, expresándose los resultados en equivalentes de Trolox (ET) por cantidad de muestra (valor ORAC). La medida de la actividad antioxidante se realizó para los péptidos previamente a su digestión y para los digeridos gástricos y gastrointestinales de dichos péptidos.

Para la ejecución del método ORAC se utilizó el protocolo descrito por Hernández-Ledesma y col. (2005). Fue necesaria la preparación de una serie de reactivos como el tampón fosfato PBS (0,075M a pH 7,4) y la solución madre de FL disódica (1166,1 µM) que se protege de la luz con papel de aluminio. Ambos reactivos se deben conservar siempre a temperaturas de 4ºC. Por otro lado, se prepararon diariamente la solución de trabajo de FL (116,61 nM) a partir de la solución madre, el AAPH (14 mM) y la solución madre de Trolox, que es el patrón antioxidante. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de color negro y fondo plano. Se añadieron 120 µL de FL a cada pocillo, 20 µL de muestra o patrón y 60 µL de AAPH. La placa se incubó durante 137 minutos en un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) y la fluorecencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente. El equipo fue controlado por el programa FLUOstar Control versión 1.32 R2. Se analizaron los resultados de tres ensayos diferentes y el valor del ORAC final se expresó como µmol ET por mg de péptido.

3.5. Análisis de biodisponibilidad

Para el estudio de biodisponibilidad de los péptidos, se empleó como modelo celular la línea de adenocarcinoma humano Caco-2 (HTB-37, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, Rockville, MD, USA) entre los pases 26 y 35. El crecimiento se realizó en medio de cultivo DMEM, suplementado con FBS al 10%, PSA al 1% y NEAA al 1%. Las células se incubaron a 37ºC en una atmósfera humidificada al 95% de aire y 5% de CO_2. Tres veces por semana se cambió el medio de cultivo de las células Caco-2, haciendo subcultivo cada siete días en nuevos frascos, empleando tripsina-EDTA.

3.5.1. Ensayo de viabilidad celular

Como paso previo al estudio de biodisponibilidad, es necesario conocer el efecto de los péptidos sobre la viabilidad de las células Caco-2, confirmando su inocuidad. Para ello, se empleó el método del MTT, que evalúa la habilidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de catalizar una reacción de reducción. Tras la acción de estas enzimas, el MTT se degrada dando lugar a un compuesto de formazano de color violeta, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 570 nm. Esta reacción sólo se da cuando las células están vivas, indicando la actividad o viabilidad metabólica de las células.

Las células Caco-2 se sembraron en microplaca de 96 pocillos proporcionado por Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Alemania) con una densidad de 3×10^4 células/pocillo que se incubaron durante 7 días y 24 horas, respectivamente. Tras ese tiempo, las células Caco-2 se trataron con los péptidos sintéticos a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM. Posteriormente, las células se lavaron con tampón fosfato (PBS). A continuación, se les añadió 100 µL a cada pocillo de una solución de MTT (concentración final de 0,5 mg/mL), incubando la placa durante 2 horas a 37ºC. Pasado ese tiempo, se descartó el MTT y los cristales de formazano insolubles se disolvieron por la adición de la solución DMSO:etanol (1:1). La absorbancia se medió a una longitud de 570 nm en el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labttech) y los resultados se expresaron como porcentaje de células viables, con respecto al control, considerado el 100% las células no tratadas. Se emplearon ocho pocillos por cada concentración de péptido y el ensayo se hizo por duplicado y los resultados obtenidos fueron expresados como la media ± desviación estándar (SD).

3.5.2. Ensayo de la permeabilidad celular. Resistencia eléctrica transepitelial

Antes del estudio de la biodisponibilidad se realizó un ensayo preliminar, para evaluar la permeabilidad de la monocapa de células Caco-2, midiendo su resistencia eléctrica

transepitelial (TEER). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos Transwell® con insertos permeables de membrana de policarbonato de la casa comercial Costar, Corning (NY, USA), con una densidad de 1,5 x 10^5 células/pocillo. En primer lugar, se humedeció la membrana situada en el compartimento apical del pocillo con 100 µL de medio de cultivo DMEM, y seguidamente se añadieron las células Caco-2 (500 µL), excepto en el primer pocillo que es el control donde solo se adiciona medio de cultivo. Además, en el compartimento basolateral se adicionó 1,50 mL de medio DMEM (Figura 6). Se dejó incubar a 37ºC en una atmósfera humidificada al 95% de aire y 5% de CO_2, y el medio se cambió cada siete días.

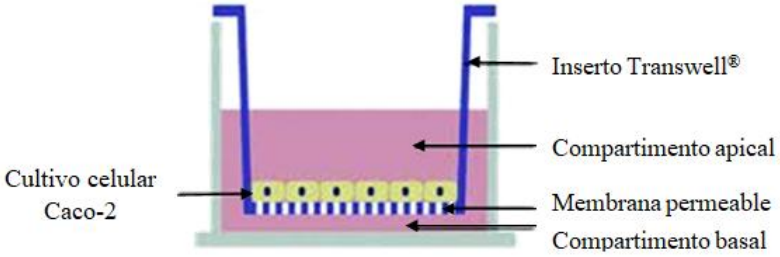


Figura 6. Diagrama representativo del montaje utilizado para las mediciones de la actividad transportadora de la monocapa de células Caco-2

Para llevar a cabo la determinación medición de la TEER, se utilizó un equipo Millicell®-ERS. Se realizó una medida a los 7, a los 14 y a los 21 días de la siembra de las células Caco-2 en los 12 pocillos con el medio atemperado. Se sumergió el electrodo de modo que la punta más corta se encontrase en contacto en el compartimento apical y la punta más larga en el pozo exterior. Para calcular los valores de TEER obtenidos en los insertos con células, se les restó el valor registrado en el pocillo control sin células y el resultado obtenido se multiplicó por el área efectiva de la membrana (1,12 cm^2). Los resultados obtenidos se expresaron en $\Omega \cdot cm^2$.

3.6. Análisis estadístico

Los datos han sido analizados estadísticamente realizando un test ANOVA de una vía. El programa utilizado para llevar a cabo el análisis estadístico ha sido GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). Los resultados se expresaron como promedio ± SD y con un valor de significancia de $p>0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis *in silico* de los péptidos sintéticos de pajuro

En este estudio se realizó un análisis *in silico* de los péptidos sintéticos de pajuro, *Erythrina edulis*, identificados a partir del hidrolizado proteico con Alcalasa® (Intiquilla y col., 2018a), usando la base de datos ToxinPred.

Se trató de obtener datos sobre sus características de hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga y punto isoeléctrico (pI) para conocer mejor su estructura y predecir su potencial actividad. Los valores de hidrofobicidad e hidrofilicidad dependen de la distribución de los aminoácidos que forman la estructura primaria y el carácter polar o apolar de sus cadenas laterales. La carga varía en función del pH y el pI proporciona información útil a la hora de investigar el comportamiento de los aminoácidos y proteínas en solución, así la presencia de grupos ionizables tiene importantes consecuencias sobre la solubilidad (García-Rubia, 2016). Por tanto, los valores de estas características influyen en las variaciones de actividad de los diferentes péptidos.

En la Tabla 11 se muestran los valores de las diferentes características de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW estudiados.

Tabla 11. Datos de las características de hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga y punto isoélectrico (pI) de los péptidos sintéticos del pajuro de acuerdo con la base de datos ToxinPred

Secuencia peptídica	Hidrofobicidad	Hidrofilicidad	Carga	pI
YPSY	-0,07	-1,07	0,00	5,87
AALWE	0,16	-0,64	-1,00	4,00
CCGDYY	-0,07	-0,60	-1,00	3,80
DGLGYY	0,03	-0,57	-1,00	3,80
MFTGPY	0,13	-1,08	0,00	5,88
SQLPGW	0,01	-0,78	0,00	5,88

Se puede observar que los péptidos AALWE, DGLGYY, CCGDYY comparten la misma carga de -1,00, mientras que la carga del resto de péptidos estudiados es 0. Respecto a los valores de hidrofobicidad e hidrofilicidad cabe destacar que la hidrofilicidad de todos los péptidos es negativa e igual sucede con los valores de hidrofobicidad de los péptidos YPSY y CCGDYY, que han presentado un valor de -0,07. Sin embargo, los péptidos AALWE y MFTGPY presentaron valores de 0,16 y 0,13 respectivamente, mucho más altos que los de los

péptidos DGLGYY (0,03) y SQLPGW (0,01), por lo que estos péptidos son los más hidrofóbicos.

4.1.1. Evaluación de su toxicidad y bioactividad

Se llevó a cabo el análisis de la toxicidad de los péptidos sintéticos mediante la base de datos de ToxinPred, diseñada para la identificación de regiones tóxicas en una secuencia proteica determinada. Gupta y col. (2013) desarrollaron una serie de modelos predictivos a partir de la información y los conocimientos recogidos en diversas bases datos como SwissProt y TrEMBL. Estos autores desarrollaron el software ToxinPred, que tiene una precisión del 90%. Se puede predecir si un péptido es tóxico en base a la presencia de diferentes residuos aminoacídicos como cisteína, histidina, asparagina o prolina. Además, este software permite realizar cambios en la secuencia del péptido tóxico para que pierda su toxicidad, aportando una serie de modificaciones adecuadas para este fin. También mediante PeptideRanker, se puede realizar análisis de péptidos y caracterización así como descubrir secuencias lineales de menor tamaño. Para investigar la bioactividad de los péptidos se empleó la base de datos BIOPEP-UWM, una de las primeras bases de péptidos bioactivos que facilita la búsqueda de secuencias peptídicas en las que se han identificado potenciales bioactividades (Minkiewicz y col., 2008). Actualmente, BIOPEP-UWM agrupa 740 secuencias proteicas y 3.972 secuencias peptídicas (Minkiewicz y col., 2019). Además, está conectada con otras bases de datos globales que investigan también la estructura y las funciones de proteínas como Swiss-Prot, TrEMBL o PubChem entre otras. La aparición de nuevos péptidos de diversas fuentes alimenticias ha hecho necesario la creación de distintas bases de datos y el establecimiento de criterios adicionales para poder evaluar el valor de las proteínas también como precursores de péptidos bioactivos (Dziuba y Iwaniak, 2006).

En la Tabla 12 se recogen los resultados de la predicción de toxicidad y de actividad, así como las potenciales actividades biológicas de las secuencias peptídicas. Respecto a la toxicidad, ninguno de de los péptidos estudiados mostró toxicidad. Por otro lado, los valores de predicción de actividad oscilaron entre 0,390 y 0,890. El péptido SQLPGW con un valor de 0,886, CCGDYY con un valor de 0,804 y MFTGPY con un valor de 0,746, fueron los péptidos con valores más altos. Sin embargo, cabe destacar el péptido AALWE con el valor más bajo (0,389) en comparación con el resto.

También, se ha llevado a cabo la identificación de las secuencias potencialmente activas donde se puede observar fundamentalmente la presencia de dipéptidos y tripéptidos. Las actividades más comunes descritas para ellas son la inhibición de ECA y de la DPP-IV.

