



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Capacidad Antioxidante Total Sérica y Niveles de Malondialdehído en
Ratas Alimentadas con Gelatina de Co-Productos del Calamar Gigante**
(Dosidicus gigas)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.A. Jesús Enrique Chan Higuera

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

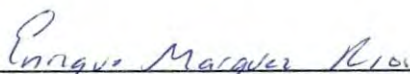
APROBACIÓN

Capacidad Antioxidante Total Sérica y Niveles de Malondialdehído en Ratas Alimentadas con Gelatina de Co-Productos de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

Q. A. Jesús Enrique Chan Higuera



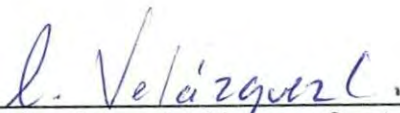
Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer
Directora de Tesis



Dr. Enrique Márquez Ríos
Sinodal



Dr. Armando Burgos Hernández
Sinodal



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Sinodal

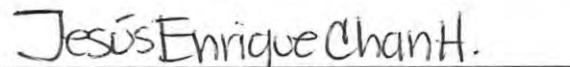
DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador de Programa del Posgrado.

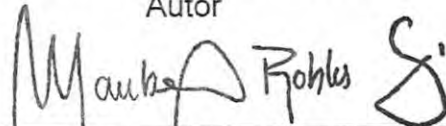
Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente



Q. A. Jesús Enrique Chan Higuera

Autor



Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez
Coordinadora del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por su formación académica a lo largo de mis estudios de Licenciatura y Maestría, así como a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos y a todos en el que él laboran, especialmente a María del Socorro Favela (Coty) y Laura Urías, por hacer de mi estancia amena y afable

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por apoyar el proyecto "Interpretación molecular entre péptidos funcionales de colágeno con quitosano: mecanismo de incorporación y caracterización molecular del colágeno de *Dosidicus gigas*" (Clave 154046)

A mi directora de tesis, la Dra. Marina Ezquerro, quien me brindó su apoyo incondicional en todo momento, sin el cual este trabajo de investigación no hubiera podido ser realizado

Al comité de tesis, los Dres. Enrique Márquez, Armando Burgos y Carlos Velázquez, por su asesoría, además de sus observaciones y comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo

A la Dra. Maribel Robles, por su disposición permanente y sus excelentes recomendaciones; al Dr. Humberto Astiazarán y al M. en C. Rafael Canett, por compartir su conocimiento acerca de la investigación en modelos animales

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, en especial a la M. en C. Alondra Cuevas

A mis amigas, la M. en C. Fernanda Amaya y la Q. B. C. Raquel Ortiz, con todo mi cariño y afecto

DEDICATORIA

A Óscar y María Teresa

A María Trinidad, Óscar Francisco y Ana Luisa

A Bo, La, Tiff y Queenah

RESUMEN

La evaluación de la actividad antioxidante de proteínas e hidrolizados de los desechos de la pesca representa un campo de investigación importante en el ámbito de la química de los alimentos. A pesar de esto, no existe un estudio enfocado en el efecto que tenga la suplementación dietética de estas proteínas en un modelo *in vivo*. En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de las gelatinas de aletas, brazos y piel del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su impacto sobre dos biomarcadores séricos: la capacidad antioxidante total y la concentración de malondialdehído. La actividad antioxidante aumentó significativamente ($p < 0.05$) cuando la gelatina fue fraccionada por enzimas que simulaban la digestión que se lleva a cabo en el organismo, en comparación con la proteína nativa. La capacidad antioxidante sérica total fue igual entre los tres grupos de ratas alimentados con gelatina y el control, sin embargo, la concentración de malondialdehído se vio disminuida con respecto al control en los tres grupos suplementados con proteína de origen marino.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
RESUMEN	vi
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Calamar Gigante	2
Reproducción y Migración	2
Alimentación y Depredación	3
Anatomía General	3
Calamar como Producto de Consumo	5
Colágeno	8
Estructura	8
Funcionalidad	9
Gelatina	11
Antioxidantes	12
Estrés Oxidativo	13
Ataque a Proteínas	14
Ataque a Ácidos Nucleicos	16
Ataque a Lípidos	17
Malondialdehído y su rol en el deterioro celular	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23

MATERIALES Y MÉTODOS	24
Extracción de Gelatina de los Co-Productos del Calamar Gigante	24
Materia Prima	24
Proceso de Extracción	24
Contenido de Proteína	26
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
Perfil de Aminoácidos	27
Digestibilidad <i>in vitro</i> y Obtención de los Productos de Digestión	27
Actividad Antioxidante	28
Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC)	28
Capacidad de Neutralización de Radicales Oxígeno (ORAC)	30
Bioensayos	32
Malondialdehído Sérico	34
Análisis Estadístico	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Obtención de Gelatina	36
Perfil Electroforético	40
Perfil de Aminoácidos	42
Actividad Antioxidante	45
Digestibilidad <i>in vitro</i>	47
Productos de Digestión	49
Actividad Antioxidante	51
Bioensayo de Intervención con Gelatina	54
Capacidad Antioxidante Total Sérica	56
Malondialdehído Sérico	58
Correlaciones entre las Variables de Estudio	61
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

No. Figura	Título	Página
1	Distribución del calamar gigante en las costas del Océano Pacífico	4
2	Anatomía interna del calamar gigante	6
3	Anatomía externa del calamar gigante	7
4	Esquema general de la oxidación lipídica	19
5	Producción de malondialdehído y su ataque a bases nitrogenadas	21
6	Esquema de la obtención de gelatina	25
7	Formación del radical ABTS ^{•+}	29
8	Algunos productos de la descomposición del AAPH	31
9	Organización de los animales de experimentación durante el bioensayo	33
10	Diagrama de la conversión de colágeno a gelatina	39
11	Patrón electroforético de las gelatinas de calamar gigante	41
12	Actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC y ORAC de las tres gelatinas	46
13	Porcentaje de digestibilidad de las tres gelatinas	48
14	Perfil electroforético de los productos de digestión de las gelatinas	50
15	Actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC y ORAC de los productos de digestión de las tres gelatinas	52
16	Consumo diario de gelatina y ganancia en peso semanal de los grupos de ratas	55
17	Capacidad antioxidante total de los sueros por los métodos de TEAC y ORAC	57
18	Concentración de malondialdehído sérico de los diferentes grupos de ratas	59

LISTA DE TABLAS

No. Tabla	Título	Página
1	Algunos ejemplos de especies reactivas producidas endógenamente	15
2	Rendimientos de la extracción ácido-alcalina	37
3	Perfil de aminoácidos de las tres gelatinas extraídas	43

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es una de las pesquerías más importantes en México, ocupando el quinto lugar en la lista de las especies más capturadas. De su aprovechamiento, se obtienen co-productos que son subutilizados, como son las aletas, los brazos y la piel (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2010). Una de las opciones de explotación de estas regiones anatómicas es la extracción de proteínas, como el colágeno.

El colágeno es una proteína estromal cuya función primordial es la de otorgar firmeza y soporte a los diversos tejidos donde se encuentra presente. Su estructura se forma por tres cadenas de aminoácidos entrelazadas y enrolladas en una doble hélice con giro a la derecha. El colágeno puede ser convertido por medio de un proceso térmico a gelatina, la cual es más soluble y tiene propiedades físicoquímicas, nutricionales y tecnológicas más deseables (Branden y Tooze, 1998; Szpak, 2011; Gómez-Guillén y col., 2011).

Además de las aplicaciones en la industria alimentaria, se han encontrado distintas actividades biológicas cuando la gelatina se analiza como un posible compuesto biofuncional, como actividad antiproliferativa, antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, por mencionar algunas (Alemán y col., 2011). Ésta última resulta de interés especial, ya que las enfermedades relacionadas al estrés oxidativo comienzan a despuntar a nivel mundial como la mayor causa de decesos.

La idea central del presente estudio fue la de comparar las diferencias en capacidad antioxidante en modelos *in vitro* de la gelatina a partir de las aletas, los brazos y la piel del calamar gigante, así como su impacto sobre la producción de malondialdehído y la capacidad antioxidante sérica de ratas sanas suplementadas con las tres gelatinas.

ANTECEDENTES

Calamar Gigante

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es uno de los cefalópodos más abundantes en la zona del Golfo de California. Es el calamar omastréfido más grande; su manto llega a medir 1-1.2 m de largo y pesar entre 30 y 50 kg. Prefieren aguas templadas de áreas tropicales para mantener su hábitat, siempre encontrándose dentro del Este del Océano Pacífico. Optan por regiones de alta energía oceánica donde la concentración de plancton es elevada. Son animales sociales, nadan en bancos de entre 20 y 40 animales. Alcanzan velocidades de 25 km/h o incluso mayores si el calamar se ve enfrentado con alguna amenaza. El calamar gigante se diferencia de otras especies de calamares por varias características, siendo una de las más distintivas su rápida tasa de crecimiento ya que alcanza tallas grandes en menos de 10 meses. Sin embargo, su periodo de vida es corto, el cual suele ser de aproximadamente un año (Field y col., 2007).

Reproducción y Migración

La temporada de reproducción de *Dosidicus gigas* comienza una vez que alcanza la madurez sexual. Los meses de mayor reproducción están comprendidos entre octubre y enero. El rito de apareamiento es complejo e involucra la utilización de los tentáculos y los brazos (a cuyo conjunto se le denomina coloquialmente "cabeza").

En este proceso, cuya duración oscila entre 50 s y 1 min, el macho coloca los espermatozoides en la membrana oral de la hembra para fecundarla y comience la formación de los huevos (Keyl y col., 2008).

Tiene hábitos migratorios que dependen de la etapa de desarrollo en la que se encuentre, la disponibilidad de alimento y la época del año, por mencionar algunos

factores. Su hábitat, como ya se mencionó, se encuentra distribuido únicamente en las costas este del Océano Pacífico, en aguas bentónicas y cambia a medida que las condiciones acuáticas ya no resultan favorables (Nigmatullin y col., 2001). En la **Figura 1**, se muestra un mapa con la distribución en América del calamar gigante acorde a varios autores.

Alimentación y Depredación

El calamar gigante es un depredador que caza activamente a sus presas, donde sus periodos de alimentación más provechosos comprenden desde el crepúsculo al amanecer. Los animales de los cuales se nutre cambian a medida que el animal se desarrolla y gana tamaño (una presa representa del 5 al 15 % del tamaño del calamar). De igual manera que las presas, los depredadores varían a medida que la ontogénesis progresa: calamares pequeños son atacados por atunes, otros calamares y aves marinas; los adultos por tiburones, peces espada y ballenas (Field y col., 2007).

Anatomía General

El calamar gigante se caracteriza por carecer de una coraza externa y por ser bastante activo, teniendo como método de locomoción la propulsión a chorro. Posee dos tipos de extremidades: los brazos (ocho, cubiertos enteramente por ventosas) que sirven para mantener a la presa quieta y poder llevarla a las mandíbulas, y los tentáculos (dos, con ventosas únicamente en regiones extremas conocidas como "manos") que utiliza para atraer y atrapar presas, además de cumplir con un efecto atrayente durante el apareamiento. Otro órgano útil en este rito son las aletas, las cuales baten una vez que se topan con un prospecto para reproducción. También sirven para conferirle estabilidad cuando el animal se encuentre nadando, brindándole estabilidad hidrodinámica. Con respecto al aparato digestivo, el calamar posee un par de mandíbulas terminadas en punta (pico) que conduce a

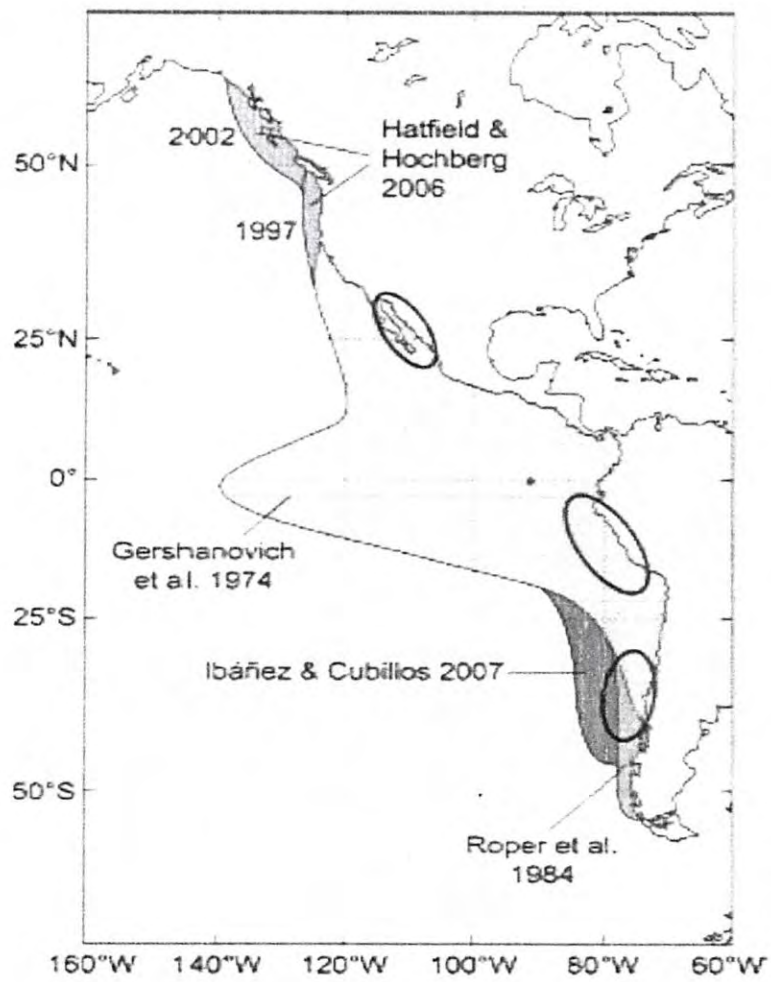


Figura 1. Distribución del calamar gigante en las costas del Océano Pacífico (Keyl y col., 2008)

la presa hacia la rádula, la cual alberga a una gran cantidad de pequeños dientes que sirven para triturar y facilitar su digestión (Boyle y Rodhouse, 2005; Rosas-Luis y col., 2008).

La anatomía interna del calamar gigante se muestra en la **Figura 2** donde se aprecian sus principales órganos. El sifón es un órgano involucrado en la propulsión a chorro, ya que se encarga de la eliminación rápida del agua que absorbe, lo que ocasiona que el animal se impulse a altas velocidades e incluso nadar contracorriente. El saco de tinta sirve para almacenar este recurso que utiliza el calamar como método de defensa cuando se siente en situaciones de estrés, como lo es un encuentro con un posible depredador. La tinta causa confusión y pérdida de visibilidad, lo que le da la oportunidad de escapar rápidamente usando la propulsión a chorro. La pluma es una estructura rígida que cumple con la función de soporte, comparable con la espina dorsal de los vertebrados, la cual queda embebida en el músculo del animal para otorgarle cierta firmeza y estructura a los órganos internos (Boyle y Rodhouse, 2005; Nigmatullin y col., 2001).

