

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS
VEGETALES DE CHÍA (*Salvia hispanica L.*)
Y EL ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES
BIOACTIVAS

Álvaro Villanueva Lazo
Tesis Doctoral 2023

**“OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS
VEGETALES DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.)
Y EL ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES
BIOACTIVAS.”**



Departamento de Alimentación y Salud



Facultad de medicina

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e

Inmunología

Memoria que presenta D. Álvaro Villanueva Lazo

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Dra. MARÍA DEL CARMEN MILLÁN LINARES, Profesora del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS VEGETALES DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) Y EL ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES BIOACTIVAS.” realizada por D. Álvaro Villanueva Lazo para optar al grado de Doctor, ha sido llevada a cabo bajo mi dirección.

V.º B.º La Directora

Dra. M^a del Carmen Millán Linares

Dr. CECILIO CARRERA SÁNCHEZ, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla, INFORMA que D. Álvaro Villanueva Lazo cumple los requisitos académicos (R.D. 99/2011) para optar al grado de Doctor.

V.º B.º

El Tutor

Dr. Cecilio Carrera Sánchez

**“Un esfuerzo mas allá de lo exigido,
dará un resultado más allá de lo esperado”**

Gonzalo García Molina

A mi familia, la sevillana y la malagueña.

A Vicky, Álvaro y Victoria.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que me han animado y ayudado siempre a alcanzar las metas que me he propuesto y que seguro me van a acompañar en las que me quedan por alcanzar, en especial:

A mi jefe, tutor y amigo, desde que entre a formar parte de su grupo de trabajo, Francisco Millán Rodríguez que me ha formado en el terreno profesional y me ha inculcado unos valores éticos y humanos que me han hecho crecer como persona, y a mi directora de Tesis María del Carmen Millán Linares, que tomando el testigo que le dejaba su padre, impulsó mi carrera científica, carrera que espero desarrollar junto a ella.

A los integrantes del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla, que tan generosamente me han acogido como uno más, gracias por vuestro trabajo y apoyo.

A todos los que, en algún momento, han formado parte de mi vida profesional, con especial cariño a aquellos con los que empecé mi andadura, Alfonso, Raúl, Justo, María del Mar, Manolo, Julio y Javier, y a todos con los que alguna vez he colaborado, entre los que se encuentra Cecilio, que sin dudarlo aceptó ser el tutor de esta Tesis y con el que espero seguir colaborando en el futuro.

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
aC	Antes de Cristo
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADA	Asociación dietética americana
ADGL	Ácido dihomo- γ -linolénico
AESAN	Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
AGL	Ácido γ -linolenico
ALA	Ácido α -linolénico
Alcalase	Alcalase 2.4 L
ANOVA	Análisis unidireccional de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
AU	Unidades Anson
BHT	3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
Caco-2	Adenocarcinoma colorrectal humano
CCR7	Receptor de quimiocinas CC tipo 7
CDF	Harina desengrasada de chía
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CPH	Hidrolizado proteico de chía
CPI	Aislados proteicos de chía
DHA	Acido docosahexaenoico
DM	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FA	Formic acid
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
FAO/OMS	Food and agriculture organization of the united Nations/Organización Mundial para la Salud
FAO/OMS/UNU	Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la alimentación/organización mundial de la salud/universidad de las naciones unidas
FBS	Suero fetal bovino
FCC	Código de productos químicos alimentarios
Flavourzyme	Flavourzyme 1000LAPU
FUFOSE	Ciencia funcional de los alimentos en Europa
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G/P/S	L-glutamina/penicilina/estreptomycin
HD	Grado de hidrólisis
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

IC50	Concentración efectiva que inhibe el 50%
ICP	Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente
IFN γ	Interferón gamma
IL-4	Interleuquina 4
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IFIC	Consejo internacional de información alimentaria
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-10	Interleuquina 10
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
JECFA	Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios
kDa	Kilodaltons
LA	Ácido α -linoleico
LAPU	Unidad de leucina aminopeptidasa
LC-TIMS-MS/MS	Nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con movilidad iónica
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MPA	Fase móvil A
MPB	Fase móvil B
MRC1	Receptor de manosa C-tipo 1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
NAA	Nuevos alimentos autorizados
NK	Aseseina natural
NSD-risc	Red de colaboración de factores de riesgo de enfermedades no transmisibles
NO	Óxido nítrico
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PGE2	Prostaglandina E2
pI	Punto isoeléctrico
P/S	Penicilina/estreptomicina
PEU	Unidad de energía de PASTA
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
p/v	Peso/volumen
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S	Svedverg
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SAT	Ácidos grasos saturados
SD	Desviación estándar
SDS	Sodio dodesilsulfato
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TNBS	Ácido trinitro bencensulfónico
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Unión europea
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
UN	Naciones unidas
ω 3	Ácidos grasos omega 3
ω 6	Ácidos grasos omega 6
WHO	Organización mundial de la salud

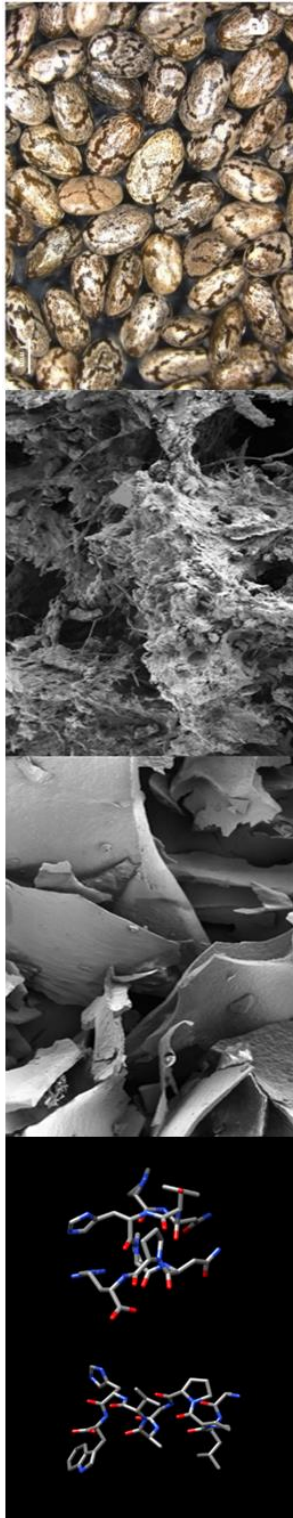
ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Salvia hispanica</i> L.	3
Generalidades	3
Aspectos agronómicos	6
Relación dieta-salud. Definición de alimento funcional	11
Chía como nuevo alimento en Europa	15
Composición nutricional de las semillas de chía	19
<i>Hidratos de carbono</i>	22
<i>Lípidos</i>	24
<i>Proteínas</i>	26
<i>Vitaminas y minerales</i>	30
<i>Fracción fenólica y otros fitoquímicos</i>	32
Aislados proteicos de origen vegetal	32
<i>Preparación de aislados proteicos</i>	33
<i>Usos y aplicaciones de los aislados proteicos</i>	38
Hidrolizados proteicos. Tipos y aplicaciones en alimentación	40
Péptidos bioactivos	44
Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos	45
El sistema inmunitario: monocitos y macrófagos	48
Influencia de la dieta en el estrés oxidativo y la inflamación	52
OBJETIVOS	57
Objetivo general	59
Objetivos específicos	59
MATERIALES Y MÉTODOS	61

Reactivos y muestras	63
Obtención de harina desengrasada de chía en planta piloto	64
Obtención de aislados proteicos	64
Obtención de hidrolizados proteicos de chía	66
Determinación cuantitativa del contenido graso	66
Determinación cuantitativa de la composición de ácidos grasos	66
Determinación cuantitativa de proteínas y péptidos	67
Determinación de cenizas y humedad	68
Determinación de fibra total	68
Determinación de polifenoles y azúcares	70
Determinación cuantitativa de aminoácidos	72
Determinación del punto isoelectrico de las proteínas de chía. Curva de solubilidad proteica frente al pH	74
Grado de hidrólisis	75
Estimación de pesos moleculares mediante cromatografía de filtración en gel	76
Determinación del contenido en minerales mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inducido	76
Caracterización ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido	77
Determinación de propiedades funcionales	77
<i>Solubilidad</i>	77
<i>Absorción de aceite</i>	78
<i>Actividad y estabilidad emulsificante</i>	78
<i>Capacidad y estabilidad espumante</i>	79
Determinación de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina	80

Determinación de la actividad antioxidante	81
<i>Decoloración de β-caroteno</i>	81
<i>Determinación del poder reductor</i>	82
<i>Determinación de la capacidad para secuestrar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo</i>	83
Extracción, purificación e identificación del peptidoma mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de alta resolución con movilidad iónica	84
Análisis <i>in silico</i>	86
Determinación de la viabilidad celular	88
Ensayo de absorción intestinal mediante sistema transwell utilizando la línea celular Caco-2	89
Aislamiento de monocitos humanos primarios	89
Diferenciación y polarización a macrófagos M1/M2	90
Producción de especies reactivas de oxígeno	91
Producción de nitritos	91
Determinación de citoquinas por inmunoensayo ligado a enzimas .	92
Aislamiento de ácido ribonucleico y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	92
Análisis estadístico	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
Obtención de productos de alto valor añadido	97
<i>Obtención de harina desengrasada y aislado de chía</i>	97
<i>Obtención de hidrolizados proteicos de chía</i>	100
Elección del hidrolizado con mejores actividades antihipertensivas y antioxidantes	103
<i>Determinación de la actividad antihipertensiva de los hidrolizados proteicos de chía</i>	103

<i>Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de chía</i>	105
Caracterización de los productos de alto valor añadido	107
<i>Composición química</i>	107
<i>Composición aminoacídica de los productos proteicos de chía</i>	110
<i>Caracterización ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido</i>	114
<i>Caracterización del contenido mineral de CPH15A</i>	115
<i>Propiedades funcionales</i>	117
<i>Peptidoma del hidrolizado proteico de chía</i>	121
<i>Péptidos biodisponibles en CPH15A</i>	125
<i>Análisis in silico de los péptidos biodisponibles</i>	128
Funcionalidad <i>in vitro</i> sobre el estado oxidativo e inflamatorio en monocitos primarios humanos	144
<i>Efecto del hidrolizado de chía sobre el estrés oxidativo en monocitos primarios humanos</i>	144
<i>Efecto del hidrolizado de chía sobre la liberación de citoquinas inflamatorias en monocitos primarios humanos</i>	147
<i>Efecto del hidrolizado de chía sobre la expresión génica de mediadores inflamatorios en monocitos primarios humanos</i>	148
<i>Efecto del hidrolizado de chía sobre la polarización de macrófagos</i>	150
CONCLUSIONES	155
REFERENCIAS	163
Curriculum Vitae abreviado	209



1.- INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

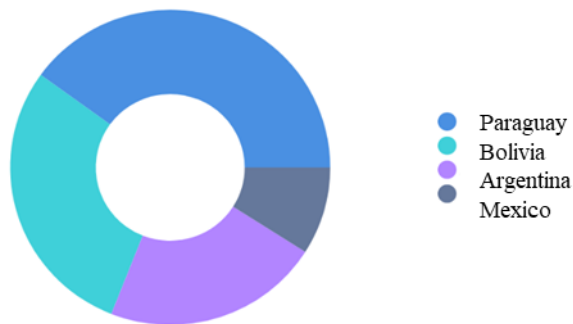
Salvia hispanica L.

Generalidades

La chía (*Salvia hispanica L.*) debe su nombre al botánico sueco Carl Von Linneo que la clasificó en 1753 a partir de unas plantas recolectadas en España. Casi 2 siglos después, se demostró que esta planta es nativa de una región entre México y Guatemala, y que fue Cristóbal Colón quien la trajo a España [1]. Recientes investigaciones han demostrado que comenzó a ser utilizada en la alimentación humana hace 5500 años, que entre el 1500 y el 900 antes de Cristo (a.C.), aztecas, mayas e incas utilizaron las semillas para la preparación de diversos medicamentos, alimentos y pinturas, y que de esta época proviene el nombre común con la que la conocemos en la actualidad. En el lenguaje náhuatl, de los aztecas, chían significa aceitoso, y así llamaban a todas las especies del género *Salvia* caracterizado por su alto contenido en aceite. Tras la conquista española, se suprimieron éste y otros cultivos indígenas, pues con sus semillas y harinas se hacían tortas o panes que ofrecían a sus dioses y luego comían en ritos religiosos, como se hace en la Eucaristía, por lo que los frailes españoles lo consideraron herejía. Afortunadamente el

cultivo de chía se conservó en las zonas montañosas de Jalisco, Michoacan y Puebla [1].

Hoy en día, y aunque la planta de chía solo crece adecuadamente entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, como veremos más adelante, debido a la creación de nuevas variedades adaptadas a otras condiciones climáticas, su cultivo se ha extendido por, América del Sur, Australia, África y Europa [2]. En cuanto al mercado, después de superar los estragos de la pandemia de la COVID 19, en la actualidad, Paraguay es el principal productor y exportador, con 30000 toneladas y Bolivia el segundo, con unas 15000 toneladas anuales, seguido de Argentina y México (**Figura 1**).



Fuente: Mordor Intelligent

Figura 1. Principales productores de semillas de chía, importaciones a Europa (%) 2020 [3].

Además, el mercado de semillas de chía está en continuo crecimiento. Se espera que crezca un 6.5% cada año entre 2022-2027, siendo el mercado europeo el que más rápido está creciendo [4], debido en parte, al impacto social que ha tenido la pandemia, aumentando la preocupación de los consumidores por temas relacionados con la salud, y que se ha traducido en un aumento en la demanda de productos más saludables, entre los que se encuentran las semillas de chía. Así, América del Norte, es el principal consumidor de semillas de chía, seguida de Europa, continentes donde se encuentran países desarrollados y donde los gobiernos están haciendo fuertes campañas de concienciación, recomendando la inclusión en la alimentación de semillas y la sustitución de parte de la proteína animal de nuestra dieta por proteína vegetal (**Figura 2**) [3].



Fuente: Mordor Intelligent

Figura 2. Mercado de semillas de chía por regiones, 2021 [3].

Aspectos agronómicos

La planta de chía es una herbácea anual de la familia de las lamiáceas, como la menta y la albahaca, subfamilia Nepetoideae y género *Salvia*, que engloba a aproximadamente 900 especies. Existen dos variedades de chía, blanca y negra, con muy pocas diferencias nutricionales, solo una ligera diferencia morfológica, las semillas blancas son más grandes, más gruesas y más anchas que las negras; por otra parte, cuando se siembra chía blanca, solo se obtienen semillas blancas, pero cuando se siembra chía negra aparecen algunas blancas [5]. La planta puede alcanzar una altura de entre 100 y 150 cm y presenta hojas opuestas de 4-8 cm de largo por 3-5 cm de ancho. Las flores son hermafroditas, purpúreas (chía negra) (**Figura 3**) o blancas (chía blanca), y brotan en inflorescencias que contienen, de media, tres semillas por cáliz, la cual, mide unos 2 mm de largo por 1.5 de ancho, y es ovalada y lustrosa [6].



Figura 3. Detalles de las características botánicas de las plantas e inflorescencias de chía

(<http://identify.plantnet.org/es/the-plant-list/species/Salvia%20hispanica%20L./data>)

Como puede apreciarse en la **Figura 4**, las cubiertas de las semillas muestran estrías o hendiduras con diferentes pigmentaciones y espesores [7].

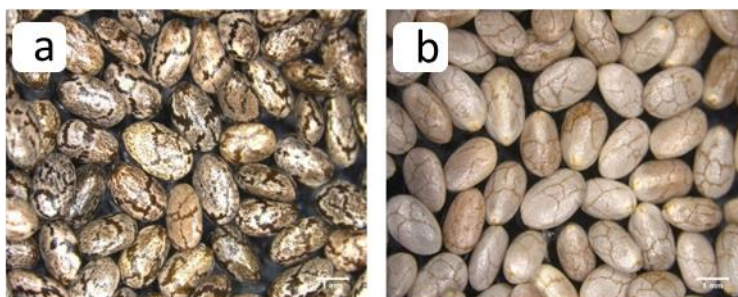


Figura 4. Semillas de chía, **a** Semillas de chía negra, **b** Semillas de chía blanca [7].

Las condiciones óptimas de crecimiento de la chía son, altitudes entre 400 y 2500 metros, temperaturas medias entre 20 y 30 °C, una lluvia media anual entre 500 y 1000 mm, bien distribuidas durante las primeras fases del crecimiento y desarrollo, y condiciones secas durante la maduración de la semilla y la cosecha, y por último un fotoperiodo que induce la floración de 12h:12h, es decir, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad [8, 9]. Por otra parte, la chía es sensible a las heladas, requiere un suelo bien drenado con baja salinidad y un pH entre 6 y 8.5, aunque tolera en parte los suelos ácidos y la sequía [9]. Bajo estas condiciones y con unas buenas prácticas agronómicas puede producir entre 1200 y 1500 Kg/hectárea [6]. Las semillas en contacto con agua segregan una sustancia mucilaginosa creando un microambiente a su alrededor, relevante para el aporte hídrico a la semilla, ya que es capaz de absorber unas 30 veces su peso en agua, y que protege a la futura planta de los microorganismos. En cambio, la lluvia después de la maduración de las semillas provoca una gran pérdida en la producción, ya que las semillas liberan el mucílago, de manera que se pegan unos cálices con otros impidiendo su recolección [7, 9].

Por todos estos motivos, se trata de una planta de día corto que solo crece adecuadamente cerca de los trópicos de Cáncer y

Capricornio, fuera de estas latitudes, aunque la calidad es comparable a la encontrada en los cultivos tradicionales, la producción es mucho menor, esto se debe a una tardía floración y a las bajas temperaturas de otoño durante el llenado de las semillas [9]. Para resolver este problema se está investigando para encontrar variedades capaces de florecer en países de día largo, como Sahi Alba 912, Sahi Alba 913 de Perú, Sahi Alba 914 de Argentina o la variedad Oruro de Francia [10, 11]. De esta forma actualmente se siembra comercialmente, aparte de en los países de donde es originaria, México y Guatemala, en los países de América Central, Honduras, Nicaragua y Panamá, Estados Unidos, en América del Norte, en los de América del Sur, Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, Colombia, Paraguay y Perú, Kenia, Tanzania y Uganda, en África, Australia, y Europa, en esta última en invernaderos, siendo la variedad “Pinta” la más cultivada a nivel mundial [1, 10].

En la actualidad, la popularidad de los ingredientes saludables, a partir de verduras, hortalizas, raíces, tubérculos y semillas, ha aumentado significativamente, conociéndose su composición y alto valor nutricional y funcional, principalmente por su contenido en fibra, proteínas de alta calidad, antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados, etc., por lo que se les considera superalimentos, que

aunque es un término sin una definición científica oficial, se atribuye a aquellos alimentos que aportan nutrientes en grandes cantidades y contribuyen al adecuado funcionamiento del organismo [12], aportando varios beneficios, tanto nutricionales como para la salud [13, 14]. En este contexto, la chía, junto con otras semillas como quinoa, lino, amaranto o cáñamo, ya eran consumidas por nuestros ancestros, quienes, aunque no sabían su composición, si conocían sus propiedades culinarias y medicinales, y las usaban como base de su alimentación y para tratar y curar una gran variedad de dolencias.

Su consumo se ha correlacionado con niveles más bajos de triglicéridos y colesterol, así como con bajada de la presión arterial y disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares; las semillas también tienen actividades antidiabéticas y hepatoprotectoras y brindan protección contra la artritis, enfermedades autoinmunes y cáncer [4]. Por otra parte, se trata de un cultivo sostenible de bajo impacto ambiental, por lo que su aumento podría redundar en la mejora de degradación de la tierra y erosión del suelo, ofreciendo oportunidades para obtener más beneficios a largo plazo, a través de prácticas sostenibles de agricultura regenerativa, creciendo en regiones semiáridas y contribuyendo a la seguridad alimentaria [4].

Relación dieta-salud. Definición de alimento funcional

El mundo actual se enfrenta a dos grandes retos, garantizar la seguridad alimentaria, y garantizar la salud de las personas. La seguridad alimentaria está en riesgo por los conflictos bélicos, la variabilidad y condiciones extremas del clima, las desaceleraciones y debilitamiento de la economía, la inasequibilidad de las dietas saludables y el continuo y preocupante aumento de la población mundial, que según los datos del World Population Prospect (revisión de 2022) estima un crecimiento desde 7.9 billones de personas en 2022 a 9.7 billones en 2050 [14]. En cuanto a la salud de las personas, los datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO), reforzados por los aportados por la Red de colaboración mundial sobre factores de riesgo de enfermedades no transmisibles (NCD-Risc) [15], auguran un incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), entre las que destacan, enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades respiratorias crónicas entre otras, está en aumento, y se prevé que sean responsables del 70% de las muertes mundiales en 2030 [16].

Así, tanto la necesidad de alimentos, como que estos sean saludables, ha llevado a organizaciones internacionales, gobiernos, industrias y consumidores, a demandar nuevos alimentos ricos en

nutrientes, calóricamente eficientes, saludables y sostenibles con el medio ambiente, como alternativa a los alimentos de origen animal, debido al impacto ambiental que supone su producción y a que en muchas ocasiones estos alimentos no son asequibles para gran parte de la población. Así, se están buscando nuevas fuentes de proteína como, legumbres, algas, insectos, medusas, proteínas microbianas o semillas vegetales, como quinoa, lino, amaranto, cáñamo o chía [17].

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, son evidentes las causas que han motivado que el mercado de los alimentos funcionales halla cobrado una gran importancia en los últimos años, llegando a alcanzar un valor superior a 166 mil millones de euros en 2022 [18]. Aunque no existe hasta el momento una definición legal de alimento funcional, varias autoridades nacionales y organizaciones científicas relevantes a nivel internacional han formulado definiciones semejantes en busca de un consenso, así, el Consejo Internacional de Información Alimentaria (IFIC) define los alimentos funcionales como “alimentos que pueden proporcionar beneficios para la salud más allá de la nutrición básica”, la Asociación Dietética Americana (ADA) como "alimentos que brindan beneficios adicionales para la salud que pueden reducir el riesgo de enfermedades y/o promover una salud óptima" o el Instituto

internacional de ciencias de la vida (ILSI), a través del proyecto de la Unión Europea (UE) “Ciencia funcional de los alimentos en Europa” (FUFOSE) especifica que son “alimentos, que se ha demostrado satisfactoriamente, que afectan beneficiosamente a una o más funciones objetivo del organismo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que es relevante para mejorar el estado de salud y bienestar, y/o reducción del riesgo de enfermedad” [19]. Por todo lo anterior, se deduce, que un alimento funcional sería, cualquier alimento o ingrediente alimentario que mejora la salud y reduce el riesgo de contraer ciertas enfermedades, teniendo en cuenta que deben seguir siendo un alimento, y que el beneficio para la salud, deben ejercerlo con las cantidades que normalmente son consumidas en la dieta [19].

Melo et al. [20], hicieron una revisión sistemática de la composición de las semillas de chía y de sus beneficios para la salud, poniendo de manifiesto sus potenciales beneficios anti-inflamatorios, inmunomoduladores, anticarcinogénicos y antidiabéticos. Van den Driessche et al. [21], reporta 5 ensayos que usaban las semillas de chía para reducir los factores de riesgo de síndrome metabólico.

Un estudio doble ciego en paralelo demostró el impacto de la semilla de chía molida en 77 individuos con diabetes mellitus tipo 2

(DM), obesos y con sobrepeso. Los participantes incluían 1000 kilocalorías de semilla de chía o de salvado de avena en su dieta para perder peso durante 6 meses, como resultado, los individuos que suplementaron su dieta con chía, perdieron 6 veces más peso que los que la suplementaron con salvado de avena [22].