Tabla 12. Datos de toxicidad y actividad biológica de los péptidos sintéticos del pajuro derivados de hidrolizados de proteínas de pajuro de acuerdo con las bases de datos BIOPEP-UPW, PeptideRanker y ToxinPred

Secuencia peptídica	Predicción toxicidad	Predicción actividad	Secuencias potencialmente activas	Potencial bioactivo	Referencia
YPSY	No tóxico	0,5577	YP, SY, PSY YP YP, PS, SY	Inhibidor ECA[a] Inhibidor α-glucosidasa Inhibidor DPP-IV[b]	Suetsuna, 1998 Bautista, 2019 Shamloo y col., 2014
AALWE	No tóxico	0,3897	AA, LW LW, LWE AA, AL, LW, WE LW	Inhibidor ECA[a] Antioxidante Inhibidor DPP-IV[b] Inhibidor renina	Liu y col., 2015 Velarde, 2015 Castillo y col., 2015
CCGDYY	No tóxico	0,8042	GD, DY DYY YY	Inhibidor ECA[a] Antioxidante Inhibidor DPP-IV[b]	Hernández-López y col., 2015 Herrera-Ponce y col., 2019
DGLGYY	No tóxico	0,5319	DG, GL, LG, DGL GYY LGY GYY GL, GY, YY	Inhibidor ECA[a] Opioide Inmunoestimulante Antioxidante Inhibidor DPP-IV[b]	Meisel y col., 2006 Suetsuna, 1998 Zhu y col., 2008 Vioque y col., 2000
MFTGPY	No tóxico	0,7461	GP MF, TG, GP, TGP GP MF, TG, GP, PY FT	Anamnésico Inhibidor ECA[a] Antitrombótico Inhibidor DPP-IV[b] Inhibidor renina	O'Keeffe y col., 2017 Vioque y col., 2000 Hernández-Martínez y col., 2017
SQLPGW	No tóxico	0,8857	PG PG, GW, LPG PG QL, LP, PG,GW	Anamnésico Inhibidor ECA[a] Antitrombótico Inhibidor DPP-IV[b]	Cubillos, 2009 Villadóniga y col.,2009 Illanes, 2019

[a] ECA: Enzima convertidora de angiotensina

[b] DPP-IV: Enzima dipeptidil peptidasa IV

La actividad inhibidora de la ECA es muy importante ya que uno de los mecanismos a través del cual los péptidos antihipertensivos pueden ejercer su actividad. La ECA es una enzima que participa en el sistema renina-angiotensina, catalizando la degradación del decapéptido angiotensina I en el octapéptido angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor. También participa en el sistema quinina-calicreína, catalizando la degradación de la bradiquinina, péptido vasodilatador. Además, la ECA estimula la liberación de aldosterona en la corteza adrenal, que regula el equilibrio del sodio y el agua. Por ello, la ECA juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial del organismo. Como puede observarse en la Tabla 12, la actividad inhibidora de la ECA se ha descrito para los dipéptidos YP, SY, DG, GL, LG PG, GW, MF, GD y para los tripéptidos PSY, DGL, LPG y TGP. En un extracto de *Allium sativum* L, ajo, Suetsuna (1998) describió la presencia del dipéptido SY con capacidad inhibidora de la ECA y de la DPP-IV. El tripéptido PSY se identificó en un hidrolizado de proteínas de trigo sarraceno, mostrando actividad inhibidora de la ECA (Shamloo y col., 2014). El péptido DG ejerce una reducción de la presión sanguínea a través de la inhibición de la ECA (Meisel y col., 2006). Del mismo modo, el péptido TGP, identificado en la piel del abadejo de Alaska y en la gelatina de piel de porcino, ha sido caracterizado por sus propiedades inhibidoras de la ECA (O'Keeffe y col., 2017).

La actividad inhibidora de DPP-IV es importante ya que una de las nuevas estrategias para prevenir y combatir la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se basa en la inhibición de esta enzima. Esta enzima es responsable de la degradación e inactivación de las hormonas incretinas, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulinotrópico dependiente de la glucosa (GIP). Estas dos hormonas son secretadas en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen intestinal y actúan estimulando la secreción de insulina (glucosa-dependiente) por parte de las células β-pancreáticas. La inhibición de la DPP-IV evita la degradación de estas hormonas, manteniéndose la producción de insulina. De acuerdo con nuestros resultados, para los dipéptidos YP, PS, SY, AA, AL, WE, LW, GL, GY, MF, TG, GP, YY y para el tripéptido LPG se han descrito actividad inhibidora de la enzima DPP-IV. Como ya se ha mencionado, Suetsuna (1998), en un extracto de ajo, había descrito actividad inhibidora de la DPP-IV en los dipéptidos SY y GY.

Únicamente para los péptidos AALWE, DGLGYY y CCGDYY se han descrito secuencias di- y tri-peptídicas antioxidantes, concretamente el dipéptido LW y los tripéptidos LWE, GYY y DYY. Zhu y col., (2008) a partir de productos fermentados de soja y okara obtuvieron una fracción proteica en la que aislaron el dipéptido DG con actividad inhibidora de la ECA y el tripéptido GYY que en diferentes modelos *in vitro* presentó actividad

antioxidante. Además, Liu y col. (2015) identificaron los péptidos LW y LWE con actividad antioxidante en un hidrolizado enzimático de *Mactra veneriformis*, almeja marina. Como ya se mencionó en la introducción, los péptidos con actividad antioxidante son capaces de participar en la inhibición de reacciones de oxidación en las que están involucradas los radicales libres, evitando un estado de estrés oxidativo asociado con numerosas enfermedades degenerativas graves, como los desórdenes cardiovasculares y neurodegenerativos, la DMT2, el síndrome metabólico, las cataratas, algunos tipos de cáncer y el propio envejecimiento (Bray, 2000). Además, las reacciones de oxidación participan en el origen de los procesos relacionados con la pérdida de calidad en los alimentos, como la rancidez de las grasas, los cambios de color y el deterioro nutricional del alimento, disminuyendo su calidad. Por ello, la gran importancia de investigar la eficacia antioxidante de los péptidos.

También se han descrito dipéptidos y tripéptidos con otras actividades como el dipéptido YP con actividad inhibidora de α-glucosidasa, los dipéptidos LW y FT capaces de inhibir la renina, los dipéptidos LW, LWE, PG y GP, con capacidad anamnésica, los dipéptidos PG y GP, con propiedades antitrombóticas y los tripéptidos como GYY y LGY con efectos opiode e inmunoestimulante, respectivamente.

4.1.2. Evaluación de la digestión gastrointestinal

Se empleó el software PeptideCutter como herramienta para predecir los posibles sitios de corte que se producen por las diferentes proteasas que intervienen en la digestión gastrointestinal así como las diferentes zonas con la posición de la escisión o escisiones que pueden ocurrir. El objetivo es determinar a nivel teórico las secuencias peptídicas que se pueden formar tras la digestión gástrica e intestinal. Una vez realizada la simulación, se pueden observar las diferencias en la hidrólisis de los péptidos según se realice la digestión gástrica con pepsina y la intestinal con quimotripsina de alta especificidad o baja especificidad. Las enzimas usadas degradan los péptidos por zonas de corte diferentes, formando en los digeridos distintos péptidos.

Los péptidos resultantes de la simulación *in silico* de la digestión se muestran en la Tabla 13. Puede observarse como el péptido DGLGYY es parcialmente hidrolizado por la pepsina y la qimotripsina en las zonas de corte 1, 2, 3, 4, 5, formando dipéptidos como YY y DG, tripéptidos como GYY y DGL y también péptidos de mayor tamaño como DGLGY, DGLG y LGYY. El péptido CCGDYY es parcialmente degradado por la pepsina y la quimotripsina en las zonas de corte 4, 5 formando los péptidos CCGDY, CCGD e YY y quedando un aminoácido libre, la tirosina, Y. En el péptido MFTGPY, las zonas de corte de la

Tabla 13. Puntos de escisión y péptidos liberados tras la simulación *in silico* de la digestión gastrointestinal de los péptidos sintéticos identificados en el hidrolizado de proteína de pajuro usando el software PeptideCutter

	DIGESTIÓN GÁSTRICA				DIGESTIÓN INTESTINAL				
Secuencia Peptídica	**Peso Molecular (Da)**	**[1]Zonas de corte Pepsina**	**Secuencia Peptídica**	**Peso Molecular (Da)**	**Péptidos de la digestión gástrica**	**Zonas de corte[1] Quimiotripsina[2]**	**Zonas de corte[1] Quimiotripsina[3]**	**Secuencia Peptídica**	**Peso Molecular (Da)**
DGLGYY	687	2, 3, 4, 5	DGLGY	524	**DGLGYY**	5	3, 5	DGLGY	524
								GYY	401
								DGL	303
			LGYY	515	DGLGY	------	3	DGLG	360
			GYY	401	DGLG	------	3	DGL	303
			DGLG	360	LGYY	3	1, 3	GY	238
			YY	344	GYY	2	2		
			DGL	303	YY	1	1	------	------
			DG	190					
CCGDYY	723	4, 5	CCGDY	560	**CCGDYY**	5	5	CCGDY	560
			CCGD	396					
			YY	344	YY	1	1	------	------
MFTGPY	715	1, 2, 5	FTGPY	584	**MFTGPY**	2	1, 2	FTGPY	584
			MFTGP	552	FTGPY	1	1	TGPY	436
			TGPY	436	MF	1	1	MF	296
			MF	296	MFTGP	1	1, 2	TGP	273
SQLPGW	687	3	PGW	358	**SQLPGW**	------	------	------	------
			SQL	346					
YPSY	529	1	PSY	365	**YPSY**	------	------	------	------
AALWE	589	2, 3, 4	AALW	460	**AALWE**	4	3, 4	AALW	460
			LWE	447	LWE	2	1, 2	LW	317
			WE	333	AALW	------	3	AAL	273
			AAL	273	WE	1	1	------	------
			AA	160					

[1]Zonas de corte: los enlaces a los que corresponde los puntos de escisión se enumeran de izquierda derecha

[2]Quimotripsina de alta especificidad y [3]Quimotripsina de baja especificidad

pepsina y la quimotripsina son 1, 2 y 5, liberando péptidos de mayor tamaño y peso molecular, como FTGPY, MFTGP y de menor peso molecular como TGPY y MF. Por último, el péptido AALWE es hidrolizado parcialmente por la pepsina en las zonas de corte 2, 3, 4 y por la quimotripsina con cortes en las posiciones 1, 2, 3, 4, originando péptidos de distinto tamaño como AALWE, LWE, WE, LW, AAL, AA. Sin embargo, los péptidos SQLPGW e YPSY sólo son degradados por la pepsina de la digestión gástrica. En el caso del péptido SQLPGW la pepsina corta por el enlace 1 y 3, formando los tripéptidos PGW y SQL. Del mismo modo, el péptido YPSY es degradado en la fase gástrica por la pepsina en el enlace 1 perdiendo la Y del extremo N-terminal y formando el tripéptido PSY. Sin embargo, en la digestión intestinal no se ha detectado actividad de la quimotripsina, manteniéndose los péptidos mencionados anteriormente intactos.