Calamar como Producto de Consumo

Como pesquería, en 2010 el calamar se posicionó en el quinto lugar en relación a toneladas capturadas. Sin embargo, en el mercado no es muy apreciado, situación que se ve reflejada en su precio y en escasas ventas (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2010). Para su aprovechamiento, la región que se aprovecha con mayor frecuencia es el manto, el cual se caracteriza por su color blanco, textura firme y generalmente carente de aromas asociados a productos marinos. De los órganos y/o extremidades que no son del todo aprovechadas (**Figura 3**), se tienen a las aletas, tentáculos y brazos. La generación de estos co-productos está también relacionada con la contaminación, ya que representan toneladas de desperdicios que algunas plantas procesadoras arrojan al mar. Una alternativa de aprovechamiento es la obtención de productos de baja calidad como alimento para animales y harina de

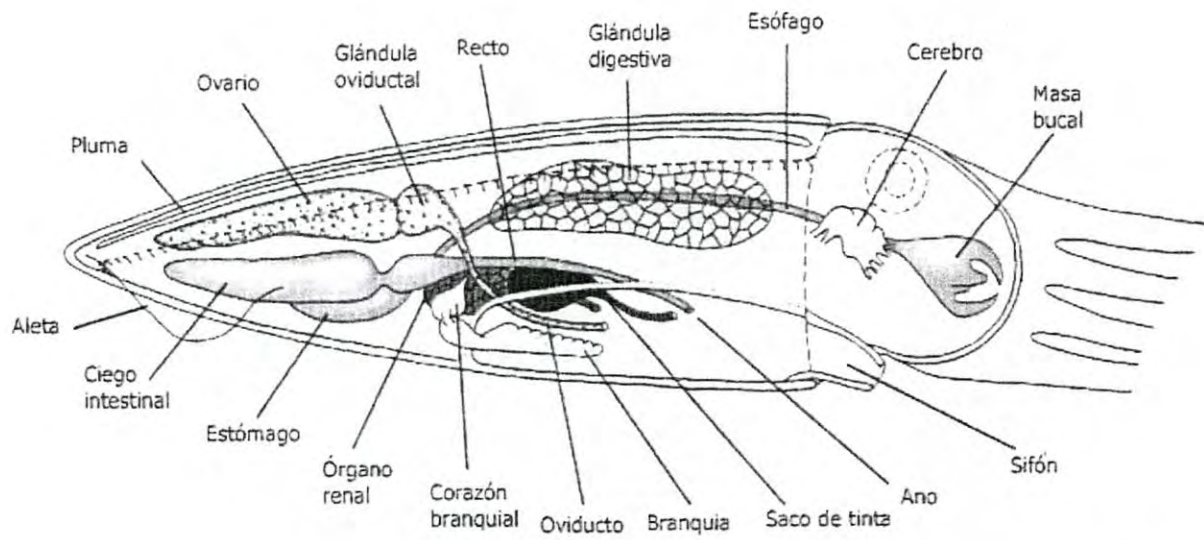


Figura 2. Anatomía interna del calamar gigante (Boyle y Rodhouse, 2005)

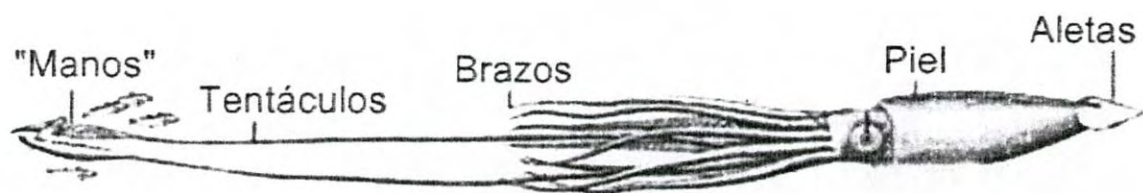


Figura 3. Anatomía externa del calamar gigante (Universidad de California, 2012)

pescado (Martínez-Álvarez y col., 2007). No obstante, estas mismas regiones anatómicas sub-aprovechadas pudieran utilizarse como materia prima en la elaboración de productos derivados que pudieran resultar de mayor interés desde el punto de vista comercial y de la investigación, como concentrados proteicos o para aislar compuestos con posible actividad biológica, como pudieran serlo las proteínas estromales o conjuntivas, dentro de ellas la más relevante es el colágeno.

Colágeno

El colágeno es una proteína fibrosa que se encarga de formar estructuras supramoleculares agregadas en el espacio extracelular y dar fortaleza a la piel y a los cartílagos. Está compuesto primordialmente por el tripéptido glicina-X-Y, donde X representa a prolina y siendo Y hidroxiprolina. Este aminoácido es formado a partir de la prolina por acción de la enzima prolil hidrolasa, representando el componente más característico del colágeno, tanto por su sola presencia como por su elevada concentración (Branden y Tooze, 1998).

Estructura

Las largas cadenas características de colágeno no son sintetizadas tal como forman parte en el músculo, sino que son pequeñas secuencias de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos (procolágeno) las que se modifican para después interactuar y reestructurarse de tres cadenas a una sola, como se observa en la figura 4. Entre cadena y cadena, se dan distintos tipos de enlaces e interacciones que le confieren rigidez a la proteína. De manera muy similar al ADN, el colágeno forma una triple hélice con giro hacia la derecha, una estructura que es mantenida a través de puentes de hidrógeno. El residuo de aminoácido más repetido en el colágeno es la glicina, cuya cadena lateral consta de solamente un hidrógeno. Para que la estructura sea la más termodinámicamente estable, la glicina está presente cada 3 residuos de aminoácidos, esto para que su pequeña cadena lateral

permanezca al interior de la hélice, permitiendo que el espacio entre cadenas sea el mínimo y su conformación sea la más compacta posible. En lo que respecta a los grupos R de prolina e hidroxiprolina, ambos están expuestos al exterior de la hélice y su presencia determina la fuerza del colágeno: en peces de aguas frías, la incidencia de estos dos compuestos es muy baja y su colágeno es menos termoestable que en aquellos peces de aguas templadas o cálidas, cuyo colágeno tiende a contar con más residuos de prolina e hidroxiprolina ya que estos residuos tienen mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno (Szpak, 2011; Branden y Tooze, 1998).

De acuerdo a ciertas características como la estructura conformacional y la función biológica, el colágeno se clasifica en formador de fibrillas, formador de redes, formador de estructuras de anclaje, colágeno transmembranal, entre otros. A su vez, el colágeno se divide en dos grandes grupos, acorde a las cadenas que forman la triple hélice: homotrímeros (tres cadenas iguales), que comprende a los colágenos de los tipos II, III, VII, VIII, X, XIII, XV, XVII, XXIII y XXV; y el de los heterotrímeros (al menos una cadena diferente), con los tipos I, IV, V, VI, IX y XI (Ricard-Blum y Ruggiero, 2005). El calamar es rico en colágenos tipo I y V, los cuales forman parte de las membranas basales. El colágeno se encuentra en una gran proporción en los animales marinos, representando del 10 al 17 % del contenido de proteína total del calamar gigante. Estos colágenos pertenecen a una familia de seis cadenas homólogas que van de la α_1 a la α_6 . Una característica estructural que comparten es la presencia de secuencias repetidas de aproximadamente 1400 residuos, con áreas no colagenosas de alrededor de 20 residuos. Estas cadenas tienen pesos moleculares específicos que las diferencian entre ellas, rasgo útil en la identificación del colágeno en técnicas de identificación proteica como la electroforesis (Borza y col., 2001; Vanacore y col., 2004).

Funcionalidad

En la composición del colágeno intervienen diversos factores, dentro de los cuales se encuentran la edad del animal y la región anatómica donde se encuentra localizado,

ya que esta proteína es el componente mayoritario de cartílago y piel. Las fibras de colágeno son fuertes gracias a enlaces covalentes que las estabilizan, formando reticulados proteicos que confieren rigidez estructural (Gómez-Guillen y col., 2011; Watanabe-Kamiyama y col., 2010). Esta propiedad es utilizada en la industria farmacéutica para hacer del colágeno una molécula acarreadora de proteínas y diversos medicamentos para obtener una actividad específica y localizada (Kim y Mendis, 2006).

El colágeno ha demostrado que puede ser, hasta cierto punto, degradado por enzimas endógenas, tener baja afinidad con el agua y compuestos polares, bajo potencial alergénico y mejores propiedades como material polimérico sobre otros compuestos naturales y sintéticos. Esto se debe a que tiene la capacidad de agregarse con otras cadenas colagenosas y entrecruzarse con ellas a través de enlaces covalentes. Como material, puede ser moldeado en hojas, esponjas, perlas, pellets, etc., utilizando compuestos que permitan la formación de enlaces covalentes que le confieran una resistencia mayor (Lee y col., 2001).

Las aplicaciones del colágeno como material de tipo farmacéutico son vastas: protección de componentes oftalmológicos, esponjas para tratar quemaduras, pellets para transportar y liberar proteínas, como componente en agregados para la liberación prolongada de fármacos y para proteger y liberar genes sin sufrir daños durante el proceso digestivo o por enzimas del suero sanguíneo (Lee y col., 2001; Auger y col., 1998).

Tanto en su forma nativa como en la hidrolizada, el colágeno de origen marino y la gelatina obtenida de él, cumplen con una gran cantidad de funciones biológicas y funcionales que han sido estudiadas y aprovechadas.

Gelatina

La gelatina es una sustancia de naturaleza proteica derivada del colágeno, la cual es el resultado de su hidrólisis parcial a causa de un tratamiento térmico moderado (mayor a 45 °C). Se encuentra compuesta por una mezcla de péptidos y proteínas que provienen de tejido conectivo animal. Cuando el colágeno es tratado térmicamente, las estructuras que le confieren su rigidez e insolubilidad son rotos, lo cual se observa en una mejorada capacidad de disolución en solventes polares. Aunado a esto, la pre-hidrólisis de la gelatina la hace biológicamente más disponible en comparación con el colágeno (Alemán y col., 2010).

En la industria alimentaria, la gelatina se utiliza por su habilidad para retener agua y formar geles. Esta propiedad se ve reflejada en la mejora de la calidad textural en el alimento en el que fue añadida. Sin embargo no únicamente se le concede esta propiedad, sino que también se le reconocen propiedades encapsuladoras, capacidad de formar películas y potencial como agente emulsionante, todas estas propiedades dependen intrínsecamente de la secuencia de aminoácidos que la compongan. Esta funcionalidad no radica únicamente en su forma nativa; los hidrolizados de gelatina se han evaluado por su potencial aplicación como compuestos antioxidantes, antihipertensivos, anticancerígenos, entre otros (Gómez-Guillén y col., 2011).

A pesar de que nutricionalmente son de baja calidad (no aportan las cantidades mínimas de aminoácidos esenciales, específicamente triptófano), tanto el colágeno como la gelatina, son de utilidad en otros ámbitos (Fennema, 1996). Cabe mencionar que las funciones biológicas no solamente se han descubierto para las formas nativas de estas proteínas, sino también para sus hidrolizados (Alemán y col., 2011).

Antioxidantes

Acorde al Instituto de Medicina (EEUU), un antioxidante es una sustancia de origen alimentario que reduce de manera significativa los efectos adversos de las especies reactivas, tales como las de oxígeno y nitrógeno, bajo condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, esta definición no hace ninguna especificación al mecanismo por el cual el llamado "antioxidante" actúa. Esta sustancia puede o no interactuar con los radicales, o quelar metales para prevenir la reacción de Fenton, inhibir enzimas oxidantes (como la ciclooxigenasa) o actuar como cofactores de enzimas endógenas de carácter antioxidante. El espectro de mecanismos de acción biológica de un "antioxidante" es muy amplio por lo que no se puede limitar o rechazar el potencial de dicha sustancia hasta ser vastamente estudiado (Huang y col., 2005).

Desde el punto de vista de la oxidación lipídica, la acción antioxidante puede incluir la estabilización oportuna del oxígeno singulete (especie que se forma cuando se da un re-arreglo de electrones tras la absorción de grandes cantidades de energía), para quelar metales que actúan como catalizadores en la peroxidación, evitar la descomposición de las especies no radicales o bien neutralizar radicales alquilo que provienen de los esqueletos carbonados de ácidos grasos, etcétera. La acción antioxidante, cualquiera que ésta sea y en cualquiera de las etapas de oxidación, resulta favorable ya que previene la posterior formación de compuestos que pudieran ser aún más dañinos (como el malondialdehído) o que los productos oxidados continúen con esta reacción en cadena.

Dentro de los compuestos en los cuales se han detectado diferentes beneficios, están las proteínas de origen marino donde también se abarca la actividad antioxidante, la cual es de interés remarcable debido a su relación con la prevención y reversión de los estragos ocasionados por el estrés oxidativo (Alemán y col., 2011).

Estrés Oxidativo

En las reacciones la fosforilación oxidativa, la mitocondria genera energía en forma de ATP y de forma secundaria se producen especies reactivas de oxígeno (ERO). Los mismos complejos enzimáticos presentes se encargan de estabilizar estos compuestos, entre ellos la manganeso superóxido dismutasa (que estabiliza el radical superóxido a peróxido de hidrógeno) y el citocromo C. También se encuentran de forma natural en la célula otros dos compuestos de gran capacidad antioxidante, que son el glutatión y la tioredoxina, por mencionar algunas. Cuando estos sistemas de estabilización de ERO no están funcionando o no son suficientes para neutralizar a todos los radicales producidos, se genera una liberación de estos compuestos, conociendo a este estado como estrés oxidativo (Quiney y col., 2011).

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es uno de los más reactivos de entre los radicales generados del oxígeno, (en comparación con otra especie como el radical superóxido $\text{O}_2\cdot^-$) teniendo una vida media de 1 ns. Su formación no es normal en el organismo humano: es debida a varios factores destacándose la radiación ionizante, la degradación de otros radicales como los peróxidos y la reacción de Fenton, que es la catálisis ayudada por metales de transición del peróxido de hidrógeno para formar al radical hidroxilo más el ion hidroxilo (^-OH). Es por su escasa vida que las moléculas blanco de su ataque son aquellas cercanas a donde el radical fue generado, por lo que las hidroxilaciones presentes en el ADN sugiere que los radicales hidroxilo fueron generados en regiones cercanas, permitiendo que existiera la colisión entre ambas moléculas. Otros radicales no poseen la misma capacidad de ataque del radical hidroxilo, sino que su formación y presencia permiten el ataque de otras especies reactivas, tal es el caso de los radicales peróxido, quienes favorecen la unión del radical hidroxilo con biomoléculas (Valko y col., 2006).

A pesar de que se le conozca de forma general como estrés oxidativo, no son únicamente las especies reactivas de oxígeno las capaces de generar radicales

libres: existen también las especies reactivas de nitrógeno. El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es una molécula que cumple con funciones normales en el organismo como la regulación de la presión sanguínea, por mencionar un ejemplo. Su vida media en medio acuoso es de segundos (superior al de radicales provenientes de oxígeno) y su naturaleza anfipática y bajo peso molecular le confieren una alta permeabilidad con mayor facilidad a través de membranas y llegar a moléculas que pudieran no estar disponibles en el momento de su generación. Cuando el óxido nítrico reacciona para producir peroxinitritos (ONOO^-), su reactividad aumenta considerablemente, ya que son a estas especies reactivas a las que se les reconoce la actividad pro-oxidante (Valko y col., 2006; Carr y col., 2000).

Es importante remarcar que, aunque se use de manera indistinta el término radical libre, algunas especies reactivas no son radicales *per se*. En la **Tabla 1** se muestra de forma separada a los radicales libres de los no radicales, pero de forma global se les denomina especies reactivas.

El daño de los radicales libres es generalizado a todas aquellas moléculas que se encuentren alrededor de los sitios de producción (para aquellos de baja vida media) o que sean especialmente afectados por su acción, reconociéndose así el efecto nocivo que causan sobre proteínas, ácidos nucleicos y lípidos principalmente.

Ataque a Proteínas

La estructura que puede verse afectada en la oxidación proteica puede ser tanto la cadena de aminoácidos unidos, atacando los enlaces peptídicos así como los residuos de éstos (grupos R).

Los aminoácidos con azufre son especialmente susceptibles a ser oxidados por efecto de las ERO: la metionina se oxida para producir sulfóxido de metionina. A pesar de que los aminoácidos azufrados son fácilmente atacados, existen reductasas responsables

Tabla 1. Algunos ejemplos de especies reactivas producidas endógenamente

Radicales Libres	No Radicales
Superóxido $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno H_2O_2
Hidroxilo OH^{\bullet}	Peróxidos $ROOH$
Hidroperoxil HO_2^{\bullet}	Ozono O_3
Peroxil RO_2^{\bullet}	Ácido hipocloroso $HOCl$
Alcoxil RO^{\bullet}	Ácido hipobromoso $HOBr$
Óxido nítrico NO^{\bullet}	Peroxinitrito $ONOO^-$

Fuente: Adaptada de Rizzo y col., 2010

de restaurar la metionina oxidada y se reconoce que es un proceso relativamente normal en el organismo. Además los residuos de metionina suelen estar alejados del sitio activo, haciendo su oxidación relativamente irrelevante para la función de la proteína. La oxidación de otro aminoácido azufrado, la cisteína, es de gran importancia ya que sus residuos se encuentran en la mayoría de los sitios activos enzimáticos. Se pueden tomar dos caminos distintos, la formación de enlaces disulfuro entre dos cisteínas o unirse de forma irreversible a moléculas de glutatión (Lushchak, 2007; Quiney y col., 2011).

La formación de carbonilos es una reacción no enzimática irreversible y se observa que para ciertos aminoácidos (arginina, treonina, lisina y prolina), esta reacción es dependiente de la presencia de metales. El óxido nítrico es generado de la degradación de la lisina, por acción de la óxido-nítrico sintasa. En sí, el óxido nítrico se puede considerar inocuo, pero cuando reacciona con el superóxido o con dióxido de carbono forma especies aún más dañinas a la célula, como los peroxinitritos (ONOO^-) o los nitrosoperoxocarboxilatos (ONOOCO_2^-). Así como para las ERO, los aminoácidos azufrados son los más susceptibles ante las especies reactivas del nitrógeno. Para metionina, se forman derivados S-nitrosotiol y se considera como una de las modificaciones más dañinas desde el punto de vista de proteínas de señalización (Lushchak, 2007).

Ataque a Ácidos Nucleicos

Las agresiones por parte de los radicales libres a componentes celulares no es algo que diste de la cotidianeidad: una célula normal es expuesta diariamente a 1.5×10^5 ataques oxidativos o nitrosativos. Es el desbalance o la incapacidad de contrarrestar el efecto que ocasionan los radicales, los que terminan por causar un daño celular que puede culminar en una enfermedad (Dizdaroglu y col., 2002).