Las propiedades beneficiosas que un alimento funcional puede ejercer sobre nuestro organismo, se deben a su contenido en sustancias o compuestos con una determinada actividad biológica, comúnmente denominados bioactivos, que pueden ser de distinta naturaleza, pre y pro-bióticos, polifenoles, carotenoides, fibra dietética, esteroides, vitaminas, ácidos grasos o péptidos entre otros [13]. Estos últimos son secuencias de entre 2 a 20 aminoácidos, que permanecen inactivas dentro de la proteína nativa, pero que, al ser liberados, por ejemplo, mediante la digestión gastrointestinal, fermentación o procesos de hidrólisis controlada utilizando proteasas exógenas, presentan propiedades funcionales o saludables [23].

El consumo de compuestos bioactivos vegetales, como los péptidos de semilla de chía, aborda esta perspectiva de la alimentación funcional saludable y sostenible, en línea con el cumplimiento con varios de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), fijados por los estados miembros de las Naciones Unidas (UN), como parte

de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, como son, “Salud y bienestar” (Objetivo 3), “Producción y Consumo responsables” (Objetivo 12) y “Acción por el clima” (Objetivo 13) entre otros.

Existe por tanto una clara relación dieta-salud, conocida ya por nuestros antepasados, como lo demuestra el célebre aforismo de Hipócrates en el siglo III a.C. “que tu alimento sea tu medicina, y tu medicina sea tu alimento”.

Chía como nuevo alimento en Europa

En el Reglamento (UE) 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, se define por primera vez nuevo alimento como “un alimento que no ha sido consumido en gran medida por humanos en la UE antes del 15 de mayo de 1997”, fecha en la que entró en vigor dicho reglamento. Esta definición fue actualizada por el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de noviembre de 2015, incluyendo nueve categorías, de forma que el nuevo alimento tenía que pertenecer, al menos, a alguna de ellas. Respecto a la chía, mediante la Decisión 2009/827/UE de la Comisión se autorizó, por primera vez, la comercialización en la UE de semillas de chía como nuevo alimento para ser utilizadas en productos de panadería y por la Decisión

2014/890/UE de la Comisión, se autoriza la comercialización de aceite de chía como nuevo ingrediente alimentario. Mediante el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión, se estableció la lista de la Unión de nuevos alimentos autorizados (NAA) o notificados con arreglo al Reglamento (UE) 258/97, y periódicamente se va actualizando, a medida que aparecen nuevos alimentos o se actualiza el uso de alguno de ellos. Así en la **Tabla 1** se muestran las entradas, actualizadas a fecha 26 de abril de 2023, y que aparecen en la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), respecto a los usos autorizados de semillas de chía y sus derivados y la entrada correspondiente a semillas de chía, que, aunque no aparece en las tablas de AESAN, siguen en vigor según el Reglamento de ejecución (UE) 2020/24 de la Comisión.

Tabla 1. Nuevos alimentos autorizados en la UE derivados de la chía.

Nuevo alimento autorizado	Reglamento/ Decisión	Condiciones de uso	
		Categoría	Contenido máximo
“Aceite de chía (Salvia hispanica)”	Decisión 2014/890/UE ^a	Grasas y aceites	≤10%
		Complementos alimenticios	≤ 2 g/día
“Semillas de chía (Salvia hispanica)”	Reglamento (UE) 2020/24 ^b	Productos de panadería	5 % (semillas de chía enteras o molidas)
		Productos de pastelería	10 % semillas de chía enteras
		Cereales de desayuno	10 % semillas de chía enteras
		Comidas preparadas esterilizadas a base de granos de cereales, pseudocereales y/o legumbres	5 % semillas de chía enteras
		Mezclas de frutas, nueces y semillas	Sin restricción
		Semillas de chía envasadas	Sin restricción
		Artículos de confitería (incluidos el chocolate y los productos de chocolate), excepto las gomas de mascar	Sin restricción
		Productos lácteos (incluido el yogur) y derivados	Sin restricción
		Helados comestibles	Sin restricción
		Productos de frutas y hortalizas (incluidos productos para untar, compotas con/sin cereales, productos lácteos con frutas, postres de frutas)	Sin restricción
		Bebidas no alcohólicas (incluidos los jugos de frutas y las bebidas de mezcla de frutas y verduras)	Sin restricción
		Puddings que no requieren tratamiento térmico a 120 °C o más en su fabricación, procesamiento o preparación	Sin restricción

Nuevo alimento autorizado	Reglamento/ Decisión	Condiciones de uso	
		Categoría	Contenido máximo
“Polvos de semillas de chía (<i>Salvia hispanica</i>) parcialmente desgrasados”	Reglamento (UE) 2020/500 ^c	Polvos con alto contenido proteínico	
		Productos lácteos fermentados aromarizados y sin aromatizar	0.7 %
		Productos de confitería	10 %
		Zumos y néctares de frutas y hortalizas	2.5 %
		Bebidas aromatizadas	3 %
		Complementos alimenticios, tal como se definen en la Directiva 2002/46/CE, excluidos los complementos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad	7.5 g/día
		Polvos con alto contenido en fibra	
		Productos de confitería	4 %
		Zumos de frutas y hortalizas	2.5 %
		Néctares de frutas y hortalizas	4 %
		Bebidas aromatizadas	4 %
		Complementos alimenticios, tal como se definen en la Directiva 2002/46/CE, excluidos los complementos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad	12 g/día

^a DECISIÓN DE EJECUCIÓN DE LA COMISIÓN de 8 de diciembre de 2014 por la que se autoriza la comercialización de aceite de chía (*Salvia hispanica*) como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (UE) 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo

^b REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2020/24 DE LA COMISIÓN de 13 de enero de 2020 que autoriza una ampliación del uso de las semillas de chía (*Salvia hispanica*) como nuevo alimento y el cambio de las condiciones de uso y de los requisitos de etiquetado específicos de tales semillas con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, y que modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión

^c REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2020/500 DE LA COMISIÓN de 6 de abril de 2020 por el que se autoriza la comercialización de polvos de semillas de chía (*Salvia hispanica*) parcialmente desgrasados como nuevo alimento con arreglo al Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470 de la Comisión

Como puede apreciarse, hasta la fecha, existen tres nuevos alimentos relacionados con la chía, aceite de chía, semillas de chía y polvos de semilla de chía parcialmente desgrasados, pudiéndose usar en una amplia gama de alimentos, restringiendo, en algunos casos, las cantidades máximas permitidas, como, productos de panadería, lácteos, mezclas de frutos secos, frutas y semillas, cereales para el desayuno, zumos o semillas de chía preenvasadas como tales, éstas últimas, deben llevar un etiquetado adicional para informar al consumidor de que la ingesta diaria no debe ser superior a 15 g.

Composición nutricional de las semillas de chía

La chía ha ganado mucha popularidad hoy en día en todo el mundo, y en particular sus semillas, debido a que presentan un perfil nutricional equilibrado, presentando niveles altos de carbohidratos (42%), entre los cuales el 81% corresponde a fibra dietética, grasa (26-40%), con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, de hecho, es considerada la fuente vegetal con mayor contenido en $\omega 3$, y proteína (16-26.5%), cuya composición en aminoácidos es equilibrada, según los requerimientos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud/Universidad de las Naciones Unidas (FAO/WHO/UNU) [2, 20, 24]. Por otra parte, las

semillas de chía son una rica fuente de antioxidantes naturales, como tocoferoles, fitosteroles, carotenoides y compuestos fenólicos, vitaminas, principalmente, B3, C, B2 y E y minerales, principalmente, fósforo, calcio, potasio y magnesio [1, 13, 25].

Las semillas de chía también contienen ácido fítico, inhibidores de tripsina, saponinas y taninos, compuestos conocidos comúnmente como antinutrientes, ya que pueden tener un efecto negativo sobre la digestibilidad de las proteínas y sobre la biodisponibilidad de los aminoácidos [2]. Sin embargo, investigaciones recientes apuntan a que niveles bajos de estas sustancias, poseen efectos beneficiosos y terapéuticos en la prevención de varias enfermedades [26].

En la **Tabla 2** se muestra la composición nutricional de la chía, comparada con la de lino, cáñamo, quinoa y amaranto, cuatro de las semillas ancestrales que hoy día son consideradas superalimentos y que se pueden agrupar en dos grupos bien diferenciados, por un lado, chía, lino y cáñamo consideradas oleaginosas, destacan por sus contenidos en grasa, fibra dietética y proteínas; y por otro quinoa y amaranto, consideradas pseudocereales, con un alto contenido en carbohidratos y contenido proteico algo inferior a las otras tres.

Tabla 2. Composición química de semillas ancestrales (g/100 g).

Nutriente	Chía^a	Lino^a	Cáñamo^b	Quinoa^a	Amaranto^a
Humedad	5.80	6.96	4.18	13.28	11.29
Proteína	16.54	18.29	22.51	14.12	13.56
Grasa	30.74	42.16	32.35	6.07	7.02
Cenizas	4.80	3.72	4.74	2.38	2.88
Carbohidratos	42.12	28.88	n.d.	64.16	65.25
Fibra dietética	34.40	27.30	27.67	7.00	6.70

n.d.: no determinado

^aBase de datos de nutrientes de la USDA (2019). <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

^b [25]

Como se mencionó anteriormente, la localización y condiciones del cultivo de la chía, particularmente la temperatura, pueden influir en su composición nutricional, afectando, como les ocurre a otras semillas oleaginosas, tanto a la composición en ácidos grasos como al contenido en proteínas, entre otros [2]. Así, en general, el contenido en proteína disminuye al aumentar la altitud donde se cultiva, decrecen los niveles de ácido α -linoleico (LA), un ácido graso omega 6 ($\omega 6$) y aumentan los de ácido α -linolénico (ALA), un ácido graso omega 3 ($\omega 3$) y, por tanto, se reduce el ratio $\omega 6/\omega 3$, muy importante para evaluar la calidad nutricional de un aceite, como se verá más adelante [2]. En publicaciones científicas recientes se

encuentran contenidos en proteínas que oscilan entre 16.45 y 26.03%, lípidos entre el 30.00 y el 33.50%, con un contenido en ácidos grasos saturados (SAT), entre el 9.26 y el 11.32% y un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), de los cuales, entre el 16.99 y el 22.50% corresponden a LA/ ω 6, y entre el 56.93 y el 64.75% a ALA/ ω 3 [2].

Hidratos de carbono

El contenido en carbohidratos de la chía se sitúa en torno al 42% (**Tabla 2**), de los cuales, aproximadamente el 80% corresponde a fibra dietética y en el 20% restante, se han identificado, mediante resonancia magnética nuclear (RMN), glucosa, sacarosa y rafinosa [28]. La fibra dietética es un nutriente esencial para el ser humano que se puede separar en las siguientes tres subcategorías: fibra dietética de alto peso molecular, incluyendo formas solubles e insolubles, fibra dietética de bajo peso molecular y almidón resistente [29]. Es abundante en cereales integrales, frutas y verduras, y aunque no se digiere ni absorbe fácilmente en el intestino delgado, puede ser parcialmente fermentada en el intestino grueso, ejerciendo diversos efectos beneficiosos para la salud, como la reducción de la glucosa postprandial en sangre, disminución de los niveles de colesterol, la

prevención del carcinoma rectal, de la DM y enfermedades cardiovasculares [29, 30].

El contenido absoluto de fibra dietética en la semilla de chía es del 34.40%, superando en contenido a las semillas antes mencionadas, como lino (27.30%), amaranto (6.70%), quinoa (7.00%) y cáñamo (27.60%) [31, 32], y dentro de éste, el 85-93% pertenece a la fracción insoluble y entre el 7 y el 15% a la fracción soluble. El componente principal de la fracción insoluble es la lignina Klason, responsable de la actividad hipocolesterolémica asociada con la ingesta de fibra [2], y el de la fracción soluble el mucílago, que se produce a partir de una capa externa de células especializadas del pericarpio, que sufren lisis al exponerse a la humedad [30]. Diversas investigaciones apuntan a que el mucílago, es un tetrasacárido compuesto principalmente por polímeros pécticos, no celulósicos y hemicelulósicos, aunque su estructura no está todavía del todo clara, con una enorme capacidad para absorber agua, hasta 30 veces su peso en agua, por lo que tiene un efecto saciante y mejora el tránsito intestinal [7, 30, 33]. Por otra parte, es estable a diferentes pH, fuerzas iónicas y las temperaturas habituales de procesado de alimentos, pudiendo aumentar la viscosidad de disoluciones a bajas concentraciones, por lo que se presenta como un excelente ingrediente

funcional en la industria alimentaria [7]. Además, se caracteriza por ser un agente emulsificante, gelificante y encapsulante, pudiendo tener un efecto positivo sobre el índice glucémico y la microbiota intestinal [30, 33, 34]. Puede usarse como sustitutivo de grasas en productos de pastelería, como emulsificante y estabilizante en helados o como sustituto de grasa y huevo en mahonesa, uno de los condimentos más consumidos en el mundo, haciendo todos estos productos más saludables [35].

Lípidos

El factor más importante a la hora de evaluar la calidad nutricional de la fracción lipídica es el ratio $\omega 6/\omega 3$ (**Tabla 3**), ya que niveles elevados en un alimento, es decir un alto contenido en $\omega 6$, se relacionan con un efecto proinflamatorio y protrombótico, y por tanto su consumo excesivo podría ser un factor de riesgo para padecer enfermedades relacionadas con la inflamación como obesidad, diabetes o aterosclerosis entre otras; de hecho, un consumo regular de alimentos ricos en $\omega 3$, se ha asociado con una menor incidencia de estas enfermedades [36, 37]. En este sentido el aceite de chía presenta una baja relación $\omega 6/\omega 3$, al igual que el de lino, lo que mejora el metabolismo lipídico y previene el desarrollo de células tumorales, trastornos metabólicos y enfermedades crónicas [38]. Tanto $\omega 6$ como

ω 3 son PUFAs esenciales. Los ω 3 se distinguen por la existencia del primer doble enlace, en el tercer carbono, contando desde el grupo metilo; son componentes importantes de las membranas celulares y realizan importantes funciones en el corazón, vasos sanguíneos, pulmones, sistema inmunitario y sistema endocrino. Se dividen en tres tipos, ALA, presente principalmente en aceites vegetales como linaza, soja, Sacha inchi, cáñamo o chía, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), ampliamente presentes en los aceites de pescado [33]. Por otra parte, cuando ALA está en cantidades suficientes, lo utilizan para sintetizar EPA y DHA, formando enlaces dobles. Específicamente, el organismo es capaz de convertir algo de ALA (18 átomos de carbono y 3 dobles enlaces) en EPA (20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces), para luego formar DHA (22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces) [33]. Los ω 6, que se caracterizan por tener el primer doble enlace en el carbono 6, a partir del grupo metilo, son LA, ácido γ -linolénico (AGL), ácido dihomo- γ -linolénico (ADGL) y ácido araquidónico (AA). LA es abundante en la naturaleza, mayoritariamente en semillas vegetales, pero ALA no lo es tanto, siendo la chía la semilla vegetal que más cantidad de ALA contiene [39]. El metabolismo humano permite convertir LA en AA [40]. Por tanto, el aceite de chía puede ser una alternativa a las fuentes

habituales de EPA y DHA, pescados y mariscos, al ser una fuente menos costosa y de suministro más accesible para ciertas partes de la población mundial [39].

Tabla 3.- Principales grupos de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) de semillas ancestrales (g/100 gramos) [41]

Acidos Grasos	Chía	Lino	Cáñamo	Quinoa	Amaranto
Saturados	10.8 ± 0.7	10.6 ± 0.9	10.2 ± 0.8	13.0 ± 1.0	25.5 ± 2.4
MUFAs	5.9 ± 0.8	17.6 ± 1.2	12.8 ± 2.6	25.7 ± 3.9	23.0 ± 0.7
PUFAs	83.3 ± 1.5	71.8 ± 1.9	77.1 ± 3.1	61.3 ± 3.3	51.5 ± 1.9
De los cuales					
ω6	20.1 ± 0.6	19.6 ± 6.8	58.9 ± 0.3	53.8 ± 4.1	50.6 ± 1.9
ω3	63.2 ± 1.3	52.3 ± 6.7	18.2 ± 2.9	7.5 ± 1.9	0.9 ± 0.0
ω6/ω3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	7.2 ± 0.0	56.2 ± 0.0

MUFAs: ácidos grasos monoinsaturados

Proteínas

Las principales proteínas de las semillas son proteínas de almacenamiento que representan alrededor del 60-80% de las proteínas totales, y su análisis es muy complicado por la heterogeneidad de los polipéptidos y los diferentes comportamientos en cuanto a solubilidad. Pueden dividirse en cuatro clases, albúminas,

solubles en agua y a pH neutro, globulinas, solubles en soluciones alcalinas pero insolubles en agua, glutelinas, solubles en soluciones de ácidos y bases diluidas y prolaminas, solubles en etanol al 70-90 % [42].

En la semilla de chía, la fracción más abundante es la de globulinas, que representa entre un 52% del total, seguida de albúminas, 17.3%, glutelinas con un 14.5% y prolaminas con un 12.7%. Este patrón de composición proteica muestra cierta similitud con otras semillas importantes como guisantes, altramuces y algodón [42, 43]. Las proteínas suelen caracterizarse por su coeficiente de sedimentación, que se mide en Svedverg (S), y en este sentido, las globulinas de chía, presentan como fracción mayoritaria, las globulinas 11S, seguida de la fracción 7S y se ha reportado la presencia de dos fracciones minoritarias, con coeficientes de sedimentación de 6S y 19S, resultando un patrón de sedimentación similar al de otras semillas como, amaranto, sésamo o cebada, entre otras [42].

Las propiedades funcionales de las proteínas, como solubilidad, absorción de agua, absorción de aceite, propiedades gelificantes, espumantes o emulsionantes, son fundamentales a la hora de utilizarlas como ingredientes alimentarios, y éstas dependen

del tamaño molecular, distribución de carga, la estructura tridimensional y la hidrofobicidad superficial de las mismas. En este sentido, las proteínas 11S confieren una buena capacidad de gelificación y las 7S exhiben propiedades emulsionantes [42].

Por otra parte, en la elaboración de algunos alimentos que contienen proteínas vegetales, se necesita someter al producto a tratamientos térmicos, por lo que es importante conocer las propiedades térmicas de las mismas. Las temperaturas de desnaturalización de albúminas y globulinas de chíá, son similares, 103.6 °C y 104.7 °C, respectivamente, relativamente más altas que las de algunas legumbres y cereales, que en su mayoría están por debajo de 100 °C, por ejemplo, las albúminas y globulinas de semillas de amaranto están entre 70 y 96 °C. Estas altas temperaturas de desnaturalización implican la estabilización de dichas proteínas por residuos hidrofóbicos, de naturaleza endotérmica, y que, por tanto, necesitan de mayor temperatura para su desnaturalización [42].

En términos nutricionales, la calidad de una proteína para alimentación humana, se mide en función de su composición aminoacídica y de la digestibilidad, ésta última es mayor para proteínas animales que para proteínas vegetales, debido a diferentes factores como conformación de las proteínas y presencia de factores

antinutricionales en las proteínas vegetales, entre otros [44]. Esta menor digestibilidad puede solventarse utilizando adecuados tratamientos de procesamiento tales como germinación, ebullición, remojo, fermentación, tratamientos enzimáticos o extrusión [44]. En cualquier caso, la digestibilidad de las globulinas de chíá, con un valor en torno al 77%, es mayor a la que presentan las globulinas de maíz (66.6%), arroz (59.4%), sorgo (59.1%) y trigo (52.7%) [42]. En cuanto a la composición aminoacídica, se consideran proteínas de alto valor biológico, si aporta todos los aminoácidos esenciales y en una composición adecuada para las necesidades humanas, la cual, queda reflejada en las tablas de requerimientos en aminoácidos esenciales publicadas por la FAO [45] (**Tabla 4**).

Tabla 4. Patrones de puntuación de aminoácidos para bebés, niños, adolescentes y adultos.

Aminoácidos	Edad (años)					
	0.5	1-2	3-10	11-14	14-18	>18
His	20	18	16	16	16	15
Ile	32	31	30	30	30	30
Leu	66	63	61	61	60	59
Lys	57	52	48	48	47	45
SAA	27	25	23	23	23	22
AAA	52	46	41	41	40	38
Thr	31	27	25	25	24	23
Trp	8.5	7	6.6	6.6	6.3	6
Val	43	41	40	40	40	39

Datos expresados en mg/g de proteína

His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; SAA, sulphur amino acids; AAA, aromatic amino acids, Thr, threonine, Trp, tryptophan; Val, valine

Por tanto, la chía es una importante fuente de proteína de gran calidad, con un contenido entre el 16 y el 26%, mayor que los alimentos tradicionales como el arroz (5.95 %), el trigo (9.61 %) y la avena (13.15 %) [38] y similar al de semillas oleaginosas, como lentejas (23%) o garbanzos (21%) [42]. Además, la proteína de chía es una excelente fuente de aminoácidos esenciales, destacando su contenido en aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), que intervienen en la funcionalidad de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas [42], arginina, que presenta un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares [46], ácido aspártico, el cual estimula la regulación hormonal para un funcionamiento apropiado del sistema nervioso [47] y ácido glutámico, que activa el sistema nervioso central, está implicado en su desarrollo inmunológico y aumenta la resistencia atlética [47, 48].

Vitaminas y minerales

Las vitaminas son micronutrientes naturales indispensables, que un organismo requiere en bajas cantidades para la adecuada actividad de sus funciones celulares, que actúan como reguladores y activadores de las reacciones químicas del organismo [33]. Las

semillas de chía contienen altas cantidades de vitaminas B1 (0.6 mg / 100 g), vitamina B2 (0.2 mg / 100 g) y B3 (8,83 mg / 100 g), ácido fólico (49 mg/100 g), tiamina (0.62 mg/100 g), y riboflavina (0.17 mg/100 g). También contiene vitamina E (antioxidante natural) como tocoferoles: α -tocoferol (8 mg/kg de lípidos), γ -tocoferol (422 mg/kg de lípidos), y δ -tocoferol (15 mg/kg de lípidos) [32, 34]. El mecanismo antioxidante de la vitamina E implica la eliminación de radicales libres o la descomposición de productos de oxidación primarios [49].

Los minerales, aunque solo representan entre el 4 y el 6% del peso corporal, se consideran vitales para la salud y el bienestar general de los seres humanos. Los macrominerales como el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y el sodio (Na), actúan como componentes estructurales de los tejidos e intervienen en el metabolismo celular y basal y en el equilibrio hídrico y ácido-base, mientras que los microminerales, como el hierro (Fe), el zinc (Zn), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el selenio (Se) y el yodo (I), son muy importantes para la producción y control de hormonas, las vitaminas y la actividad enzimática. Las semillas de chía son una fuente extraordinaria de minerales, como manganeso, fósforo, cobre, selenio, hierro, magnesio y calcio [33, 50].

Fracción fenólica y otros fitoquímicos

Los componentes fenólicos son un grupo de sustancias químicas que tienen uno o más grupos hidroxilo (OH) unidos a un hidrocarburo aromático, presentes en vegetales, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos, que juegan un papel importantísimo en la desaceleración del envejecimiento, reducción del proceso inflamatorio y estrés oxidativo, causa de las enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, cáncer o diabetes [33].

Los estudios científicos han constatado la presencia de polifenoles en la semilla de chía: ácidos gálico, cafeico, clorogénico, cinámico y ferúlico, quercetina, kaempferol, epicatequina, rutina, apigenina y ácido p-cumárico, además de pequeñas cantidades de isoflavonas, como la daidzeína, la gliciteína, la genisteína y la genistina y de esteroides como campesterol, estigmasterol, β -sitosterol o D5-avenasterol [13].

Aislados proteicos de origen vegetal

Los aislados proteicos son ingredientes alimentarios de alta calidad con contenidos proteicos cercanos al 90%, que pueden mejorar tanto la composición nutricional como las características tecnofuncionales de los alimentos. Las principales materias primas utilizadas para la preparación de aislados proteicos vegetales son las

semillas de plantas ricas en proteínas, tradicionalmente la soja, pero también los guisantes [51], los garbanzos [52] o el cáñamo [32].