4.2. Estudio de los péptidos sintéticos. Identificación mediante HPLC-MS/MS

Los seis péptidos sintéticos, YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW, se analizaron mediante HPLC-MS/MS, inyectando concentraciones crecientes de los mismos, de 1 a 100 µM. A modo de ejemplo, en la Figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos para el péptido MFTGPY. Con la intensidad de la señal del péptido y la concentración se construyó una curva patrón del péptido MFTGPY, el resto se muestran en la Figura S2. Se pudo comprobar que todos presentaban gran pureza y un comportamiento lineal en cuanto a su concentración, siendo en todos los casos el coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,98.

4.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante antes de la digestión gastrointestinal *in vitro*

La actividad antioxidante de los péptidos de pajuro se evaluó mediante el método de neutralización de radicales peroxilo (ORAC). Para realizar el ensayo se empleó el estándar de Trolox, un análogo de la vitamina E. En la Figura 8 se muestra la recta de Trolox representando el área bajo la curva (AUC) con respecto a la cantidad (µmol de Trolox). Se analizaron los péptidos sintéticos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW a diferentes concentraciones, obteniéndose las rectas para cada uno de ellos del área bajo la curva con respecto a los µmoles de péptido. En la Figura 9 se muestra, a modo de ejemplo, la recta correspondiente al péptido YPSY.

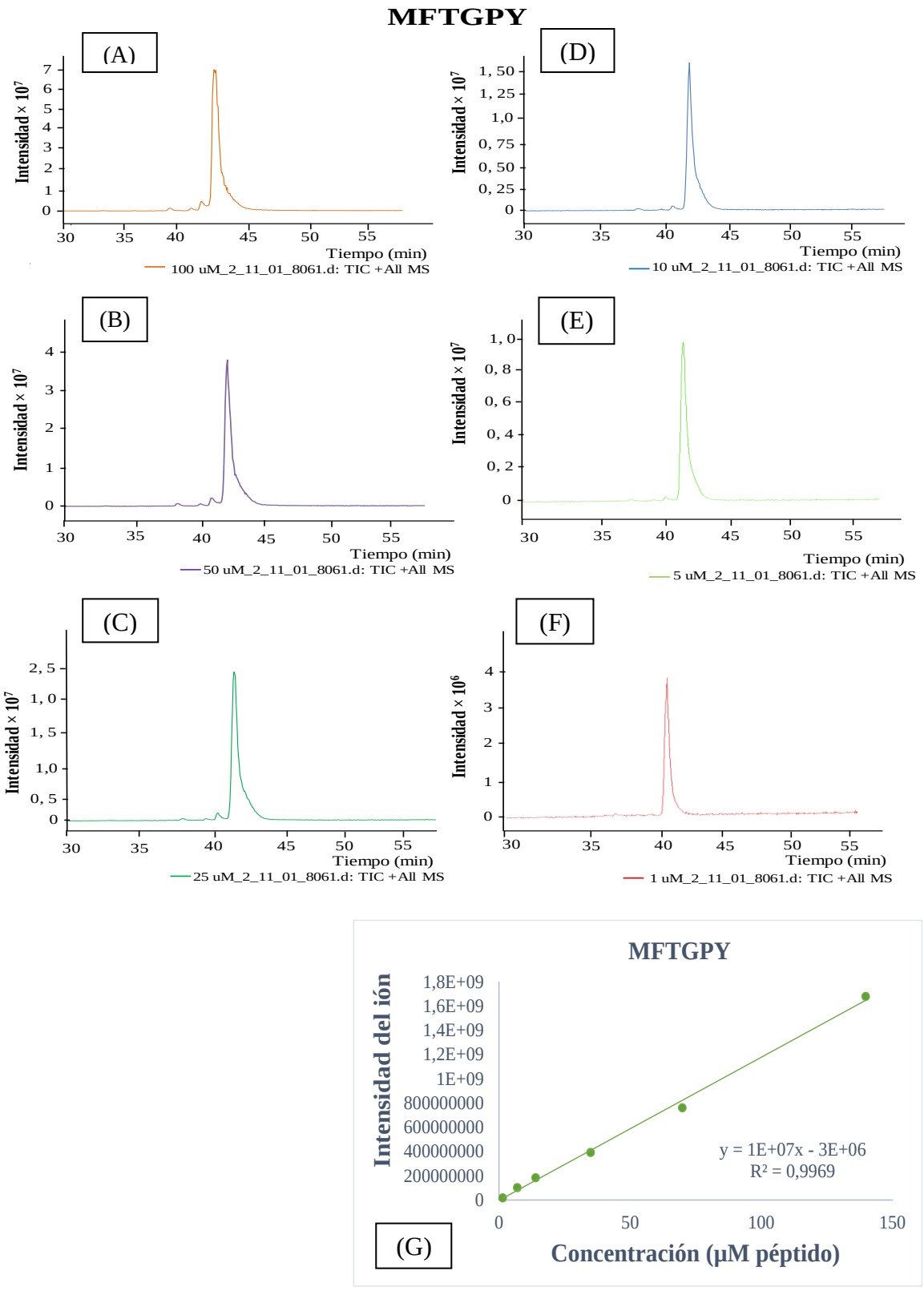


Figura 7. Cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC-MS/MS a concentraciones de (A) 100, (B) 50, (C) 25, (D) 10, (E) 5, (F) 1 µM del péptido MFTGPY. Representación de la intensidad del ión con respecto a la concentración de los péptidos (G) MFTGPY

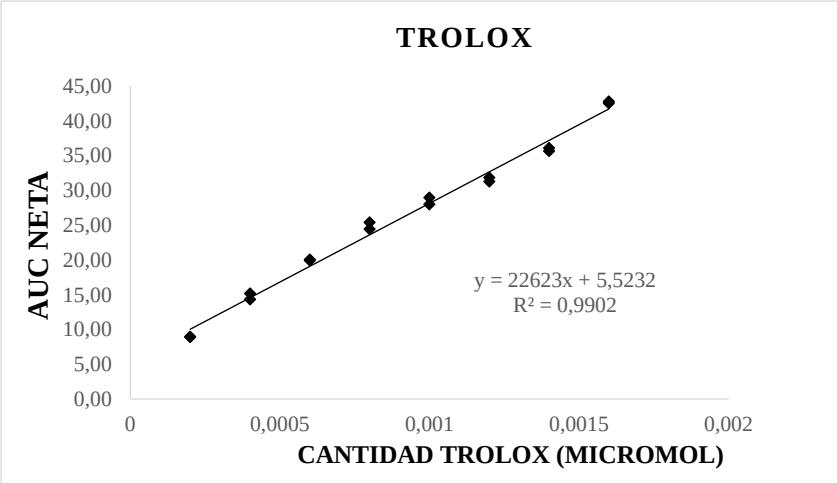


Figura 8. Regresión lineal del área neta bajo la curva (AUC) en función de los µmol de Trolox

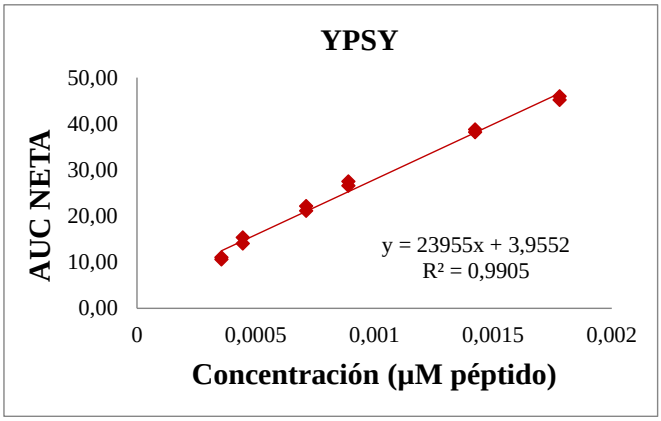


Figura 9. Regresión lineal del área neta bajo la curva (AUC) en función de los µmol del péptido YPSY

Para calcular el valor TEAC, se dividió la pendiente de la curva de los péptidos sintéticos y la de la curva de Trolox, expresándolo como µmol equivalente de Trolox (ET) por µmol péptido. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad antioxidante (expresada como µmol equivalente de Trolox (ET) µmol péptido) de los péptidos sintéticos del pajuro antes de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Péptido	ORAC (µmol ET/µmol péptido)
YPSY	1,075 ± 0,030
AALWE	1,015 ± 0,059
CCGDYY	0,869 ± 0,066
DGLGYY	0,977 ± 0,036
MFTGPY	0,580 ± 0,027
SQLPGW	0,930 ± 0,022

Entre los péptidos que han presentado mayores valores de TEAC se encuentra el péptido YPSY (1,075 ± 0,030 µmol ET/µmol péptido), AALWE (1,015 ± 0,059 µmol ET/µmol péptido), DGLGYY (0,977 ± 0,036 µmol ET/µmol péptido) y SQLPGW (0,930 ± 0,022 µmol ET/µmol péptido). Los péptidos CCGDYY y MFTGPY mostraron una actividad antioxidante menor en comparación con los otros péptidos, dando lugar a valores de 0,869 ± 0,066 y 0,580 ± 0,027 µmol ET/µmol péptido, respectivamente.

Se ha investigado que la estructura y la composición de aminoácidos aromáticos como tirosina, triptófano, histidina y fenilalanina, son clave para expresar la actividad antioxidante. Chen y col. (1995) obtuvieron seis péptidos antioxidantes derivados de β-conglicinina de soja, que incluían aminoácidos hidrófobos, como valina y leucina en la posición N-terminal y prolina, histidina y tirosina a lo largo de la secuencia aminoacídica. Después usando péptidos sintéticos derivados de leucina-leucina-prolina-histidina-histidina, demostraron que el segmento histidina-histidina era importante para la actividad, ya que la eliminación de la histidina C-terminal disminuyó la actividad antioxidante. La alta actividad antioxidante de triptófano y tirosina puede explicarse por su capacidad para donar hidrógeno, en el caso de la metionina puede oxidarse a sulfóxido de metionina y en la cisteína puede donar el hidrógeno de azufre.

Si comparamos los resultados de la actividad antioxidante con respecto a péptidos o fracciones proteicas de otras especies de leguminosas, en el caso de la judía Adzuki, se observó la capacidad de inactivación del 50% de los radicales peroxilo en diferentes fracciones proteicas, con resultados de 0,89 ± 007 y 1,12 ± 0,03 µmol ET/µmol proteína (Durak y col., 2013), similares a los valores obtenidos en los péptidos de pajuro. García-Mora y col. (2015) evaluaron la actividad antioxidante de diferentes péptidos como VNPDPKEDLRIIQL, VVNEGAHVE, VVNEGAHVELVGPK procedentes de la judía pinta tras su hidrólisis con Alcalasa® y Savinasa®. Los resultados de actividad antioxidante más

altos se obtuvieron tras la hidrólisis durante 120 minutos para ambas enzimas, con un valor de 348,99 µmol ET/g para el hidrolizado con Alcalasa® y 326,11 µmol ET/g para el hidrolizado con Savinasa®. También mostraron presencia de aminoácidos como valina, prolina e histidina en el extremo N-terminal.