En la actualidad se conocen más de 100 productos del daño oxidativo y nitrosativo del ácido desoxirribonucleico, los cuales significan detención o principio tardío o

temprano de la transcripción, errores en la replicación o simplemente inestabilidad genética. Los radicales hidroxilo son los principales agresores al material genético, al grado de ser capaces de unirse tanto a purinas, pirimidinas y/o al componente glucídico del ADN (Marnett, 2000). Uno de los productos de estas reacciones que es de mayor importancia dado su estatus como biomarcador de estrés oxidativo y predictor de daño genético es la producción de la 8-hidroxiguanina.

No es únicamente el radical hidroxilo el que reacciona formando aductos y productos estables. Las especies reactivas de nitrógeno también están relacionadas con el daño genético, principalmente el óxido nítrico y los peroxinitritos. Sin embargo, el ataque de estas dos especies sobre el ADN es relativamente fácil de reparar, empero el ocasionado a los distintos tipos de ARN resulta permanente.

El ADN mitocondrial también puede ser blanco del ataque de los radicales libres en desbalance que se encuentren en el medio celular. Cuando la estabilización no es suficiente para resarcir el daño al ADN de mitocondrias, esto se ve reflejado en un funcionamiento deficiente por parte de estos organelos: liberación de radicales de oxígeno al medio (siendo que éstos son propiamente estabilizadas en su interior), daño a la membrana mitocondrial y mutación en genes mitocondriales (Brown y Borutaite, 2001).

Ataque a Lípidos

La oxidación de los lípidos es un fenómeno que ha sido estudiado desde una gran variedad de perspectivas: nutricional, alimentaria, médica, etc., llegando siempre a la conclusión general de que se trata de un conjunto de reacciones que generan productos que mantienen e incluso aceleran el proceso de degradación lipídica: una reacción en cadena. Esta cascada se activa por diversos factores como es la presencia de metales (principalmente hierro y cobre), de oxígeno en su estado excitado (singulete), de peróxidos (provenientes de reacciones de oxidación previas), de radiación ultravioleta, entre otros.

Se distinguen tres fases en la también llamada autooxidación:

- 1) Iniciación: Por efecto de los factores mencionados, se forma el radical alquil por la extracción de un átomo de hidrógeno.
- 2) Propagación: El radical alquil puede reaccionar con una molécula de oxígeno y formar al radical hidroperóxido, el cual tiene la posibilidad de reaccionar con otro componente graso y regenerar al radical alquil más un hidroperóxido de nueva cuenta (es por ello que se menciona que es una reacción que se “alimenta” a ella misma)
- 3) Terminación: Los productos finales son muy variados, todos dependiendo de los radicales intermedios generados, el tiempo que se permita que se lleve a cabo la reacción, la presencia o ausencia de pro-oxidantes o antioxidantes y otros factores

Todos los productos de la oxidación lipídica pueden atacar a moléculas susceptibles al ataque de un radical libre, algunos en mayor medida que otros. Por ejemplo, el radical superóxido es virtualmente incapaz de llegar a unirse a otra molécula debido a la acción de la enzima superóxido dismutasa (Akoh y Min, 2002).

Uno de los productos de la oxidación de lípidos más importantes es el malondialdehído, tanto por su rol metabólico en ciertas patologías así como su utilidad como biomarcador de estrés oxidativo y daño lipídico.

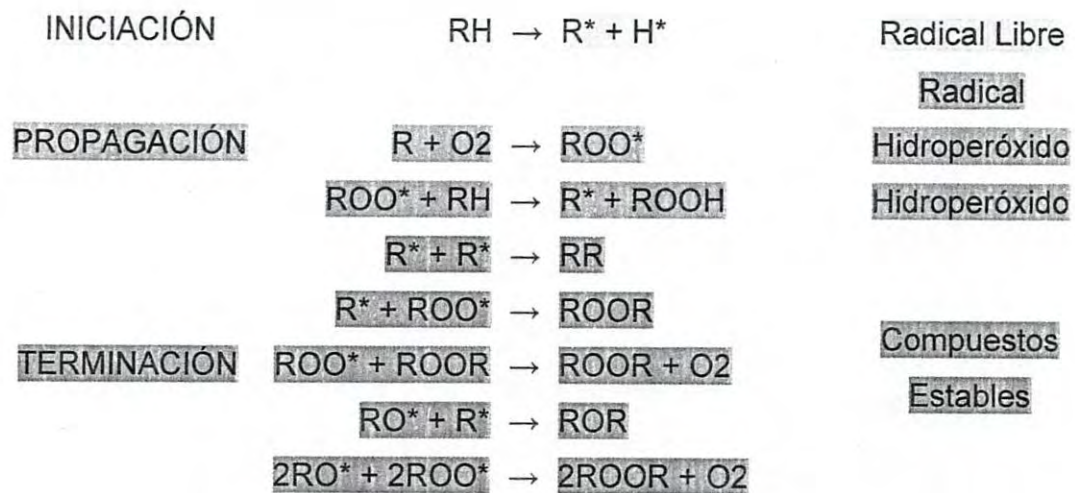


Figura 4. Esquema general de la oxidación lipídica (Fennema, 1996)

Malondialdehído y su rol en el deterioro celular

En la oxidación lipídica se genera una gran cantidad de compuestos derivados del ataque inicial y subsecuente de los radicales libres, generalmente sobre ácidos grasos insaturados. Uno de estos productos son los endoperóxidos, los cuales producen como producto final al malondialdehído (MDA) de fórmula molecular $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, que en condiciones fisiológicas normales está presente en la forma de enol ($\text{HOCH}=\text{CH}-\text{CHO}$), un mutágeno comprobado que puede reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN como se observa en la **Figura 5**.

El malondialdehído es el producto final de la oxidación con mayor relación a enfermedades asociadas al estrés oxidativo dada su capacidad mutagénica en células humanas (Niedemhofer y col., 2003). Existen varios mecanismos de mutagenicidad sugeridos para la acción del MDA: uno de ellos es la formación de la M_1G (pirimido[1,2-*a*]purin-10(3*H*)-ona) la cual causa errores en el marco de lectura y sustituciones de pares de bases, otro es el de propiciar la interacción irreversible ADN-proteína, atacando en primer lugar a las histonas quienes después reaccionan con el ADN. Por último, un mecanismo propuesto es la formación de dobles enlaces entre pares de bases mediante la remoción de un hidrógeno en la estructura helicoidal (Del Rio y col., 2005). Esta molécula también está asociada a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, primer paso en el desarrollo de padecimientos como la aterosclerosis. El mecanismo fue descrito por Niedemhofer y colaboradores, donde el MDA propicia la formación de enlaces de entrecruzamiento entre residuos adyacentes de lisina.

Sin importar cuál sea la molécula blanco del ataque del malondialdehído, este producto de la oxidación es representativo del estrés oxidativo al que se ve sujeto un organismo en un momento dado, haciendo de él un biomarcador por excelencia de la peroxidación lipídica (Del Rio y col., 2005).

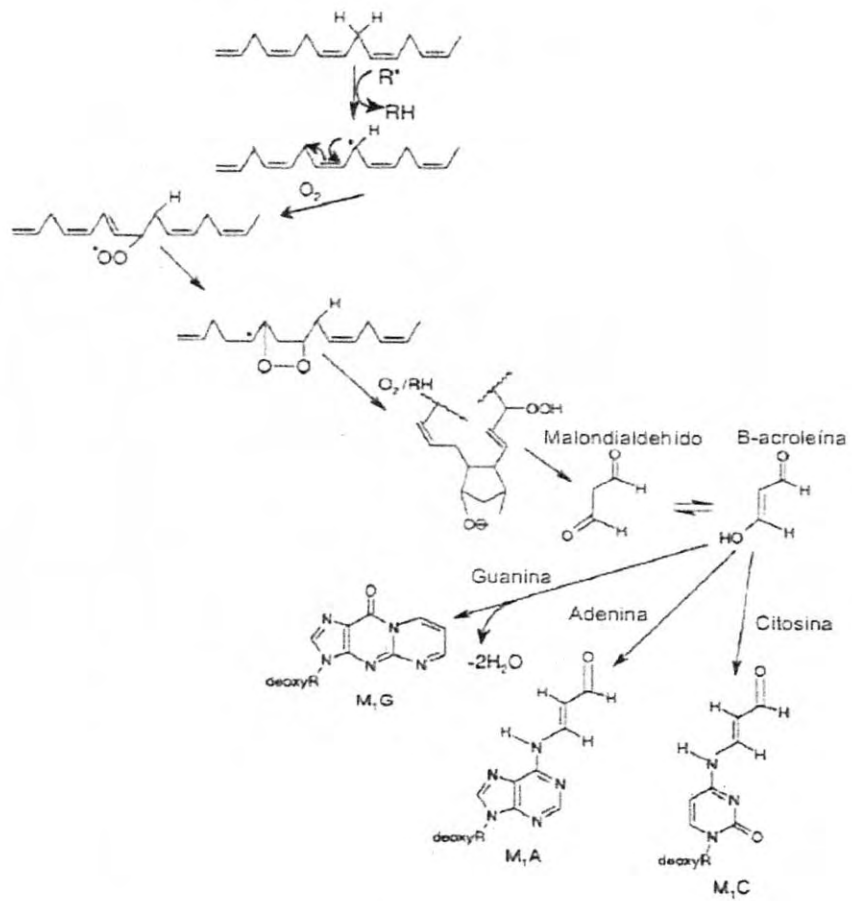


Figura 5. Producción de malondialdehído y su ataque a bases nitrogenadas (Adaptado de Valko y col., 2006)

HIPÓTESIS

La alimentación de ratas con la gelatina de aletas, brazos y piel de calamar gigante tendrán un efecto positivo en la capacidad antioxidante sérica total; a su vez, se disminuirán los niveles de malondialdehído en el suero de éstas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante de la gelatina de aletas, tentáculos y piel del calamar gigante y sus productos de hidrólisis, así como la efectividad de su consumo sobre los niveles de malondialdehído sérico, como una medición de la protección ante el estrés oxidativo en una rata Sprague Dawley.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la actividad antioxidante *in vitro* de las gelatinas extraídas de las aletas, brazos y piel del calamar gigante

Determinar el efecto de la digestibilidad (mediante un modelo *in vitro*) sobre la actividad antioxidante de las gelatinas de aletas, brazos y piel del calamar gigante

Medir la capacidad antioxidante total sérica y la concentración de malondialdehído en suero de ratas que fueron alimentadas con las tres distintas gelatinas

MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados se desarrolló la siguiente metodología, la cual fue dividida en tres etapas:

1. Extracción y determinación de la actividad antioxidante de la gelatina
2. Digestión *in vitro* y actividad antioxidante de los productos de digestión
3. Bioensayo de intervención con gelatina (capacidad antioxidante total sérica y cuantificación de malondialdehído)

Extracción de Gelatina de los Co-Productos de Calamar Gigante

Materia Prima

La materia prima fue aletas, brazos y piel de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), provenientes de 50 organismos capturados en Guaymas, Sonora, durante el periodo de noviembre de 2012 a marzo de 2013. Los especímenes fueron enhielados y transportados al Laboratorio de Productos Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (Hermosillo, Sonora) donde cada organismo fue lavado y eviscerado, separándose aletas y brazos sin piel (troceados en cubos pequeños), así como la capa más externa de piel del manto. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Proceso de Extracción

Las muestras de las tres regiones anatómicas fueron descongeladas y atemperadas antes de comenzar el proceso. El esquema de la extracción se muestra en la **figura 6**. Las distintas regiones fueron lavadas en una solución de cloruro de sodio al 0.8 % (proporción 1:2 p/v/ por separado en un agitador Wrist Action Shaker (Modelo 75, Burrell) durante 15 minutos. Después se lavó la muestra con agua destilada para

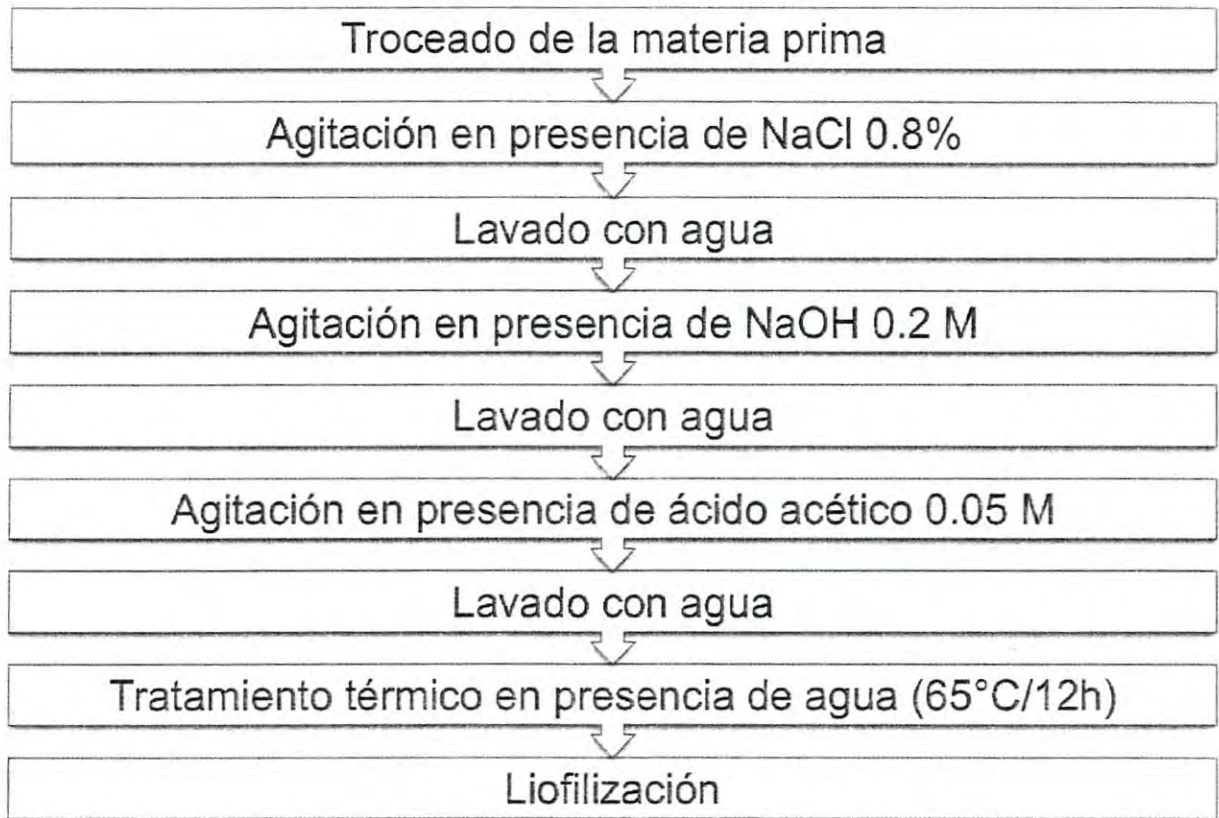


Figura 6. Esquema de la obtención de gelatina (Modificado de Jongjareonrak y col., 2010)

remover las proteínas sarcoplásmicas y el exceso de sal, para continuar con una agitación durante 45 min en presencia de hidróxido de sodio 0.2 M para facilitar la eliminación de proteínas miofibrilares presentes. Después siguió un lavado con ácido acético 0.05 M durante 90 min para continuar con la remoción de todas aquellas proteínas no colagenosas. Para concluir, las muestras fueron puestas en un baño de agua con calentamiento a 65°C para proceder a la conversión térmica de colágeno a gelatina. Se utilizó el liofilizador Freezone (LabConco, modelo 12) para conservar las muestras para las consiguientes determinaciones.

Contenido de Proteína

El porcentaje de proteína de cada una de las gelatinas obtenidas fue obtenido utilizando el determinador de nitrógeno mediante el método de combustión (Leco, modelo FP-528)

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó el análisis del perfil electroforético de las gelatinas para confirmar la presencia de gelatina en los extractos. Para ello, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 4% y 12% de gel concentrador y gel separador, respectivamente (Laemmli, 1970). Se inyectaron 10 µg de proteína disueltos en 10 mg de agua. El estándar de peso molecular (Producto S8445, Sigma-Aldrich) estuvo compuesto por miosina de corazón de puerco (200 kDa), β-galactosidasa de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilasa B de músculo de conejo (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), deshidrogenasa glutámica de hígado bovino (55 kDa), ovoalbúmina de huevo de gallina (45 kDa) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa).

Perfil de Aminoácidos

Los aminoácidos fueron determinados utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con ligeras adecuaciones a la técnica desarrollada por Vázquez-Ortiz y col. (1997).