Como ya se mencionó anteriormente, en 2014 se autorizó en la UE la comercialización de aceite de chía y en 2017, fué considerado seguro para el consumo humano por la Farmacopea de los Estados Unidos [4]. La extracción de aceites de semillas, produce a su vez grandes cantidades de residuos o subproductos, que, como ocurre con la chía, constituyen una biomasa con un alto valor nutricional por su elevado contenido en proteína de buena calidad, lo que hace, que la harina desengrasada de chía, sea una buena materia prima para la obtención de productos de alto valor añadido como los aislados e hidrolizados proteicos.

Preparación de aislados proteicos

El proceso de obtención de aislados proteicos supone una serie de etapas, encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos, para conseguir un producto final con una riqueza proteica entorno al 80-90%.

El desengrasado de la harina constituye el paso inicial del proceso de obtención de aislados proteicos, para lo cual, los métodos convencionales son el prensado mecánico o la extracción por

solvente. De ellos, la extracción por solventes, hexano o acetona, es el más utilizado a escala industrial por su elevado rendimiento, su sencilla implementación y bajo costo, sólo requiere triturar la semilla y ponerla en contacto con el disolvente, normalmente en un proceso en continuo tipo soxhlet. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones, como la inflamabilidad del hexano, que aumenta el riesgo de explosión, y el riesgo para la salud asociado a los residuos de disolvente que quedan en el aceite. En cuanto a la extracción por prensado, se requiere un pretratamiento de la semilla, que suele incluir acondicionado térmico y de humedad y trituración de la misma, para después introducir las en un equipo de prensa de tornillo que extrae el aceite. La extracción por presión tiene muchas ventajas en comparación con la extracción por solventes, como la alta calidad del aceite extraído, libre de contaminación por solventes y el bajo riesgo del proceso, sin embargo, es un proceso de bajo rendimiento.

La purificación de proteínas vegetales mediante extracción en medio alcalino, y posterior precipitación al pH de mínima solubilidad de las proteínas extraídas o punto isoeléctrico (pI), es la forma más habitual de obtener aislados proteicos a escala industrial debido a su elevado rendimiento y fácil escalabilidad [2]. La solubilidad de las proteínas depende, además de si están en su estado nativo o

desnaturalizado, del pH y fuerza iónica, ya que estos dos parámetros afectan en gran medida a la carga y repulsión electrostática entre moléculas de proteína. En el pI la carga neta es cero, y la repulsión electrostática entre las moléculas es más baja, por lo que se produce la agregación rápida de las mismas y la consecuente precipitación. Este proceso se realiza en dos etapas. En la primera, las proteínas se solubilizan a pH alcalino para separarlas del resto de los compuestos no solubles, principalmente fibra y glúcidos insolubles. El extracto obtenido contiene, además de las proteínas, el resto de componentes solubles de la harina (compuestos nitrogenados no proteicos, azúcares solubles, polifenoles, sales, etc.). Los factores principales que hay que considerar en esta etapa son el pH, la relación materia prima/solvente, la duración y el número de extracciones. Usualmente, se prefiere la extracción a pH alcalino, y posterior precipitación al pI, pues así se extraen la fracciones mayoritarias de globulinas y las glutelinas, que requieren un pH igual o superior a 11 para poder ser extraídas, y porque se ha demostrado científicamente y con diferentes materias primas, como quinoa o amaranto, que se obtienen unos rendimientos altos de extracción y un aislado proteico con una riqueza proteica alta, superior al 80% [52]. Como agente alcalino suele usarse hidróxido sódico (NaOH) y es posible emplear agentes reductores, como sulfito

sódico, para prevenir la oxidación de sustancias fenólicas que pueden oscurecer el aislado [53]. Respecto a los otros factores, las relaciones materia prima/solvente, van a depender del tipo de materia prima, utilizando aquella que permita una correcta agitación de la muestra y posterior centrifugación de la misma, por citar algunos ejemplos, en diversas investigaciones científicas, se ha utilizado una relación 1/8 para aislado proteico de garbanzo [52] o una relación 1/10 para guisante [51] y cáñamo [32]. En el caso de la chía se debe emplear más solvente, debido a que la presencia del mucílago hace que las suspensiones sean muy viscosas, de forma que la relación materia prima/solvente es de 1/20 [54, 55]. De igual modo, se debe ajustar el tiempo de extracción y el número de extracciones, que no suele ser superior a tres, ya que con un número mayor no se observan mejoras significativas en los rendimientos de extracción [53].

La segunda etapa, precipitación isoelectrica, tiene por objeto la concentración de las proteínas y, sobre todo, su purificación respecto al resto de componentes solubilizados. Consiste en llevar la solución al pH correspondiente al pI, que suele oscilar entre valores de 4-5 [53] y posteriormente, se realiza la separación de las mismas del resto de las moléculas solubles mediante centrifugación. En ocasiones, las proteínas precipitadas requieren de una purificación

posterior con agua al mismo pH que el pI, para extraer los compuestos solubles retenidos en la floculación, y una nueva centrifugación. Finalmente, el aislado proteico es neutralizado (opcional) [56] y secado. Existen otros métodos como la extracción salina y diálisis, mediante el cual, las moléculas solubles no proteicas, de bajo peso molecular, atraviesan la membrana y constituyen el permeado, mientras que las proteínas, de mayor peso molecular, son retenidas. El retenido final se suele dializar para eliminar las pequeñas moléculas solubles, y el permeado se puede someter a ósmosis inversa para reciclar el agua [57]. La principal ventaja de esta alternativa es que permite recuperar no solo las proteínas insolubles en el pI sino también las solubles, presentando una mayor cantidad de albúminas, que no pueden ser recuperadas por el método de extracción alcalina y precipitación, mientras que su principal inconveniente es el aumento del tiempo global y el coste del proceso [57]. Otro método que está hoy en día en estudio, es el de extracción asistida por ultrasonidos, ya que según los resultados obtenidos se necesita menos tiempo de extracción, obteniéndose rendimientos y riquezas proteicas similares a los obtenidos por el método de extracción alcalina y precipitación isoeléctrica [58, 59].

Usos y aplicaciones de los aislados proteicos

Al crecimiento demográfico y el aumento de la esperanza de vida, con el consecuente envejecimiento de la población, se suman el incremento de consumidores veganos, las evidencias del impacto medioambiental de la producción de carne animal, la incidencia de su consumo sobre enfermedades crónicas, o la ingestión asociada de patógenos, responsables de zoonosis, como brucelosis o encefalopatía bovina esponjiforme, así como de sustancias químicas como antibióticos u hormonas [60], provocando que, en la actualidad, esté creciendo enormemente la demanda de alimentos sustitutos de la carne y proteínas lácteas, elaborados con aislados proteicos vegetales [55]; por ejemplo, obteniendo productos, habitualmente elaborados con carne, como hamburguesas o salchichas, a base de proteínas vegetales mediante procesos de extrusión. La extrusión consiste en someter a las proteínas vegetales a altas temperaturas y presión, que las desnaturalizan, organizan y orientan, de manera irreversible, formando una estructura tridimensional [61, 62]. El aislado proteico de soja es el más utilizado en el campo de la industria alimentaria, debido a sus propiedades espumantes, emulsionantes, antioxidantes, su bajo costo y alto valor nutricional [63], sin embargo, algunos inconvenientes relacionados con la alergenicidad y su alto contenido

en isoflavonas, similares a los estrógenos, hormonas femeninas que pueden causar infertilidad masculina [64], están impulsando la búsqueda de nuevas fuentes de proteína vegetal que puedan sustituir a la proteína de soja, como guisante [51], garbanzos [52] o cacahuets [65]. Los aislados proteicos se utilizan en otras formulaciones con el objetivo de reducir la cantidad de colesterol, de grasas o de aportar un incremento en el valor nutricional, por ejemplo, como sustituto del huevo [66, 67], en emulsiones bajas en grasa [68] y en productos de panadería [69, 70].

La limitación del uso generalizado de los aislados proteicos en el procesado de los alimentos es su baja solubilidad especialmente a pH entre 3-5, donde muchos alimentos manufacturados tienen establecido su pH, y por otro lado su potencial alergenicidad, ya que es en las proteínas intactas donde se encuentra el epítipo o los epítipos antigénicos responsables de las alergias alimentarias. Una forma de mejorar dichas propiedades es realizar una modificación de las proteínas o hidrólisis proteica. La hidrólisis proteica produce por un lado una disminución del tamaño de la proteína generando grupos iónicos cargados que inciden en una mejora de la solubilidad proteica y, por otro lado, mediante una hidrólisis extensiva podemos propiciar la ruptura del epítipo antigénico responsable de dicha alergia

obteniendo hidrolizados proteicos finales con un carácter hipoalérgico.

Estas razones, junto con la demanda de nuevos alimentos, han llevado al desarrollo de procesos de hidrólisis proteica de diversos vegetales, como espárrago [71], cáñamo [72], gluten de trigo [73] o kiwicha [74], entre otros.

Hidrolizados proteicos. Tipos y aplicaciones en alimentación

Durante la hidrólisis proteica se produce la ruptura de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos dentro de una proteína, generando péptidos de menor tamaño que la proteína original y aminoácidos libres. Esto puede producirse naturalmente durante la digestión gastrointestinal, por fermentación o maduración durante el procesamiento de alimentos, y mediante procesos de hidrólisis controladas utilizando proteasas exógenas [23].

Tradicionalmente, la hidrólisis proteica se producía por métodos químicos (con ácidos o bases), pero debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos y se forman compuestos tóxicos como la lisinoalanina, hoy en día la hidrólisis se realiza por métodos biológicos, con enzimas denominadas proteasas, en condiciones más

suaves de pH y temperatura, reduciéndose la formación de compuestos indeseables y manteniendo el valor nutritivo de la proteína de origen, ya que no se produce degradación de los componentes hidrolizados [75]. Existen proteasas animales (tripsina, quimotripsina, pepsina y renina), vegetales (papaína, bromeolina), bacterianas y fúngicas [76]. Por otra parte, según su actividad catalítica, las proteasas pueden ser endopeptidasas, si hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína, dando como resultado cadenas de péptidos, o exopeptidasas, si hidrolizan enlaces terminales de una proteína, dando como resultado aminoácidos libres.

En la industria alimentaria, la serin-endoproteasa Alcalase, producida a partir de *Bacillus licheniformis* y cuyo componente principal es Subtilisina A, es una de las enzimas más utilizadas. Fue descubierta en 1947 por Liderstrom, Lang y Ottesen en el Laboratorio Carlsberg (Copenhague, Dinamarca), y se encuentra entre las primeras con mayor facturación mundial. Las características que justifican su amplia utilización son un pH de máxima actividad hidrolítica, entre 7 y 10, y una temperatura óptima, entre 50 y 70 °C, lo que es de gran interés para evitar la contaminación en el proceso, al impedir el crecimiento bacteriano, además de tener un amplio espectro de especificidad, y ser totalmente soluble en agua

cumpliendo con las especificaciones recomendadas por la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), el Joint Expert Committee on Food Aditives (JECFA) y el Food Chemicals Codex (FCC) relativas a enzimas de uso alimentario. Las principales aplicaciones del uso de proteasas son la elaboración de cerveza, la maceración de cereales, la fabricación de queso y la producción de hidrolizados de proteínas con diversos fines [77].

Las características de un hidrolizado y, por tanto, su posible aplicación industrial, vienen determinadas por su grado de hidrólisis (HD), es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a los que presenta la proteína original. La concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación, las condiciones de pH y temperatura, y la naturaleza de la enzima son algunos de los factores que influyen en este parámetro [78]. De este modo, en la industria agroalimentaria encontramos distintos hidrolizados proteicos.

Los hidrolizados limitados, con bajo HD, entre el 1 y el 10%, se usan para la mejora de las propiedades funcionales, que son aquellas propiedades físicas y químicas que afectan al comportamiento de las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo. Entre estas

propiedades, la más importante es la solubilidad, debido a su influencia en otras como la absorción y retención de agua, capacidad y estabilidad emulsionante, y capacidad y estabilidad espumante [78]. Se sabe que globulinas y glutelinas de chíá poseen una buena capacidad emulsificante, buenas absorciones de agua y aceite y baja capacidad espumante [79].

Los hidrolizados con HD mayor del 10% ó extensivos pueden tener distintas aplicaciones, una de ellas como sustancias flavorizantes en sopas, salsas y platos precocinados. Estos hidrolizados se caracterizan por su elevada solubilidad, permitiendo su uso en alimentación especializada destinada a personas de la tercera edad, en bebidas enriquecidas para cubrir la demanda de proteínas generada por una pérdida de apetito, en formulación de dietas enterales para lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición o alergenicidad, en nutrición de deportistas de elite en ciclismo, fondo, halterofilia o culturismo o en el tratamiento de enfermedades del hígado, enfermos de Crohn o colitis ulcerosa, entre otras [66, 80]. Además, los hidrolizados extensivos pueden usarse por su contenido en péptidos con secuencias específicas que poseen propiedades bioactivas, como antioxidantes, anticolesterolémicos, inmunomoduladores e inhibidores de la enzima convertidora de

angiotensina (ACE), entre otras [79], como potenciales ingredientes de alimentos funcionales.

Péptidos bioactivos

En la obtención y desarrollo de estos alimentos funcionales, los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados proteicos, entrarían en la formulación como un complemento, dotando de un valor añadido a los alimentos tradicionales. Los péptidos bioactivos son secuencias cortas de proteína que contienen de 2 a 20 aminoácidos y que pueden influenciar en una multitud de funciones corporales. Generalmente, se encuentran encriptados en las proteínas, pero pueden ser liberados por acción de diferentes enzimas [81]. Las actividades biológicas de los mismos dependen principalmente de las propiedades estructurales del péptido, la composición de aminoácidos, la secuencia, el tamaño molecular, la hidrofobicidad (superficial y molecular), la carga neta y la conformación espacial (82, 83).

Cada vez es mayor el interés por el desarrollo de péptidos bioactivos y seguros procedentes de diversas fuentes vegetales que puedan ser utilizados para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades degenerativas como hipertensión, obesidad, cáncer o la enfermedad de Alzheimer [84, 85]. Estos péptidos, ofrecen ventajas

sobre los fármacos convencionales debido a su amplio espectro de acción terapéutica, los bajos niveles de toxicidad, gran solubilidad y digestibilidad [76, 81].

Como se ha descrito en apartados anteriores, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias, más allá de sus propiedades nutricionales, pueden exhibir diversas actividades biológicas que incluyen actividades antihipertensivas, antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, hipoglucemiantes, hipocolesterolémicas y antibacterianas, entre otras [86].

Los péptidos bioactivos presentes en hidrolizados proteicos de chía han demostrado su potencial como antibacteriano [87], antihipertensivo [88] y antioxidante [89], entre otros. Además, el análisis empleando cultivos celulares [90] o animales de experimentación (ratas) [91], aumenta la evidencia de que estos péptidos pueden modular el estado fisiológico de los seres humanos tras su ingesta.

Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos

Una vez ingeridos, los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados proteicos, deben ser en primer lugar resistentes a la degradación por las enzimas digestivas y una vez absorbidos, deben

superar la degradación mediada por peptidasas plasmáticas hasta alcanzar sus tejidos diana donde ejercer sus actividades biológicas [92]. En el tracto gastrointestinal, las proteasas digestivas pueden hidrolizar péptidos grandes, lo que conlleva a la liberación de nuevos péptidos más pequeños con más o menos actividad. Por tanto, debe evaluarse la estabilidad *in vivo* de los biopéptidos frente a las proteasas digestivas para predecir sus efectos biológicos. Esta estabilidad depende de su composición y longitud. Varios estudios observaron que los péptidos pequeños son más resistentes a la degradación por proteasas gastrointestinales y peptidasas plasmáticas que los péptidos de alto peso molecular, lo que lleva a pensar que los péptidos pequeños, que muestran actividad *in vitro*, puedan conservar estas propiedades al ser consumidos y por lo tanto mostrar efectos *in vivo* [76]. Investigaciones recientes combinan estrategias preclínicas de análisis con tejidos o células (*in vitro*), pruebas físico-químicas (*in chimico*) y modelos computacionales (*in silico*) para explorar completamente el potencial de estos péptidos bioactivos [93, 94, 95].

En cuanto a la composición de aminoácidos, se conoce, que los péptidos que contienen prolina son generalmente resistentes a la degradación digestiva y, por lo tanto, podrían ser absorbidos en su forma intacta a través del intestino [96, 97], lo cual ha sido observado

en el caso de péptidos pequeños, particularmente, en estos dipéptidos y tripéptidos [98, 99]. En conjunto, es importante evaluar no solo su digestión y absorción, sino también la distribución, el metabolismo y la excreción [100].

Con relación a su absorción, se han postulado distintos mecanismos para explicar la captación intestinal de péptidos desde la luz del tracto gastrointestinal. De forma muy resumida, los principales mecanismos son el transporte paracelular a través de uniones estrechas intercelulares; el transporte directo a través de las membranas de las células epiteliales; endocitosis/fagocitosis por las células; y por último, el transporte activo mediante proteínas transportadoras específicas. Cada uno de estos mecanismos puede ocurrir solo o en asociación con otros, y a su vez, un mismo péptido puede utilizar más de un mecanismo, lo que aumenta la complejidad del proceso [101, 102].

Por tanto, el uso oral de péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas ofrece una serie de ventajas y desafíos específicos que requieren de más investigación y desarrollo dirigidos a diferentes aspectos como la palatabilidad, la digestión y los sitios de acción. El desarrollo de estos péptidos con fines terapéuticos y de promoción de la salud debería tener en cuenta estos factores a la hora de diseñar

estrategias para el uso oral [101]. Esto ha dado lugar a una intensa investigación sobre las posibles aplicaciones de los péptidos multifuncionales derivados de los alimentos en la prevención o el tratamiento de diferentes enfermedades [103].

Debido a su potencial para la salud humana y a que no comportan ningún riesgo conocido para ésta, los hidrolizados de proteínas y los péptidos bioactivos, y concretamente los procedentes de *Salvia hispanica* L., podrían usarse como ingredientes en alimentos funcionales y productos farmacéuticos para mejorar la salud y prevenir enfermedades [76].

El sistema inmunitario: monocitos y macrófagos

El sistema inmunitario es una compleja red de moléculas, células, tejidos y órganos que actúa para eliminar elementos potencialmente dañinos como bacterias, virus, hongos, protozoos y previene el crecimiento de células cancerosas. Se clasifica en dos categorías funcionales principales, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [104].

La inmunidad innata es inespecífica y proporciona la primera línea de defensa a través de medios anatómicos (piel y membranas mucosas), fisiológicos (pH bajo, Temperatura y mediadores

químicos), celulares (macrófagos, células polimorfonucleares y células dendríticas), células natural killer (NK) y componentes inflamatorios (citoquinas, interferones, moléculas del complemento, defensinas, leucotrienos, proteínas de fase aguda y prostaglandinas) [104].

La inmunidad adaptativa, también llamada inmunidad específica o inmunidad adquirida, se divide a su vez, en dos tipos, inmunidad mediada por células e inmunidad mediada por anticuerpos o humoral. Los linfocitos T y B son las células más importantes en la inmunidad adaptativa. La inmunidad mediada por células implica a los linfocitos T efectores, que secretan moléculas como citoquinas y median la respuesta inmunitaria tras la interacción con células presentadoras de antígenos. La inmunidad humoral involucra a los linfocitos B, responsables de la producción de anticuerpos tras la interacción con antígenos específicos. Los anticuerpos pueden unirse a antígenos de patógenos invasores y marcarlos para su destrucción por macrófagos [104].

Los monocitos son componentes fundamentales de la inmunidad innata, en particular del sistema mononuclear fagocítico, cuyas funciones son la eliminación de desechos celulares (detritus), sistema de reconocimiento y defensa inespecífica, mecanismos de

reparación e inflamación y un importante enlace con el sistema linfoide más específico. Responden a la infección microbiana o cambios fisiológicos en el microambiente [84]. En condiciones fisiológicas, los monocitos pasarán de la médula a la sangre, y de ésta a los tejidos, diferenciándose en macrófagos M1 o M2. En algunos órganos concretos reciben un nombre particular, como las células de Kupffer en el hígado, microglía en cerebro, macrófagos alveolares en pulmones, osteoclastos en el hueso o histiocitos en piel y tejido conectivo [84]. En condiciones patológicas, si los monocitos reciben señales de alguna inflamación, a través de mensajeros químicos producidos por células del sistema inmune, como los factores de crecimiento locales, las citoquinas y otros productos biológicos, los monocitos llegan al tejido dañado y se diferencian a macrófagos a mayor velocidad y en mayor cantidad.

Además, en función al tipo de señal que active a los macrófagos, estos pueden experimentar diferentes formas de polarización. Los monocitos clásicos, fracción principal de los monocitos totales, que expresan en gran medida el receptor de quimioquinas migratorias CCR2, dan lugar a macrófagos M1, que son células asesinas altamente inflamatorias y eficaces que producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y secretan

citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Interleuquina 1 β (IL-1 β) e Interleuquina 6 (IL-6). Mientras que los monocitos no clásicos, más pequeños que los clásicos, están implicados funcionalmente en la reparación del tejido, el patrullaje y la curación de heridas, y promueven la aparición de macrófagos M2 o antiinflamatorios, orientados a la modulación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de moléculas antiinflamatorias como la Interleuquina 10 (IL-10) (**Figura 5**) [105].

Por tanto, los monocitos primarios de sangre periférica humanos y el estudio sobre su activación, diferenciación y polarización a macrófagos maduros constituyen una herramienta muy interesante para la investigación de los beneficios que aportan los compuestos bioactivos sobre los trastornos oxidativos e inflamatorios crónicos [106, 107].

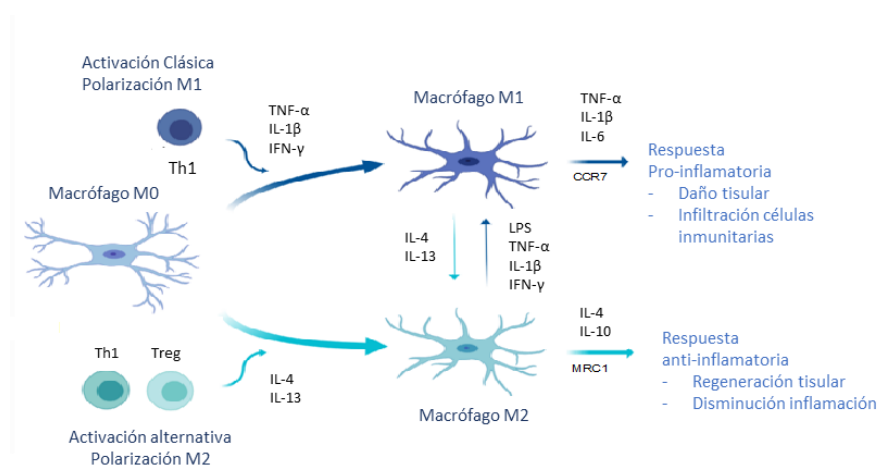


Figura 5. Representación esquemática del proceso de polarización en macrófagos.

Influencia de la dieta en el estrés oxidativo y la inflamación

Es evidente que nuestro estilo de vida y la dieta influyen directamente sobre nuestra salud, pudiendo modular la respuesta inflamatoria y estado oxidativo del organismo, ya que en los alimentos se encuentran sustancias que inciden directamente sobre las rutas metabólicas. Así, hay metabolitos de nutrientes que pueden actuar como mensajeros intracelulares, pro o antiinflamatorios y como antioxidantes [105], o proteínas implicadas en la expresión génica regulando mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo [107]. Estas sustancias se denominan inmunomoduladores, pudiendo aumentar, disminuir o modificar la respuesta inmune al influir en cualquier punto del sistema inmunitario, ya sea en la respuesta innata o adaptativa. Existen fármacos para modular la respuesta inmunitaria en humanos. Sin embargo, los efectos secundarios dañinos y el alto costo de éstos han restringido su uso en determinados pacientes y la mayoría de los fármacos inmunomoduladores no son apropiados para usos crónicos o preventivos. En los últimos años, se ha demostrado que la modulación de la función inmunológica a través de los componentes de la dieta es una estrategia eficaz y eficiente; mientras tanto, el descubrimiento de nuevos péptidos inmunomoduladores a

partir de proteínas alimentarias podría proporcionar una ventaja adicional al tratamiento [104].