4.2.2. Efecto de los péptidos en la viabilidad de Caco-2

Se evaluó el efecto directo de los péptidos sintéticos sobre la viabilidad celular de las células Caco-2, incubándolas con los péptidos a concentraciones de 10, 25, 50, 100 µM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. Según los resultados, el péptido CCGDYY mostró un ligero efecto citotóxico a concentraciones de 10, 25, 50 µM, produciendo una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa, con resultados de 92,85 ± 6,96, 96,58 ± 6,76 y 92,78 ± 7,59, respectivamente. Los péptidos SQLPGW, YPSY y AALWE a concentraciones de 25 y 50 µM produjeron también una disminución en la viabilidad celular. Sin embargo, a la concentración más alta, 100 µM, no se ha producido ningún efecto en la disminución de la viabilidad celular en comparación con las demás concentraciones. Con los péptidos CCGDYY y SQLPGW incluso se han obtenido valores superiores al 100% de células viables, excepto con el péptido MFTGPY que produjo un ligero efecto citotóxico 95,44 ± 6,81, siendo el valor más bajo.

Rodrigues-Marques y col. (2018), investigaron la viabilidad del péptido MELNAVSVV del frijol caupí en células Caco-2, observando una ligera disminución de las células viables a una concentración de 100 µM, pero a 250 µM la disminución fue de un 70%, dando lugar a un efecto citotóxico. Sin embargo, con células HepG2 se realizó el mismo ensayo y a la concentración de 250 µM la viabilidad celular solo se redujo en un 55%.

4.3. Análisis de los péptidos tras la digestión gastrointestinal *in vitro*

Los péptidos sintéticos de pajuro fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulando las condiciones fisiológicas. Los digeridos fueron analizados para identificar los péptidos liberados tras la acción de las enzimas digestivas y su actividad antioxidante fue determinada mediante el método ORAC, tal como se había realizado anteriormente con los péptidos antes de su digestión.

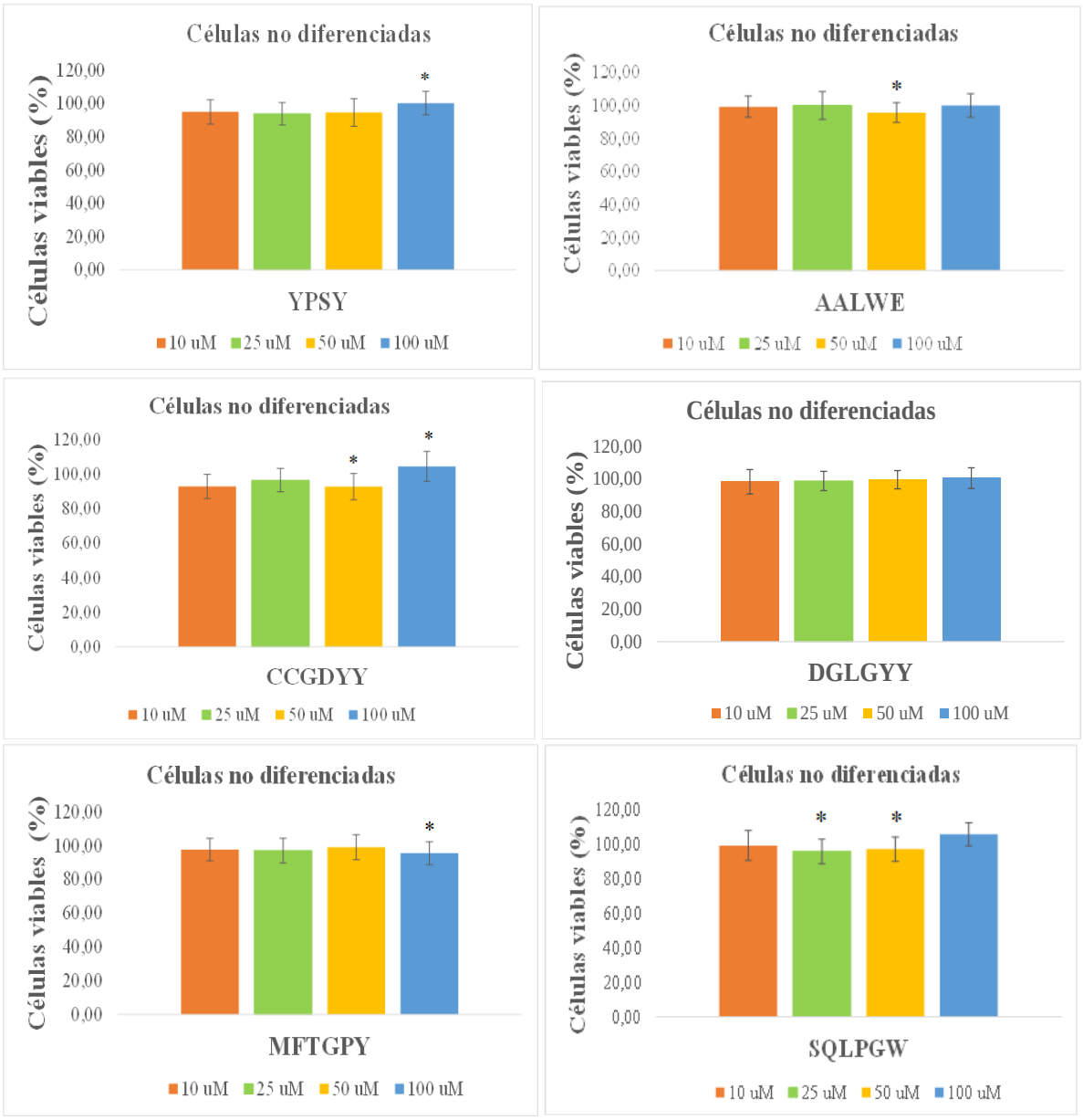


Figura 10. Porcentaje de células Caco-2 viables no diferenciadas en presencia de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control *$p>0,05$

4.3.1. Análisis mediante HPLC-MS/MS

Los digeridos gástricos y gastrointestinales de los seis péptidos fueron analizados mediante HPLC-MS/MS. Con las curvas patrón de los péptidos sintéticos, se pretendía cuantificar la cantidad de péptido residual tras el proceso digestivo. Además, el estudio pretendía identificar los péptidos liberados durante dicho proceso. Comparando los resultados con el estudio *in silico* podrían identificarse posibles secuencias bioactivas obtenidas tras la

digestión de los péptidos del pajuro. En este caso el ensayo no se pudo concluir debido a las limitaciones del tiempo. A modo de ejemplo, se muestran en la Figura 11, los cromatogramas que se obtuvieron del péptido DGLGYY, donde se pueden ver los picos tras la digestión gástrica y tras la digestión gastrointestinal.

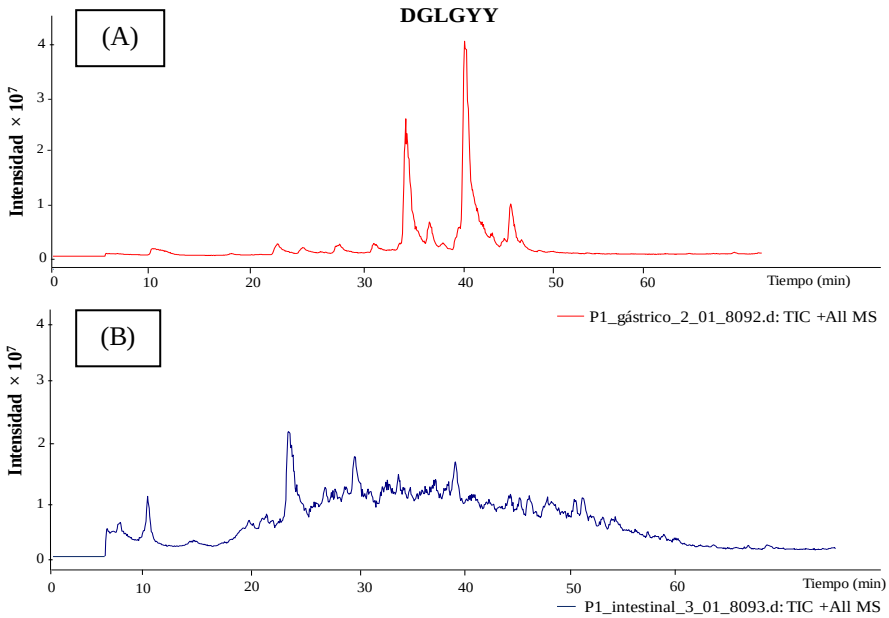


Figura 11. Cromatogramas obtenidos tras la digestión gástrica (A) y tras la digestión gastrointestinal (B) resultantes del análisis de HPLC-MS/MS del péptido DGLGYY

4.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante

Una vez realizada la digestión gastrointestinal *in vitro* de los péptidos sintéticos, se realizó de nuevo el ensayo ORAC para evaluar la actividad antioxidante. En este caso y debido a la pandemia por COVID-19, sólo se pudieron obtener los resultados de actividad antioxidante de los péptidos DGLGYY, CCGDYY y MFTGPY, quedando los otros tres péptidos pendientes para su análisis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15. En los péptidos DGLGYY y CCGDYY los valores de actividad antioxidante obtenidos tras la digestión gástrica e intestinal son similares pero disminuyeron a lo largo del proceso de digestión. Tras la digestión gástrica, la actividad en ambos péptidos disminuyó un 64% y tras la digestión gastrointestinal hubo una reducción del 78% con respecto a la actividad del péptido sin digerir. Si se comparan sólo los resultados de ambas digestiones, tanto de la digestión gástrica como de la digestión gastrointestinal, los dos péptidos han tenido una reducción de la actividad del 40%. Por lo tanto, ambos péptidos han disminuido su capacidad antioxidante al haber sido sometidos a la digestión *in vitro*.

Tabla 15. Actividad antioxidante (expresada como µmol equivalente de Trolox (ET)/µmol péptido) de los péptidos sintéticos del pajuro DGLGYY, CCGDYY, MFTGPY antes y después de la digestión gástrica e intestinal *in vitro*

	ORAC antes de la digestión	**ORAC tras la digestión gástrica**	**ORAC tras la digestión gastrointestinal**
Péptido	µmol ET/ mg péptido	µmol ET/ mg péptido	µmol ET/ mg péptido
DGLGYY	1,379 ± 0,051	0,502 ± 0,013	0,301 ± 0,011
CCGDYY	1,368 ± 0,059	0,501 ± 0,033	0,317 ± 0,031
MFTGPY	0,945 ± 0,038	1,525 ± 0,092	1,395 ± 0,088

De hecho, eran los péptidos GYY y DYY los que se habían descrito previamente como péptidos antioxidantes. En cambio, tras la digestión del péptido MFTGPY, la actividad antioxidante aumentó en un 61% respecto al péptido no digerido, reduciéndose ligeramente tras la acción de las enzimas intestinales. Aún así el valor final de la actividad antioxidante tras la digestión *in vitro* en comparación con DGLGYY y CCGDYY, fue superior. Los estudios *in silico* indican que la digestión gástrica del péptido MFTGPY origina otros péptidos de menor tamaño como FTGPY, TGPY y MF que resisten a la digestión gastrointestinal. También se muestra la formación de un tripéptido al final de la digestión, el tripéptido TGP.

Estudios de péptidos bioactivos como LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPILRYL, TLEPNSVFLPVLLH derivados de proteínas de leche de soja después de haber sido sometidos a una digestión *in vitro*, provocó un incremento significativo en la actividad antioxidante con una mejora del 35% (Singh y Vij, 2018). Olagunju y col. (2018), realizaron un estudio *in vitro* con péptidos de guisante, encontrando que presentaban un potencial superior de actividad antioxidante, aumentando su actividad un 36% como ocurre con el péptido MFTGPY de pajuro.