Digestibilidad *in vitro* y Obtención de los Productos de Digestión

La digestibilidad *in vitro* de las tres gelatinas obtenidas se realizó utilizando la tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), carboxipeptidasa (EC 3.4.17.1) y la proteasa bacteriana obtenida de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62) (todas de la marca Sigma-Aldrich), donde las primeras tres representan algunas de las proteasas digestivas intestinales más representativas, y la última se utiliza para representar la posterior hidrólisis que se lleva a cabo por parte de microorganismos, así como para que la mimetización de la digestión sea la más eficiente. El procedimiento que se siguió fue el descrito por Satterlee y col. (1982), donde el sustrato (gelatina) es acondicionado a un pH de 8.0 y una temperatura de 37°C, condiciones fisiológicas que aseguran la acción enzimática, por un periodo de 10 min, para después pasar el sistema a 55°C para la posterior adición de la proteasa bacteriana. Tras 20 min de hidrólisis se registró el pH de las gelatinas, el cual fue sustituido en la ecuación 1:

$$\%Digestibilidad = 234.84 - 22.56x \qquad \text{Ecuación 1}$$

donde x representa el valor de pH a los 20 min, a 37°C

Las muestras hidrolizadas fueron congeladas y posteriormente liofilizadas para posteriores análisis utilizando el equipo previamente mencionado.

Actividad Antioxidante

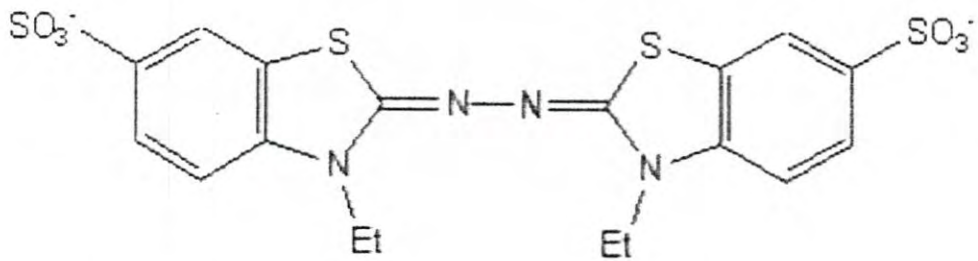
Un compuesto puede actuar como un antioxidante toda vez que tenga la capacidad de estabilizar a un radical. Existen distintos métodos que sirven para detectar y cuantificar la capacidad antioxidante de una molécula. Se utilizaron dos métodos que evalúan los dos mecanismos más reconocidos de estabilización de radicales: la donación de un átomo de hidrógeno y la donación de un electrón, ambos métodos son ampliamente aceptados en la evaluación de actividad antioxidante en extractos proteicos, así como la capacidad antioxidante total de fluidos biológicos.

Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC)

Un método utilizado ampliamente en la determinación del potencial antioxidante es el de estabilización del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), el cual se caracteriza por ser un radical hidrosoluble que requiere de una previa activación. El método utilizado fue el descrito por Porstmann y col. (1981), donde primero se activa al radical mezclando 88 μ L de persulfato de potasio (0.139 mM) en un mililitro de agua con 19.2 mg de ABTS disuelto en 5 mL de agua. La mezcla reposó durante 12 horas en ausencia de luz para asegurar la formación del radical (la reacción que ocurre se muestra en la **Figura 7**).

Se tomó un mililitro de esta solución y se diluyó en 88 mL de etanol al 70%. Se ajustó la solución de radical a 0.7 de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm añadiendo gotas de etanol para después mezclar 2.9 mL con 0.1 mL de gelatina, producto de digestión o suero murino (dependiendo de la etapa del experimento) y se realizaron lecturas durante 30 minutos cada 6 minutos en el espectrofotómetro (UV-Vis Spectrophotometer, Varian Cary 50). Finalmente se calcula el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 2.

$$\%Inhibición = 1 - \left(\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Blanco} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$



Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

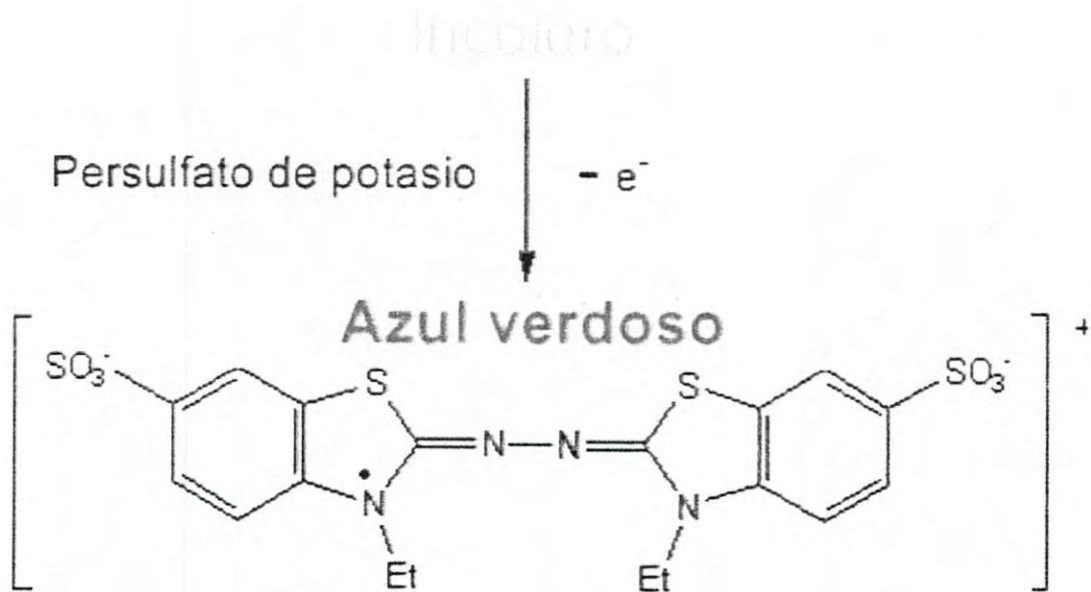


Figura 7. Formación del radical ABTS^{•+} (Porstmann y col., 1981)

En el caso de esta determinación, se comparó la actividad antioxidante de la gelatina y los productos de hidrólisis, contra la curva estándar de Trolox, un antioxidante que es la versión análoga hidrosoluble de la vitamina E, obteniendo así la capacidad antioxidante equivalente a esta molécula.

Capacidad de Neutralización de Radicales Oxígeno (ORAC_{FL})

El método del ABTS se basa la estabilización de un radical no fisiológico, es decir, que no se encuentra de forma natural en un ser vivo. Es por ello que el método de ORAC ha sido ampliamente aceptado, ya que trata con la estabilización de radicales oxígeno. Para esta determinación se utilizó al reactivo AAPH (dihidrocloruro de 2,2'-azobis-2-aminidopropano) por ser un azocompuesto generador de especies reactivas de oxígeno (Garrett y col., 2010) como se observa en la **Figura 8**. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron en una celda (que se mantuvo siempre a 37°C con ayuda de una placa de calentamiento) 1.7 mL de buffer de fosfatos (0.075 M; pH 7), 0.1 mL de fluoresceína 0.048 µM, 0.1 mL de AAPH 0.36 M y 0.1 mL de gelatina, producto de digestión o suero (según fue el caso). En el espectrofluorómetro (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent Technologies) las lecturas se tomaron a 484 y 515 nm de excitación y emisión respectivamente, en ciclos de 5 minutos durante 60 minutos. Los cálculos realizados fueron para determinar la actividad de las muestras restando el posible efecto del solvente y del tiempo, obteniendo así las áreas bajo la curva (AUC) de las muestras, a las cuales se les restó la AUC del blanco (misma mezcla, únicamente sin muestra, reemplazando este volumen con buffer). La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$AUC = \left(0.5 + \left(\frac{f1}{f1} \right) + \left(\frac{f2}{f1} \right) + \dots + \left(\frac{fn}{f1} \right) \right) CT \quad \text{Ecuación 3}$$

donde $f1$ = fluorescencia inicial (0 min)

fn = fluorescencia final (60 min)

CT = tiempo del ciclo en min.

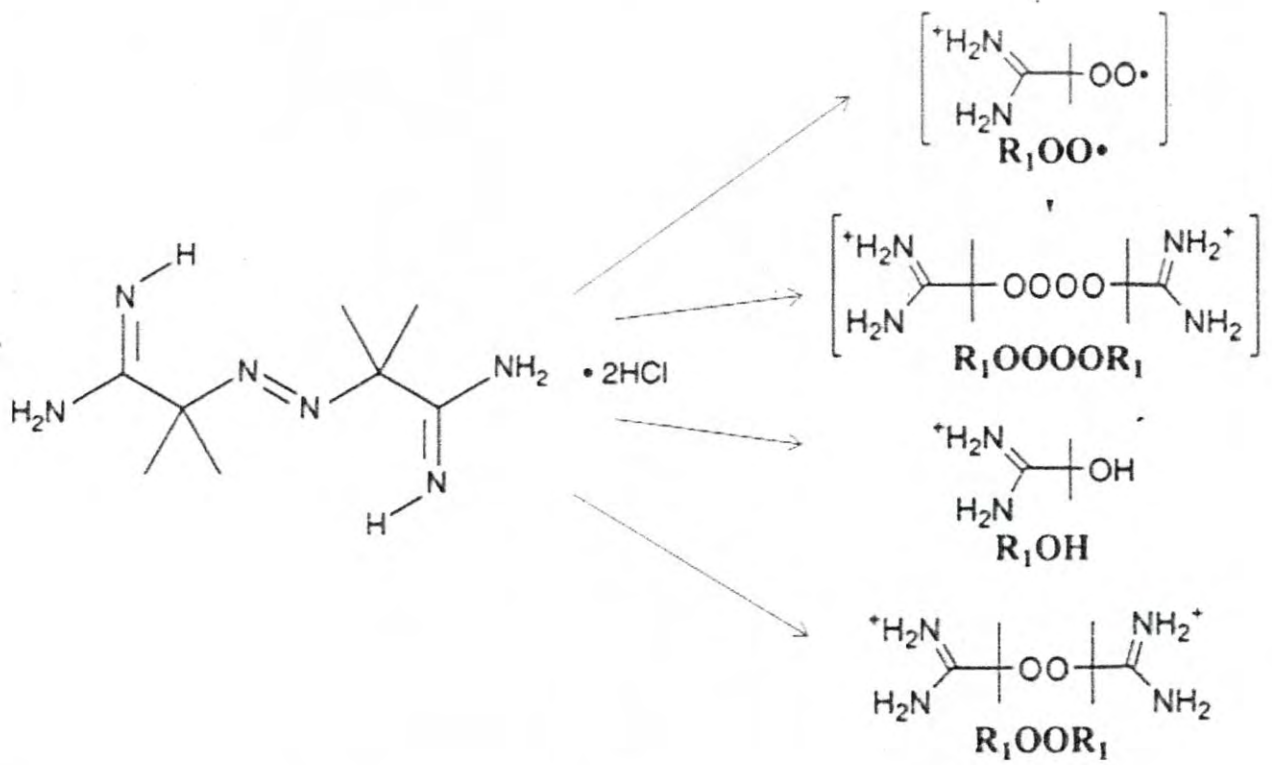


Figura 8. Algunos productos de la descomposición del AAPH (Adaptado de Werber y col., 2011)

Para después obtener la AUC neta de las muestras se utilizó la fórmula

$$AUC_{neta} = AUC_{muestra} - AUC_{blanco} \quad \text{Ecuación 4}$$

Los valores de AUC neta fueron comparados con una curva estándar de Trolox para obtener de nueva cuenta la actividad antioxidante en milimoles equivalentes.

Bioensayos

Para determinar el efecto de la gelatina de calamar gigante como posible agente potenciador de la capacidad antioxidante sérica, se utilizaron como modelos animales ratas Wistar hembras de 100 g de peso proporcionadas por el bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (**Figura 9**). Un grupo de 10 ratas fueron depositadas en jaulas individuales donde se les administró en el bebedero una solución de 0.5 g de gelatina liofilizada por 100 mL de agua (0.5%) (Roomi y col., 2005), teniendo así 3 grupos de animales, uno por cada gelatina obtenida. Se registró diariamente el consumo de gelatina por un periodo de un mes para comprobar que era consumida de manera constante y uniforme. Se mantuvo un grupo control de 10 animales a los cuales se les suministró únicamente agua destilada en el bebedero. El alimento fueron pellets balanceados para la nutrición de ratas (LabDiet, producto 5008), administrado de forma igual a los cuatro grupos de animales.

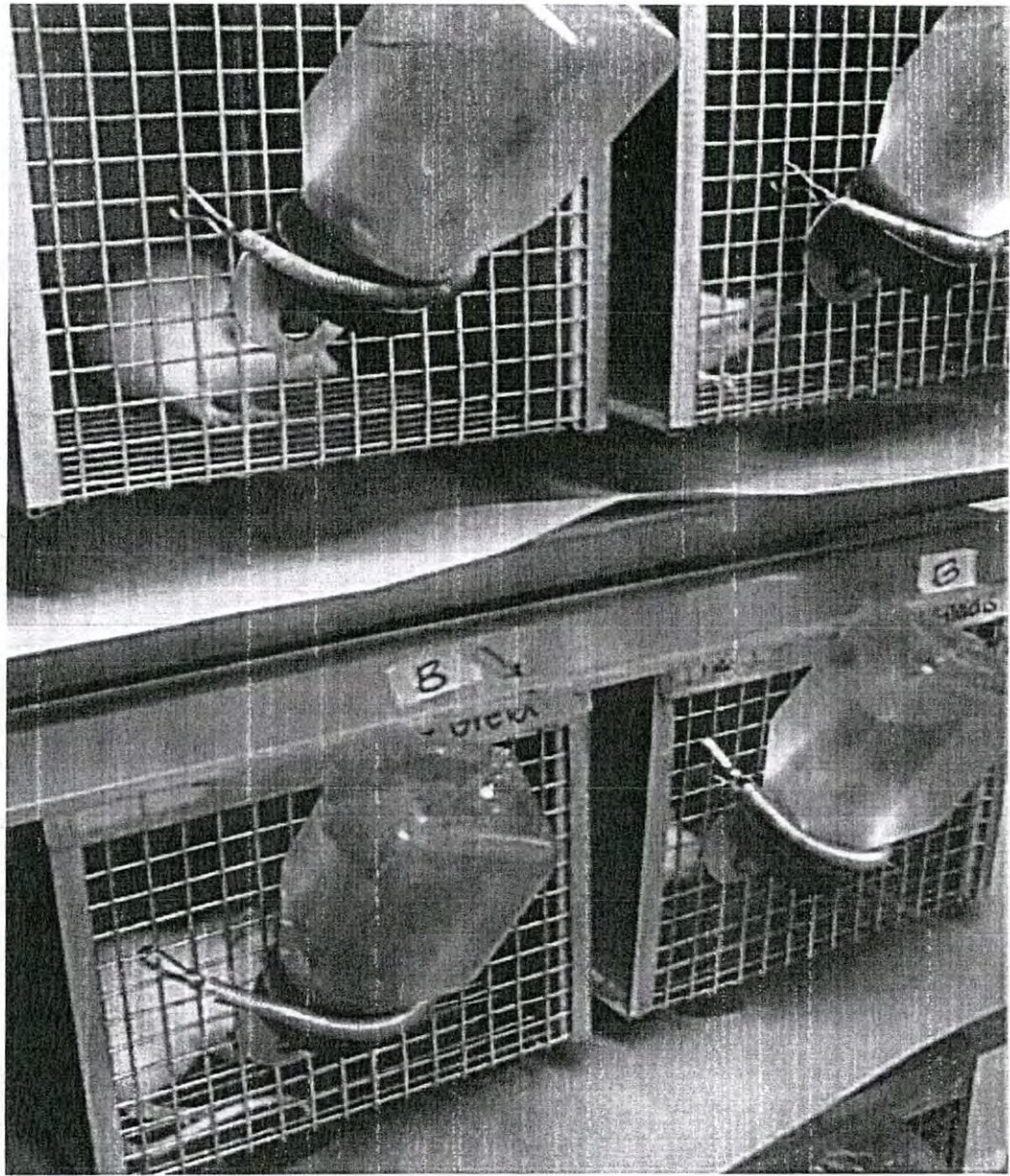


Figura 9. Organización de los animales de experimentación durante el bioensayo

Transcurrido el mes de suplementación de gelatina de calamar se tomó una muestra de sangre a través de punción cardíaca y se sacrificó a los animales. Se recuperó el suero para las determinaciones de capacidad antioxidante y concentración de sustancias activas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Malondialdehído Sérico

Un biomarcador ampliamente utilizado en la determinación del daño ocasionado por el estrés oxidativo a componentes celulares de naturaleza lipídica es el de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, el cual se expresa en nanomoles de malondialdehído (MDA). El fundamento de esta técnica radica en la reacción que se lleva a cabo entre una molécula de MDA con dos de ácido tiobarbitúrico para formar un aducto colorido, el cual posee una absorbancia máxima a los 532 nm.