El consumo de hidrolizados de proteínas vegetales inmunomoduladores puede contribuir a retrasar o prevenir enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico. Con el fin de desarrollar estos hidrolizados, es necesario conocer qué péptidos, contenidos en ellos, son responsables de estos efectos biológicos, así como los mecanismos subyacentes. Se han empleado con éxito tanto métodos *in vitro*, con cultivos de líneas celulares, como *in vivo*, usando principalmente modelos animales, para evaluar los efectos inmunomoduladores de péptidos o hidrolizados de proteínas de origen alimentario [104, 108], demostrándose su potencial efecto bioactivo en monocitos, macrófagos y células mononucleares de sangre periférica humana [109, 110, 111]. El efecto biológico de algunos de estos hidrolizados proteicos ha sido corroborado en ensayos con humanos [112].

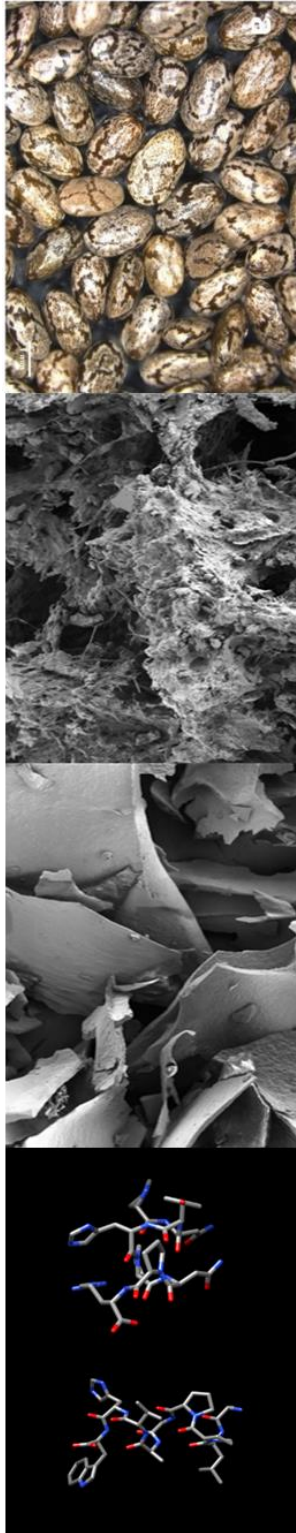
El potencial inmunomodulador de los péptidos presentes en los hidrolizados proteicos relacionado con la inflamación se ha convertido en un área activa de investigación, ya que la inflamación se ha asociado durante mucho tiempo con la fisiopatología de muchas enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis, artritis reumatoide,

colitis ulcerosa, diabetes, etc. Estudios recientes avalan el efecto de péptidos procedentes de hidrolizados de proteínas sobre mecanismos inflamatorios, al inhibir la producción de mediadores como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) y citoquinas (IL-1 β , IL-6, Interleuquina 8 (IL-8) y TNF α en modelos de cultivo celular *in vitro* inducidos por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) [104].

Para comprender los efectos inmunitarios que pueden inducir los hidrolizados de proteínas y, en última instancia, utilizarlos en alimentación especializada, es de crucial importancia comprender exactamente cómo se producen estos efectos. Hasta ahora, solo unos pocos estudios se han centrado en elucidar los mecanismos subyacentes de los efectos inmunomoduladores de los hidrolizados proteicos. Investigaciones recientes sugieren que los péptidos podrían unirse directamente a inmunoreceptores de la superficie celular implicados en la señalización pro o antiinflamatoria; entrar en la célula a través de un transportador de péptidos e interferir con estas vías de señalización; o bien ser absorbido por la célula mediante endocitosis y actuar de forma similar [108].

Una vez verificada la evidencia de los efectos beneficiosos de distintos hidrolizados proteicos sobre la salud, particularmente sobre las ECNT, relacionados con los efectos sobre parámetros oxidativos

e inflamatorios y el sistema inmune, la hipótesis de partida de la presente Tesis Doctoral plantea que, las secuencias peptídicas bioactivas presentes en los hidrolizados proteicos de chía (CPH), podrían alcanzar la circulación sistémica de forma intacta para poder ejercer sus efectos beneficiosos *in vivo*, utilizando un sistema transwell de absorción intestinal mediante la línea celular adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, modular la respuesta inmune y promover la polarización de los monocitos primarios humanos y los macrófagos maduros, hacia un fenotipo menos inflamatorio, demostrando la potencial aplicación de los CPH como ingredientes funcionales en distintas formulaciones de alimentos destinados a la prevención o el tratamiento de afecciones relacionadas con el proceso inflamatorio.



2.- OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la funcionalidad *in vitro* de un hidrolizado proteico de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre el estado oxidativo e inflamatorio en monocitos primarios humanos.

De este objetivo general, se derivan una serie de objetivos específicos, de carácter más técnico y que garantizan la consecución del objetivo general con suficientes garantías, demostrando la seguridad, eficacia y bioactividad de los productos generados. De este modo, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

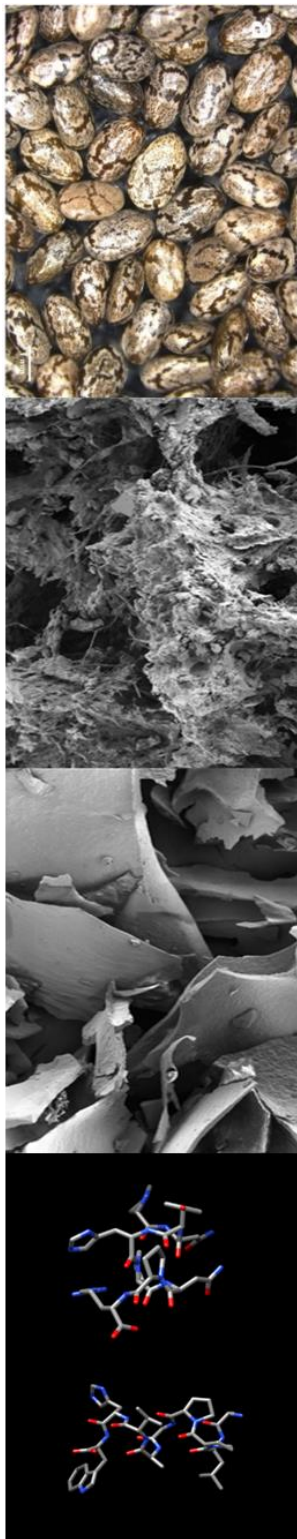
Objetivos específicos

1. Obtener, caracterizar y optimizar el aislado e hidrolizados proteicos seguros, eficaces y tecnofuncionales a partir de harina desengrasada de semillas de chia a nivel de planta piloto.
2. Estudiar *in vitro* la actividad antihipertensiva y antioxidante del aislado e hidrolizados proteicos de chía.
3. Estudiar *in vitro* las propiedades funcionales (absorción de aceite, capacidad espumante y emulsificante, etc.) del aislado e hidrolizado proteico de chía con mejores propiedades antihipertensivas y antioxidantes.
4. Identificar mediante técnicas ómicas y análisis de alto rendimiento el peptidoma de los hidrolizados proteicos de chía preseleccionados

por su potencial actividad biológica en sistemas libres de células y predicción *in silico* de su potencial actividad antihipertensiva y antioxidante.

5. Estudiar *in vitro* la biodisponibilidad de las secuencias bioactivas presentes en los hidrolizados proteicos de chía utilizando un sistema celular de absorción gastrointestinal tipo transwell e identificar el peptidoma de las secuencias biodisponibles en relación al hidrolizado original.

6. Estudiar *in vitro* el efecto inmunomodulador de los hidrolizados proteicos de chía sobre la activación, diferenciación y polarización de monocitos primarios humanos a macrófagos maduros.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y muestras

Las semillas de chía fueron suministradas por la Universidad autónoma de Nuevo León (México).

Las enzimas empleadas fueron Alcalase 2.4 L (Alcalase) y Flavourzyme 1000L (Flavourzyme) (Novozymes, Madrid, España). Alcalase es una serina-endoproteasa, producida a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es Subtilisin A, que muestra una actividad de 2.4 unidades Anson (AU) /g de enzima, siendo definida la unidad Anson aquella cantidad de enzima que, bajo las condiciones del test, libera 1 mmol (1 milimol = mol) de aminoácidos positivos al reactivo de Folin por minuto, calculados como tirosina. Su temperatura óptima de reacción se sitúa entre 50-60 °C y su pH óptimo de acción 6.5-8.5. Cumple con las especificaciones recomendadas por la FAO/WHO relativas a enzimas de uso alimentario. Flavourzyme se produce por fermentación del *Aspergillus oryzae* y presenta actividad endoproteasa y exopeptidasa. El peso molecular difiere de las diferentes endoproteasas, ya que se trata de un complejo endo y exoproteasas. Fácilmente soluble en agua, tiene una actividad de 1000 Unidades de Leucina Aminopeptidasa (LAPU)/g de enzima, siendo

definida LAPU como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto, utilizando el método AF 298/1 (Novo Nordisk) pH óptimo de 7 y temperatura óptima de 50 °C.

Todos los productos químicos (reactivos y disolventes) fueron de grado analítico y proporcionados por Sigma-Aldrich, Bachem AG y Gibco.

Obtención de harina desengrasada de chía en planta piloto

Las semillas de chía se molieron en molino Retsch Grindomix modelo GM200 (Retsch GmBh, Haan, Germany) a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 segundos, se empaquetaron en cartuchos de papel de filtro de aproximadamente 1 Kg y se introdujeron en Extractor sólido-líquido Armfield FT29 (Armfield Limited, Ringwood, Hampshire, England), empleando como disolvente hexano. La extracción tiene lugar durante unas 6 horas, posteriormente la harina desengrasada de chía (CDF) es desolventizada, secada en estufa de aire a 50 °C y molida.

Obtención de aislados proteicos

El aislado proteico de chía (CPI) en laboratorio, se obtuvo a partir de la CDF utilizando el método de Timilsena et al. [55], con

algunas modificaciones. Una vez molturadas las semillas, las proteínas de chía se extraen 2 veces mediante extracción alcalina a pH 10.5, en una relación 1:20 peso/volumen (p/v) con Na₂SO₃ al 0.25% (p/v) y pH 10.5 durante 1 h a temperatura ambiente. Después de cada extracción se procede a centrifugar a 7500 rpm durante 15 minutos, se recuperan los sobrenadantes, los cuales se llevan a pH 4.0, para precipitar las proteínas y se centrifugan, en las mismas condiciones. Finalmente, las proteínas precipitadas fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

Una vez establecidos los parámetros de operación en el laboratorio se procedió, en planta piloto, a la obtención de un CPI en cantidad suficiente para la realización de los hidrolizados y demás determinaciones. La planta piloto dispone de cuatro tanques agitados de 400 litros de capacidad provistos de un pH-metro y un sensor de nivel, y para las separaciones sólido-líquido, la planta dispone de un decanter Sharples P600 (Alfa Laval Iberia S. A., Madrid, España), un Tricanter Flottweg Z23-3/441 (Flottweg S. E. Vilsbiburg, Germany) y una centrífuga vertical Clara 20, Alfa Laval (Alfa Laval Iberia S. A., Madrid, España). El secado del aislado se realiza en un atomizador modelo Production Minor (Gea Niro, Copenhague, Dinamarca)

Obtención de hidrolizados proteicos de chía

Los CPH fueron obtenidos a partir del CPI. Para ello, 50 g de CPI se disolvieron en agua, en una relación 7.5% (p/v). Tras ajustar el pH a 8.0 se desarrolló la hidrólisis con la enzima comercial Alcalase a 50 °C y una concentración de enzima de 0.3 AU por gramo de proteína, manteniéndose el pH 8.0 con NaOH 1 N. La incubación con esta enzima se realizó durante 60 minutos, tomando alícuotas, tras añadir la enzima, a los 0, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos. La hidrólisis con Flavourzyme se realizó disolviendo el CPI a pH 7 y 50° C. La enzima se añade a una concentración de 60 LAPU/g de proteína. En esta ocasión se dejó incubar durante 120 minutos, cogiendo alícuotas a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Determinación cuantitativa del contenido graso

El contenido total en lípidos fue determinado por el contenido en aceite extraído de las semillas de chía mediante hexano en un soxhlet durante 9 h y expresado como porcentaje (%) en masa del producto (p/p) (UNE-EN ISO 659:1968).

Determinación cuantitativa de la composición de ácidos grasos.

El perfil de ácidos grasos de la fracción grasa fue determinado según el método de Garcés, R. and Mancha, M. [113]. La determinación de los ácidos grasos se realizó mediante los ésteres

metílicos de estos ácidos grasos. Para ello, 3 ml de una mezcla de metilar, compuesta por metanol 88%, ácido sulfúrico 2% y tolueno 10%, y 1 ml de heptano, fue añadida a 5 mg de aceite de chía, incubando a 80° C durante 1 h. Tras este tiempo de incubación, se tomó 1 µL para análisis por cromatografía gaseosa. Como patrón interno se usó el ácido heptadecanoico (C17:0). El cromatógrafo de gases utilizado fue equipado con una columna capilar Supelco SP2380 (30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.2 µm de grosor de fase) de sílice fundido (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). El gas portador usado fue hidrógeno, con una presión en cabeza de columna de 0.827 bares y un flujo de 1 mL/min, empleándose nitrógeno como gas auxiliar. La temperatura del inyector y del detector fue de 220 °C y la del horno de 170 °C. Los ácidos grasos se identificaron por comparación con patrones estándar.

Determinación cuantitativa de proteínas y péptidos

Las medidas de nitrógeno se realizaron en un microanalizador LECO TRUSPEC MICRO y un LECO MACRO CN828 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU), según cantidad disponible y homogeneidad de la muestra, en torno a 1 mg en el caso de TRUSPEC MICRO y en torno a 100 mg en el caso de LECOMACRO CN828. La separación de elementos del material se produce por combustión a

alta temperatura (975 °C). En el proceso de combustión, la muestra es encapsulada en una cápsula de estaño, se coloca en el autocargador y se mantiene ahí hasta que se inyecta la dosis de oxígeno. La muestra entonces, se deja caer dentro del horno al mismo tiempo que llega el oxígeno, produciéndose la combustión de la misma en un ambiente rico de oxígeno. El nitrógeno se mide por conductividad térmica. La conversión de nitrógeno en proteína se calculó multiplicando el contenido en nitrógeno por 6.25 como factor de conversión.

Determinación de cenizas y humedad

La humedad se calculó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca a 110 °C hasta peso constante (UNE-EN ISO 665:1968). El contenido de cenizas se determinó también por gravimetría, incinerándose las muestras a 550 °C durante 36 h (UNE 050:1994) en una mufla Heraeus Type 170 (W. C. Heraeus GMBH. HANAU).

La humedad también se calculó utilizando un analizador de humedad MB45 (Ohaus, Parsippany, NJ, EEUU).

Determinación de fibra total

El contenido en fibra se determinó según Lee, S. C. et al. [114]. Este método está basado en la digestión de las muestras por las

enzimas α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa, y posterior determinación del residuo resultante por gravimetría. Las muestras desengrasadas (1 g) se agitaron en 40 mL de tampón MES 0.05 M, TRIS 0.05 M pH 8.2. Se añadió 50 μ L de la solución de α -amilasa termoestable e incubó con agitación durante 15 min a 95-100 °C. Se enfrió a 60°C y añadió 100 μ L de una solución de 50 mg de proteasa por mL del tampón MES/TRIS, manteniéndola en agitación continua a 60 °C durante 30 min. Se añadió 5 mL de HCl 0.56 N y ajustó el pH a 4.0-4.7. Se añadió 300 μ L de la solución de amiloglucosidasa e incubó con agitación constante a 60 °C durante 30 min. Una vez finalizada la digestión, a las muestras se les añadió 225 mL de etanol 96% a 60 °C, dejándose precipitar la muestra 1 h a temperatura ambiente. Se filtraron las muestras, lavando el retenido con etanol 78%, etanol 96% y acetona. Al residuo, una vez secado en estufa a 105 °C y pesado, se le determinó el contenido en cenizas y proteínas. El porcentaje en fibra total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{\text{Residuo (g)} - \text{Proteínas (g)} - \text{Cenizas (g)}}{\text{Muestra (g)}} \times 100$$

Determinación de polifenoles y azúcares

Estos dos ensayos se hicieron a partir de un mismo extracto etanólico que se preparó extrayendo las muestras (2-10 g) con etanol 96% en un soxhlet durante 16 h. El extracto se filtró y se llevó a un volumen fijo (100 ó 200 mL).

Los azúcares solubles se determinaron según Dubois, M. et al. [115]. Este método se basa en la reacción coloreada que tiene lugar entre los azúcares, el fenol y el ácido sulfúrico. Alícuotas del extracto etanólico (100 μ L) se llevaron a 1 mL con agua, añadiéndoles 1 mL de fenol al 5% (p/v) en agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron y dejaron enfriar a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 480 nm frente a un blanco. La determinación cuantitativa se hizo mediante una recta de calibrado preparada a partir de una solución de 10.3 mg de glucosa por mL. Los contenidos en azúcares solubles se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento (p/p). (**Figura 6**).

El contenido en polifenoles de las muestras se determinó según el procedimiento de Moores, R. G. et al. [116], que cuantifica los polifenoles a partir de su absorbancia a 324 nm. La recta de calibrado se hizo usando una solución patrón de ácido clorogénico con una concentración de 0.74 mg/mL. Los contenidos en polifenoles

se refirieron a las muestras extraídas en tanto por ciento (p/p). (**Figura 7**).

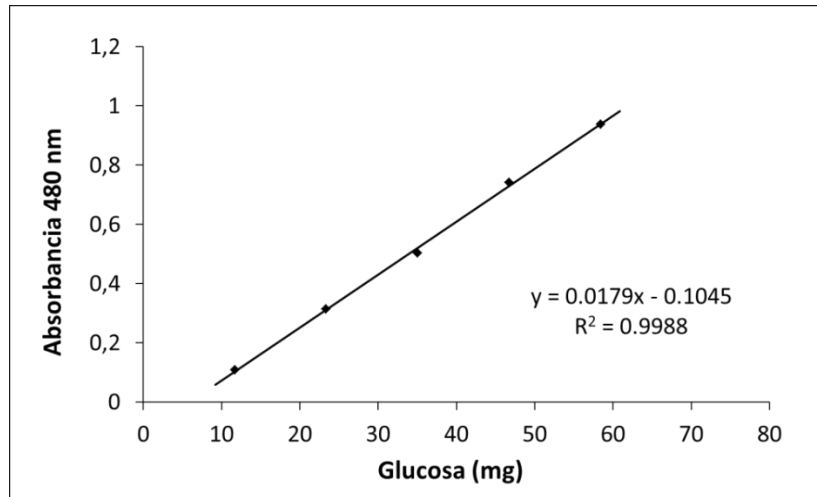


Figura 6. Recta de calibrado de azúcares solubles.

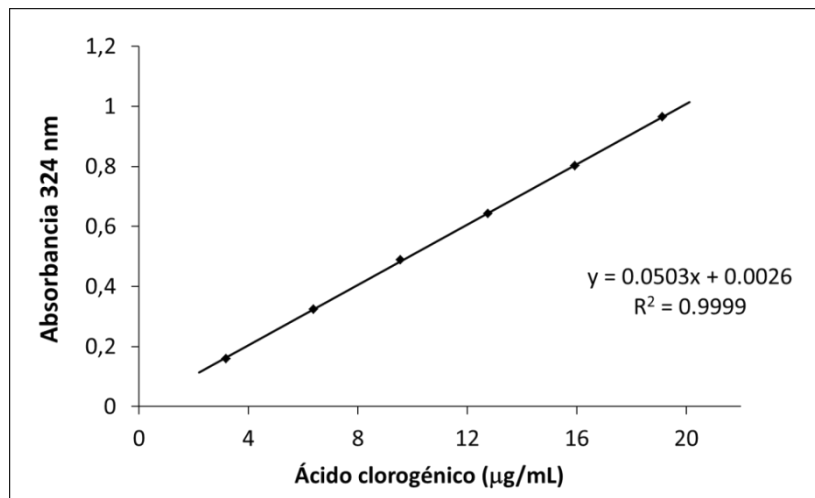


Figura 7. Recta de calibrado para la determinación de polifenoles.

Determinación cuantitativa de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó según el método de Alaiz et al. [117] con ligeras modificaciones. Para ello, las muestras (2-4 mg de proteína) se hidrolizaron mediante incubación con HCl 6 N a 110°C durante 24 h en tubos sellados cerrados y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez finalizada la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor Hei-VAP Precision HL G1B (Heidolph, Kelheim, Alemania), y se redisolviéron en tampón borato sódico 1 M pH 9, llevándolas a un volumen final de 10 ml. Tras su derivatización con etoximetilenmalonato de dietilo, los aminoácidos se determinaron en el hidrolizado ácido mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) (Acquity Arc, Waters, EE. UU.), utilizando ácido D, L- α -aminobutírico como patrón interno, y una columna de fase inversa de 3mm x 150mm (XSelect HSS T3 XP, 2,5 μ m; Waters). Se utilizó un sistema de gradiente binario con los disolventes (A) acetato de sodio 25 mM, azida de sodio al 0.02% (pH 6.0) y (B) acetonitrilo. El flujo fue de 0.8 mL/min y el gradiente de elución usado fue: tiempo 0-1 min, elución en isocrático con A:B 92:8, tiempo 1-4.33, gradiente lineal desde A:B 92:8 hasta A:B 86:14; tiempo 4.33-7.32 min, elución isocrática con A:B 86:14; tiempo 7.32-11.65 min, gradiente lineal desde A:B 86:14 hasta A:B 72:28; tiempo

11.65-13.31 min gradiente lineal desde elución con A:B 72:28 hasta A:B 65:35, tiempo 13.31-15.64 gradiente lineal desde A:B 65:35 hasta A:B 92:8, tiempo 15.64-16 elución isocrática con A:B 92:8. La cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante curvas de calibración para cada uno de ellos, para lo cual se utilizó una solución patrón de la casa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) que contiene 17 aminoácidos en una concentración de 2.5 $\mu\text{moles/mL}$ (1.25 $\mu\text{moles/mL}$ en el caso de L-cisteína) y que se sometió a las mismas condiciones de hidrólisis de las muestras. La relación completa de estos aminoácidos es: L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-cistina, L-fenilalanina, glicina, L-histidina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, y L-valina. Los picos resultantes se analizaron con el software EMPOWER (Waters, EE. UU.). Además, el contenido de triptófano se evaluó según el método de Yust et al. [118]. Brevemente, las muestras (20 mg de proteína aproximadamente) se hidrolizaron con 3 mL de NaOH 4 N a 110 °C durante 4 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7 usando HCl 6 N. Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 10 mL con tampón borato sódico 1 M a pH 9. El análisis

se llevó a cabo mediante UHPLC con una columna de fase inversa de 3 mm x 150 mm (XSelect HSS T3 XP, 2.5 μ m; Waters), usándose un sistema isocrático binario con tampón acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% (p/v) pH 6 y acetonitrilo como disolventes en relación 91:9, siendo el flujo de 0.8 mL/min. El contenido en triptófano se determinó a partir de una recta de calibrado preparada con un patrón de L-triptófano también de la casa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)

Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas de chíá.