4.4. Evaluación de la biodisponibilidad

4.4.1. Efecto sobre la viabilidad celular en Caco-2

Previo al ensayo de biodisponibilidad fue necesario confirmar que los péptidos no eran citotóxicos para las células Caco-2 en las dosis ensayadas mediante el estudio de viabilidad con células diferenciadas. Se evaluó el efecto directo de los péptidos del pajuro sobre la viabilidad celular realizando un ensayo en células Caco-2, sembradas 7 días antes de ser

tratadas con los péptidos. Las concentraciones de los péptidos fueron de 10, 25, 50 y 100 µM y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

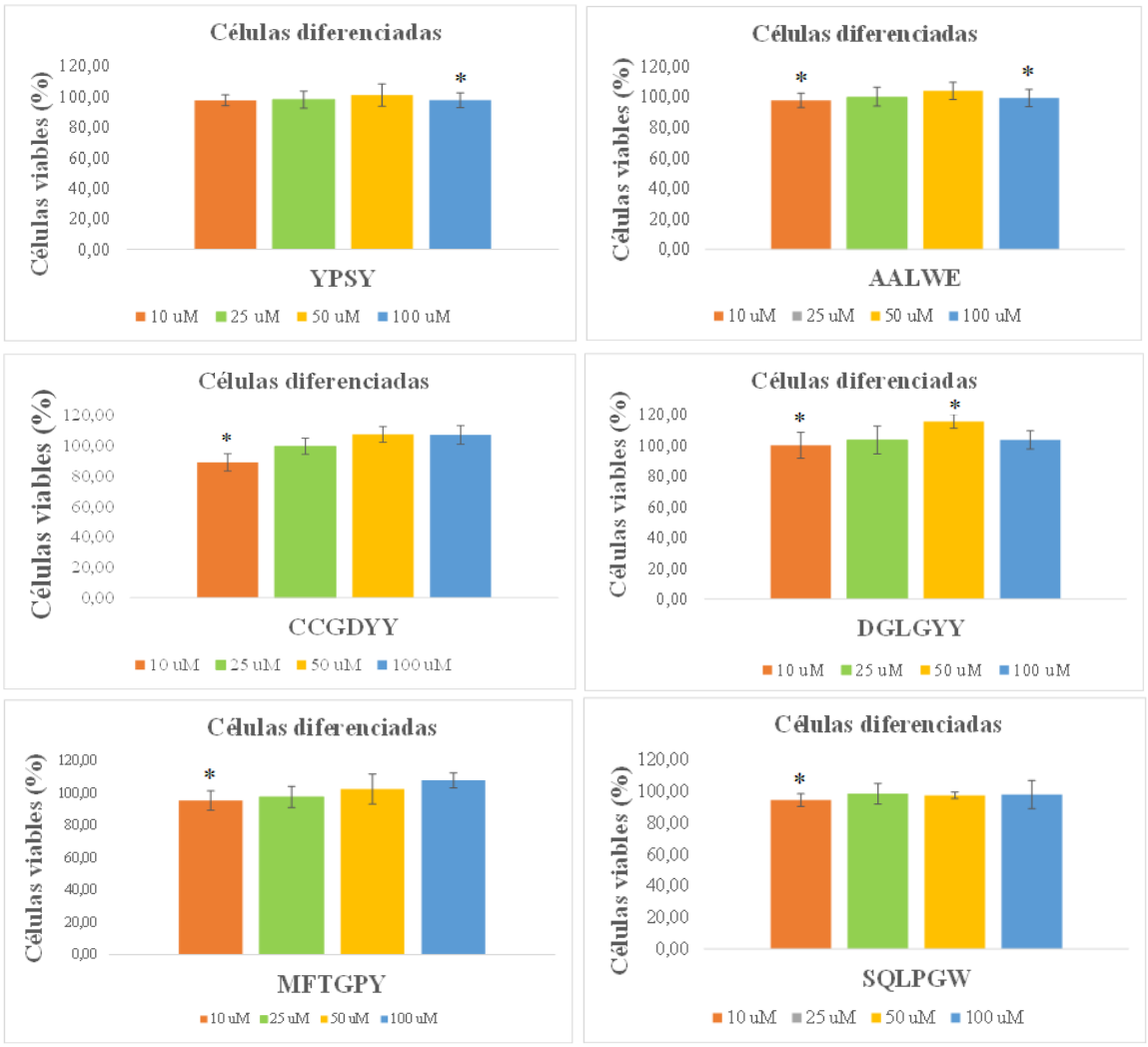


Figura 12. Porcentaje de células Caco-2 viables diferenciadas en presencia de los péptidos YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µM. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control *$p>0,05$

El péptido CCGDYY a concentración de 10 µM, es el que presentó menor porcentaje de células viables diferenciadas con respecto a los demás péptidos con un resultado de 88,77 ± 5,70, por lo que muestra un ligero efecto citotóxico. Sin embargo, el péptido DGLGYY a todas sus concentraciones iguala o supera el 100% de células viables diferenciadas. Destacar los resultados obtenidos para los péptidos DGLGYY, CCGDYY, MFTGPY a concentraciones de 50 y 100 µM, ya que la viabilidad celular fue superior al 100%. El péptido DGLGYY a 50 µM proporciona un valor de viabilidad del 115,62 ± 4,54 y a 100 µM de 103,59 ± 5,91. Con el péptido CCGDYY se obtuvieron resultados similares a las mismas concentraciones, con

resultados de viabilidad de 107,16 ± 5,20 y 106,84 ± 6,19, respectivamente. Por último, el péptido MFTGPY a concentraciones de 50 y 100 µM resultó en un porcentaje de células viables del 102,61 ± 9,31% y 108,00 ± 4,60%, respectivamente. Si los comparamos con los péptidos SQLPGW, YPSY y AALWE, en todas las concentraciones se observa una disminución de la viabilidad de las células Caco-2 produciendo un ligero efecto citotóxico, excepto para el péptido AALWE a una concentración de 50 µM (104,21 ± 5,72).

4.4.2. Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial

Se realizó un ensayo preliminar midiendo la resistencia eléctrica transepitelial para evaluar la permeabilidad de la monocapa celular Caco-2 que se formó. Las células se dejaron incubar a 37ºC en una atmósfera humidificada al 95% de aire y al 5% de CO_2, cambiando el medio cada siete días. Se evaluó la TEER a los 7 y 14 días después de la siembra de las placas. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 13, 14 y 15, donde la casilla de color azul representa el control y las de color blanco las células Caco-2.

98	763	452	637
720	622	622	605
689	1907	587	371

Figura 13. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 7 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$

143	707	606	482
719	420	405	413
2129	1773	1175	586

Figura 14. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 14 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$

156	574	669	584
494	954	794	753
1001	540	532	380

Figura 15. Determinación de la resistencia transepitelial de las células Caco-2 a los 14 días de incubación, expresada en $\Omega.cm^2$

El ensayo de permeabilidad celular es un ensayo predictivo de absorción con el fin de evidenciar los problemas de biodisponibilidad que puedan surgir cuando se administre los digeridos gastrointestinales peptídicos. La TEER permite evaluar indirectamente la expresión adecuada de las uniones intercelulares y el factor estructural que se relaciona con los cambios que se producen en los valores de este parámetro. Los niveles de las diferentes proteínas como son las claudinas, permiten formar las barreras paracelulares y poros que determinan la permeabilidad de la unión, jugando un papel muy importante en las células de carcinoma de colon (Cogollo-Carvajal y col., 2016).

Antes del cuarto día del cultivo de las células, no se registran niveles cuantificables de TEER, siendo un hecho indicativo de la ausencia de la monocapa de las células Caco-2 y revelando una escasa unión célula-célula. Para poder llevar a cabo el ensayo de biodisponibilidad el nivel del TEER tiene que ser superior a 400 $\Omega.cm^2$. Para calcularlo hay que restar el valor del blanco, inserto sin células, a todos los demás resultados que se obtuvieron de los insertos con las células Caco-2 en crecimiento. Las placas se midieron a los 7 días y a los 14 días de incubación donde se pudo observar un aumento de los valores resultantes, por lo que algunas células ya cumplirían los requisitos para poder realizar el ensayo, aunque los 21 días es el tiempo idóneo donde ya estarían expresados todos los mecanismos celulares para realizar de manera óptima el ensayo. La formación de la monocapa es imprescindible para que se pueda realizar el estudio de permeabilidad, ya que se asegura una barrera homogénea y reproducible para el paso de sustancias en dirección apical-basolateral.

5. CONCLUSIONES

1. El estudio *in silico* permitió evaluar la potencialidad biológica de los péptidos de pajuro antes y después de la digestión gastrointestinal. Todos los péptidos analizados mostraron secuencias con capacidad para ejercer diferentes actividades, sin resultar tóxicos para el organismo.

2. Los péptidos de pajuro YPSY, AALWE, CCGDYY, DGLGYY, MFTGPY y SQLPGW presentaron actividad antioxidante, mediada por la capacidad para neutralizar radicales peroxilo debida a la presencia de aminoácidos aromáticos en su secuencia.

3. Tras la digestión gástrica simulada, la actividad antioxidante del péptido MFTGPY aumentó de forma notable, disminuyendo ligeramente tras la fase intestinal. En el caso de los péptidos DGLGYY y CCGDYY, la actividad antioxidante disminuyó de forma progresiva durante todo el proceso digestivo.

4. El péptido CCGDYY mostró efectos citotóxicos significativos sobre la viabilidad de las células de cáncer colorrectal Caco-2 no diferenciadas, a concentraciones de 10 y 50 µM. En el caso de la viabilidad de las células diferenciadas, el péptido DGLGYY, presentó valores superiores a 100% en todas las concentraciones, presentando un posible efecto protector sobre las células.

5. Las condiciones del ensayo empleadas en el estudio garantizaron la correcta diferenciación de las células Caco-2, sirviendo como punto de partida para la evaluación de la biodisponibilidad los péptidos de pajuro.

6. La combinación de las estrategias *in silico* e *in vitro* permiten abordar de forma integrada el estudio de la multifuncionalidad y biodisponibilidad de los péptidos procedentes de la proteína de pajuro.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agencia española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2019). Informe sobre legumbres, Nutrición y salud. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2017/Informe_Legumbres_Nutricion_Salud.pdf.

Amigo-Benavent, M., Clemente, A., Caira, S., Stiuso, P., Ferranti, P. y Castillo, M. D. (2014). Use of phytochemomics to evaluate the bioavailability and bioactivity of antioxidant peptides of soybean β-congycinin. Electrophoresis, 35, 1582- 1589.

Araujo, V. A. (2005). Estudio taxonómico e histológico de especies del género *Erythrina* L. (Fabaceae) (Tesis Doctoral). Universidad de San Marcos, Lima.

Aune, D., De Stefani, E., Ronco, A., Boffeta, P., Deneo-Pellegrini, H. y Mendilaharsu, M. (2009). Legume intake and the risk of cáncer: a multisite case-control study in Uruguay. Cancer Causes y Control, 20 (9), 1605-16015.