Se utilizó el kit comercial ofrecido por la marca Sigma-Aldrich (producto MAK085), donde la primera fase consistió en la preparación de la muestra, donde el suero es mezclado con ácido sulfúrico 42 mM y ácido fosfotúngstico para lograr la liberación de las moléculas de MDA de la muestra. Después se forma el aducto MDA-TBA mediante la adición del ácido tiobarbitúrico en un periodo de incubación de 60 min a 96°C y se registró la absorbancia de las muestras a 532 nm.

Por último, se calculó la concentración de MDA utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \left(\frac{S_a}{S_p} \right) \times 4 \times D \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde C = Concentración de MDA en la muestra, S_a = Cantidad de MDA en la muestra, según la curva estándar, S_v = Volumen de muestra en el pozo y D = Factor de dilución.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico

En este experimento se evaluaron los potenciales antioxidantes de la gelatina (primera etapa), de sus productos de digestión (segunda etapa) y de los sueros de ratas alimentadas con gelatina (tercera etapa). Para los tres casos, la variable respuesta fue la actividad antioxidante obtenida por los dos métodos (TEAC y ORAC_{FL}) y como las variables independientes las tres regiones anatómicas (aletas, brazos y piel).

En la segunda etapa, la determinación de porcentaje de digestibilidad *in vitro* fue la variable respuesta y las variables independientes las tres regiones del calamar gigante.

En la tercera y última etapa, la concentración de malondialdehído fue la variable respuesta y las variables independientes las tres regiones.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía en las tres etapas. Los datos son expresados como la media de las repeticiones ($n = 3$) más/menos la desviación estándar. La prueba de rangos múltiples de Tukey fue utilizada para comparar la diferencia de medias con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). El paquete estadístico utilizado fue el JMP versión 5.0.1 (SAS, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Gelatina

El proceso de extracción de gelatina consistió en la remoción seriada de los componentes acompañantes del colágeno, el cual se convierte en gelatina. Se realizaron modificaciones a la metodología descrita por Jongjareonrak en 2010 para ajustarlo a la extracción de gelatina de regiones ricas en músculo. El rendimiento, expresado en porcentaje de proteína en base seca, se muestra en la **Tabla 2**, donde se comparan las tres regiones anatómicas estudiadas (aletas, brazos y piel) en base a los gramos de proteína.

El proceso estuvo fundamentado en la clasificación de la proteína de origen animal en base a su solubilidad, teniendo así la proteína sarcoplásmica, miofibrilar y estromal principalmente. Las proteínas sarcoplásmicas se caracterizan por ser de bajo peso molecular y desempeñar generalmente una labor como enzimas (Belitz y col., 2009). Una característica común de este grupo de proteínas es su solubilidad en agua o soluciones salinas de baja fuerza iónica, teniendo así que el lavado en agitación con cloruro de sodio 0.8% permitió su remoción. De igual manera, el lavado con hidróxido de sodio 0.2 M facilitó la solubilización y eliminación de las proteínas miofibrilares (o contráctiles) presentes en las regiones anatómicas estudiadas. Por su estructura larga y filamentosa, la extracción suele requerir de agentes más agresivos o concentraciones salinas mayores de aquéllas utilizadas para las sarcoplásmicas (Fennema, 1996). Este grupo comprende a la miosina como componente mayoritario (~55%), la actina, la troponina, la tropomiosina, la desmina, por mencionar algunas. Por último, el lavado en presencia de ácido acético 0.05 M consistió en la remoción final de estructuras acompañantes del colágeno pertenecientes al grupo

Tabla 2. Rendimientos de la Extracción Ácido-Alcalina ^a

Región Anatómica	Porcentaje de Proteína (Base Seca)
Aletas	67.25 ± 0.46 ^a
Brazos	67.35 ± 0.61 ^a
Piel	86.30 ± 0.40 ^b

^aValores representan la media ± desviación estándar de tres repeticiones; letras iguales en la misma columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

de las proteínas estromales, como son la elastina y la queratina. En general, este conjunto es insoluble en la mayoría de solventes, a excepción de soluciones ácidas. Sin embargo, el colágeno es únicamente soluble en soluciones concentradas de ácido, razón por la cual esta proteína no se remueve durante la extracción: debido a que, siendo el ácido acético un ácido de naturaleza débil (en comparación con el clorhídrico o el sulfúrico) y usado en concentraciones bajas (0.05 M) se asegura que no será solubilizado, pero otras proteínas lo serán. La conversión del colágeno en gelatina fue llevada a cabo en presencia de agua a 65 °C. En este proceso, la triple hélice del colágeno se abre por efecto de la temperatura, haciendo que las tres cadenas que lo forman se separen mediante la modificación de las atracciones electrostáticas que mantenían a la hélice en su configuración rígida original (Ertmer y col., 2009). Cuando se enfría la solución de proteína, las cadenas son incapaces de recuperar su estructura compacta, por lo que se unen de manera desordenada y más abierta (**Figura 10**). Esta nueva conformación se ve reflejada en un cambio en sus propiedades físicas, como aumento en la solubilidad y la expresión de propiedades funcionales, así como una mayor biodisponibilidad al momento de la acción proteolítica durante la digestión (Belitz y col., 2009).

Este método de extracción fue elegido debido a que se trabaja con soluciones de baja concentración, aunado a que el proceso puede ser fácilmente adaptado al equipo y condiciones que se tienen en una empresa procesadora de productos marinos. Los efluentes generados son ricos en proteína, la cual puede ser utilizada y los reactivos utilizados no representan un riesgo de contaminación ambiental, si se toma en consideración que la concentración de ácido acético e hidróxido de sodio son bastante bajas.

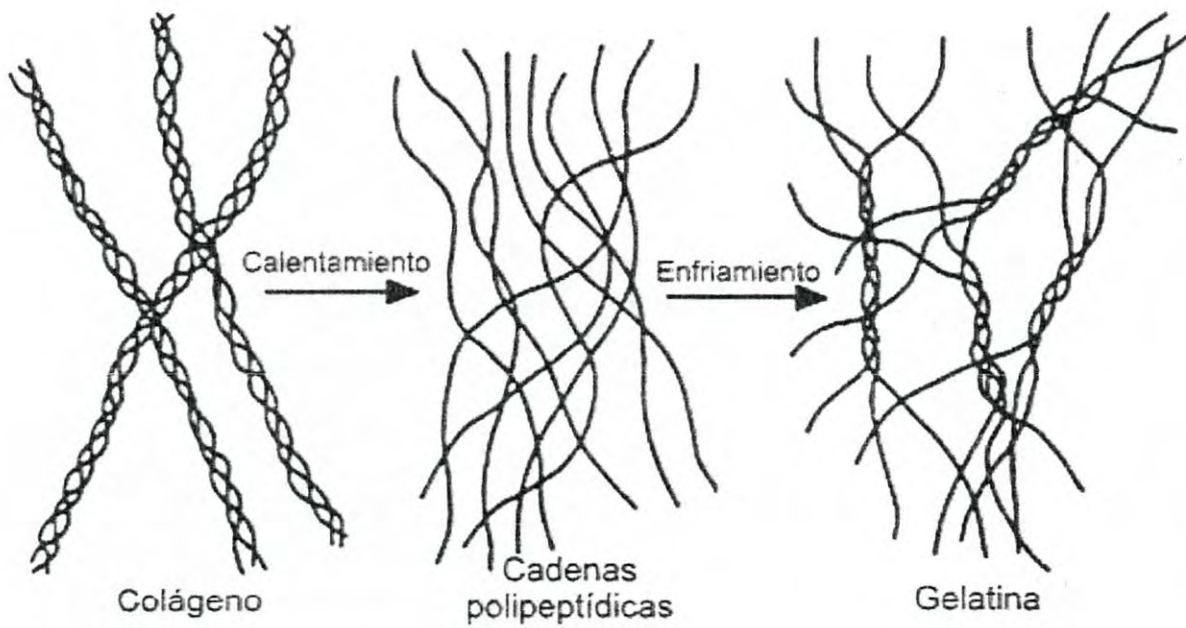


Figura 10. Diagrama de la conversión de colágeno a gelatina (Ertmer y col., 2009)

Perfil Electroforético

Para el análisis de la gelatina que se obtuvo del proceso de extracción previamente descrito, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando al detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), cuya función consiste en permitir que las proteínas tomen una conformación lineal (es decir, que pierdan su forma nativa) y cargarlas negativamente para que su migración a través de los poros del gel sea única y exclusivamente debida al tamaño del polipéptido. El desplazamiento se compara con la migración de un estándar que incluye una variedad de proteínas de peso molecular conocido contra las cuales se compara la banda o bandas generadas por la muestra de gelatina.

En la **Figura 11** se muestra el gel de las tres gelatinas de calamar, así como el carril ocupado por las bandas del estándar; a su vez, también se señalan las bandas correspondientes a las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, que forman al colágeno tipo IV, presente invariablemente en animales superiores. Este colágeno es de principal importancia ya que forma parte fundamental de la membrana basal que confiere rigidez y permite la señalización celular (Vanacore y col., 2004). La presencia de las bandas en el gel de electroforesis obtenido en este estudio permite aseverar que se logró una extracción de proteína estromal. En estudios como los de Cuevas-Acuña en 2010, Muyonga y col. en 2004 y Mingyan y col. en 2009, se muestra para extracciones de colágeno la presencia de una banda denominada β , de aproximadamente 200 kDa, la cual no fue obtenida en este estudio. Esto se debe a que durante la obtención de gelatina, el rearrreglo irreversible de las cadenas polipeptídicas después de que se llevó a cabo el tratamiento, impidió que se volviera a formar este complejo, que no es sino la combinación de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Borza y col., 2001).

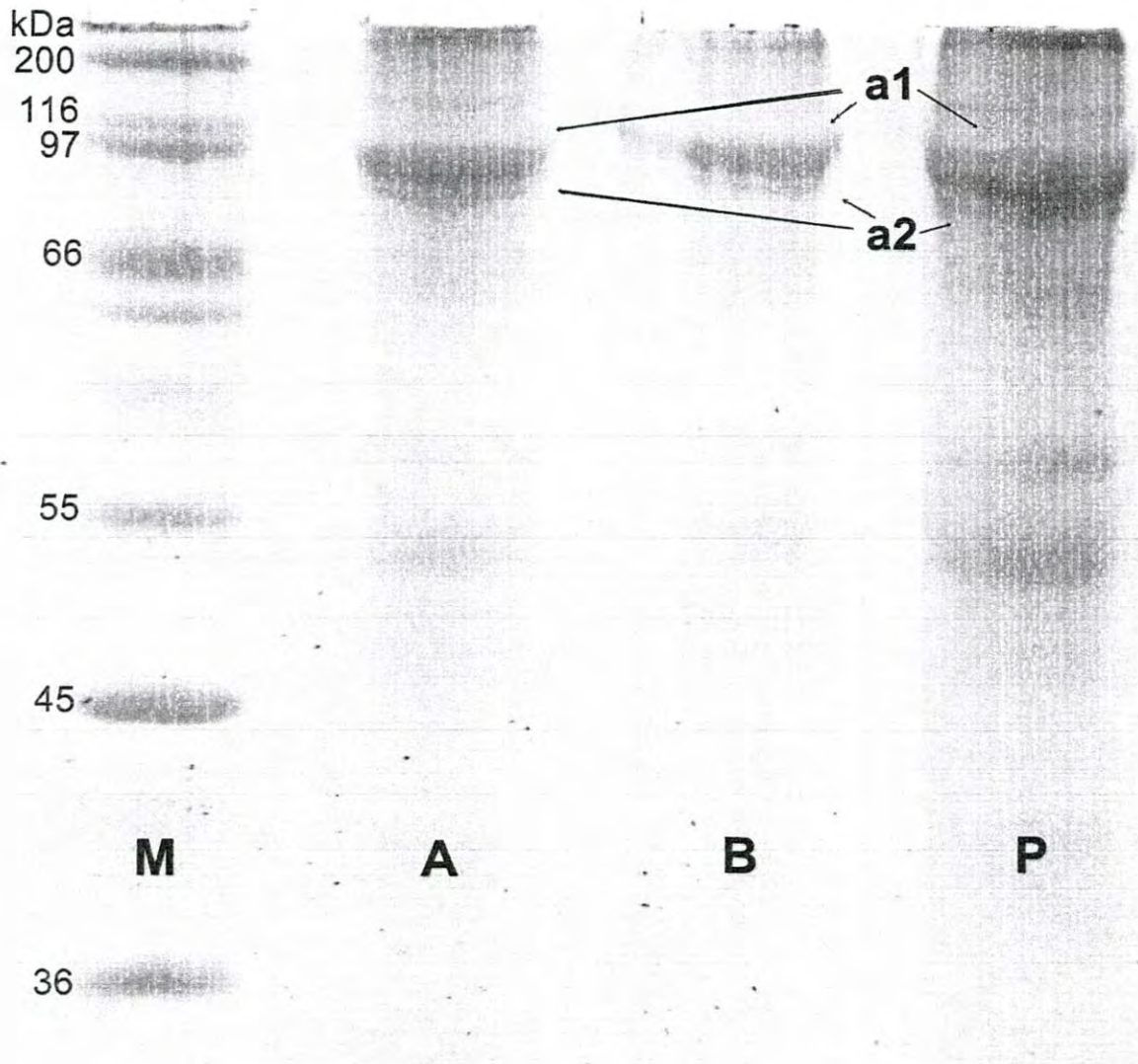


Figura 11. Patrón electroforético de las gelatinas extraídas del calamar gigante

M Carril del marcador de amplio peso molecular

A Carril de la gelatina de aletas

B Carril de la gelatina de brazos

P Carril de la gelatina de piel

Al mismo tiempo, se observa que las bandas a las cuales se ha hecho referencia, no son las únicas presentes en los carriles donde se corrieron las muestras de gelatina. Alrededor de los 50 kDa se aprecian bandas tenues en los tres carriles, las cuales pudieran representar otras proteínas que no lograron ser removidas en el proceso alcalino-ácido utilizado, tales como la elastina (De la Fuente-Betancourt y col., 2009). Otra posible explicación surge del fundamento del método de extracción, donde la proteína pudo haber sido hidrolizada en uno o varios de los pasos donde se utilizaron agentes desnaturizantes o temperaturas elevadas. El propósito de obtener el perfil electroforético en este trabajo fue únicamente corroborar que el proceso de extracción fue adecuado y se estaba trabajando realmente con proteína estromal (en este caso, gelatina) obtenida de músculo o piel del calamar gigante, lo cual se demostró en base a las bandas observadas.

Perfil de Aminoácidos

El análisis de aminoácidos de las gelatinas obtenidas del calamar gigante permitió su caracterización más detallada, retomando estos resultados en el esclarecimiento de la actividad antioxidante de estas muestras. En la **Tabla 3**, se presenta la relación de los aminoácidos presentes, separados en grupos acorde al tipo de grupo R presente en su estructura, expresados en miligramos de residuos por gramo de muestra. Se observa que las gelatinas de las tres distintas regiones del calamar presentaron una composición aminoacídica similar: la distribución de los aminoácidos estuvo cargada hacia aquéllos de naturaleza no polar, representando en las tres muestras los componentes mayoritarios. En segundo lugar se encontraron los aminoácidos cargados negativamente, es decir, aquéllos de naturaleza ácida. En tercer lugar se encontraron los cargados positivamente, para finalizar con los aromáticos.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las tres gelatinas extraídas

Residuo	Muestras (mg aminoácido/g muestra)		
	Gelatina de Aletas	Gelatina de Brazos	Gelatina de Piel
Glicina ^{NP}	48.29	53.25	50.40
Alanina ^{NP}	22.97	25.45	26.19
Valina ^{NP}	19.10	19.74	15.50
Leucina ^{NP}	33.73	38.60	23.57
Isoleucina ^{NP}	14.38	15.38	12.31
Prolina ^{NP}	32.7	36.45	70.72
Ácido aspártico ^{CN}	49.79	53.38	47.29
Ácido glutámico ^{CN}	76.16	88.38	66.77
Serina ^P	10.11	10.39	14.80
Treonina ^P	22.63	30.02	87.34
Metionina ^P	13.83	13.93	9.90
Hidroxiprolina ^P	3.31	5.22	32.79
Lisina ^{CP}	60.24	65.46	17.35
Arginina ^{CP}	14.02	16.81	26.02
Histidina ^{CP}	11.39	11.32	8.96
Fenilalanina ^A	15.89	15.65	11.57
Tirosina ^A	14.99	17.82	14.89

NP = Residuo No Polar
 CN = Residuo Cargado Negativamente
 P = Residuo Polar
 CP = Residuo Cargado Positivamente
 A = Residuo Aromático

Del listado de residuos que se encontraron en las tres muestras, los de mayor relevancia para la identificación de la gelatina son la glicina, la prolina y la hidroxiprolina, por ser los primeros dos altos en contenido y el tercero por su presencia prácticamente exclusiva en el colágeno y sus derivados. La prolina estuvo presente en las tres muestras; sin embargo la hidroxiprolina esperaba encontrarse en concentraciones elevadas por tratarse del análisis de muestras de gelatinas. Únicamente se detectó en cantidades importantes en la gelatina de la piel (32.79, contra 3.31 y 5.22 en las gelatinas de aletas y brazos respectivamente). Esto se debió a que los extractos de aletas y brazos fueron aprovechados únicamente los tejidos musculares, donde el colágeno se encuentra presente, mas no en tal cantidad como en el caso de tejido conectivo como la piel, donde la concentración fue mayor (Kier y Thompson, 2003). Un valor notable en las tres muestras, pero por su baja concentración, fue el de la glicina. Reportes de otros autores marcan a la glicina como el componente mayoritario con respecto a los otros aminoácidos (Nagai y col., 2001; Sivakumar y col., 2003; Nagai y col., 1999; Saito y col., 2002). En el caso de este estudio la glicina no representó el aminoácido de mayor prevalencia en ninguna de las tres muestras lo cual nos indica que el extracto no incluía únicamente gelatina, ni proteínas estromales. Esto se ratifica partiendo de que se reporta que en el colágeno y la gelatina, la glicina representa el 33% de los residuos (Ehrlich, 2010)). Otro resultado importante fue el contenido de lisina, el cual fue elevado en comparación con los otros residuos analizados en las muestras de aletas y brazos, mas no en la de piel. Una explicación a esto viene de la hidroxilación de la lisina en el colágeno, la cual la vuelve más propensa a formar puentes de hidrógeno y entrecruzamientos con otras cadenas colagenosas, situación que no se ve presente en otras proteínas musculares como la actina, la miosina y otras que se encuentran en el músculo (Shoulders y Raines, 2009). A pesar de lo observado en el patrón electroforético y en el perfil de aminoácidos, no se puede aseverar que se trabajó con únicamente gelatina de calamar, sino que se obtuvieron extractos proteicos bajo una metodología que iba encaminada a la separación de proteínas del estroma.