Curva de solubilidad proteica frente al pH

El pI de las proteínas de chíá es el punto de menor solubilidad de las mismas. La solubilidad de las proteínas de chíá se determinó de acuerdo al método de Salcedo-Chavez et al. [119], con algunas modificaciones. Una muestra de 2 g se disolvió en 100 mL de H₂O y se ajustó el pH a 12 con NaOH, y posteriormente fue llevado, sucesivamente, a 10, 8, 6, 4 y 2 hasta pH constante, en cada caso, con HCl. En cada uno de los puntos se tomó una alícuota, por duplicado, la cual fue centrifugada durante 15 minutos a 12000 g. A los sobrenadantes recuperados se les midió el contenido en nitrógeno. La solubilidad se determina a partir de una gráfica en la que se representó

el porcentaje de nitrógeno soluble en los sobrenadantes (respecto al nitrógeno total) frente a las diferentes unidades de pH.

Grado de hidrólisis

El HD, definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos respecto al total, se calculó a partir de las determinaciones de grupos aminos libres mediante el método del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) [120], de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{HD (\%)} = (h/ht) \times 100$$

h: grupos aminos libres procedentes del proceso hidrolítico por mg de proteína incubada.

ht: grupos aminos totales del aislado proteico, tras hidrólisis total de la muestra, por mg de proteína incubada (determina el 100% de grado de hidrólisis).

La determinación de los grupos amino libres se lleva a cabo mediante la lectura de su absorbancia a 420 nm. La recta de calibrado se realiza usando una solución patrón de Leucina en sodio dodesilsulfato (SDS) 1% (p/v).

Estimación de pesos moleculares mediante cromatografía de filtración en gel

La estimación de los pesos moleculares se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel en un sistema de UHPLC (Acquity Arc, Waters, EEUU), equipado con un sistema de bombeo Quaternary Solvent Manager-R, un inyector automático, Sample manager FTN-R, un sistema de acondicionamiento de la columna y un detector 2998 photodiodo Array. La columna utilizada fue XBridge™ Protein BEH SEC 200 Å 2.5 µm 4.6 x 150 mm y para su calibración se utilizó un KIT de patrones standard (Waters corporation, Milford, MA, USA), que contiene los siguientes patrones: Uracilo (0.112 kDa), Ribonuclease A (13.7 kDa), Albumin chicken egg white (44.2 kDa) and Bovine thyroglobulin (669 kDa). Los cromatogramas obtenidos se analizaron con el software Empower 3 Personal GPC/SEC (Waters corporation, Milford, MA, USA).

Determinación del contenido en minerales mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inducido

Se realizó una digestión asistida por microondas, usando como reactivos HNO₃ y H₂O₂, a una temperatura de 200 °C. El análisis se

realizó empleando un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inducido (ICP) (ICP, SpectroBlue) [121].

Caracterización ultraestructural mediante microscopía Electrónica de barrido.

La caracterización ultraestructural de las muestras se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Una lámina delgada de cada muestra se montó sobre un trozo de aluminio, utilizando cinta adhesiva de carbón conductor, eliminando cualquier partícula suelta. A continuación, el portamuestras se revistió, por pulverización al vacío, con aproximadamente 20 nm de oro-paladio, utilizando un instrumento Leica EM ACE600 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss Crossbeam 550 (Zeiss, Madrid, España), a un voltaje de aceleración de 2.00 kV y diferentes aumentos [122].

Determinación de propiedades funcionales

Solubilidad

La solubilidad de las proteínas de chíá se midió de acuerdo a Salcedo-Chávez et al., con pequeñas modificaciones [119]. Las muestras se disolvieron en H₂O (5% p/v) ajustándose en un rango de pH de 2-10 con NaOH 1 N o HCl 1 N y se mantuvieron en agitación durante 1 h a temperatura ambiente, centrifugándose posteriormente

a 9500 g durante 15 minutos. A los sobrenadantes se les determinó su contenido en proteínas y los resultados se refirieron como % de proteína solubilizada respecto al contenido de proteína total.

Absorción de aceite

La absorción de aceite se llevó a cabo mediante el método de Lin, M. J. Y. et al.[123]. Inicialmente, 0.5 g de muestra se mezclaron con 6 mL de aceite de soja y se dejaron en reposo durante 30 minutos. Tras centrifugar a 3700 rpm durante 25 minutos, se pesó el sobrenadante, expresando la absorción de aceite como gramos de grasa absorbida por 100 g de muestra.

Actividad y estabilidad emulsificante

Se determinó según el método de Bejosano y Corke [124], con pequeñas modificaciones. Inicialmente, 3.5 g de muestra se homogenizaron en un Omnimixer 17220 (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA) durante 30 segundos en 50 mL de agua a 10000 rpm. A continuación, se añadieron 25 mL de aceite de maíz y se mezclaron durante 30 segundos a la misma velocidad, se volvió a añadir 25 ml de aceite de maíz y se mezclaron de nuevo durante otros 90 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 1100 g durante 5

minutos. La actividad emulsificante se calculó por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad emulsificante} = \frac{\text{Volumen de la capa emulsificada} \times 100}{\text{volumen de la emulsificación antes de la centrifugación}}$$

Para la determinación de la estabilidad emulsificante, las muestras emulsificadas se calentaron a 85 °C durante 15 minutos y, una vez que las muestras se enfrían a temperatura ambiente, se centrifugaron a 1100 g durante 5 minutos. La estabilidad de la emulsión se expresó como porcentaje de la actividad emulsificante inicial.

Capacidad y estabilidad espumante

Se llevó a cabo mediante el método de Fuhrmeister and Meuser [125], con algunas modificaciones. 50 ml de una solución del 3% (p/v) de muestra en agua fueron homogeneizados en un Omnimixer 17220 (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA) durante 6 minutos a 10000 rpm. La capacidad espumante fue expresada por el incremento de volumen respecto el volumen inicial. La estabilidad espumante se determinó midiendo el volumen de espuma que se mantiene tras 60 minutos en reposo a temperatura

ambiente y se expresó como tanto por ciento respecto al volumen de la espuma inicial.

Determinación de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina

Se realizó según el método descrito por Sentandréu, M A. and Toldrá, F. [126], con ligeras modificaciones. Este método se basa en la hidrólisis del sustrato Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro por la acción de la ACE dando lugar al producto fluorescente o-aminobenzoilglicina. El sustrato Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro se disolvió en tampón Tris 0.15 M, NaCl 1.125 M pH 8.3 para obtener una concentración final de sustrato 0.45 μM y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. La ACE, previamente disuelta en glicerol al 50% a una concentración de 1 Unidad/mL, se diluyó en tampón Tris 0.15 M que contenía ZnCl₂ 60 μM a pH 8.3, siendo la concentración final de enzima de 0.04 Unidad/mL. Se empleó una placa multipocillo negra de poliestireno (Porvair, Leatherhead, Reino Unido), donde a cada pocillo se añadieron 40 μL de tampón Tris para los blancos, o de disolución de la ACE, y se ajustó a 80 μL con agua para el blanco y el control, o con muestra, esta última a una concentración de 200 μg/ml. Para tener en cuenta las interferencias de los compuestos, se preparó un blanco sustituyendo el agua por muestra (blanco de muestra). La reacción enzimática se

inició al añadir 160 µL del sustrato fluorescente que inmediatamente se mezcló e incubó a 37 °C en un fluorímetro de microplacas Fluoroskan Ascent® de Thermo Scientific. La fluorescencia generada se midió tras 60 minutos utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión 350 y 420 nm, respectivamente. Se empleó el software FLUOstar Control versión 1.32 R2 para procesar los datos.

La actividad inhibitoria de cada muestra se determinó por triplicado y para su cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibidora de la ACE (\%)} = ((F_c - F_b) - (F_s - F_{sb})) / (F_c - F_b)$$

F_c: fluorescencia del control

F_b: fluorescencia del blanco

F_s: fluorescencia de la muestra

F_{sb}: Fluorescencia blanco de la muestra

Determinación de la actividad antioxidante

Decoloración de β-caroteno

Se llevó a cabo según el método de Pastor-Cavada et al., con algunas modificaciones [127]. El ensayo se basa en determinar la decoloración que sufre el β-caroteno por los productos de oxidación del AL/ω6.

Para ello, 1 mL de una disolución de 2 mg/mL de β -caroteno en cloroformo se añade a una mezcla de 20 mg de AL/ ω 6 y 200 mg de Tween 20, se vortea y se lleva a sequedad con nitrógeno. Se adicionan 20 mL de agua rica en oxígeno, obtenida burbujando oxígeno durante 25 min. En una placa multipocillos se disponen alícuotas de 200 μ L de esta mezcla y 20 μ L de las muestras cuya actividad antioxidante quiere ensayarse, 3,5-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT) (control positivo) o agua (blanco). Se mide la absorbancia a 470 nm y a 50 °C en lector de placas Multiskan Spectrum de Thermo Scientific, a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos, manteniendo durante todo el experimento la placa a 50 °C y oscuridad. Los datos se procesaron con el programa Multiskan Spectrum (versión 1.0) y los resultados se expresaron como porcentaje de β -caroteno no oxidado ($A_t=n/A_{t=0} \times 100$), siendo A la Absorbancia frente al tiempo en min.

Determinación del poder reductor

La determinación del poder reductor de los hidrolizados se realizó según el método de Oyaizu, M. [128]. Para ello, 0.1 mL de muestra (a una concentración de 1 mg/mL de proteína) se añadieron a una mezcla compuesta por 0.25 mL de tampón fosfato sódico 0.2 M pH 6.6 y 0.25 mL de ferricianuro potásico 1% (p/v) y se incubó a 50°

C durante 20 min. Pasado este tiempo, se añaden 0.25 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) y se agita. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min y a 0.5 mL de la capa superior se añaden 0.5 mL de agua destilada y 0.1 mL de cloruro férrico al 0.1% (p/v). Se toman alícuotas de 0.2 mL de la mezcla y se añaden 0.2 mL de agua y 40 μ L de cloruro férrico 0.1% (p/v). Tras incubar 10 min a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 700 nm. Como control negativo se empleó agua y como control positivo BHT a una concentración de 0.08 mg/mL.

Determinación de la capacidad para secuestrar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

Se realizó según el método descrito por Wu, H. C. et al. [129], con ligeras modificaciones. Así, a 150 μ L de muestra (a una concentración de 1 μ g/ μ L de proteína), BHT (control positivo) o agua (blanco), se añaden 150 μ L de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 0.1 mM en etanol 95%. La mezcla se agita y se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 30 min se mide la absorbancia a 517 nm en lector de placas Multiskan. Como control positivo se empleó BHT a una concentración final de 0.08mg/mL. Los resultados fueron expresados como:

Captación (%) = (Absorbancia blanco-absorbancia muestra)/Absorbancia blanco × 100.

Extracción, purificación e identificación del peptidoma mediante nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de alta resolución con movilidad iónica.

Las muestras se acidificaron con ácido trifluoroacético al 0.5%. El paso de desalinización y concentración se realizó con ZipTip C18 (Millipore) y las muestras digeridas (con tripsina) se secaron a vacío. La nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de alta resolución con movilidad iónica (LC-TIMS-MS/MS) se llevó a cabo utilizando UHPLC de nanoflujo nano Elute (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), acoplado a un espectrómetro de masas TIMS-TOF Pro 2, equipado con una fuente de iones de nanoelectrospray CaptiveSpray (Bruker Daltonics) de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente P202230873. Brevemente, se cargaron alrededor de 200 ng de digerido de péptido en una columna capilar Bruker FIFTEEN C18 (15 cm de longitud, 75 µm de diámetro, 1.9 µm de tamaño de partícula, 120 Å de tamaño de poro; Bruker Daltonics). Los péptidos se separaron a 30 °C usando un gradiente de 20 minutos a un caudal de 300 nL/minuto (fase móvil A (MPA): 0.1% FA; fase móvil B (MPB): 0.1% FA en acetonitrilo). Se

aplicó un gradiente escalonado de 0 a 35% de MPB durante 13 minutos, seguido de un apaso de 35 a 90% de MPB de 13 a 15 minutos, y finalizó con un lavado de 90% de MPB durante 5 minutos adicionales. Tims-tof Pro 2 se ejecutó en modo DDA-PASEF. Los espectros de masas para escaneos MS y MS/MS se registraron entre 100 y 1700 m/z. La resolución de movilidad de iones se fijó en 0.85-1.30 V s/cm² durante un tiempo de rampa de 100 ms. La adquisición de datos se realizó utilizando 4 escaneos PASEF MS/MS por ciclo, con un ciclo de trabajo cercano a 100%. Se aplicó un filtro poligonal en el espacio m/z y la movilidad iónica para excluir m/z baja, principalmente iones de una sola carga de la selección de precursores de PASEF. Se aplicó un tiempo de exclusión activa de 0.4 minutos a los precursores que alcanzaron las 20000 unidades de intensidad. La energía de colisión se incrementó gradualmente en función de la rampa de movilidad de iones, de 27 a 45 eV. Los datos sin procesar se analizaron en PEAKS Studio ProX (Bioinformatics Solution Corp). La biblioteca de referencia se adquiere de UniProt_proteome_Salvia-ssp_Feb22. Los datos sin procesar se analizaron con una tolerancia de error de masa principal establecida en 15 ppm y una tolerancia de error de masa de fragmento de 0.05 Da. Para tener en cuenta las modificaciones posteriores a la traducción y

el etiquetado químico, se utilizaron los siguientes ajustes: la carbamidometilación de los residuos de cisteína se estableció como modificación fija, la oxidación de metionina y la cetilación (término N de proteína) se estableció como modificación variable. Los péptidos únicos de proteína se establecieron en más de 1 y se aplicó una puntuación de alta confianza de $-10\lg P > 20$ para indicar una proteína identificada con precisión.

Análisis *in silico*

Como criterio se estableció someter al análisis *in silico* los 20 péptidos con un peso molecular inferior a 1 kDa y mayor puntuación de confianza o espectro de fragmentación ($-10\lg P$), mediante el uso de:

- a) Software ToxinPred, para predecir, para cada péptido, su hidrofobicidad, carga, pI, anfipaticidad, impedimento estérico, toxicidad y peso molecular

(<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>).

- b) PeptideRanker, para clasificar las secuencias según la probabilidad predicha de ser bioactivas, oscilando las puntuaciones asignadas entre 0 y 1.0, con un umbral de 0.5.

(<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb>)

- c) AnOxPePred-1.0, para predecir las propiedades antioxidantes (cuantificadas por la eliminación de radicales libres y las puntuaciones de quelación de iones) de los péptidos utilizando una red neuronal convencional (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?AnOxPePred-1.0>).
- d) mAHTPred, para predecir la propiedad antihipertensiva de los péptidos utilizando una representación de características efectiva, las puntuaciones asignadas oscilaron entre 0 y 1.0 con un umbral de 0.5. (<http://thegleelab.org/mAHTPred/index.html>)
- e) Estabilidad molecular computacional: se utilizó el servidor web PASTA 2.0 para calcular la tendencia de autoagregación de péptidos y la estructura de tipo amiloide predicha (agregación paralela/antiparalela) que eran específicos de la posible región en la secuencia. Para la discriminación de péptidos, los umbrales óptimos se cambiaron como Top = 1 y Energía < -5 Unidad de energía de PASTA (PEU) (1 PEU = 1.192 kcal/mol). También se informó la probabilidad de desorden intrínseco y la porción de estructura secundaria estimada que complementan los datos de agregación. Para los

péptidos de interés, se simuló la mejor energía dentro de la matriz de secuencias cruzadas para evaluar la probabilidad de propensión inherente a la autoagregación/ coagregación de péptidos (el umbral de la mejor energía para el emparejamiento péptido-péptido se fijó en cero) (<http://protein.bio.unipd.it/pasta2/>) [130].

Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán (compuesto insoluble de color púrpura). Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron con el CPH hasta una concentración máxima de 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h. La técnica consistió en añadir una solución acuosa de MTT (0.5 mg/mL) a los pocillos e incubar a 37 °C durante 2 h, tiempo después del cual se retiró el medio y las células se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino (PBS); finalmente se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. La intensidad de color púrpura se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 620 nm, en un lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Labsystems).

Ensayo de absorción intestinal mediante sistema transwell utilizando la línea celular Caco-2

Las células Caco-2 se cultivaron en insertos de cultivo celular de 12 pocillos, en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado por calor y 1% de penicillin/streptomycin (P/S). Las células se incubaron a 37 °C bajo atmósfera modificada de 5% de CO₂ y se les cambió el medio cada 2-3 días. La integridad de la monocapa celular se controló mediante resistencia eléctrica transepitelial, utilizando un voltamperímetro Millicell® ERS-2 (Millipore). Los insertos se usaron durante 2 semanas después de la siembra y tenían una resistencia de al menos 500 W/cm². Los insertos se transfirieron a placas de 12 pocillos y se iniciaron reemplazando el medio con medio nuevo que contenía CPH a 1 mg/mL en la cámara apical. Después de 4 horas, el contenido en el lado basolateral se recuperó con PBS.

Aislamiento de monocitos humanos primarios

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de *buffy coats* cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Sevilla y Huelva y Banco de Tejidos, mediante centrifugación sobre un gradiente con Ficoll (Sigma, Madrid, España) [105]. Los monocitos se aislaron de PBMCs

mediante selección positiva usando Microbeads CD14 y columnas LS en un sistema midiMACS (Miltenyi Biotec, Madrid, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después del aislamiento, los monocitos se suspendieron en un medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, penicilina, estreptomicina (G/P/S) y 10% de FBS inactivado por calor. Para los tratamientos, 5×10^5 monocitos/pocillo fueron sembrados en placas de 24 pocillos en presencia o no de LPS (100 ng/mL) (Sigma, Madrid, Spain) y tratados con CPH a 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h.

Diferenciación y polarización a macrófagos M1/M2

Los monocitos (5×10^5 por pocillo) fueron incubados durante 6 días en presencia de factor estimulante de colonias de macrófagos humano recombinante (M-CSF) (25 ng/mL) para obtener macrófagos diferenciados M0. Estas células fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con G/P/S y SFB al 10%. Para polarización a M1 y M2, los macrófagos M0 fueron expuestos a LPS (100 ng/mL) más interferón γ (IFN γ) (20 ng/mL) e IL-4 (20 ng/mL), respectivamente, durante otras 24 h adicionales. Para evaluar el efecto del CPH en la polarización de macrófagos, macrófagos M1 fueron expuestos a 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de CPH durante 24 h.

Producción de especies reactivas de oxígeno

Los niveles de ROS intracelular se determinaron utilizando el reactivo CellROX (ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Después de la estimulación *in vitro* con LPS a 100 ng/mL, los monocitos se expusieron a 50 y 100 µg/mL de CPH durante 24 h y luego con CellROX (5 µM) durante 30 min. Las células se lavaron con PBS y la señal de fluorescencia se analizó en un fluorómetro Fluoroskan Microplate Fluorometer (ThermoFisher Scientific) equipado con un conjunto de filtros de excitación/emisión 485/555. La auto-fluorescencia de las células se midió en las mismas condiciones, pero sin agregar CellROX [131]. Los datos mostrados se refieren al % de producción de ROS intracelular y a la comparación con un control positivo (100% de producción de ROS) después del tratamiento celular en presencia de LPS.

Producción de nitritos

Como indicador de la producción de NO se determinó la concentración de nitritos (NO₂) en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Volúmenes iguales de sobrenadante y reactivo de Griess (Sigma-Aldrich) se añadieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placa por triplicado [132]. La cantidad de nitrito se obtuvo a partir de una curva estándar de NO₂.

Determinación de citoquinas por inmunoensayo ligado a enzimas

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron recogidos y la liberación al medio de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 fue medida usando la técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (Diacclone, Besancon, France) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de citoquinas fueron expresadas en pg/mL, mediante curvas de calibrado de estándares para cada citoquina. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Labsystems).

Aislamiento de ácido ribonucleico y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

En monocitos y macrófagos tratados se procedió a la extracción del ácido ribonucleico (ARN) total con TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se midió en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Madrid, España). Para la síntesis de ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) por transcriptasa reversa se utilizaron 250 ng de ARN siguiendo el protocolo del iSCRIPT *Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad). El cDNA resultante se utilizó para determinar los cambios en la expresión génica mediante PCR cuantitativa ó RT-qPCR en un equipo

Bio-Rad CFX96. El gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) se usaron como genes normalizadores. Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas por triplicado y se cuantificó de acuerdo al método $2^{-\Delta Ct}$. Los primers utilizados para las amplificaciones se detallan en la **Tabla 5**.

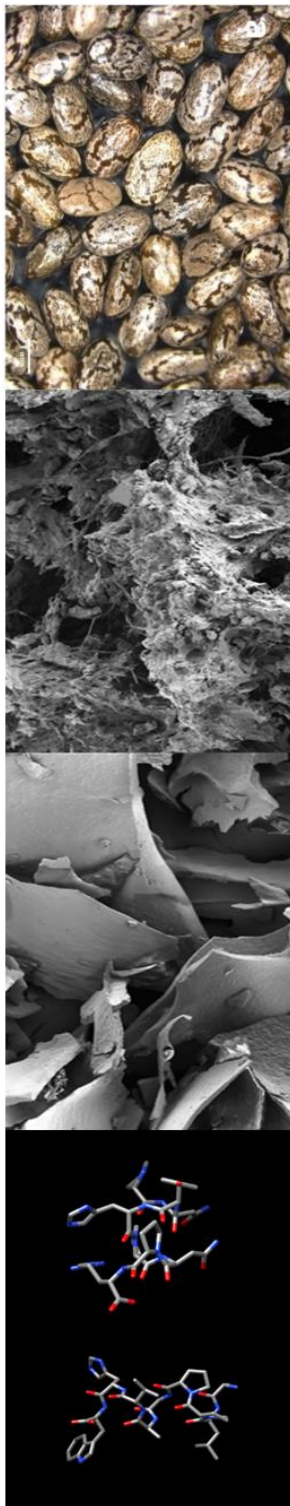
Tabla 5. Secuencias de los cebadores para el análisis de expresión génica por RT-qPCR

Gen	Nº de acceso	Dirección	Secuencia (5'→3')
<i>iNOS</i>	NM_000625	Forward	ACCCAGACTTACCCTTTGG
		Reverse	GCCTGGGGTCTAGGAGAGAC
<i>IL18</i>	NM_000576	Forward	GGCCTCAAGGAAAAGAATC
		Reverse	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA
<i>IL6</i>	NM_000600	Forward	TACCCCGAGGAGAAGATTCC
		Reverse	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT
<i>TNFα</i>	NM_000594	Forward	TCCTTCAGACACCCTCAACC
		Reverse	AGGCCCCAGTTTGAATTCTT
<i>IL10</i>	NM_000572	Forward	GCCTAACATGCTTCGAGATC
		Reverse	TGATGTCTGGGTCTTGGTTC
<i>CCR7</i>	NM_007719.2	Forward	GTGTGCTTCTGCCAAGATGA
		Reverse	CCACGAAGCAGATGACAGAA
<i>MRC1</i>	NM_138806	Forward	GGCGGTGACCTCACAAGTAT
		Reverse	ACGAAGCCATTTGGTAAACG

Gen	Nº de acceso	Dirección	Secuencia (5'→3')
<i>HPRT</i>	NM_001289746	Forward	ACCCACGAAGTGTGGATA
		Reverse	AAGCAGATGGCCACAGAACT
<i>GAPDH</i>	NM_001289746	Forward	CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG
		Reverse	CCAGCAGTGAGGGTCTCTCT

Análisis estadístico

Todos los valores de las figuras y el texto se expresan como las medias aritméticas \pm la desviación estándar (SD). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism versión de software 6.01 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). La significación estadística de las diferencias en cada parámetro se evaluó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de comparación múltiple de Tukey como prueba post hoc. Los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes.