Bärh, M., Fechner, A., Krämer, J., Kiehntopf, M. y Jahreis, G. (2013). Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL Cholesterol ratio in hypercholesterolemics adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossoverstudy. Nutrition Journal, 12 (1), 107-115.

Banan-Mwine, E., Deog, H. y Byong, L. (2017). Bioactive Peptides. MDPI Foods, 6, 2-22.

Bautista, S. (2019). Obtención de un ingrediente multifuncional a partir de lentejas mediante fermentación e hidrólisis enzimática a pH controlado dirigido al control del síndrome metabólico (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Best, D., Lara, P., Aguilar, E., Cen, F., Ku, J. y Sangines, J. (2017). *In vivo* digestibility and nitrogen balance in sheep diets with foliage of fodder trees in substitution for soybean meal. Agroforestry Systems, 91 (6), 1079-1085.

Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D. y Byong, L. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. Food Chemistry, 145, 34-40.

Bray, T. M. (2000). Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress, Nutrition: 16, 578-81.

Castillo, Y., Betancur, E., Segura, D. A. y Rubí, M. (2015). Proteínas de Mucuna pruriens con potencial de inhibir el sistema Renina-Angiotensina. Revista Latinoamericana de Hipertensión, 10 (1), 123-131.

Chen, H. M., Muramoto, K. Y Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidant peptides from soybean β-conglycinin. Journal Agriculture Food Chemestry, 43, 574-578.

Cogollo-Carvajal, A., Restrepo-Múnera, L., y Ruiz-Correa, A. (2016). Caracterización de diferentes cepas de células Caco-2 para su uso en ensayos de permeabilidad in vitro. Revista Cubana de Farmacia, 50 (3), 236-241. Recuperado de: http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/38/42.

Cubillos, C. (2000). Desarrollo de nuevas estrategias de vacunación frente al virus de la fiebre aftosa basada dn péptidos sintéticos (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Delgado-Andrade, C., Olías, R., Jiménez-López, J. C. y Clemente, A. (2016). Aspectos de las legumbres nutricionales y beneficios para la salud humana. Arbor, 192, 779.

Delgado, J. N. (2014). Evaluación de harinas de Chachafruto (*Erythrina edulis*) y Quinua (*Chenopodium Quinoa* W) como extensoresen el proceso deelaboración de salchichas tipo Frankfurt (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A. y Swieca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. Food Chemistry, 141 (3), 2177-2183.

Dziuba, J., y Iwaniak, A. (2006). Database of protein and bioactive peptide. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. CRC Press, 97, 543-564.

Escamillo, S. (2012). El pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. Investigaciones sociales, 16 (28), 16-20.

Fernández-Tomé, S., Sanchón, J., Recio, I. y Hernández-Ledesma, B. (2018). Transepithelial transport of lunasin an derived petides: Inhibitory effcts on the gastrointestinal cáncer cells viability. Journal of Food Composition and Analysis, 68, 101-110.

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). (2017). Food Outlook: Biannual report on global food markets. Disponible en: chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbdfmadadm/http://www.fao.org/3/i3751e/i3751e.pdf.

Fundación Universitaria Iberoamericana (FUNIBER). (2020). Composición nutricional. Disponible en: https://www.composicionnutricional.com/.

García, M. C., P. Puchalska, P. y Esteve, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. Talanta, 106, 328-349.

García-Mora, P., Frías, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczkowski, W., Zielinska, D. y Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities form pinto biean *(Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. Journal of Functional Foods, 18 (A), 319-332.

García-Rubia, G. (2016). Hidrofobicidad y anfipatía de hidrofobicidad. Disponible en: http://ingenieria-proteinas.blogspot.com/2016/07/hidrofobicidad-y-antipatia-de.html

Girón-Calle, J., Alaiz, M. y Vioque, J. (2010). Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and *in vitro* bioavailability. Food Research International, 43 (5), 1365-1370.

González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., y Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestión of germinated soybean proteins inhibit human colon cáncer cells proliferation and inflammation. Food Chemestry, 242, 78-82.

Guerra-Almonacid, C. M., Torruco-Uco, J. C., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. J. y Rodríguez-Miranda, J. (2019). Efecto del pretratamiento con ultrasonido sobre la capacidad antioxidante y la actividad antihipertensiva de los péptidos bioactivos obtenidos de los hidrolizados de proteínas de *Erythrina edulis*. Emirates Journal of Food & Agricultura, 31 (4), 120-131.

Gül Akıllıoglu, H. y Karakaya, S. (2009). Effects of heat treatment and *in vitro* digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. European Food Research and Technology, 229, 915 - 921.

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R.. y Raghava, G. P.(2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. PLoS One, 8 (9), e73957.

Herlina, T., Mardianingrum, R., Gaffar, S. y Supratman, U. (2017). Isoquinoline alkaloids from *Erythrina poeppigiana* (Leguminosae) and cytotoxic activity against breast cancer cells line MCF-7 *In Silico*. In Journal of Physics: Conference Series, 812 (1), 012091.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., y Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolyzates from α-lactalbumin and β-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 588-593.

Hernández-López, M. V., García-Ruelas, M. Aguirre-Ponce, A., Santiago-Reyes, R., Tovar-Pérez, J., Almanza-Pérez, J. y Reyes-Bautista, R. (2015). Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv bayo azteca fuente de péptido con capacidad para inhibir la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México.

Herrera-Ponce, A. L., Alarcón-Rojo, A. D., Salmerón, I. y Rodríguez-Figueroa, J. C. (2019). Efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero en la salud: una revisión. Revista Chilena de Nutrición, 46 (2), 89-94.

Indiano-Romacho, P., Fernández-Tomé, S., Amigo, L. y Hernández-Ledesma, B. (2019). Multifuncionalidad de lunasina y péptidos liberados durante su digestión gastrointestinal simulada. Food Research International, 87, 145-152.

Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Zavaleta, A. I., Arnao, I., Peña, C., Chávez-Hidalgo, E. L. y Hernández-Ledesma, B.(2016). *Erythrina edulis* (Pajuro) Seed protein: A new source of antioxidant peptides. Natural Product Comumunications, 11, 1 – 6.

Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K. Guzmán, F., Alvarez, C. A., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V. y Hernández-Ledesma, B. (2018). Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of *Erythrina edulis* (pajuro) protein. Society of Chemical Industry, 99 (5), 2420-2427.

Intiquilla, A., Indiano-Romacho, P., Jiménez-Aliaga, K., Izaguirre, V., Zavaleta, A., Amigo, L. y Hernández-Ledesma, B. (2018). Multifunctionality and bioavailability of peptides derived

from *Erythrina edulis* (pajuro) protein. Second International Conference on Food Bioactives and Health. Lisboa, Portugal.

Inoue, N., Nagao, K., Sakata, K., Yamano, N., Gunawardena, P. E., Han, S-Y., Matsui, T., Furuta, H., Takamatsu, K. y Yanaguita, T. (2011). Detección de dipéptidos hipotrigliceridémicos derivados de proteínas de soja *in vitro* e *in vivo*. Lipids in Health and Disease, 10 (85), 365-373.

Jiménez, G., Mendoza, G., Soto, L. y Alayon, A. (2015). Evaluation of local energy sources in milk production in a tropical silvopastoral system with *Erythrina poeppigiana*. Tropical animal health and production, 47(5), 903-908.

Lammi, C., Zanoni, C., Arnoldi, A. y Aiello, G. (2018). YDFYPSSTKDQQS (P3), a peptide from lupin protein, absorbed by Caco-2 cells, modulates cholesterol metabolism in HepG2 cells via SREBP-1 activation. Revista de bioquímica alimentaria, 43 (1), e12524. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jfbc.12524

Lammi, C., Aiello, G., Boschin, G. y Arnoldi, A. (2019). Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food- derived peptides. Journal of Functional Foods, 55, 135-145.

Li, H. y Aluko, R. E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemestry, 58, 11471-11476.

Liu, R., Zheng, W., Li, J., Wang, L., Wu, H., Wang, X. y Shi, L. (2015). Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Mactra veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry. Food Chemistry, 167 (15), 484-489.

Llamas, F. y Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): Una síntesis de los usos y de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia lo largo del tiempo. AmbioCiencias, 14, 5-18.

Luna-Vital D.A., González de Mejia E. y Loarca-Piña G. (2016). Dietary peptides from the nom-digestible fraction of *Phaseolus vulgaris* L. decrease angiotensin II-dependent proliferation in HCT116 human colorectal cancer cells through the blockade of the renin-angiotensin system. Food & Function, 7, 2409-2419.

Lunde, M. S. H, Hjellset, V. T., Holmboe-Ottesen, G. y Hostmark, A. (2011). Variations in postprandial blood glucose responses and satiety after intake of three types of bread. Journal of Nutrition and Metabolism, 1, 2-7.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. y Lima, J. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 613 (1), 1-9.

Maisuthisakul, P., Pasuk, S. y Ritthiruangdej, P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. Journal of Food Composition and Analysis, 21(3), 229-240.

Mamani, E. (2014). Efecto de la harina de hojas de Pisonay (*Erythrina* sp) en la coloracion de la yema de huevo en gallinas de postura (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Altiplano-Puno, Perú.

Margatan, W., Ruud, K., Wang, Q., Markowski, T. y Ismail, B. (2013). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of soy protein subjected to selective hydrolysis and thermal processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (14), 3460-6467.

Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B. y FitzGerald, R. J. (2006). ACE inhibitory peptides. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. CRC Taylor & Francis Group, 269-315.

Minekus, M., Alminguer, M., ALvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Bputrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, N. C., Singh, R. P., Vegarud, E. G., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. y Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion mtehod suitable for food an international consensus. Food and Function, 5, 11-13.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAGRAMA). (2019). Leguminosas de grano y oleginosas. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAGRAMA). (2019). Informe del consumo alimentario en España 2018. Disponible en:

https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/.

Mojica, L., Chen, K. y González, E. (2014). Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin–pancreatin hHydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. Journal of Food Science, 80 (1), 188-198.

Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. y Cuadrado, C. (2013). Tablas de composición de Alimentos. Guía de prácticas. Madrid: Editorial Pirámide, (16ºed.).

Morel, F. B., Dai, Q., Ni, J., Thomas, D., Partnet, P. y Fanca-Berthon, P. (2015). Galacto-oligosaccharides dose-dependently reduce appetite and decrease inflammation in overweight adults. Journal of Nutrition, 145 (9), 2052-2059.

O'Keeffe, M. B., Norris, R., Alashi, M. A., Aluko, R. E., y FitzGerald, R. J. (2017). Peptide identification in a porcine gelatin prolyl endoproteinase hydrolysate with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and hypotensive activity. Journal of Functional Foods, 34, 77-88.

Olagunju, A. I., Omoba, O. S., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M. y Aluko, R. E. (2018). Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An *in vitro* study. Food Science Technology, 97, 269-278.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. y Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4619-4626.

Papanikolaou, Y. y Fulgoni, V. L. (2008). Bean Consumption is associated with greater nutrient intake, reduced systolic blood pressure, lower body weight, and a smaller waist circumference in adults: Results from the National health and nutrition examination survey 1999-2002. Journal of the American College of Nutrition, 27 (5), 569-576.