Actividad Antioxidante

Para demostrar que las gelatinas de calamar gigante poseen funcionalidad biológica, se evaluó su actividad antioxidante por dos métodos distintos: la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) y la capacidad de neutralizar radicales oxígeno (ORAC). En la **Figura 12** se muestra la actividad antioxidante expresada en milimoles equivalentes al Trolox de las tres gelatinas por las dos técnicas. En la determinación de TEAC, donde se evalúa la efectividad de un compuesto para neutralizar el radical ABTS, la actividad resultó estadísticamente igual ($p \geq 0.05$) para el caso de las gelatinas de brazos y piel, al mismo tiempo que fue igual para aletas y brazos. Sin embargo, en los resultados de la capacidad de neutralizar radicales oxígeno se observa una diferencia significativa entre las tres gelatinas. La gelatina de piel del calamar resultó la de mayor actividad sobre las otras dos, efecto principalmente atribuido a la presencia de pigmentos en este tejido los cuales no pudieron ser removidos en su totalidad en el proceso de extracción. Estos compuestos coloridos cumplen con la función de proteger al organismo ante los efectos nocivos de la radiación solar y otras agresiones relacionadas con la generación de radicales libres (Simpson, 2012). La actividad antioxidante de una proteína está dada principalmente a su secuencia de aminoácidos. Todos ellos suelen considerarse como antioxidantes, en mayor o menor medida unos que otros. Lo que resulta biológicamente importante es la capacidad de éstos de mantenerse estables y no volver a reaccionar con otras moléculas, *e. g.* no continuar con la reacción en cadena de la oxidación (Eliás y col., 2008). Los aminoácidos que poseen la capacidad de donar átomos hidrógeno y estabilizarse a sí mismos son los aromáticos, como es el caso de la tirosina, la cual es capaz de llevar a cabo este proceso por medio de la resonancia deslocalizada del grupo fenólico, lo cual hace de ella un grupo menos reactivo que el radical que ella misma regeneró (Decker, 2008). Otro posible factor involucrado en la actividad antioxidante es el grado de compactación, lo cual se ve reflejado en una menor exposición de grupos R con potencial actividad estabilizante de radicales (Mendis y col., 2005).

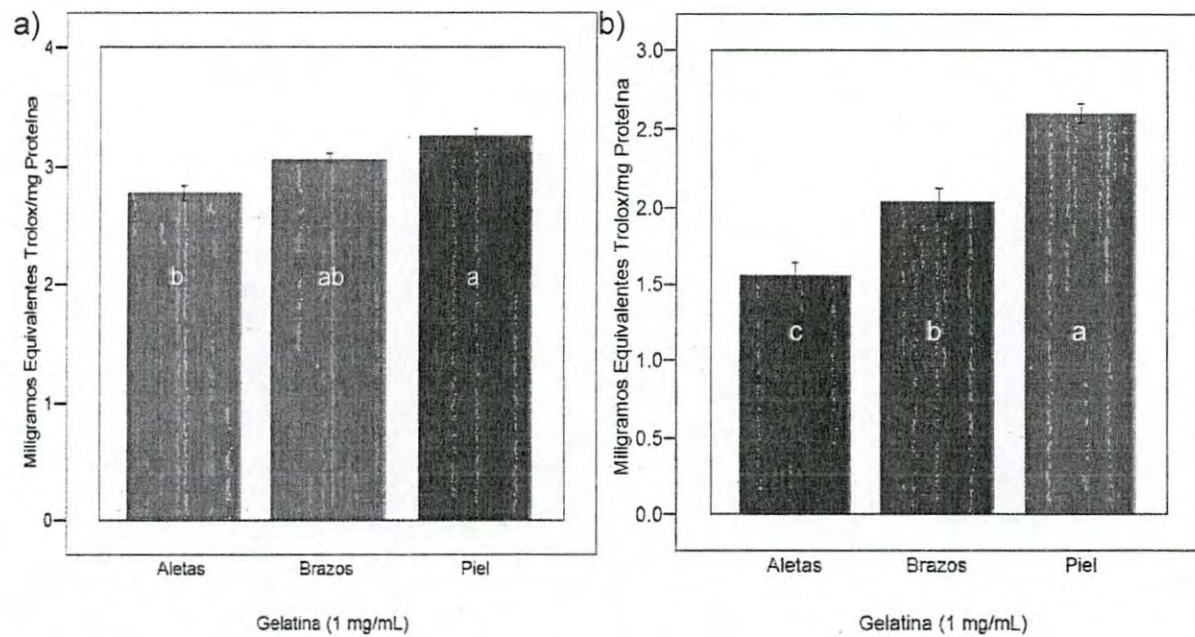


Figura 12. Actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC (a) y ORAC (b) de las tres gelatinas

Digestibilidad *in vitro*

Otro parámetro evaluado en las gelatinas fue el porcentaje de digestibilidad, el cual sirve para predecir si una proteína sería asimilable por un organismo. Los resultados se observan en la **Figura 13**, donde se observa que la gelatina de piel fue la de mayor grado de digestibilidad (81.056 ± 0.469) en comparación con las de aletas y brazos (78.4992 ± 0.677 y 77.3712 ± 0.001 respectivamente), las cuales resultaron estadísticamente iguales. Como se mencionó anteriormente, en el proceso de extracción para el caso de las regiones musculares no se logró una remoción total de proteínas acompañantes. Se presume que esta diferencia de valores de la digestibilidad es atribuible a la presencia de otros polipéptidos que formaron entramados que resultaron más difíciles de romper por parte de las enzimas utilizadas en la digestión. Aunado a esto, se debe considerar el perfil y secuencia aminoacídica de la proteína la cual se pretende digerir, lo cual se ve reflejado en una poca interacción enzima-proteína. Un factor también importante en la interpretación de estos datos es la formación de entrecruzamientos no deseables entre las propias cadenas de la gelatina, como son la lisinoalanina, uno de varios productos responsables de la pérdida de digestibilidad (Gilani y Sepehr, 2003).

Además de lo mencionado se llevó a cabo la comparación de las tres gelatinas de calamar gigante con dos proteínas comerciales: gelatina bovina y colágeno (ambos Sigma-Aldrich). Las tres gelatinas resultaron más asimilables que el colágeno (73.76 ± 0.45), y a su vez en menor grado que la gelatina bovina (83.01 ± 0.23). En comparación con la gelatina, el colágeno presenta como inconveniente un mayor grado de entrecruzamiento y una estructura compacta menos susceptible a la hidrólisis enzimática (Ehrlich, 2010). La gelatina bovina, por otra parte, resultó una proteína más digerible que aquella de origen marino, lo cual puede relacionarse con el grado de interacciones electrostáticas que mantienen a las estructuras firmes, las cuales están más presentes en proteínas conectivas de especies acuáticas (Branden y Tooze, 1999).

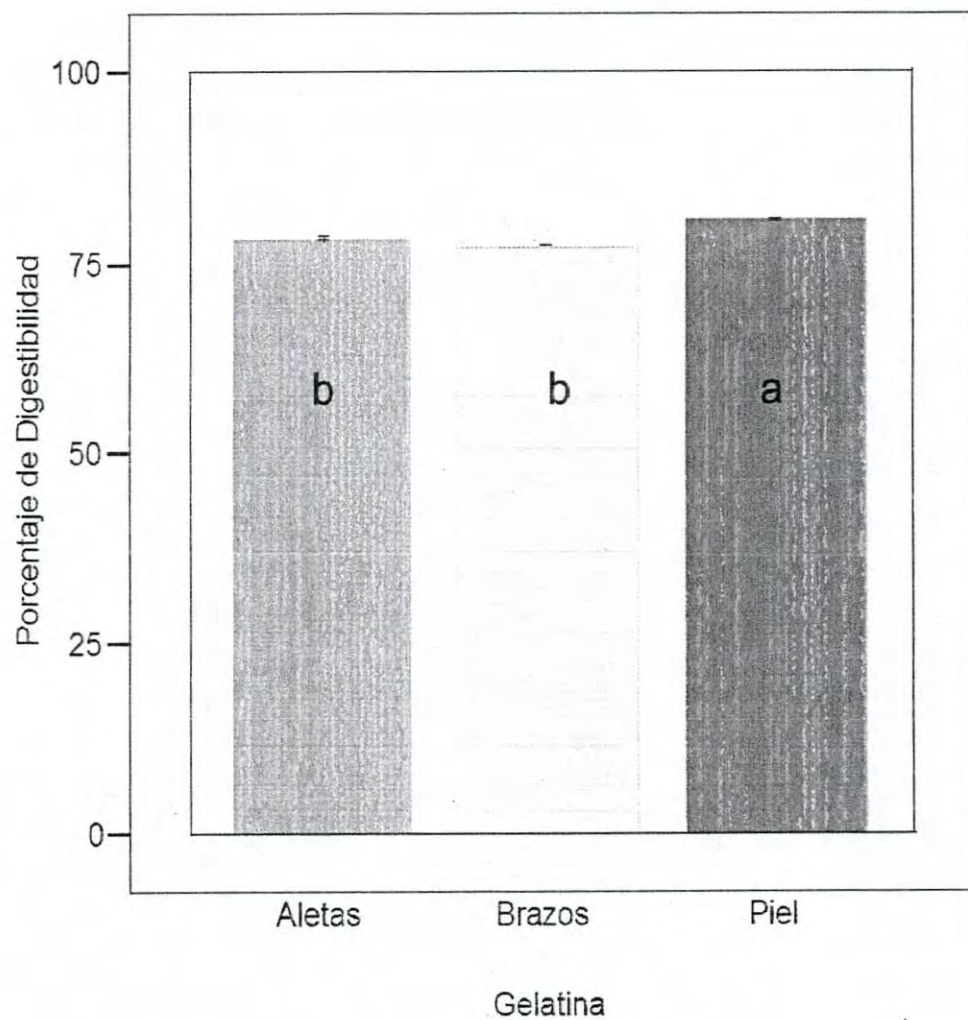


Figura 13. Porcentaje de digestibilidad de las tres gelatinas de calamar

Productos de Digestión de las Gelatinas

Para conocer el efecto de la digestibilidad sobre las gelatinas, se obtuvieron sus perfiles electroforéticos así como su habilidad para fungir como antioxidantes. En primer lugar se muestra el gel obtenido de la electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando al detergente SDS y como agente desnaturizante al β -mercaptoetanol (Figura 14).

En el carril del marcador de peso molecular (Producto M3913, Sigma-Aldrich), se observan las bandas de las 8 proteínas en éste contenidas: albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina de huevo de gallina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina presente en la soya (20 kDa), α -lactoalbúmina de leche bovina (14.2 kDa) y aprotinina de pulmón bovina (6.5 kDa).

En los carriles donde se corrieron las tres muestras se nota que no fue posible obtener bandas definidas, sino un barrido compuesto de distintas fracciones de hidrolizados que exhibieron tener pesos moleculares diversos. Como la digestión que se realizó no fue encaminada a la obtención de cierto tipo de péptidos, se obtuvieron productos que estuvieron en el rango de los 14.2 y menores de 6.5 kDa, por lo observado en el perfil electroforético. Tomando en cuenta que la mayoría de los autores reconocen a los fracciones proteicas menores a los 10 kDa como aquéllos de actividad biológica, se puede inferir que los productos de digestión de las tres gelatinas de calamar gigante la tendrán (Aluko, 2012).

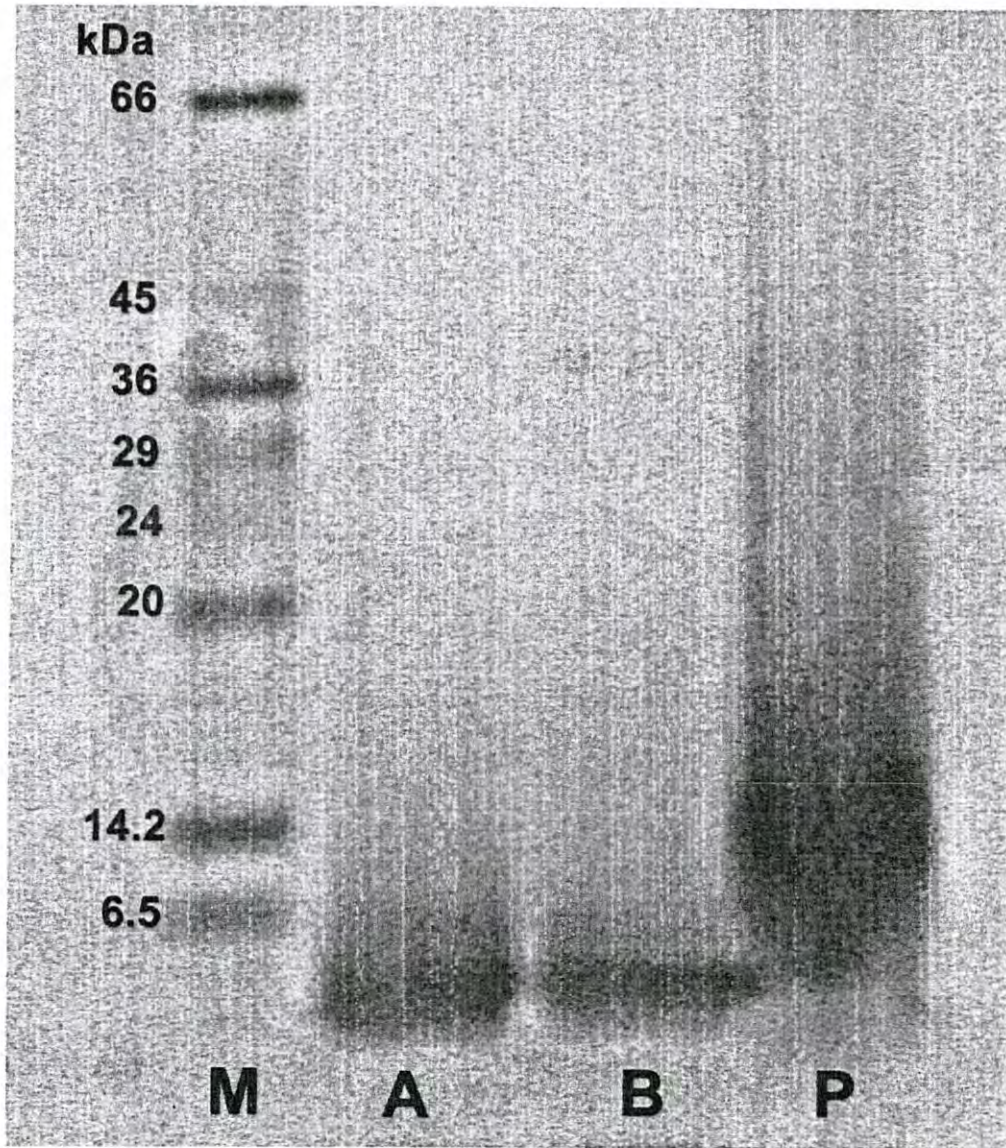


Figura 14. Perfil electroforético de los productos de digestión de las gelatinas

M Carril del marcador de bajo peso molecular

A Carril de los productos de digestión de la gelatina de aletas

B Carril de los productos de digestión de la gelatina de brazos

P Carril de los productos de digestión de la gelatina de piel

Actividad Antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de los productos de digestión obtenidos tras la determinación de la digestibilidad *in vitro* por los dos métodos descritos previamente (TEAC y ORAC). En la **figura 15** se muestran los resultados obtenidos de ambas técnicas. Se observa en primera instancia que la actividad antioxidante fue mayor en los productos de digestión sobre la gelatina. Este mismo comportamiento ya había sido reportado por otros autores para proteínas de origen marino (Alemán y col., 2010; Gómez-Guillén y col., 2010; Alemán y col., 2010). Esto se ve relacionado con la exposición de grupos R que, de otra forma, no estarían disponibles para reaccionar con los radicales a los que se ve enfrentada la proteína; además se supera el impedimento estérico, es decir, la imposibilidad de interactuar por efecto del tamaño de la molécula y la presencia o ausencia de cargas, las cuales obstruyen la reacción (Kim y Mendis, 2005).