4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de productos de alto valor añadido

Obtención de harina desengrasada y aislado de chía

Siguiendo los métodos descritos en materiales y métodos, en primer lugar, se obtuvo CDF a escala de planta piloto, partiendo de 20 Kg de semillas de chía, se establecieron en laboratorio los parámetros óptimos de obtención de CPI, a partir de CDF, y por último se obtuvo en planta piloto CPI en cantidad suficiente y homogénea, para, a partir de éste, obtener los CPHs y realizar todas las determinaciones. El método elegido para la obtención de CPI es el de extracción en medio alcalino, y posterior precipitación al pH de mínima solubilidad de las proteínas extraídas o pI, ya que, como se comentó en la introducción, es la forma más habitual de obtener aislados proteicos a escala industrial, de aquellas semillas que, como en el caso de la chía, las suma de globulinas y glutelinas representan la fracción mayoritaria de las proteínas presentes, más del 60%, que requieren un pH igual o superior a 11 para poder ser extraídas, obteniéndose un elevado rendimiento y siendo un método fácilmente escalable [2, 54, 43]. Para la aplicación de este método, el primer paso es conocer la solubilidad de las proteínas, presentes en CDF, para así decidir el pH óptimo de extracción proteica y el óptimo de

precipitación de las proteínas extraídas (pI). En la **Figura 7** se muestra la curva de solubilidad de las proteínas de chía y en la **Figura 8**, el esquema de obtención de CPI, así como los rendimientos de extracción y la riqueza proteica de los productos obtenidos.

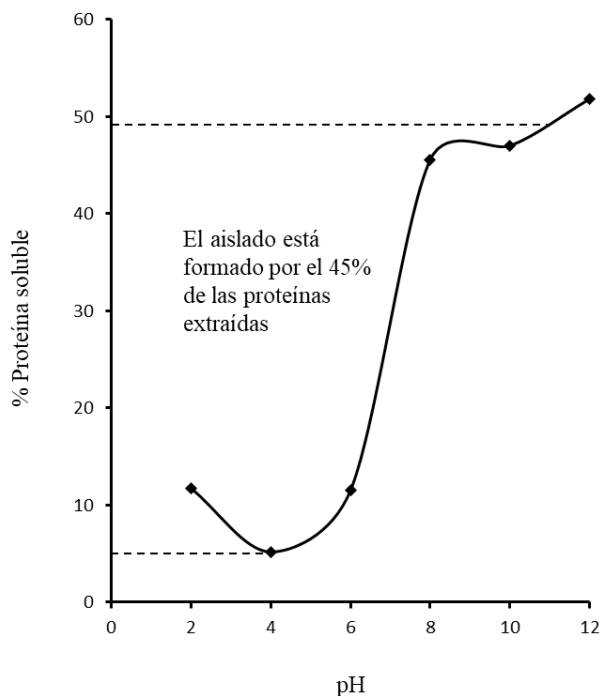


Figura 7. Curva de solubilidad proteica en función del pH de CDF.

Como puede observarse en la **Figura 7**, la solubilidad a pH básico (8-12) es mayor que a pH ácido (6-2). En cuestión de rendimiento del proceso, lo más significativo es la diferencia entre el punto de máxima solubilidad y el de mínima o pI (pH 4.0) ya que, ello va a condicionar el porcentaje de proteína recuperada, tras la precipitación al pI.

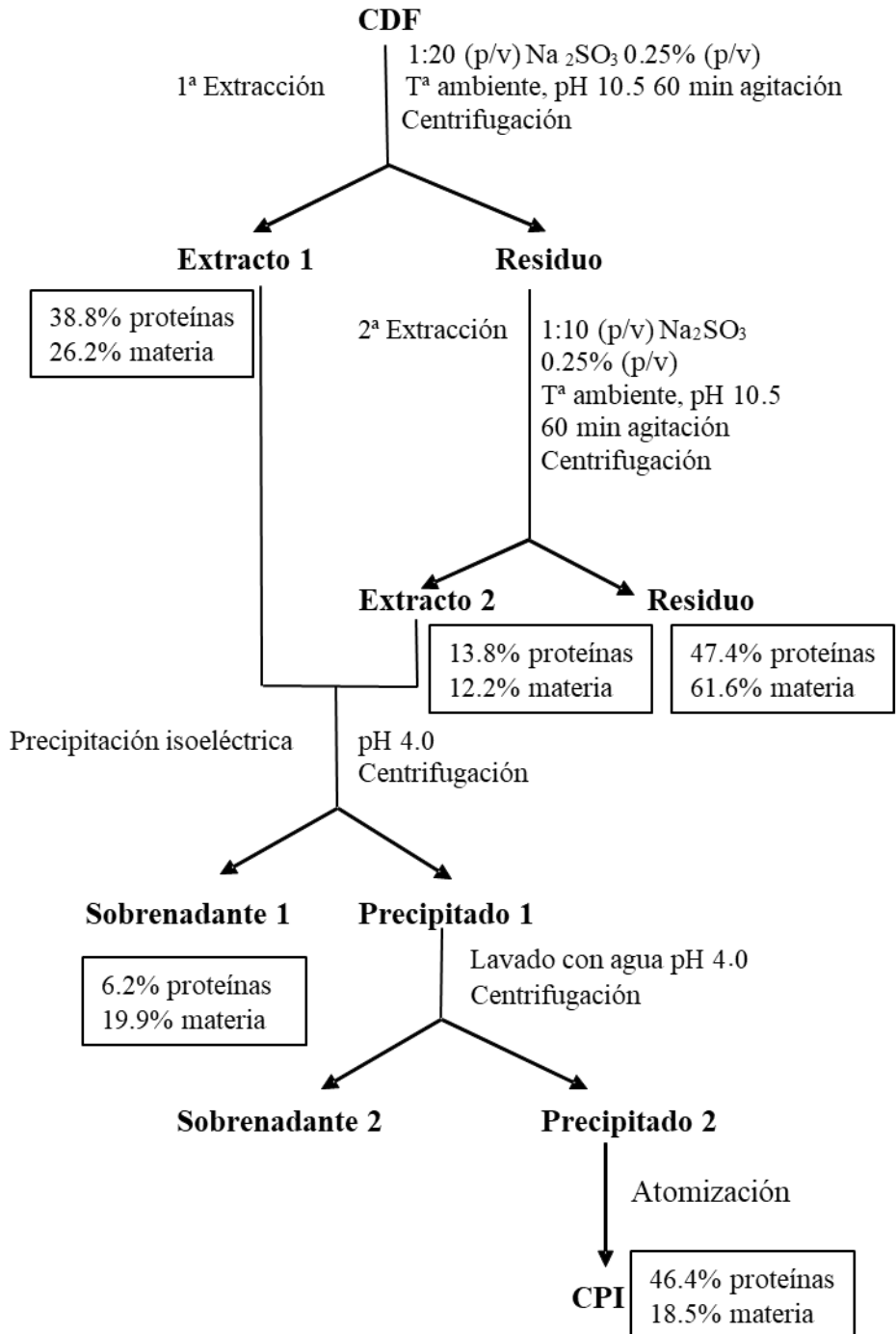


Figura 8. Proceso de obtención de CPI a partir de CDF.

En la primera extracción se obtiene el 38.8% de las proteínas y en la segunda extracción el 13.8%, es decir, se extraen el 52.6% de las proteínas de partida. Respecto al CPI obtenido, se obtiene un rendimiento en peso del 18.5%, resultado similar al obtenido por Timilsena et al. (2016) [55] y un rendimiento en cuanto a recuperación proteica del 46.4%, dato que concuerda con lo reflejado en la curva de solubilidad representada en la Figura 7, y que es muy similar a los rendimientos obtenidos en otros aislados proteicos obtenidos a partir de semillas emergentes, como cáñamo o amaranto [32, 122]. En el residuo quedan el 47.4% de las proteínas de partida, que no se han solubilizado por estar interaccionando con la fibra y carbohidratos existentes. No obstante, dicho residuo es un producto rico en fibra y proteína, apto para la elaboración de piensos para animales.

Obtención de hidrolizados proteicos de chía

CPI, que tiene una riqueza proteica del 82.85%, se utilizó para obtener dos tipos de hidrolizados: unos obtenidos tras la hidrólisis enzimática con Alcalase 2.4 L, endo-peptidasa de alto espectro, no específica, que escinde principalmente a aminoácidos hidrofóbicos [134] y otros con Flavourzyme 1000L, una exopeptidasa inespecífica, es decir, escinde los aminoácidos terminales independientemente del

tipo de aminoácido que se trate De este modo, se obtuvieron cuatro CPH usando Alcalase 2.4 L, designados CPH15A, CPH30A, CPH45A, CPH60A (**Figura 9A**) y ocho usando Flavourzyme 1000L, designados CPH15F, CPH30F, CPH45F, CPH60F, CPH75F, CPH90F, CPH105F y CPH120F (**Figura 9B**), indicando el número el tiempo de hidrólisis, ya sea Alcalase (A) o Flavourzyme (F). En ambos casos, se tomó una muestra inicial, antes de añadir el enzima, que se trata de la misma manera que las demás muestras. Alcalase y Flavourzyme son dos enzimas ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, ya que su óptima actividad hidrolítica se encuentra a un pH, entre 7 y 10 y a una temperatura entre 50 y 70 °C, muy interesante en alimentos manufacturados, para impedir contaminaciones durante el proceso, previniendo el crecimiento bacteriano. Por otra parte, ambas enzimas son totalmente solubles en agua cumpliendo con las especificaciones de la FAO [135] y JECFA [136]. Durante el proceso hidrolítico con Alcalase, se apreció un alto grado de hidrólisis durante los primeros 15 minutos (CPH15A), debido a su acción endoproteasa, alcanzando un HD de 36.2% y una solubilidad del 84.7% a pH 8. A partir de los 15 minutos, el HD de las muestras no sufrió variaciones significativas, alcanzando al final del proceso (CPH60A) un HD del 43.8% y una solubilidad del 97.7% a pH 8. Un valor alto de

solubilidad es importante para permitir el uso de los CPH en formulaciones líquidas, tales como zumos y bebidas energéticas [137]. Durante la hidrólisis con Flavourzyme, el HD experimentó un incremento más gradual, 32.3% a los 15 minutos (CPH15F), 39% a los 60 minutos (CPH60F) y 72.3% a los 120 minutos (CPH120F), debido a su actividad exopeptidasa, que escinde los aminoácidos terminales de las cadenas polipeptídicas. Estos resultados son similares a los observados para otros hidrolizados proteicos realizados a partir de aislados proteicos de trigo y quinoa. [73, 138].

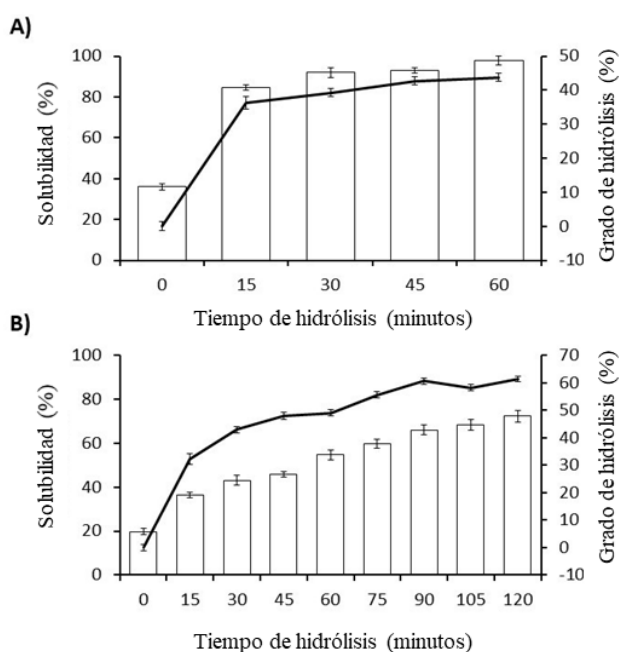


Figura 9. Evolución temporal del grado de hidrólisis y solubilidad de los CPH obtenidos con Alcalase (A) y con Flavourzyme (B). Los datos se expresan como la media \pm SD de al menos tres determinaciones

Elección del hidrolizado con mejores actividades antihipertensivas y antioxidantes

Determinación de la actividad antihipertensiva de los hidrolizados proteicos de chíá

La ACE conduce a un aumento de la presión sanguínea produciendo el péptido vasoconstrictor angiotensina II y degradando el péptido vasodilatador bradiquina. Los inhibidores de la ACE (captopril, benazepril, enalapril, lisinopril, etc.) se utilizan en la terapia contra la hipertensión [139]. Diferentes artículos científicos muestran la existencia de una amplia variedad de proteínas animales y vegetales con actividad inhibidora de la ACE [140]. Como se muestra en la **Tabla 6**, los CPH obtenidos con Alcalase indujeron una actividad inhibidora de la ACE de alrededor del 80% a la concentración de 200 µg/mL. Los CPH mostraron una mayor actividad inhibidora de la ACE en comparación con los obtenidos por los hidrolizados de proteína de gluten de trigo [73], arroz, soja, guisantes o trigo [140].

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los CPH y no fue posible correlacionar la inhibición de la ACE con el tiempo de hidrólisis. Los CPH obtenidos con Flavourzyme mostraron una mayor inhibición de la ACE en comparación con los producidos

por CPI, aunque los valores inhibidores de la ACE (menos del 40%) fueron inferiores a los obtenidos con Alcalase a la misma concentración. Una vez más, no hubo correlación entre la inhibición de la ACE y el tiempo de hidrólisis. Estos resultados son similares a los obtenidos por San Pablo-Osorio, B. et al (2019) [141] para un CPH con un HD del 35% y mejores a los reportados para los hidrolizados de proteínas con Alcalase de *Cicer arietinum* y *reticulatum* [142], que exhibían un HD similar, entorno al 40%, con un IC₅₀ a 60 minutos de 182 µg/mL

Tabla 6. Actividad inhibidora de la ACE (%) de los CPHs a 200 µg/ml. Actividad inhibitoria máxima de la ACE (IC₅₀) de CPH obtenidos usando Alcalase.

Tiempo de hidrólisis (min)	CPH	CPH Alcalase	
	Flavourzyme	Inhibición ACE(%)	IC ₅₀ (µg/mL)
0	15.92 ± 0.27	12.33 ± 0.54	
15	42.19 ± 0.53	82.85 ± 0.42	78.84 ± 1.21
30	36.17 ± 0.83	80.13 ± 0.40	74.63 ± 0.53
45	40.50 ± 0.40	82.16 ± 0.25	67.50 ± 0.44
60	36.66 ± 0.62	82.84 ± 0.13	68.06 ± 0.67
75	28.79 ± 0.74		
90	34.33 ± 0.84		
105	30.36 ± 0.61		
120	31.83 ± 2.04		

Tomando en conjunto los resultados anteriores, los CPH obtenidos con Flavourzyme se descartaron para los siguientes análisis y los CPH obtenidos con Alcalase se probaron en un rango de concentración para calcular la concentración requerida para producir el 50% de inhibición de la ACE (IC50), resultando un IC50 en un rango entre 67.50-78.84 $\mu\text{g/mL}$. En comparación con otros miembros de la familia de la chía, como la albahaca, se han identificado diferentes péptidos con actividad inhibidora de la ACE en semillas de albahaca limón [143]. Por otra parte, el uso de CPH puede mejorar la actividad inhibidora de la ACE observada en tartas sin gluten con un 10-20% de suplementos de harina de semilla de chía cruda [144].

Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de chía

La actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos puede deberse a varios mecanismos [111], por lo que se emplearon tres ensayos, decoloración de β -caroteno (**Figura 10A**), medida del poder reductor (**Figura 10 B**) y medida de la capacidad para secuestrar el radical libre DPPH (**Figura 10 C**). En todos los ensayos se empleó BHT como control positivo. De acuerdo a los resultados de la ACE, se seleccionaron los hidrolizados con Alcalase para realizar los ensayos de actividad antioxidante.

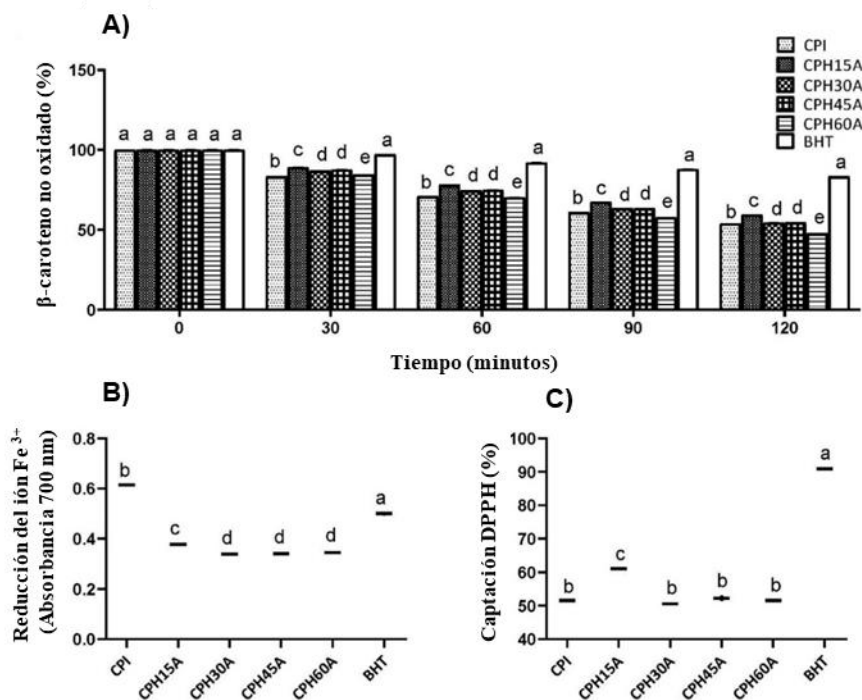


Figura 10. Actividad de β -caroteno no oxidado (A), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) (B) y capacidad para secuestrar el radical DPPH (C) por CPI y CPH obtenidos usando Alcalase en experimentos *in vitro* sin células. Los valores se representan como media \pm SD de tres determinaciones. Las diferencias estadísticas se marcan con letras diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados mostraron que solo CPH15A tuvo una mayor actividad antioxidante en comparación con los obtenidos CPH30A, CPH45A y CPH60A y por tanto fue elegido como el hidrolizado de chíá con mejores propiedades antihipertensivas y antioxidantes, siendo CPH15A el empleado en las siguientes determinaciones. En cuanto al poder antioxidante reductor férrico, CPI mostró la mayor

actividad antioxidante, similar a BHT, probablemente debido a la presencia de otros compuestos no proteicos con actividad antioxidante.

Caracterización de los productos de alto valor añadido

Composición química

Como se aprecia en la **Tabla 7** los componentes mayoritarios de CDF son fibra, con un 50.46% y proteínas, con un 34.95%, datos acordes a los aportados por otros autores [4]. Un alto contenido en proteínas es un parámetro básico para utilizar esta materia prima en la obtención de aislados e hidrolizados proteicos. Dicho contenido en proteínas es algo inferior al de la harina de soja utilizada en todo el mundo para alimentación animal y humana [144], pero similar o superior a otras harinas desengrasadas de semillas utilizadas para la generación de aislados de proteínas como el cáñamo [32] o los guisantes [51].

Tanto aislado como hidrolizado poseen un contenido en fibra del 11%, que proviene de la fibra soluble del mucílago y que no se eliminó antes de desengrasar las semillas. El contenido de cenizas es mayor en el hidrolizado (6.31%) que en el aislado (1.39%), debido al uso de ácido y base para mantener el pH óptimo para la reacción

enzimática, hecho por el cual la riqueza proteica del hidrolizado (75.03%) es menor que la del aislado (82.85%).

Tabla 7. Composición química (g/100 g) de semilla de chía, CDF, CPI y CPH15A.

	Semilla de chía	CDF	CPI	CPH15A
Grasa	39.34±1.34	n.d.	n.d.	n.d.
Humedad	3.68±0.07	6.07±0.07	4.80±0.30	7.32±0.08
Cenizas	4.08±0.05	6.72±0.05	0.13±0.09	6.45±0.17
Proteínas	21.20±0.43	34.95±0.43	82.85±0.11	75.03±0.45
Fibra	30.61±1.98	50.46±1.98	11.01±0.80	11.20±0.70
Azúcares solubles	0.94±0.23	1.54±0.23	n.d.	n.d.
Polifenoles	0.15±0.01	0.26±0.01	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado

Debido al alto contenido en materia grasa de la semilla de chía (39.4%), podría competir con cualquier semilla oleaginosa, en su aprovechamiento de la fracción oleica, a nivel industrial, como el girasol o la colza.

El contenido en los ácidos grasos saturados mayoritarios, ácido palmítico (C_{16:0}) y ácido esteárico (C_{18:0}), representa un 11.01% de la grasa total (6.88 y 4.13%, respectivamente) (**Tabla 8**). De entre

los insaturados, destacan el monoinsaturado ácido oleico (18:1/ ω 9), con un 8.22%, y los PUFAs LA/ ω 6, con un 19.40% y ALA/ ω 3, con un 54.66%, y una relación ω 6/ ω 3 de 0.35, datos que están en concordancia por los publicados por otros autores [37, 146].

Tabla 8. Composición de ácidos grasos de las semillas de chía.

Ácido graso	Contenido (%)
Ácido Palmítico (C16:0)	6.88 \pm 0.30
Ácido Esteárico (C18:0)	4.13 \pm 0.10
Ácido Oleico (ω 9) (C18:1)	8.22 \pm 0.20
Ácido Linoleico (ω 6) (C18:2)	19.40 \pm 0.40
Ácido α -Linolénico (ω 3) (C18:3)	54.66 \pm 0.10
Ácidos grasos minoritarios: Mirístico (C14:0), Palmitoleico (C16:0), Margaricoleico (C17:1), Araquídico (C20:0), Gadoleico (C20:1), Behénico (C21:0), Lignocérico (C24:0)	6.71 \pm 0.00

Los datos expresados en %, son la media \pm la SD de 3 experimentos independientes.

Composición aminoacídica de los productos proteicos de chía

Los análisis de composición de aminoácidos (**Tabla 9**) demostraron que los valores obtenidos para los productos de proteína de chía fueron más altos que los requerimientos de los adultos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud/Universidad de las Naciones Unidas (FAO/WHO/UNU), para los aminoácidos dietéticos esenciales, llegando a duplicar la dosis recomendada en algunos de ellos. Los aminoácidos esenciales predominantes fueron los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y los aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). En este último grupo, los niveles de triptófano de los productos proteicos fueron los que mostraron mayor diferencia con respecto a los requisitos establecidos en la norma, y con respecto a los azufrados, su abundancia es relevante ya que, como se señaló en la introducción, intervienen en la funcionalidad de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas [42]. En cuanto a los aminoácidos no esenciales los mayoritarios son, arginina, que parece proteger contra enfermedades cardiovasculares [46], ácido aspártico, que interviene en la regulación hormonal para un funcionamiento apropiado del sistema nervioso [47] y ácido glutámico, que estimula el sistema

nervioso central y está implicado en su desarrollo inmunológico y aumenta la resistencia atlética [47, 48]. En términos generales, no se observaron diferencias significativas entre CDF, CPI y CPH15A, lo que indica que el proceso de hidrólisis enzimática es un proceso que no daña los aminoácidos ni produce metabolitos secundarios.

Tabla 9. Resumen de la composición de aminoácidos esenciales y no esenciales de los productos proteicos de chía y los requerimientos en aminoácidos esenciales para adultos según FAO/WHO/UNU 2007.