Park, J. H., Jeong, Jeong, H. J. y de Lumen, B. O. (2007). *In vitro* digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. Journal of Agricultural and Food Chemestry, 55 (26), 10703-10706.

Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M. E. y Molina-Torres, J. (2003). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. Acta Farmacéutica Bonaerense, 23 (2), 252-258.

Pownall T. L., Udenigwe C. C. y Aluko R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate Fractions. Journal of Agricultural of Food Chemestry, 58, 4712-4718.

Pownall, T. L., Udenigwe, C. C. y Aluko, R. E. (2011). Effects of cationic property on the *in vitro* antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. Food Research International, 44 (4), 1069-1074.

Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L. y Recio, I. (2005). Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de péptidos derivados del kéfir de caprina. Journal of Dairy Science, 88, 3480-3487.

Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y el Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos, (2007). Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32011R1169.

Rodrigues-Marques, M., Cerda, A., Guadagnucci, G., Carvalho, D., Manólio, R., Hiroyuki, M., Dominguez, R. y Gomes, J. A. (2018). Transport of cowpea bean derived peptides and their modulator effects on mRNA expression of cholesterol-related genes in Caco-2 and HepG2 cells. Food Research International, 107, 165-171.

Rui, X., Boye, J. I., Simpsons, B. K. y Prasher, S. O (2013). Purification and characterization of angiotensinI-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. Journal of Functional Foods, 5 (3), 1116-1124.

Sánchez, A. y Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. Food Quality and Safety, 1, 29-46.

Sánchez, K. (2018). Efecto de dietas con recursos forrajeros no convencionales sobre parámetros productivos de conejos Nueva Zelanda blanco (*Oryctolagus cuniculus*) bajo produccion de agricultura familiar en Silvania (Cundinamarca) (Trabajo fin de grado). Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá (Colombia).

Santhiya, N., Priyanga, S., Hemmalakshmi, S. & Devaki, K. (2016). Phytochemical analysis, Anti inflammatory activity, *in vitro* antidiabetic activity and GC-MS profile of *Erythrina variegata* L. bark. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6 (7), 147-155.

Santos, W., Da Silva, A., Santos, C., Santana, A. y Marcal, R. (2012). *In vitro* and *ex vivo* anticholinesterase activities of *Erythrina velutina* leaf extracts. Pharmaceutical Biology, 50 (7), 919-924.

Sarwat, S. y Ahmad, N. (2012). Screening of potential medicinal plants from district sawat specific for controlling women diseases. Pakistan Journal of Botany, 44 (4), 1193-1198.

Schisano, C., Narciso, V., Maisto, M., Annunziata, G., Grieco, P., Sommella, E. M., Tenore, G. C. y Novellino, E. (2019). *In vitro* effects of protein fractions from Controne beans (*Phaseolus vulgaris* L. ecotype Controne) on intestinal permeability, ACE and α-amylase activities. European Food Research and Technology, 20, 345-356. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s00217-019-03338-5.

Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. y Bentacur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidadde péptidos con actividad biológica. Revista Chilena de Nutrición, 37 (3), 386-390.

Shamloo, M., Eck, P. y Beta, T. (2015). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from cereals. Journal of Human & Food Science, 3 (1), 1057-1060.

Singh, B. P. y Vij, S. (2018). *In vitro* stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. Food Science and Technology, 91, 303-307.

Sirtori, C. R, Triolo, M., Bosisio, R., Bondioli, A., Calabresi, L., De Vergori, V., Gomaraschi, M., Mombelli, G., Pazzucconi, F., Zacheri, C. & Arnoldi, A. (2012). Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. British Journal of Nutrition, 107 (8), 1176-1189.

Solano, E. S. (2017). Modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* para la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y quelantes de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Sudiono, J., Sandra, F., Saputri, N., Kadrianto, T. y Melinia, M. (2013). Bactericidal and cytotoxic effects of *Erythrina fusca* leaves aquadest extract. Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi, 46 (1), 9-13.

Tingal, K. L. (2019). Influencia de los diferentes valores de pH y la concentración de proteína en la determinación de las propiedades tecnofuncionales de la harina de pajuro (*Erythrina edulis*) (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca..

Torres-Fuentes, C., Contreras, M. M., Recio, I., Alaiz, M. y Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chemistry, 180, 194-202.

Udenigwe, C. C. y Mohan, A. (2014). Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. Journal of Functional Food, 8, 45-52.

Vázquez, J. Y. (2019). Leguminosas (Fabaceae): características, hábitat, cultivo, usos. Disponible en: https://www.lifeder.com/leguminosas-fabaceae/

Velarde, A. J. (2015). Caracterización de péptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa (DPPIV) encriptados en las proteínas de las semillas de amaranto (Tesis Doctoral). Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, San Luis Potosí.

Velásquez, L. F., Montoya, D. F., Jiménez, A. A., Murillo, W. y Méndez, J. J. (2019). Género *Erythrina*: Actualidad en la investigación y perspectivas de desarrollo científico. Colombia: Universidad de Tolima, ISBN: 978-958-5569-03-4.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Decroos, K., Van Wijmelbeke, L. y Verstraete, W. (2003). The impact of fermentation and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. Journal of Dairy Science, 86 (2), 429-438.

Vermeirssen, V., Augustijns, P., Morel, N., Van Camp, J., Opsomer, A. y Verstraete, W. (2009). *In vitro* intestinal transport and antihypertensive activity of ACE inhibitory pea and whey digests. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56 (6), 415-430.

Villafuerte, F., Pérez, E., Mahfoud, A., Valero, Y. y Pérez, A. (2019). Obtaining protein products low in phenylalanine from milk whey and chachafruto (*Erythrina edulis* -Triana). ALAN, 69 (1), 25-33.

Vioque, J., Sánchez, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. y Millán, F. (2000). Péptidos en proteínas de reserva. Grasas y Aceites, 51 (5), 361-365.

Vizcardo, D. L., y Zavala, J. C. (2016). Péptidos bioactivos: pequeños gigantes en salud. Revista Sociedad Peruana Medicina Interna, 29 (4), 150-155.

Wardani, A., Mun' im, A. y Yanuar, A. (2018). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase of selected indonesia medicinal plants and isolation of the inhibitor from *Erythrina variegata* L. leaves. Journal of Young Pharmacists, 10 (2), 169-171.

Xue, Z., Wen, H., Zhai, L., Yu, Y., Li, Y., Yu, W., Cheng, A., Wang, C. y Kou, X. (2015). Antioxidant activity anti-proliferative effct of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Food Research International, 77 (2), 75-81.

Yea C.S., Ebrahimpour A, Hamid A.A., Bakar J., Muhammad K. y Saari N. (2014). Winged bean [*Psophorcarpus tetragonolobus* (L.) DC] seeds as an underutilized plant source of bifunctional proteolysate and biopeptides. Food & Function, 5, 1007-1016.

Yili, A., Ling, M.Q., Bo, Z., Asrorov, A. S., Oshchepkova, Y. I. y Aisa, H. A. (2012). Nuevo péptido a partir de semillas de *Cicer arietinum*. Chemistry of Natural Compounds, 47, 959–962.

Zhu, Y. P., Fan, J. F., Cheng, Y. Q. y Li, L. T. (2008). Improvement of the antioxidant activity of chinese traditional femented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. Food Control, 19 (7), 654-661.

Tabla S1. Bioactividades descritas para las especies *E. fusca, E. crista-galli, E. poeppigiana, E. variegata* y *E. velutina*

Especie	Parte de la planta	Bioactividad	Compuestos bioactivos	Referencia
E. fusca	Hoja	Antimicrobiana	Taninos	Vivot y col., 2012
	Flor	Antitusiva	---	Bipat y col., 2016
	Hoja	Citotóxica	Faseolidina	Sudiono y col., 2013
E. crista-galli	Hoja	Antimicrobiana	Fenoles	Sarwat y Ahmad, 2012
	Hoja	Antioxidante	Flavonoides, fenoles y vitamina C	Maisuthisakul y col., 2008
E. poeppigiana	Hoja	Estrogénica	Isoflavonoides	Njamen y col., 2013
E. variegata	Hoja	Antimicrobiana	Fenoles	Sudiono y col., 2013
	Raíz y corteza	Anticonvulsionante	---	Chinchawade y col., 2013
	Hoja	Citotóxica	Alcaloides	Herlina y col., 2017
	Hoja	Antiviral	Apigenina-7-O-β-D-glucopiranósido	Wardani y col., 2018
	Corteza	Antioxidante	Flavonoides y fenoles	Santhiya y col., 2016
E. velutina	Corteza	Antimicrobiana	Flavonoides	Gomes y col., 2016
	Hoja	Anticolinesterásica	Alcaloides	Santos y col., 2012
	Hoja	Citotóxica	---	Craveiro y col., 2008; Ozawa y col., 2009
	Semilla	Aglutinante	Inhibidor de tripsina	Machado y col., 2013

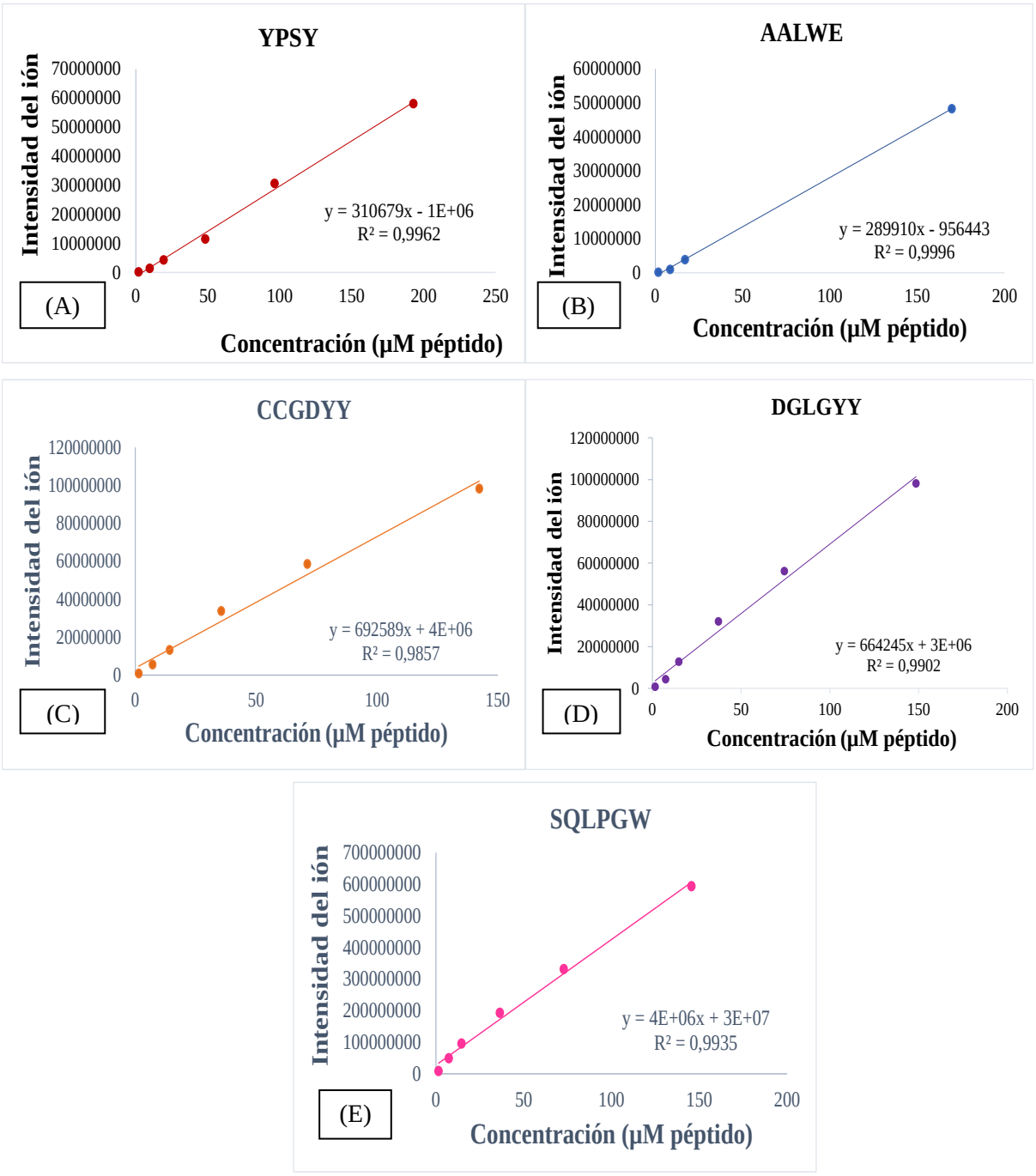


Figura S2. Representación de la intensidad del ión con respecto a la concentración de los péptidos (A) YPSY; (B) AALWE; (C) CCGDYY; (D) DGLGYY; (E) SQLPGY