En respecto al mecanismo de acción que exhiben los péptidos antioxidantes se cuenta con información bastante limitada, sin embargo para el de los aminoácidos está relativamente esclarecido. Los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) son los más ampliamente reconocidos como poderosos antioxidantes debido, precisamente, al átomo de azufre presente en su estructura, el cual le confiere características nucleofílicas. Los aminoácidos contenientes anillos aromáticos son capaces de donar hidrógenos y posteriormente estabilizar su estructura (como es el caso de la tirosina). Los residuos polares se caracterizan por contener grupos funcionales que pueden donar con relativa facilidad un hidrógeno (grupos OH y NH₂), así como los cargados positiva y negativamente (COOH y NH₂). Con respecto a los aminoácidos no polares, se les reconoce por su capacidad de interactuar en la interfase entre los compuestos hidrofílicos e hidrófobos, previniendo la oxidación lipídica (Mendis y col., 2005). El anillo imidazol de la histidina se comporta como un estabilizador de radicales hidroxilo y promover la quelación de metales. Este grupo funcional tiene la capacidad de funcionar en reacciones como la transferencia de átomos de hidrógeno, así como donar electrones para neutralizar radicales (Krämer y col., 1996).

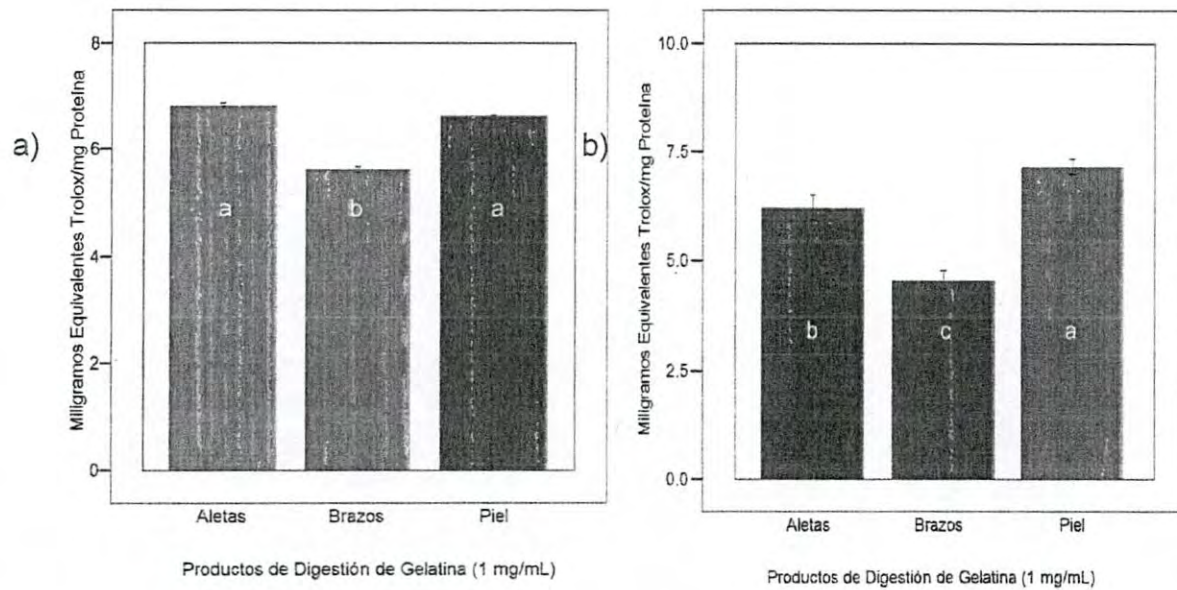


Figura 15. Actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC (a) y ORAC (b) de los productos de digestión de las tres gelatinas

La presencia de grupos hidrofóbicos en las gelatinas en altas concentraciones, en especial leucina y prolina, hacen suponer que facilitarán su aprovechamiento por parte de las células debida su afinidad a las membranas celulares (Alberts y col., 2008). Relacionado con esta afinidad está la capacidad de interactuar de forma integral con este componente celular y prevenir el ataque de radicales a ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se reconoce como los blancos principales de estas especies reactivas (Udenigwe y Aluko, 2011). Las estructuras cíclicas electrónicamente densas de aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina y triptófano, son reconocidos neutralizadores de radicales libres ya que logran formar los productos *meta*, *para* u *orto* hidroxilados, los cuales son más estables que el propio radical hidroxilo (Nimalaratne y col., 2011). Por otro lado, los aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico) son capaces de donar electrones, así como de quelar metales, formando sales que inhiben la posterior reacción de éstos en reacciones como la de Fenton y de Haber-Weiss (Udintsev e Ivanov, 1983). El grupo sulfhidril de los aminoácidos metionina y cisteína se reconoce como un fuerte donador de protones, confiriéndole capacidad antioxidante en pruebas como las de ORAC (Levine y col., 1996).

Desde otro punto de vista, estos mismos residuos pueden ser de importancia en la capacidad antioxidante pero no como antioxidantes primarios, sino como bloques que conformarán al tripéptido glutatión (ácido glutámico-cisteína-glicina) (Waschulewski y Sunde, 1988). Dentro de este mismo rubro está el dipéptido metionina-tirosina obtenido de músculo de sardina, el cual se encontró que promovió la expresión de la hemo-oxigenasa 1 y la ferritina, ambas relacionadas a la prevención del daño oxidativo (Bougates y col., 2010). El consumo de hidrolizados de colágeno obtenido de medusas aumentó la expresión de la superóxido dismutasa, así como la concentración de malondialdehído sérico en ratones (Udenigwe y Aluko, 2011).

Bioensayo de Intervención con Gelatina

La siguiente parte de la investigación consistió en la evaluación del efecto que tendría la suplementación con gelatina al 0.5 % de las tres regiones anatómicas del calamar gigante en la dieta de ratas sobre la capacidad antioxidante total sérica y la producción de malondialdehído presente en suero.

En la **Figura 16** se muestran los gráficos del consumo diario de gelatina y la ganancia en peso semanal de los animales. El consumo diario de gelatina resultó estadísticamente igual ($p \geq 0.05$) para los tres grupos de ratas analizados, lo cual demostró que el volumen de gelatina consumido no representaría una variable en este estudio. Esto implica en que la cantidad ingerida por los animales fue igual, por ende, haciendo los datos entre los grupos comparables entre sí. La cantidad ingerida por los tres grupos resultó ser mayor a la media de consumo de agua que se reporta para ratas Wistar, que es de 15 mL por 100 g de peso (Wostmann y col., 1983). La ganancia en peso no se vio afectada significativamente ($p \geq 0.05$) con respecto al grupo control ni entre los grupos de intervención, dado que las gelatinas no poseían un perfil de aminoácidos adecuado para representar una fuente de proteína de calidad, específicamente por la ausencia de triptófano y cisteína (Davis y col., 1993).

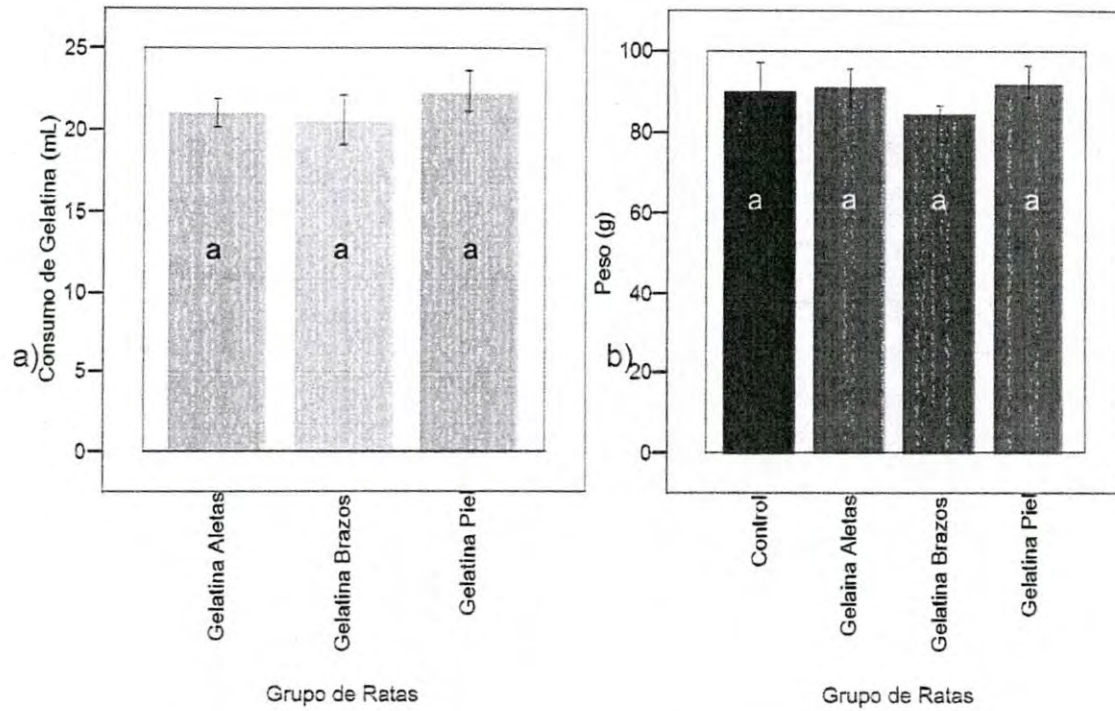


Figura 16. Consumo diario de gelatina (a) y ganancia en peso semanal (b) de los grupos de ratas

Capacidad Antioxidante Total Sérica

Transcurridos 30 días de intervención con gelatina se analizó la capacidad antioxidante total de los sueros de las ratas por los métodos de TEAC y ORAC para observar el efecto de la administración de la proteína de calamar.

En la **Figura 17** se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de los sueros por los dos métodos evaluados. Para el caso de ambas técnicas, los tres grupos de gelatina resultaron estadísticamente iguales al control y entre sí ($p \geq 0.05$). Al haberse demostrado que los productos de digestión de la gelatina poseían actividad antioxidante se sospechó que la capacidad antioxidante sérica aumentaría, sin embargo, este efecto no se encontró. Si se toma en consideración que la actividad antioxidante medida por los métodos de TEAC y ORAC representa únicamente una parte de la acción por la cual un compuesto puede actuar como tal, es decir como un agente capaz de neutralizar radicales libres ya sea donando electrones o protones, se está ignorando otros mecanismos igualmente valiosos que le confieren a un compuesto este mismo beneficio. Un antioxidante de relevancia biológica no es únicamente aquél capaz de eliminar radicales, sino también implica su rol en la expresión de enzimas antioxidantes endógenas, su acción como cofactor de dichas proteínas, de quelar metales que propician la generación de radicales, la capacidad de regenerar otros antioxidantes (vitaminas como la C y la E), su papel como precursores en la biosíntesis de péptidos antioxidantes (glutatión), por mencionar algunos (Huang y col., 2005). También se debe de tomar en cuenta la complejidad que representa la evaluación de una variable como la capacidad antioxidante en un fluido tan complejo como el suero, donde se encuentran otras moléculas con actividad antioxidante, las cuales pudieran enmascarar el efecto propio de la gelatina (ácido úrico, bilirrubina, etc.) (Cao y Prior, 1998).

Si en este estudio se hubiera separado al suero en sus fracciones proteicas y no proteicas, cabe la posibilidad de que se distinguiese el verdadero efecto de la gelatina como agente antioxidante de importancia en un ser vivo.

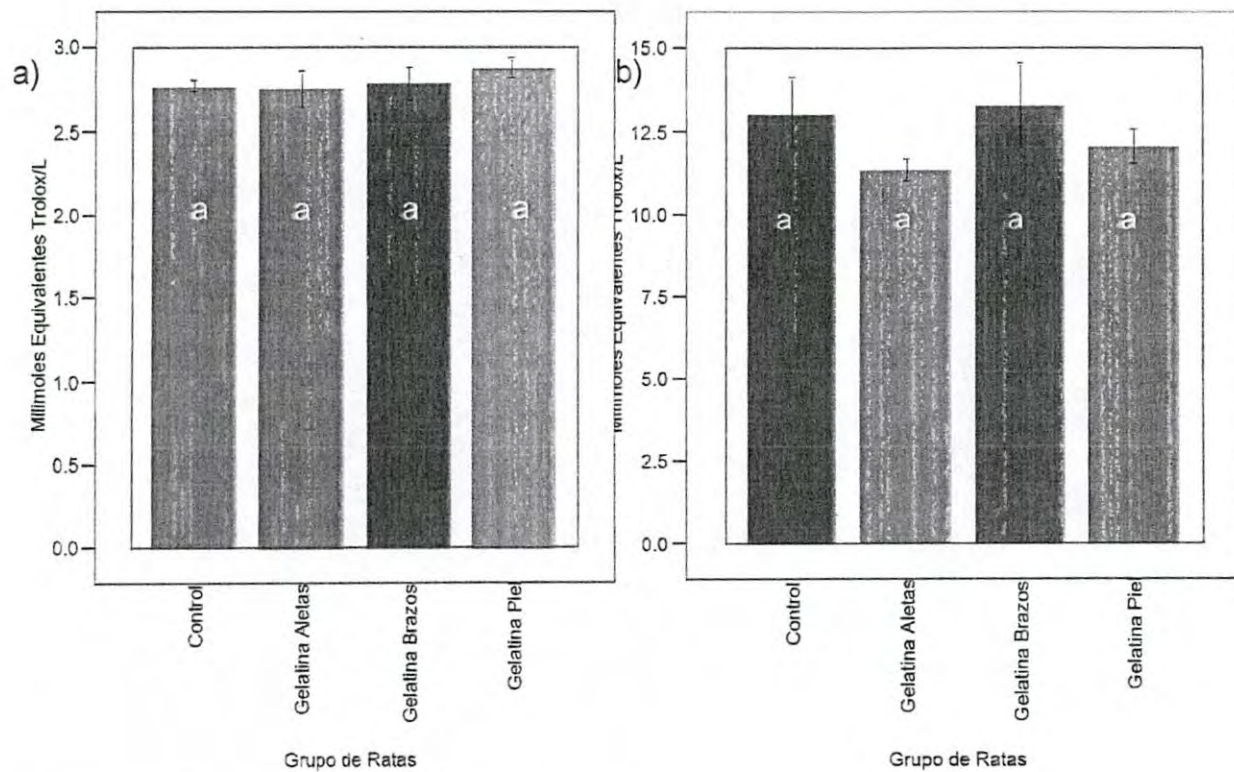


Figura 17. Capacidad antioxidante total de los sueros por los métodos de TEAC (a) y ORAC (b)

Malondialdehído Sérico

Otra prueba realizada que está altamente relacionada a la capacidad antioxidante es la concentración de malondialdehído (MDA). Esta medición se incluyó por ser la producción de MDA un biomarcador de daño oxidativo en modelos vivientes, al ser éste uno de los productos finales de la oxidación lipídica mediada por radicales libres. En la **Figura 18**, se muestra la gráfica de concentración de MDA por microlitro de suero, donde se encontró que, en contraste con los dos métodos de actividad antioxidante evaluados, sí hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos de gelatinas (aletas 0.46 ± 0.007 , brazos 0.47 ± 0.004 , piel 0.49 ± 0.001) contra el control (0.53 ± 0.007). Esto simboliza que, como se mencionó anteriormente, con las metodologías de TEAC y ORAC únicamente se probó que la sustancia evaluada puede o no donar un electrón o un átomo de hidrógeno respectivamente a un radical sintético o a una especie reactiva de oxígeno.

Los valores menores de MDA en los sueros de las ratas alimentadas con gelatina indican que es posible que haya ocurrido un efecto protector con respecto a las membranas celulares y demás compuestos de naturaleza lipídica susceptibles a la oxidación. Los mecanismos de prevención ante el ataque de radicales libres por parte de péptidos de gelatina aún no está dilucidado, por lo que lo presentado a continuación son situaciones hipotéticas que pudieron haber ocurrido en el organismo que inhibieron la generación de malondialdehído. Los péptidos generados tras la digestión de la gelatina pudieron haber estabilizado los radicales libres por reacción directa, es decir, actuar como antioxidantes primarios. Desde otra perspectiva también puede ser posible que lograron la quelación de metales de transición (especialmente hierro y cobre), previniendo la reacción de Fenton, debido a que los residuos de los péptidos (como los cargados negativamente) poseen en su estructura grupos funcionales que forman complejos que imposibilitan dicha reacción.