Aminoácidos esenciales	CDF	CPI	CPH15A	FAO/WHO/UNU 2007^{a,b}
Histidina	43.9±1.6	37.9 ± 2.9	39.2 ± 0.5	15
Isoleucina	32.9±0.8	35.2 ± 0.3	35.1 ± 0.0	30
Leucina	67.5±0.7	70.4 ± 4.6	72.2 ± 0.7	59
Lisina	48.0±1.1	46.4 ± 1.4	48.1 ± 0.6	45
Metionina + cisteína	44.9±0.9	40.5 ± 1.9	40.3 ± 1.2	22
Metionina	24.4±0.5	21.9 ± 1.8	21.1 ± 2.1	16
Cisteína	20.5±1.3	18.6 ± 1.9	19.2 ± 0.4	6
Fenilalanina + tirosina	147.3±0.2	136.7 ± 1.9	135.5 ± 1.1	38
Treonina	37.2±1.1	38.4 ± 2.1	38.0 ± 0.3	23
Triptófano	47.3±0.7	48.1 ± 0.6	49.3 ± 0.3	6
Valina	44.8±0.7	46.9 ± 0.9	47.6 ± 0.8	39
Aminoácidos indispensables totales	513.3	500.5	505.3	277

Aminoácidos no esenciales	CDF	CPI	CPH15A	FAO/WHO/UNU 2007 ^{a,b}
Ácido aspártico	90.3 ± 1.0	85.2 ± 1.7	84.5 ± 1.3	
Ácido glutámico	168.6 ± 1.6	176.2 ± 2.7	178.3 ± 1.9	
Serina	78.3 ± 2.0	71.9 ± 1.6	70.2 ± 0.7	
Glicina	48.4 ± 0.8	44.5 ± 2.4	45.0 ± 0.6	
Arginina	98.8 ± 1.5	108.0 ± 2.9	105.3 ± 1.1	
Alanina	47.3 ± 0.4	48.0 ± 1.2	49.1 ± 0.4	
Prolina	24.0 ± 0.3	23.1 ± 1.0	17.6 ± 0.3	
Aminoácidos no indispensables totales	555.7	556.9	550	

Los datos se muestran en mg/g proteína y son expresados como la media ± SD, de 3 determinaciones.

^a FAO/WHO/UNU. Patrón de puntuación en mg/g de requerimiento proteico en adultos.

^b FAO and FINUT 2017. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO Food and Nutrition Paper NO. 92.

Caracterización ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido

El análisis SEM (**Figura 11**) mostró las diferencias morfológicas de la superficie de la muestra de chíá original respecto de la muestra hidrolizada. Se observa que la proteína presente en CDF y CPI ha sido degradada en pequeños fragmentos tras la acción proteolítica de Alcalase, escindiendo varios enlaces peptídicos, y como consecuencia, dando lugar a la reducción del tamaño de partícula bajo los mismos parámetros SEM (Mag = 90x y AV = 2.0 kV / Mag = 345x y AV = 2.0 kV). Estos hallazgos son similares a los cambios informados recientemente en la caracterización ultraestructural de hidrolizados de proteínas obtenidos de kiwicha o músculo de tortuga china, además se correlacionaron con una mayor solubilidad de los hidrolizados [122, 147].

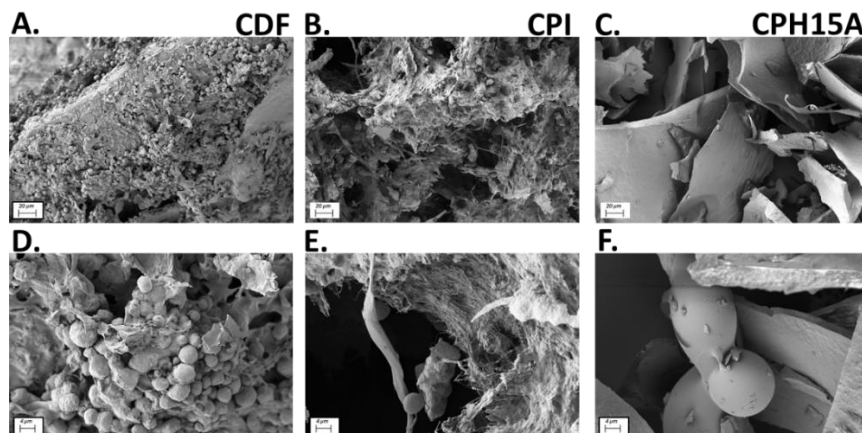


Figura 11. Características superficiales de CDF, CPI y CPH15A por microscopía electrónica de barrido (SEM) a dos aumentos (Mag.). Las imágenes SEM superior (A-C) se tomaron a Mag = 345x y AV = 2.0 kV. Las imágenes SEM inferiores (D-F) a Mag = 1.5 kx y AV = 2.0 kV.

Caracterización del contenido mineral de CPH15A

En la **Tabla 10**, se muestran los resultados del análisis mineral en mg/kg. El elemento que se encontró en mayor cantidad fue el sodio, que se debe al álcali necesario para mantener constante el pH durante el proceso de hidrólisis, así como al contenido intrínseco de chía. El contenido de azufre deriva mayoritariamente de la cantidad de cisteína y metionina cuantificada en el hidrolizado (40.32 mg/g de proteína) [90]. Un contenido mineral equilibrado es importante para tratar la deficiencia en la dieta de éstos en la población, como el contenido de potasio; considerando que también es importante tener en cuenta los niveles máximos tolerables de ingesta de minerales

esenciales, para no dar lugar a un ingrediente nutricionalmente desventajoso.

Kulczynski et al., (2019) [13] revisaron la composición química y el valor nutricional de las semillas de chía, indicando el fósforo (860–919 mg/100 g), calcio (456–631 mg/100 g), potasio (407–726 mg/ 100 g), y el magnesio (335-449 mg/100 g) como los más abundantes. El contenido de minerales no es comparable al del hidrolizado, ya que se obtiene a partir del aislado de proteína, y no a partir de las propias semillas, sin embargo, esta caracterización demuestra que CPH15A aún suministra un contenido variado en minerales, pudiendo ser nutricionalmente interesante para el consumo humano.

Table 10. Contenido mineral de CPH15A por ICP. Los valores están expresados como contenido medio \pm SD ($n=3$)

Elemento	CPH15A (mg/kg)
Calcio	195.65 \pm 0.02
Cobalto	\leq 0.25
Cromo	\leq 0.25
Hierro	46.94 \pm 0.00
Potasio	142.29 \pm 0.02
Magnesio	16.06 \pm 0.00
Manganeso	0.25 \pm 0.00
Sodio	21195.65 \pm 1.98
Niquel	\leq 0.25
Fósforo	1711.96 \pm 0.06
Azufre	12500 \pm 0.20
Selenio	\leq 1.73
Vanadio	\leq 0.25
Zinc	3.71 \pm 0.00

Propiedades funcionales

La inclusión de hidrolizados de proteínas en los alimentos podría otorgarles propiedades nutricionales y funcionales beneficiosas [76, 144]. Los hidrolizados de proteínas vegetales utilizados en alimentación se pueden dividir en dos grandes grupos según su HD. Uno de ellos, los hidrolizados limitados, HD entre 1 y 10%, se utilizan para la mejora de propiedades funcionales, como solubilidad, capacidad emulsificante, capacidad espumante y absorción de agua y aceite [148]. El segundo, los hidrolizados extensivos, HD superiores al 10%, se utilizan para la generación de alimentos especiales, principalmente en la elaboración de alimentos hipoalergénicos y bioactivos. Conocer las propiedades funcionales y biológicas de nuestros productos es sin duda un valor añadido a la hora de diseñar posibles alimentos funcionales y elegir la formulación más idónea donde incluir el ingrediente alimenticio. En este sentido, CPH15A mostró un HD de 36.2%, es decir, se trata de un hidrolizado extensivo del cual no se esperaba que tuviera propiedades funcionales, que tradicionalmente se han relacionado con los hidrolizados que presentan un menor HD. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, CPH15A tenía la particularidad de contener un alto contenido de fibra soluble de mucílago, que tiene propiedades

de retención de agua, emulsificante y estabilizador [150]. Para el estudio de las propiedades funcionales, se decidió trabajar a un pH entre 3 y 5, por ser este el rango de pH al que se encuentran la mayoría de los productos manufacturados, impidiendo su contaminación por agentes patógenos y garantizando la seguridad alimentaria. Concretamente se utilizó un pH 4, al ser éste, el pH al que se encuentran las proteínas en el CPI y ser un valor que no afecta a la solubilidad de CPH15A, que se mantiene en torno al 85% en el rango de pH entre 2 y 12. Se comprobó que CPH15A aumentó la capacidad de absorción de aceite en más de 200 veces en comparación con CPI, (**Figura 12A**), y esto puede afectar la capacidad emulsionante [151]. Las propiedades espumantes de las proteínas son importantes para predecir su funcionalidad en alimentos gaseosos. Como se muestra en la **Figura 12B**, la capacidad espumante del CPH15A, fue mayor que la del CPI, que no llega al 20%, similar a la de otros hidrolizados proteicos de garbanzo [149], y una estabilidad espumante, cercana al 100% a 15, 30 y 60 minutos. Las propiedades emulsionantes de las proteínas alimentarias dependen en gran medida de la fuente de proteínas, la estructura, el peso molecular y el comportamiento de adsorción [152]. Se ha descrito un aumento de la actividad emulsionante como resultado de la hidrólisis de proteínas para

muestras de maíz, lupino, soja, salvado de arroz, calabaza, avena, sésamo, garbanzo, cacahuete, colza y patata [153]. La capacidad emulsionante de CPI (3%) y CPH15A (50%) se muestra en la **Figura 12C**. CPH15A mostró una capacidad emulsionante 16 veces mayor que la de CPI y con una estabilidad de la emulsión superior al 90%, mientras que la emulsión de las proteínas del CPI no fue estable al tratamiento con temperatura. La capacidad y estabilidad emulsificante de CPH15A fue también mayor que la de los hidrolizados limitados de garbanzo mencionados anteriormente [149] Por tanto y aunque la hipótesis de partida, anteriormente expuesta sobre que CPH15A podía expresar propiedades funcionales debido a la presencia de mucílago, la falta de las mismas en CPI, que contiene igual cantidad de mucílago, demostró la influencia en dichas propiedades de la hidrólisis proteica. En definitiva y aunque las proteínas lácteas o de huevo siguen siendo los emulsionantes alimentarios naturales dominantes, la investigación activa sobre el uso de proteínas vegetales, y más concretamente de hidrolizados proteicos, conduciría a la utilización de alternativas de origen vegetal en un futuro próximo [154].

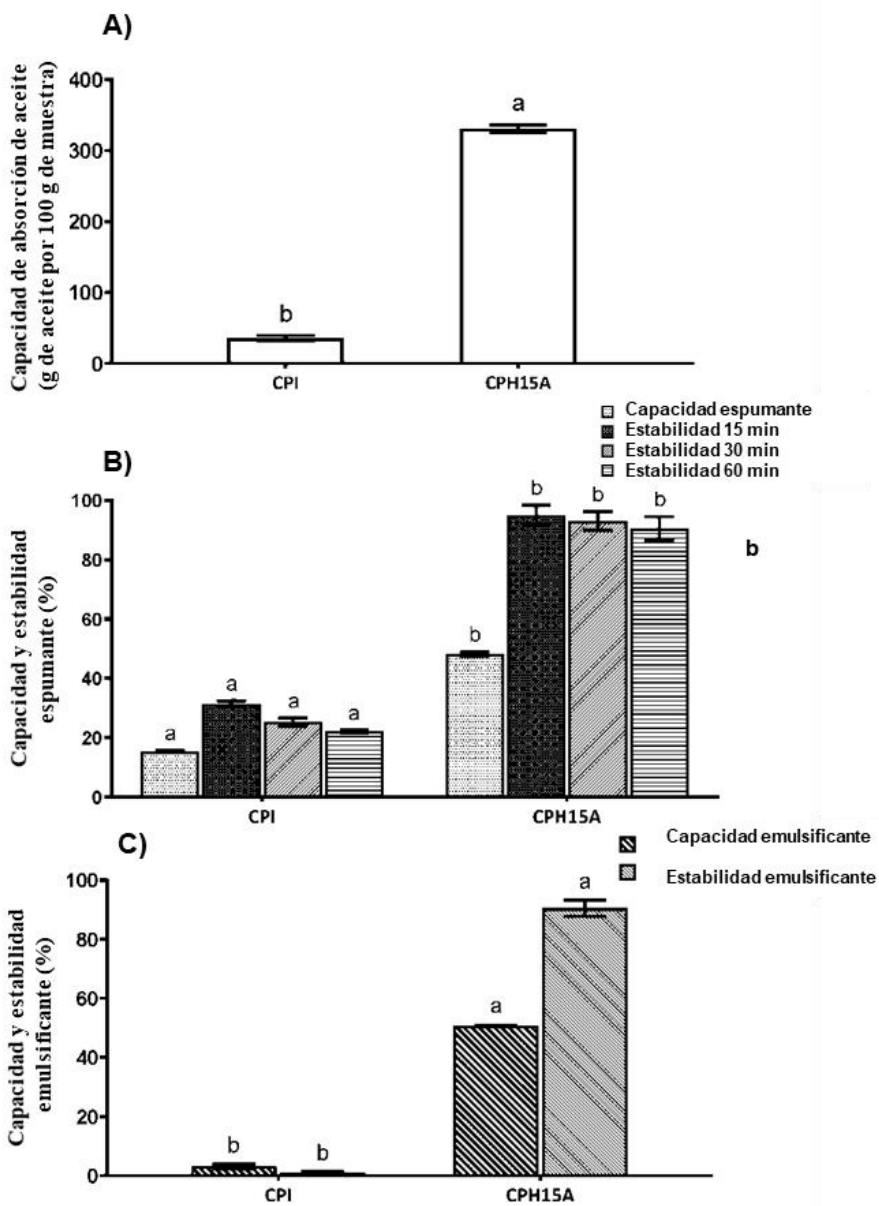


Figure 12. Capacidad de absorción de aceite (A), capacidad y estabilidad espumante (B), y actividad y estabilidad emulsionante (C) de CPI y CPH15A. Los valores se representan como media \pm SD de tres determinaciones. Las diferencias estadísticas se marcan con letras diferentes ($p < 0.05$).

Peptidoma del hidrolizado proteico de chíá

Los péptidos que tienen entre 7 y 8 residuos, aproximadamente 1 kDa, parecen presentar un mayor potencial bioactivo [155, 156], debido a su capacidad para traspasar las membranas celulares y, por tanto, se les considera biodisponibles. El perfil de péptidos liberados después de la hidrólisis enzimática depende principalmente de la especificidad de la proteasa y la duración de la reacción. Como se muestra en la **Figura 13**, el perfil molecular de las proteínas por UHPLC de CPH15A y CPH15A biodisponible obtenido en un sistema celular de absorción intestinal (**Figura 14**) mostró que el tamaño de los péptidos era similar en ambas muestras, entre 3 y 0.2 kDa. Este resultado mostró que la hidrólisis enzimática usando Alcalase produjo una cantidad significativa de péptidos biodisponibles.

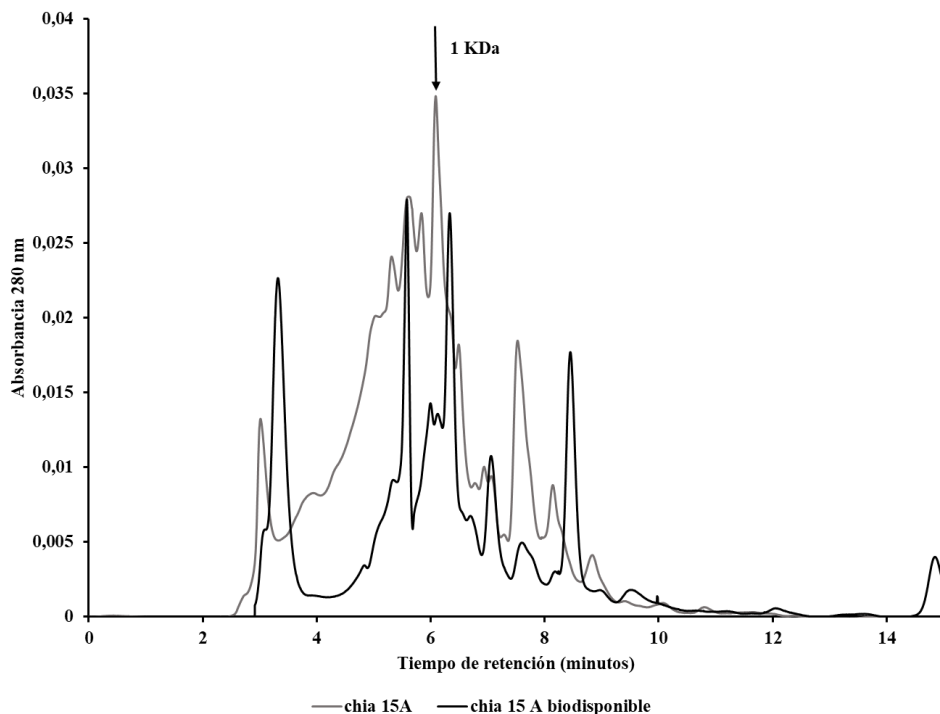


Figura 13. Perfiles de pesos moleculares por UHPLC de CPH15A y CPH15A biodisponible.

Los aminoácidos tienen dos sistemas de nomenclatura, uno clásico de tres letras y uno actual, de una sola letra mayúscula, impuesto en genética molecular e imprescindible para el uso de bases de datos, que permite la representación de la estructura primaria de una proteína mediante la disposición consecutiva de letras sin espacios ni signos intermedios, disponiendo a la izquierda el aminoácido N-terminal y a la derecha el aminoácido C-terminal (Tabla 11).

Tabla 11. Códigos de nomenclatura de aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

El peptidoma de CPH15A se caracterizó completamente por LC-TIMS-MS/MS, calculando la abundancia relativa de cada péptido. En el hidrolizado original se identificaron un total de 1868

péptidos. La longitud promedio de todos los péptidos identificados es de 12 residuos, pero se identificaron secuencias de hasta 26 aminoácidos. La longitud media de los 20 péptidos con mejor espectro de fragmentación ($-10\log P$) fue de 15 residuos, y del total de péptidos identificados, solo el 12% presentaron un peso molecular inferior a 1 kDa.

Aunque la chía no es un sustrato tan estudiado como otras fuentes proteicas habituales como el pescado o la leche [157], Aguilar-Toala et al. [158] identificó cinco péptidos, cuyas secuencias, según la nomenclatura anteriormente citada, son NNVFYPF, FNIVFPG, SRWPIDY, QLQRWFR, GSRFDWTR. En CPH15A se han identificado secuencias, como RNNVFYPPD, RNNVFYPFE y RNNVFYPF similares a NNVFYPF, y otros que se discutirán en las siguientes secciones.

Los péptidos identificados en CPH15A son de mayor peso molecular que los identificados por Aguilar-Toala et al. [158] probablemente debido a que estos autores hidrolizaron las semillas de chía usando hidrólisis enzimática secuencial (Alcalase seguida de Flavourzyme) asistida por microondas y, en consecuencia, se logra un mayor grado de hidrólisis. Dicho lo anterior, se requiere más investigación en bioprocesos para explorar cómo diferentes proteasas

liberarían un perfil diferente de péptidos, desde el mismo sustrato, ya que esto determinará su aplicabilidad como ingrediente funcional.

Péptidos biodisponibles en CPH15A

Para corroborar la biodisponibilidad del CPH15A, se realizó un ensayo de absorción intestinal mediante un sistema celular tipo transwell, compuesto por la línea celular inmortalizada Caco-2, como modelo de barrera. El CPH15A original fue añadido en la zona apical y en la zona basolateral fue recogido el CPH biodisponible (PBS) y se analizó su peptidoma identificando las secuencias idénticas presentes en relación al hidrolizado original (CPH15A).

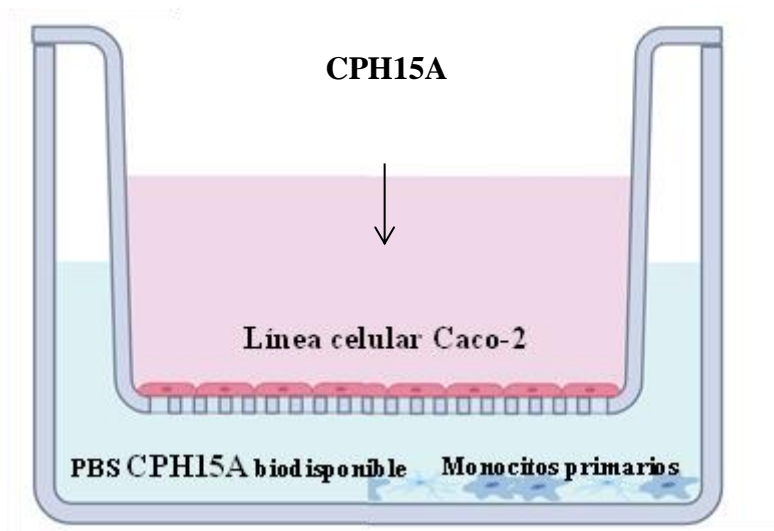


Figura 14. Sistema de absorción intestinal tipo transwell compuesto por la línea celular Caco-2. (Método recogido bajo patente P202230873).

En el hidrolizado biodisponible se identificaron un total de 1182 péptidos, un 63% de los identificados en el hidrolizado original. La longitud media de todos los péptidos identificados es de 10 residuos. Hay que tener en cuenta dos factores al comparar el hidrolizado y el hidrolizado biodisponible:

- Células Caco-2: derivan de un adenocarcinoma colorrectal humano y se han utilizado ampliamente durante más de 30 años como un modelo para el estudio de la absorción, el metabolismo y la toxicidad. Poseen muchas enzimas y proteínas de transporte [159], de forma que, los péptidos que atraviesan estas células probablemente estarían sujetos a algún tipo de modificaciones, principalmente escisión.

- La limitación de la técnica empleada para identificar el peptidoma: los parámetros incluirían los péptidos identificados solo si se encuentran en una cantidad mínima. Sin embargo, esta limitación carece de relevancia ya que, si no se detecta, es probable que su contribución a la bioactividad sea insignificante.

Centrándonos en los péptidos menores a 1 kDa, 81 secuencias se identificaron tanto en el hidrolizado original, antes de la digestión gastrointestinal, como después de someterse a la simulación de absorción en el sistema transwell, por tanto, estas secuencias son capaces de atravesar la barrera intestinal sin sufrir ningún tipo de

modificación, como se ha explicado anteriormente. Por ejemplo, de los tres péptidos similares a NNVFYPF [158], solo dos (RNNVFYPFE y RNNVFYPF) fueron identificados como biodisponibles tras realizar el experimento, mientras que RNNVFYPFD demostró no cruzar la barrera o no ser identificado en una cantidad suficiente, es decir, sería una secuencia no biodisponible a nivel sistémico.

Se ha descrito previamente que la presencia de arginina (R) como aminoácido terminal de las secuencias podría contribuir a una mayor resistencia a la digestión gastrointestinal, ya que las proteasas digestivas son específicas de estos aminoácidos [160]. Esta afirmación está en consonancia con los resultados obtenidos ya que, 12 de los 81 péptidos (15% del total) identificados poseen R en el N-terminal; y 13 de ellos en el C-terminal (16%). Otros péptidos bioactivos de fuentes vegetales como GPETAFLR, aislado a partir de un hidrolizado proteico de *Lupinus angustifolius* L., presentan en su secuencia arginina, pudiendo ser uno de los motivos de su potencial antiinflamatorio [84]. En el hidrolizado biodisponible, el péptido REGADFVR, que no se encuentra como tal en el CPH15A original, posee ambos extremos con arginina. En este sentido, varios estudios han reportado el mantenimiento, pérdida o ganancia de péptidos

después de la simulación gastrointestinal con enzimas como, Alcalase, lo que influye directamente en sus secuencias [160, 161].

Teniendo en cuenta que los péptidos de menor tamaño, identificados en la fracción biodisponible, tienen más probabilidades de ser biológicamente activos, se seleccionaron los 20 con mejor espectro de fragmentación y que presentaban un peso molecular inferior a 1 kDa, y se sometieron a análisis *in silico* para evaluar su potencial bioactivo. De estos 20 péptidos, 6 fueron detectados también en el hidrolizado original, mientras que los otros 14 no. La identificación de péptidos antes y después de ser sometidos a modelos simuladores de absorción intestinal es relevante para evaluar, por un lado, cuales son las secuencias peptídicas responsables de la actividad biológica, y por otro, si los péptidos que ejercen bioactividad se mantienen intactos o sufren modificaciones, dando respuesta a si podría ser necesaria la encapsulación para estabilizar los péptidos como nutraceuticos antes de ser incorporados a una matriz alimentaria [158].