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UAM
Universidad Autónoma de Madrid

ANEXO AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO

SOLICITUD DE PRÁCTICAS / TRABAJOS FIN DE MÁSTER

Curso: 2019-20

La Universidad Autónoma de Madrid conforme a lo establecido en la cláusula segunda. 2) del citado convenio, solicita al CSIC la realización de prácticas y/o trabajos de fin de Máster por parte del alumnado abajo consignado, según los contenidos del convenio de colaboración citado, firmado el 11 de noviembre de 2014, del que el presente documento es anexo inseparable, y en los siguientes términos:

1. Denominación del programa de Máster:	Máster en Nuevos Alimentos
2. Instituto del CSIC donde se desarrollarán las actividades:	CSIC - CIAL Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Dpto de Bioactividad y Análisis de Alimentos
3. Coodinador/a del Máster de la Universidad:	
4. Tutor/académico de la Universidad:	Diana Martin Garcia Departamento de Química Física Aplicada diana.martin@uam.es
5. Organizador/a del Máster del CSIC:	
6. Responsable de prácticas/trabajo fin de Máster del CSIC:	Blanca Hernández Ledesma / Lourdes Amigo Garrido Bioactividad y Análisis de los Alimentos 910017970 / 910017939 b.hernandez@csic.es / lourdes.amigo@csic.es
7. Finalidad de las actividades:	Desarrollo de Trabajo de Fin de Máster. Estudio de la biodisponibilidad de péptidos derivados de proteínas vegetales (pajuro->E.Edulis). -Simulación de digestión gastrointestinal bajo condiciones fisiológicas in vitro. -Manejo de cultivos celulares y

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID - Facultad de Ciencias - Sección de Prácticas Externas

	su aplicación para el ensayo de biodisponibilidad. -HPLC-MSIMS para la identificación de péptidos derivados del proceso de digestión y absorción intestinal.
8. Objetivos programáticos y actividades previstas:	**Desarrollo de Trabajo de Fin de Máster.-Aplicar los conceptos, principios y teorías adquiridos en el Máster en el campo de la** investigación e innovación tecnológica.-Capacidad de razonamiento, análisis crítico y síntesis de ideas nuevas para la elaboración de nuevos alimentos, abarcando niveles más integradores, como los vinculados a la biodiversidad y el medio ambiente.-Capacidad para buscar, analizar y gestionar información para planificar un trabajo experimental, desarrollo científico y plan de investigación.
9. Sistemas de evaluación y control:	Regulado en la guía docente de la asignatura
10. Duración de las actividades:	Del 11 de febrero de 2020 al 7 de julio de 2020
11. Horario de las actividades:	De 09:00 a 18:00 Horas diarias: 7
12. Nº total de horas	500
13. Cuantificación de la previsión del gasto en el que incurrirá eventualmente el instituto del CSIC	0

Nombre y apellidos del estudiante:	DNI/NIE:	Curso:	Teléfono:	Fecha de nacimiento:	Máster:
Sara Díaz de la Cruz	03925203T	1	662205012	27/01/1995	Máster en Nuevos Alimentos

Lo que se firma, por duplicado ejemplar, en Madrid a 6 de febrero de 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Sección de Prácticas Externas

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Marin Martin, Francisco Ramon

Firmante del Anexo TFEPE

Autorizado por el/la director/a del

Instituto del CSIC

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UAM
Universidad Autónoma
de Madrid

ANEXO II AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO.

El presente anexo se incorpora al convenio suscrito entre las citadas entidades con fecha 19 de diciembre de 2014. El alumnado abajo firmante y que se recoge en el anexo I firmado el 6 de febrero de 2020 , del citado convenio, ha leído y acepta las condiciones y compromisos establecidos en dicho convenio y declara su conformidad para realizar las prácticas y/o trabajos de fin de Máster en el CSIC, según los términos recogidos en el anexo I del mismo

Firma del/de la alumno/a

Sara Díaz

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Sección de Prácticas Externas

Fdo.: Sara Díaz de la Cruz

DNI: 03925203T

ANEXO 2

COMITÉ de ÉTICA de la INVESTIGACIÓN UAM

Solicitud de evaluación por el Comité de Ética de la Investigación (CEI-UAM) para trabajos de investigación en el ámbito docente

De acuerdo con el Reglamento del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, los trabajos de investigación que se realicen en el ámbito docente (lo que incluye Trabajos Fin de Grado y Trabajos Fin de Master, entre otros posibles) deben solicitar la evaluación de dicho Comité cuando la investigación implique a seres humanos o la utilización de muestras de origen humano, la obtención y el tratamiento de datos de carácter personal, la experimentación animal y la utilización de agentes biológicos de riesgo u organismos modificados genéticamente, de conformidad con lo establecido en la legislación vigente. Dichos trabajos, en el momento de ser solicitados o adjudicados (según especifique cada titulación), deberán presentar (junto con la documentación solicitada en cada caso) el presente documento debidamente cumplimentado.

CURSO: Máster

TÍTULO DEL TRABAJO: NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS VEGETALES

TIPO DE TRABAJO (especificar TFG, TFM u otro) Y TITULACIÓN:
TRABAJO FIN DE MÁSTER. MÁSTER EN NUEVOS ALIMENTOS

Indicar si la propuesta contempla alguno/s de los siguientes aspectos:

A: Investigación con seres humanos o uso de datos personales..... SI ☐ NO ☒
B: Utilización de muestras biológicas humanas o información genética.. SI ☐ NO ☒
C: Experimentación animal..... SI ☐ NO ☒
D: Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o para las plantas .. .. SI ☒ NO ☐
E: Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)..... SI ☐ NO ☒

En caso de haber contestado afirmativamente a uno o más ítems, indicar si el trabajo se hace dentro de un Proyecto de Investigación más amplio que cuenta con la aprobación del CEI y, si es así, especificar título del proyecto, Investigador Principal y fecha de aprobación por el CEI-UAM:

EL PROYECTO DE TFM ESTA ENGLOBADO DENTRO DEL PROYECTO AGL2015-66886-R. SE SOLICITARA LA APROBACIÓN POR PARTE DEL CEI-UAM.

ANEXO 2

Si el trabajo de investigación no se enmarca en un Proyecto ya aprobado, se ha de adjuntar una breve memoria que incluya las actividades a realizar, incluyendo la metodología y el material –en su caso- que se va a utilizar. Además, se adjuntará la siguiente **documentación**:

- **En el supuesto A,** si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado que se utilizará, donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si la investigación es retrospectiva se deberá establecer un compromiso de confidencialidad sobre los posibles datos identificativos de los participantes. En cualquier caso, se detallará si los datos o el material obtenido serán anonimizados o codificados y cómo se custodiarán. También deberá indicarse el modo de reclutamiento de los participantes. Si se trata de experimentación clínica se debe adjuntar el informe del Comité de Ética del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación, señalando la extensión de esta autorización (usos restringidos al proyecto, o para otros usos relacionados).
- **En el supuesto B** si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado a utilizar donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si la investigación es retrospectiva deberá presentarse la autorización del uso de las muestras, que deberán tratarse de forma anónima, a menos que se justifique adecuadamente la necesidad del tratamiento de forma no anónima, en cuyo caso se necesitará consentimiento informado y documento de confidencialidad.
- **En el supuesto C** se deberá adjuntar el Informe del Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) y, en su caso, del Órgano Habilitado.
- **En el supuesto D** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. Asimismo, se deberán enumerar los agentes biológicos a utilizar y describir las medidas de contención del laboratorio donde se van a realizar los trabajos.
- **En el supuesto E** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. Se debe declarar la categoría de riesgo de los OMGs empleados y su procedencia, así como los organismos receptores y donantes empleados y los vectores utilizados.

Nombre y Apellidos del estudiante: SARA DÍAZ DE LA CRUZ
Nombre y Apellidos del Director: BLANCA HERNANDEZ LEDESMA
Nombre y Apellidos del Tutor (si el Director es externo): DIANA MARTIN
Departamento: BIOACTIVIDAD Y ANALISIS DE ALIMENTOS
Centro: CIAL, CSIC-UAM
Teléfono: 91-0017970
Correo electrónico: b.hernandez@csic.es

Firma del estudiante

Sara Díaz

Firma(s) del Director y del Tutor (en su caso)

Blanca H.

DIANA MARTÍN (TUTO

Fecha: 26/12/2019.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

INFORME DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN NUEVOS ALIMENTOS

CURSO ACADÉMICO: 2019-2020

CONVOCATORIA: ■ **Ordinaria** ☐ **Extraordinaria**

ESTUDIANTE:

Apellidos Díaz de la Cruz Nombre Sara

TÍTULO DEL TFM:

Estudio bibliográfico y experimental sobre la biodisponibilidad y bioactividad de péptidos de leguminosas.

TÍTULO EN INGLÉS:

Bibliographic and experimental study on the bioavailability and bioactivity of legume peptides.

DIRECTOR

Apellidos Hernández Ledesma Nombre Blanca

Codirector: Apellidos Amigo Garrido Nombre Lourdes

TUTOR (si aplica)

Apellidos Martin García Nombre Diana

INFORME PARA EL TRIBUNAL

La firma del presente documento avala que la dedicación del estudiante ha sido adecuada a los ECTS del TFM, y que los resultados presentados en la memoria del TFM han sido generados por el autor de la misma.

Cantoblanco a 23 de junio de 2020

EL DIRECTOR	EL CODIRECTOR	EL TUTOR	EL ESTUDIANTE
Fdo.: Blanca Hernández	Fdo.: Lourdes Amigo	Fdo.: DIANA MARTÍN	Fdo.: Sara Díaz

Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
28049 Madrid