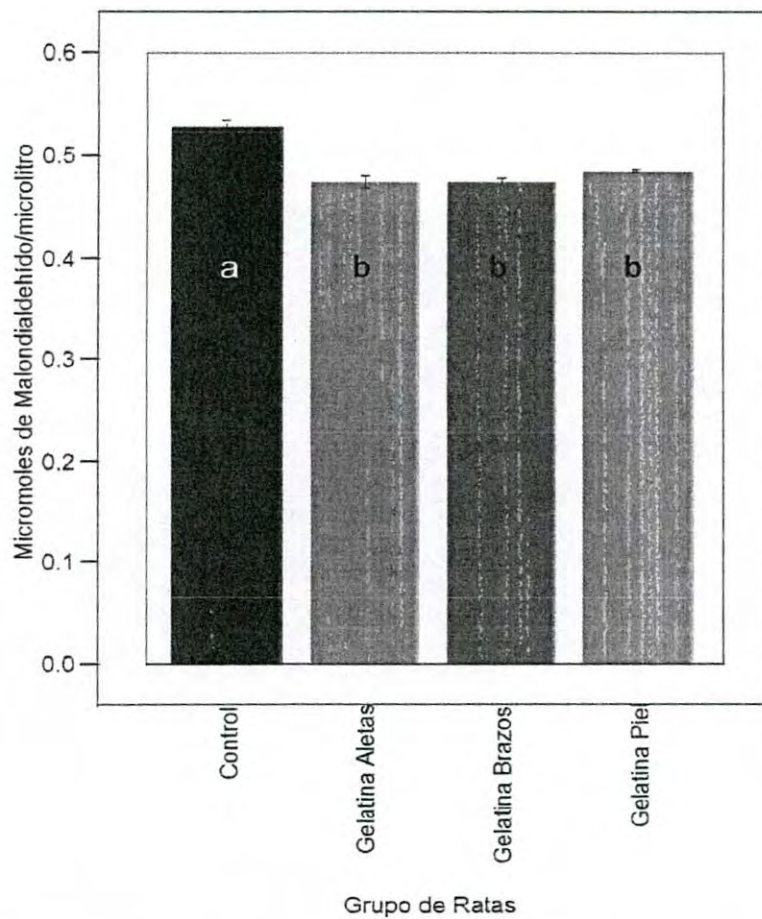


Figura 18. Concentración de malondialdehído sérico de los diferentes grupos de ratas

La actividad biológica de los péptidos obtenidos por procesos digestivos no se limita a un solo mecanismo de acción; la misma peroxidación no es una reacción simple y directa, sino que consiste en la formación de miles de distintos productos distintos los cuales están determinados en función del ácido graso oxidado. El hecho de que las gelatinas de calamar gigante fueron compuestas de principalmente aminoácidos no polares hace suponer que fueron éstos los que contribuyeron de forma mayoritaria en los beneficios observados en las ratas que fueron alimentadas con estos extractos.

La hidrofobicidad de los péptidos generados permite que interactúen con otras moléculas afines, siendo éstas beneficiadas por su actividad antioxidante (Murase y col., 1993). No obstante, existe la posibilidad de que los productos de digestión de la gelatina hayan inhibido la formación de radicales libres mediante la quelación de metales (hecho fundado en la presencia en concentraciones superiores a aminoácidos como los cargados positivamente en comparación con los demás). Estudios como los de Saiga y col. en 2003, Chen y col. en 1998 y Chen y col. en 1996 demuestran que los péptidos obtenidos de distintos alimentos, los cuales son ricos en aminoácidos de naturaleza lipofílica, tendrán una mayor afinidad a los ácidos grasos presentes en las membranas celulares y podrán protegerles de la oxidación donde participan las especies reactivas de oxígeno. Si estos ácidos grasos no son afectados, no se llevará a cabo la peroxidación, por ende, no se formará el malondialdehído ni otros compuestos igualmente dañinos.

Otro posible escenario es que los péptidos actúen como "moléculas blanco". Esta expresión quiere decir que estos productos de digestión de la gelatina representen moléculas más fáciles o más disponibles a oxidar que las membranas celulares, es decir, que resulte más factible atacar a un péptido que a un componente celular lipídico. Esta perspectiva no hablaría de actividad antioxidante, sino de una "susceptibilidad acrecentada" con respecto a su contraparte lipofílica. Analizando esta posible explicación, entonces los péptidos son oxidados espontáneamente, ya que simplemente estuvieron a expensas del incesante ataque de los radicales generados en su cercanía.

Correlaciones entre las Variables de Estudio

Por último se analizó la correlación que existía entre algunas de las variables del estudio con la finalidad de explicar el comportamiento de los datos. Se observa que el coeficiente de correlación entre los métodos de TEAC y ORAC de las gelatinas y de los productos de digestión fueron altas ($r^2 = 0.959$ y $r^2 = 0.823$, respectivamente), lo cual indica que las gelatinas así como sus péptidos generados en un proceso de digestión *in vitro* pueden actuar como antioxidantes primarios, interactuando directamente con los radicales y estabilizarlos. Otro coeficiente de correlación importante es el del porcentaje de digestibilidad con el de ORAC de los productos de digestión ($r^2 = 0.909$), el cual pudiera interpretarse como el efecto positivo que tiene la hidrólisis enzimática sobre la actividad antioxidante, específicamente con la neutralización de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado está la baja correlación ($r^2 = 0.166$) entre el consumo de gelatina y la ganancia de peso, lo cual corrobora lo estipulado anteriormente con respecto a que la gelatina que se obtuvo tenía un perfil de aminoácidos deficiente en aquellos que resultan esenciales para el desarrollo de las ratas.

CONCLUSIONES

Se obtuvo gelatina (extractos proteicos) a partir de tres importantes co-productos de calamar gigante (piel, aletas y brazos), estableciéndose un mismo protocolo para las tres regiones, empleando para ello reactivos amigables al medio ambiente y bajo condiciones viables a ser aplicadas en localidades que no puedan soportar altas tecnologías.

Bajo las condiciones evaluadas en este estudio se estableció que la actividad antioxidante de las gelatinas contra sus productos de digestión aumentó cuando se llevó a cabo la hidrólisis enzimática *in vitro*.

El bioensayo de intervención con gelatina demostró que el consumo de esta proteína al 0.5 % aunque no tuvo un efecto sobre la capacidad antioxidante total sérica, evaluada por TEAC y ORAC, los niveles de malondialdehído sérico disminuyeron significativamente con respecto al grupo control.

RECOMENDACIONES

Evaluar distintas concentraciones de la gelatina obtenida de los tres co-productos del calamar gigantes sobre la actividad antioxidantes y la concentración de malondialdehído sérico.

Obtener la capacidad antioxidante de las distintas fracciones del suero murino (proteica, no proteica y total) y determinar la aportación de cada uno de los compuestos antioxidantes presentes.

Determinar si la expresión de enzimas antioxidantes se ve afectada mediante la inclusión de gelatina en la dieta.

Evaluar otros parámetros como la concentración de glutatión oxidado, la formación de grupos carbonilos en proteínas y de F2-isoprostanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell. Ed. Garland Science. 5ta ed. EUA. pp 1601
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Res. Int.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. 2010. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. Food Sc. and Tech.
- Aluko, R. E. 2012. Functional Foods and Nutraceuticals. Ed. Springer Science+Business Media. EUA. 37-58
- Akoh, C., Min, D. 2002. Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Marcel Dekker Inc. 2da Edición. EEUU.
- Auger, F. A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V., Germain, L. 1998. Tissue-engineered human skin substitutes developed from populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. Med. Biol. Eng. Comput. 36, 801-812
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. 2009. Food Chemistry. Ed. Springer. 4ta. ed. pp 1070
- Borza, D., Bondar, O., Ninomiya, Y., Sado, Y., Naito, I., Todd, P., Hudson, B. 2001. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in smooth muscle basement membranes. Journal of Biological Chemistry. 276.30(28532-28540)
- Boyle, P., Rodhouse, P. 2005. Cephalopods: Ecology and fisheries. John Wiley and Sons.EUA. pp 464.
- Bougates, A., Nedjar-Arroume, L., Ravaillec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. Food Chem. 118, 559-565
- Branden, C., Tooze, J. 1998. Introduction to Protein Structure. Ed. Garland Publishing. 2 ed. pp 426
- Brown, G. C., Borutaite, V. 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. Life. 52, 189-195

- Carr, A., McCall, M., Frei, B. 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species – reaction pathways and antioxidant protection. *Atheroscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (1716-1723)
- Cao, G., Prior, R. L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 44 (6), 1309-1315
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. 1996. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2619-2623
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46, 49-53
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2010. Anuario estadístico de Acuacultura y Pesca 2010. CONAPESCA. pp 289
- Cuevas-Acuña, A. 2010. Potencial Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Colágeno de Aleta de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis. Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora
- Davis, T. A., Fiorotto, M. L., Reeds, P. J. 1993. Amino acid composition of body and milk protein change during the suckling period of rats. *J. Nutr.* 123 (5), 947-956
- De la Fuente-Betancourt, G., García-Carreño, F., Navarrete del Toro, M. A., Córdova-Murueta, J. H., Lugo-Sánchez, M. E. 2009. Protein solubility and production of gels from jumbo squid. *J. Food Biochem.* 33 (2), 273-290
- Decker, E. A. 2008. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Ed. Taylor & Francis. EUA. 475-492
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Pellegrini, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardio. Diseases.* 15, 316-328
- Dizdaroglu, M., Bauche, C., Rodriguez, H., Laval, J. 2002. Novel substrates of *Escherichia coli* Nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. *Biochem.* 39, 3625-3628
- Ehrlich, H. 2010. *Biological Materials of Marine Origin*. Ed. Springer Science+Business Media. EUA. 427-441

- Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., Decker, E. A. 2006. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions. *J. Agric. Food Chem.* 54 (25), 9565-9572
- Ertner, C., Rehberg, S., Van Aken, H., Westphal, M. 2009. Relevance of non-albumin colloids in intensive care medicine. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* 23 (2), 193-212
- Fennema, O. R. 1996. *Food Chemistry*. Ed. Marcel-Drecker. 3a ed. EUA. pp 1609
- Field, J., Phillips, J., Walker, W. 2007. Range expansion and trophic interactions of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, in the California current. *CalCOFI Rep.*, Vol. 48, 131-146
- Garrett, A. R., Murray, B. K., Robinson, R. A., O'Neill, K. L. 2010. Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Advance Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology.* 594, 251-262
- Gilani, G. S., Sepehr, E. 2003. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. *J. Nutr.* 133 (1), 220-225
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856
- Jongjareonrak, A., Rawdkuen, S., Chaijan, M., Benjakul, S., Osako, K., Tanaka, M. 2010. Chemical composition and characterization of skin gelatin from farmed giant catfish *Pangasianodon gigas*. *Food Science Technol.* 43, 161-165
- Keyl, F., Wolff, M., Argüelles, J., Mariátegui, L., Tafur, R., Yamashiro, C. 2008. A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in Eastern Pacific Ocean. *CalCOFI Rep.* 49, 119-128
- Kier, W. M., Thompson, J. T. 2003. Muscle arrangement, function and specialization in recent coleoids. *Berliner Paläobiol. Abh.* 3, 141-162
- Kim, S., Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review, *Food Research International*
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A., Smith, A. C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379, 635-638

- Laemmli, U (1970) Nature, 227: 680-685.
- Lee, C. H., Singla, A., Lee, Y. 2001. Biomedical applications of collagen. Int. J. Pharm. 221, 1-22
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., Stadtman, E. R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 15036-15040
- Lushchak, V. I., Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms, 2007, Biochemistry, Vol 72, No. 8, pp 809-827
- Marnett, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 21 (361-370)
- Martínez-Álvarez, O., Guimas, L., Delannoy, C., Fouchereau-Peron, M. 2007. Occurrence of a CGRP-like molecule in siki (*Centroscymnusco elolepsis*) hydrolysate of industrial origin. J. Agric. Food Chem. 55, 5469-5475
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. J. Agric. Food Chem. 53, 581-587
- Mingyan, Y., Bafang, L., Xue, Z. 2009. Isolation and characterization of collagen from squid (*Ommastrephes bartramii*) skin. Oceanic and Coastal Sea Res. 8 (2), 191-196
- Murase, H., Nagao, A., Terao, J. 1993. Antioxidant and emulsifying activity of *N*-(long chain acyl) histidine and *N*-(long chain acyl) carnosine. J. Agric. Food Chem. 41, 1601-1604
- Muyonga, J., Cole, C., Duodu, K. 2004. Characterisation of acid-soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chem. 85 (1), 81-89
- Nagai, T., Ogawa, T., Nakamura, T., Ito, T., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T. 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. J. Sci. Food Agric. 79, 855-858
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., Suzuki, N. 2001. Isolation and characterisation of collagen of the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). Food Chem. 72, 425-429
- Niedernhofer, H. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., Marnett, L. J. 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. J. Biol. Chem. 278, 31426-31433
- Nigmatullin, C., Nesis, K., Arkhipkin, A. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries Research. 54(9-19)

- Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., Wu, J. 2011. Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. *Food Chem.* 129 (1), 155-161
- Porstmann, B., Porstmann, T., Nugel, E. 1981. Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker in enzyme immunoassay. *J. Clin. Chem.* 19, 435-439
- Quiney, C., Finnegan, S., Groeger, G., Cotter T. G. *Protein Reviews, Volume 13 Post-Translational modifications in health and disease: Protein oxidation.* 2011, Springer Science+Business Media. EEUU.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Path. Biol.* 53, 430-442
- Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., Berra, B. 2010. *Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers.* Ed. Springer Science+Business Media. EUA. 52-67
- Roomi, M. W., Ivanov, K., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., Rath, M. 2005. In vivo antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human prostate cancer PC-3 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry. *In vivo.* 19 (1), 179-183
- Rosas-Luis, R., Salinas-Zavala, C.A., Koch, V., Del Monte-Luna, P., Morales-Zárate, M.V. 2008. Importance of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) in the pelagic ecosystem of the central Gulf of California. *Ecological modelling.* 218, 149-161
- Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3661-3667
- Saito, M., Kunisaki, N., Urano, N., Kimura, S. 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. Food Science.* 67 (4), 1319-1322
- Satterlee, L. D., Kendrick, J. G., Marshall, H. F., Jewell, D. K., Ali, R. A., Heckman, M. M., Steinke, H. F., Larson, P., Phillips, R. D., Sarwar, G., Slump, P. 1982. In vitro assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65 (4), 798-806
- Shoulders, M. D., Ronald, R. T. 2009. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 929-958

- Simpson, B. K. 2012. Food Biochemistry and Food Processing. Ed. Wiley-Blackwell. 2da ed. EUA. pp 896
- Sivakumar, P., Suguna, L., Chandrakasan, G. 2003. Similarity between the major collagens of cuttlefish cranial cartilage and cornea. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134 (1), 171-180
- Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Adam, V., Hubalek, J., Kizek, R., Babula, P. 2012. Automation of methods for determination of lipid peroxidation. *Biochem. Gen. Mol. Biol.*
- Szpak, P. 2011. Fish bone chemistry and ultrastructure: Implications for taxonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science.* 3358-3372
- Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *Int. J. Mol. Sciences.* 12, 3148-3161
- Udintsev, N. A., Ivanov, V. V. 1984. Antioxidant action of glutamic acid. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* Jul-Aug (4), 60-62
- Universidad de California.
<http://www.pleasanton.k12.ca.us/avhswweb/thiel/bio/labs/squid.html>. Recuperado el 01 de febrero de 2012.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions.* 160(1-40)
- Vanacore, R., Shanmugasundararaj, S., Friedman, B., Bondar, O., Hudson, B., Sundaramoorthy, M. 2004. The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ network of collagen IV. *Journal of Biological Chemistry.* 279.43(44723-44730)
- Vázquez-Ortiz F, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez M, Villegas O (1997) *J. Food Comp. Anal.* 10: 158-165.
- Watanabe-Kamiyama, M., et al., 2010. Absorption and Effectiveness of Orally Administered Low Molecular Weight Collagen Hydrolysates in Rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- Waschulewski, I. H., Sunde, R. A. 1988. Effect of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenomethionine for glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 118(3), 367-374

res. T140032

Werber, J., Wang, J., Milligan, M., Li, X., Ji, J. 2011. Analysis of 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. J. Pharm. Sciences. 100 (8), 3307-3315

Wostmann, B. S., Larkin, C., Moriarty, A., Bruckner-Kardoss E. 1983. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. Lab. Anim. Science. 33 (1), 46-50