Análisis in silico de los péptidos biodisponibles

En la **Tabla 12**, se muestran las propiedades físico-químicas (es decir, carga neta, pI, hidrofobicidad, impedimento estérico y anfipaticidad), y en la **Tabla 13**, la probabilidad de ser bioactivo y el

resultado de las herramientas de predicción de bioactividad (es decir, poder antioxidante o capacidad para secuestrar radicales libres, capacidad quelante y actividad antihipertensiva) de cada péptido. Por otra parte, y de acuerdo con el resultado del análisis del software ToxinPred, ninguno de los péptidos se prevé tóxico. En cuanto al parámetro físico-químico, y como se esperaba de una hidrólisis enzimática mediada por Alcalase, la hidrofobicidad muestra valores prometedores en la mayoría de los péptidos y, como se muestra en la literatura, se puede correlacionar positivamente con la bioactividad.

Centrándonos en los valores obtenidos por la herramienta bioinformática sobre capacidad antioxidante, las secuencias PNYHPNPR, AGDAHWTY, ALPPGAVHW y VDAHPIKAM, tienen la puntuación más alta de captación de radicales libres, y además, PNYHPNPR y VDAHPIKAM son las que tienen mayor capacidad quelante. Este resultado muestra cuales son los péptidos biodisponibles del CPH15A que podrían contribuir en gran medida a la actividad antioxidante e inmunomoduladora del hidrolizado [162], ya que éste ha demostrado reducir especies reactivas de oxígenos y nitritos y modular la expresión génica y secreción proteica de citoquinas inflamatorias.

Además, en cuanto a la probabilidad de tener actividad biológica, según Mooney et al. [163], una puntuación > 0.5 sugiere firmemente que el péptido es bioactivo, en base a sus características moleculares. Es interesante ver que los péptidos que cumplen con esta característica son los mismos que reportaron altos niveles de capacidad antioxidante según la herramienta AnOxPred, además de la secuencia HQQIGFLK, que a pesar de presentar un valor superior al cohorte de bioactividad establecido, no reporta valores muy elevados de actividad antioxidante en la herramienta empleada. Esto aumenta la evidencia de que estos péptidos podrían ser los responsables de la bioactividad del hidrolizado, pudiendo llegar a los órganos diana *in vivo* ya que han demostrado ser biodisponibles en el modelo celular empleado en esta investigación.

Tabla 12. Caracterización físico-química de las secuencias peptídicas con un peso molecular inferior a 1KDa y mayor valor -10lgP identificadas en hidrolizado de proteína de chía biodisponible (CPH15A) según análisis *in silico*.

Péptido	(-10lgP)	Peso Molecular	Residuos	Hidrofobicidad	Impedimento estérico	Anfipaticidad	Carga	pI
IVDHSQGTM	55.43	986.45	9	-0.06	0.60	0.30	-0.50	5.09
VVDHSQGTM	55.21	972.43	9	-0.08	0.60	0.30	-0.50	5.09
HGPIKLH	52.44	800.47	7	-0.08	0.42	0.94	2.00	9.11
AGDAHWTY	51.82	919.38	8	-0.03	0.53	0.18	-0.50	5.09
TNAPRLTF	49.87	918.49	8	-0.18	0.58	0.31	1.00	10.11
KNLDHPTSA	48.76	981.49	9	-0.29	0.52	0.57	0.50	7.09
VDAHPIKAM	47.92	980.51	9	-0.03	0.56	0.57	0.50	7.09
FSEDNVKVG	47.77	993.48	9	-0.17	0.69	0.55	-1.00	4.38
YTNAPRLT	47.67	934.49	8	-0.25	0.58	0.31	1.00	9.10
PNYHPNPR	46.79	993.48	8	-0.45	0.50	0.49	1.50	9.10
AEKGTLPN	45.33	975.50	9	-0.12	0.60	0.55	0.00	6.35

Péptido	(-10lgP)	Peso Molecular	Residuos	Hidrofobicidad	Impedimento estérico	Amfipaticidad	Carga	pI
SHKLPILN	44.14	920.54	8	-0.09	0.51	0.64	1.50	9.11
KQGDVIAIR	43.37	998.59	9	-0.21	0.68	0.82	1.00	9.10
HQQIGFLK	42.94	969.54	8	-0.11	0.58	0.95	1.50	9.11
VKEPVFSF	42.61	951.51	8	0.03	0.63	0.62	0.00	6.35
YTNAPRL	41.75	833.44	7	-0.26	0.58	0.35	1.00	9.10
ALPPGAVHW	41.33	946.50	9	0.17	0.46	0.16	0.50	7.10
NDGDAPLTY	41.26	964.41	9	-0.15	0.62	0.00	-2.00	3.57
HRQPQLN	40.06	891.47	7	-0.53	0.53	0.91	1.50	10.11
DAREPSYR	39.62	992.47	8	-0.61	0.61	0.77	0.00	6.42

La carga neta a pH neutro de los péptidos se calculó a través de <http://pepcalc.com/>. La solubilidad del péptido en agua pura se estimó en este servidor web en función del resultado combinado del punto isoeléctrico (pI), el número de residuos cargados y la longitud del péptido. La hidrofobicidad, el impedimento estérico y la anfipaticidad se cálculo a través de <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php/>

Tabla 13. Predicción de la bioactividad (es decir, capacidad para secuestrar radicales libres, capacidad quelante y propiedad antihipertensiva) de las secuencias peptídicas con un peso molecular inferior a 1kDa y mayor valor -10lgP identificadas en hidrolizado de proteína de chía biodisponible (CPH15A) según análisis *in silico*.

Péptido	(-10lgP)	Probabilidad de ser bioactivo	Puntuación de captador de radicales libres	Puntuación de quelación	mAHTPred
IVDHSGQTM	55.43	0.163	0.411	0.267	0.13
VVDHSGQTM	55.21	0.133	0.442	0.257	0.10
HGPIKLH	52.44	0.450	0.420	0.251	0.27
AGDAHWTY	51.82	0.605	0.532	0.217	0.11
TNAPRLTF	49.87	0.499	0.358	0.229	0.23
KNLDHPTSA	48.76	0.157	0.403	0.258	0.24
VDAHPIKAM	47.92	0.517	0.451	0.280	0.51
FSEDNVKVG	47.77	0.256	0.327	0.200	0.09
YTNAPRLT	47.67	0.473	0.392	0.212	0.18
PNYHPNPR	46.79	0.751	0.603	0.283	0.85
AEKGTLPN	45.33	0.392	0.377	0.211	0.15

Péptido	(-10lgP)	Probabilidad de ser bioactivo	Puntuación de captador de radicales libres	Puntuación de quelación	mAHTPred
SHKLPILN	44.14	0.440	0.356	0.267	0.54
KQGDVIAIR	43.37	0.238	0.271	0.180	0.11
HQQIGFLK	42.94	0.547	0.386	0.234	0.10
VKEPVFSF	42.61	0.442	0.354	0.204	0.75
YTNAPRL	41.75	0.297	0.421	0.223	0.76
ALPPGAVHW	41.33	0.656	0.471	0.257	0.83
NDGDAPLTY	41.26	0.382	0.384	0.241	0.12
HRQPQLN	40.06	0.301	0.406	0.266	0.36
DAREPSYR	39.62	0.310	0.410	0.249	0.17

La probabilidad de que los péptidos sean bioactivos fue evaluada por PeptideRanker (<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb>), un servidor para predecir péptidos bioactivos basado en una nueva red neuronal N a 1, otorgando puntuaciones que oscilan desde 0 a 1. La puntuación más alta indica la mayor probabilidad de que el péptido fuera bioactivo. La herramienta AnOxPePred (<http://services.bioinformatics.dtu.dk/service.php?AnOxPePred-1.0>) utiliza el aprendizaje profundo para predecir las propiedades antioxidantes (cuantificadas por la captación de radicales libres y la capacidad de quelación de iones) de los péptidos al otorgar puntuaciones que van desde 0 a 1. mAHTPred se usó para predecir la capacidad antihipertensiva de los péptidos utilizando una representación de características efectiva (<http://thegleelab.org/mAHTPred/idex.html>). Las puntuaciones asignadas oscilaron entre 0 y 1.0 con un umbral de 0.5.

Con base en las características físico-químicas de los péptidos individuales, se ha sugerido que valores bajos de impedimento estérico y alta anfipaticidad podrían contribuir a aumentar la bioactividad, ya que ayuda a estabilizar la interacción del péptido con el compuesto objetivo [164, 165]. Los péptidos con mayor anfipaticidad fueron HGPIKLH, HQQIGFLK y HRQPQLN, los cuales también muestran valores adecuados en las demás herramientas de predicción empleadas y, en consecuencia, también podrían considerarse péptidos bioactivos de CPH15A

León-Madrado y Segura Campos [87] realizaron una predicción *in silico* de péptidos antimicrobianos, antibiofilm y antioxidantes de chía e indicaron, en términos de capacidad antioxidante, que el fragmento LK es biológicamente relevante. Este fragmento se encontró en el péptido HQQIGFLK en el hidrolizado obtenido, el cual fue reportado como bioactivo según la herramienta de predicción antes mencionada. De manera similar, Grancieri, M. et al. [166] llevó a cabo el acoplamiento molecular con muchos péptidos derivados de la chía (por ejemplo, TGPSPTAGP, PAPGGGTH, SPKDLALPPGALPPV y HYGGPPGG) para dilucidar su capacidad de quelación de metales o donante de hidrógeno/electrones, así como su potencial interacción con marcadores de inflamación y

aterosclerosis. Aunque estos péptidos no se identificaron en nuestro hidrolizado, si se encontraron algunas secuencias coincidentes, siendo la más extensa ALPPGA, que aparece en SPKDLALPPGALPPV, de los péptidos de Grancieri, M. et al. y en **ALPPGAVHW** de CPH15A biodisponible, lo que demuestra que los péptidos que conforman las proteínas de chíá son una fuente prometedora de péptidos bioactivos. Un péptido puede ejercer actividad antioxidante de acuerdo a los residuos en su secuencia, al interactuar los grupos funcionales de estos aminoácidos con las especies reactivas de oxígeno y contrarrestar su efecto. Se ha propuesto que la presencia de valina (V) en el C-terminal (el extremo derecho) o tener tirosina (Y) en cualquiera de los extremos está relacionado con mayores propiedades antioxidantes [167]. Estas características están presentes en AGDAHWTY, YTNAPRL, YTNAPRLT y NDGDAPLTY de hecho, el primero se propone como altamente antioxidantes según las herramientas y el resto muestran una puntuación antioxidante en torno a 0.4. En la misma línea, la metionina (M) y la histidina (H) se consideran contribuyentes clave en la respuesta al estrés oxidativo, debido a su propiedad depuradora de especies reactivas de oxígeno. Estos aminoácidos también se encuentran en algunos de los péptidos identificados, considerados altamente antioxidantes como,

PNYHPNPR, ALPPGAVHW o VDAHPIKAM, y algunos otros, que, aunque no se prevén tan altamente antioxidantes, podrían agregar actividad, aunque ésta sea en menor medida.

Es realmente interesante ver la correlación de estos resultados con los resultados de la predicción de péptidos antihipertensivos. Los autores de la herramienta de predicción describen un umbral de 0.5 y, en consecuencia, las siguientes secuencias podrían considerarse antihipertensivas: VDAHPIKAM, PNYHPNPR, SHKLPILN, VKEPVFSF, YTNAPRL y ALPPGAVHW, que es un 30% de los 20 péptidos seleccionados. Entre ellos, los más activos como antihipertensivos serían PNYHPNPR y ALPPGAVHW, los cuales también fueron algunos de los péptidos con mayor actividad antioxidante. Estos dos péptidos se encontraron en el hidrolizado antes y después de someterse al ensayo de biodisponibilidad, lo que indica su resistencia a las condiciones de absorción y sugiere su potencial para llegar al torrente sanguíneo y ejercer su bioactividad en los órganos diana. La multifuncionalidad de los péptidos obtenidos de Alcalase ya ha sido descrita para chía [88], así como para otros sustratos como insectos [168], e implica un incremento del valor de los hidrolizados proteicos fabricados. De hecho, se ha informado que los péptidos antihipertensivos generalmente están relacionados con la

presencia de ciertos aminoácidos, que incluyen prolina (P), fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W) en el extremo C-terminal (extremo derecho); y valina (V), leucina (L) o isoleucina (I) en el N-terminal (extremo izquierdo) [169]. El potencial bioactivo de los péptidos de chía descrito por Aguilar-Toalá, J. E. et al. [88], reveló que las siguientes secuencias tenían la puntuación de energía más baja para ACE, lo que sugiere su actividad antihipertensiva: NNVFYPF, FNIVFPG, SRPWPIDY, QLQRWFR, GSRFDWTR, DFKF, DLRF, FKAF, FRSF y QFRF. Se pueden encontrar algunas similitudes entre este grupo de péptidos y los identificados en CPH15A. Por ejemplo, el terminal SF del péptido FRSF también se encuentra en el descrito como altamente antihipertensivo VKEPVFSF; así como el motivo VF de FNIVFPG; aumentando la evidencia de que esta secuencia tiene una alta participación en la actividad biológica descrita para el hidrolizado [162], o en la misma línea, el motivo PG se puede encontrar en la secuencia ALPPGAVHW, con un valor en la herramienta de 0.83.

En cuanto al punto isoeléctrico de los péptidos, se ha descrito que valores bajos se asocian con una mayor actividad antioxidante, aunque no se observó una correlación evidente entre este parámetro y las propiedades antihipertensivas de los péptidos en estudio [170].

Entre los cuatro péptidos con mayor potencial antioxidante, la secuencia AGDAHWTY tiene el punto isoeléctrico más bajo, mientras que ALPPGAVHW es la que tiene el impedimento estérico más bajo. Aunque la verificación de la bioactividad debería realizarse empleando péptidos sintéticos, estos análisis muestran el potencial de las herramientas *in silico* en la caracterización de péptidos bioactivos de una forma económica y rápida [171]. El punto isoeléctrico y la anfipaticidad de los péptidos también son importantes, por ejemplo, al considerar su potencial antioxidante si se usan en una emulsión, ya que pueden estar en la interfaz entre el aceite y el agua, estabilizándola [172].

Teniendo en cuenta todos los parámetros discutidos, los péptidos AGDAHWTY y VDAHPIKAM, dos de los más abundantes, muestran resultados prometedores en términos de actividad biológica potencial. Sin embargo, estos péptidos no se identificaron en el hidrolizado original. Esto implica que estos péptidos se liberan del hidrolizado debido a la actividad de las células y su concentración ha aumentado tanto, que es cuantificable en la fracción biodisponible, mediante la metodología usada. Además de estos dos, PNYHPNPR y ALPPGAVHW también se proponen como péptidos abundantes en CPH15A, que ejercen altas propiedades antioxidantes y

antihipertensivas, y en este caso si están presentes en el hidrolizado original, como ya se discutió con anterioridad.

Más allá de estos factores relacionados con la estructura primaria de los péptidos, la comprensión de la estructura secundaria de los péptidos, también proporciona una idea de cómo definir los péptidos bioactivos y su papel en la progresión de enfermedades, ya que puede interferir en su capacidad para interactuar con otras proteínas y células [130, 173]. Por ello, el estudio de la propensión a la agregación de péptidos es un aspecto importante en el desarrollo farmacéutico de fármacos peptídicos [174].

Según lo calculado por el servidor PASTA 2.0 (**Tabla 14**), 19 de 20 secuencias peptídicas (95% en cantidad) derivadas de CPH15A tenían la probabilidad máxima de generar una espiral aleatoria sin ninguna contribución ni a la hélice α ni a la cadena β , y solo 1 (KQGDVIAIR), de las 20 secuencias (5% en cantidad), permitió la formación de cadena β en simulación.

Tabla 14. Predicción de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas con un peso molecular inferior a 1 kDa y mayor valor -10lgP identificadas en hidrolizado de proteína de chíá biodisponible (CPH15A) según análisis *in silico*.

Péptido	(-10lgP)	Región propensa a la autoagregación y amiloides	Probabilidad de desorden (%)	Probabilidad en estructura secundaria (%)		
				Hélice- α	Cadena- β	Espiral aleatoria
IVDHSGQTM	55.43	1-4 (NI)	100	-	-	100
VVDHSGQTM	55.21	1-4 (NI)	100	-	-	100
HGPIKLH	52.44	4-7 (NI)	100	-	-	100
AGDAHWTY	51.82	4-8 (NI)	100	-	-	100
TNAPRLTF	49.87	5-8 (NI)	100	-	-	100
KNLDHPTSA	48.76	2-5 (NI)	100	-	-	100
VDAHPIKAM	47.92	1-4 (NI)	100	-	-	100
FSEDNVKVG	47.77	5-8 (NI)	100	-	-	100
YTNAPRLT	47.67	1-4 (NI)	100	-	-	100
PNYHPNPR	46.79	2-5 (NI)	100	-	-	100
AEKGTLPN	45.33	4-7 (NI)	100	-	-	100
SHKLPILN	44.14	4-7 (NI)	100	-	-	100

Péptido	Abundancia rel. (-10lgP)	Región propensa a la autoagregación y amiloides	Probabilidad de desorden (%)	Probabilidad en estructura secundaria (%)		
				Hélice- α	Cadena- β	Espiral aleatoria
HQGDVIAIR	43.37	5-8 (PA)	100	-	-	100
HQIGFLK	42.94	4-7 (NI)	100	-	44.44	55.56
VKEPVFSF	42.61	5-8 (NI)	100	-	-	100
YTNAPRL	41.75	1-4 (NI)	100	-	-	100
ALPPGAVHW	41.33	6-9 (NI)	100	-	-	100
NDGDAPLTY	41.26	6-9 (NI)	100	-	-	100
HRQPQLN	40.06	1-4 (NI)	100	-	-	100
DAREPSYR	39.62	4-8 (NI)	100	-	-	100

Para calcular la tendencia de autoagregación de péptidos específica de la posible región en la secuencia (con el número registrado comenzando desde el extremo N) se utilizó el servidor web PASTA 2.0 (<http://protein.bio.unipd.it/pasta2/>). Para la discriminación de péptidos, los umbrales óptimos se cambiaron como Superior = 1 y Energía < - 5 PEU (1 PEU (unidad de energía de pasta) = 1.192 kcal/mol). NI: no se predijo amiloide; PA: agregación paralela calculada. También se calculó la probabilidad de desorden intrínseco y la porción de estructura secundaria estimada que complementan los datos de agregación.

En general, a través del cálculo realizado, los amiloides y la autoagregación no se vieron sustancialmente favorecidos por estos monómeros peptídicos de interés, independientemente de su hidrofobicidad. Los amiloides son una clase de proteína con propiedades únicas de autoagregación, y su acumulación aberrante puede conducir a disfunciones celulares asociadas con numerosas enfermedades por lo que la identificación y caracterización de las especies moleculares críticas para la formación de amiloide han sido objeto de un intenso escrutinio [175].

Según la revisión bibliográfica realizada, los péptidos aquí identificados propuestos como péptidos antioxidantes y antihipertensivos derivados de un CPH obtenido con Alcalase no han sido identificados previamente, lo que demuestra que, en el campo de la investigación de los péptidos bioactivos, aún queda mucho camino por recorrer.

Con el objetivo de caracterizar claramente el efecto de CPH15A a nivel sistémico, y poder determinar su potencial como ingrediente destinado a una nutrición de precisión, verificando el efecto *in vitro* de dicho hidrolizado, es necesario, llegados a este punto, esclarecer cuales son los efectos del hidrolizado metabolizado a nivel intestinal, evaluando su efecto a nivel celular y molecular, de

modo que se pueda sugerir de un modo más directo su potencial efecto como ingrediente funcional.

Funcionalidad *in vitro* sobre el estado oxidativo e inflamatorio en monocitos primarios humanos

Efecto del hidrolizado de chía sobre el estrés oxidativo en monocitos primarios humanos

Los monocitos son células esenciales en el desarrollo y la perpetuación del estado inflamatorio, que exhiben diferentes fenotipos de acuerdo con la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16 [176]. El fenotipo principal de los monocitos circulantes pertenece al CD14⁺⁺CD16⁻ y los monocitos restantes, descritos como intermedios (escasamente estudiados) o no clásicos (que darán lugar a los macrófagos M2), se corresponden con un fenotipo CD14⁺⁺CD16⁺ y CD14⁺CD16⁺⁺, respectivamente [177]. En respuesta a un estímulo inflamatorio, como por ejemplo el LPS, los monocitos clásicos acuden, en primera instancia, a los sitios de inflamación, produciendo citoquinas proinflamatorias y contribuyendo a la inflamación local y sistémica [72, 84]. Estos monocitos son altamente invasivos y pueden diferenciarse en macrófagos inflamatorios M1, actuando en la fase aguda de la inflamación. En estado estable, los monocitos no clásicos acuden al

endotelio vascular y se convierten en macrófagos residentes al infiltrarse en el tejido inflamado. Durante la fase tardía de la inflamación, los monocitos no clásicos diferenciados (formalmente macrófagos M2) adquieren un fenotipo antiinflamatorio, que contribuye a la parada de los leucocitos activados y a la reparación de los tejidos dañados [178, 179].

Antes de proceder a los ensayos con células, se verificó la viabilidad celular. El tratamiento durante 24 h con CPH15A hasta dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$, no tuvo efecto citotóxico en los monocitos primarios humanos (**Figura 14A**). Teniendo en cuenta el ensayo MTT, las dosis de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de CPH fueron las elegidas para los ensayos de actividad antioxidante y antiinflamatoria. El LPS aumentó significativamente tanto las ROS intracelulares (**Figura 14B**) como los nitritos (**Figura 14C**), en comparación con las células no estimuladas. La producción de ROS y nitritos en presencia de CPH15A fue significativamente menor que el control estimulado con LPS. Además, el LPS estimuló la expresión génica de iNOS en comparación con las células no estimuladas (**Figura 14D**). CPH15A disminuyó la expresión de iNOS en monocitos primarios humanos estimulados con LPS. Nuestras observaciones sugieren que la inhibición de la expresión de iNOS inducida por LPS podría ser uno

de los mecanismos por los cuales CPH15A disminuye el estrés oxidativo en monocitos humanos primarios. Los efectos son clínicamente relevantes, ya que el estrés oxidativo agudo y crónico por sobreproducción de ROS y NO en monocitos, puede acelerar la captura de macrófagos por infiltración en tejidos dañados donde se someten a apoptosis, dando lugar a diversas enfermedades inflamatorias [166].

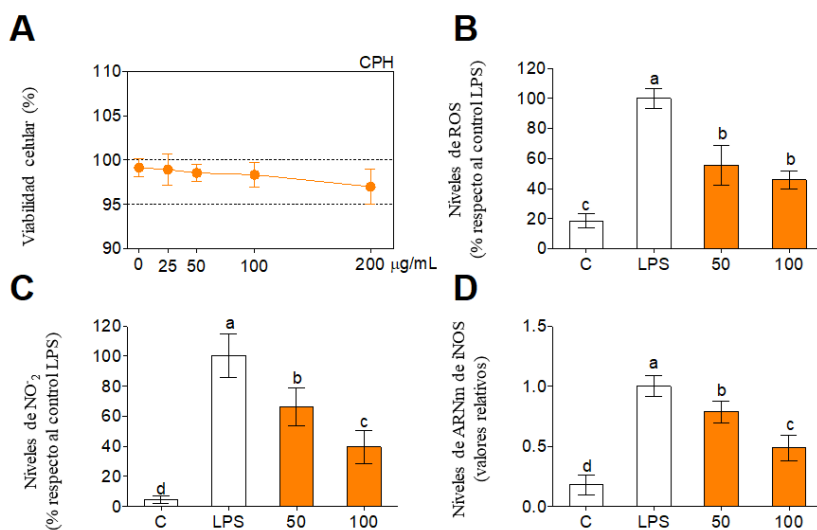


Figura 14. Viabilidad celular (A), producción de ROS (B) y nitritos (C) expresado como porcentaje de fluorescencia/absorbancia, y niveles de ARNm de iNOS (D) relativos a células estimuladas con LPS (100 ng/mL), después del tratamiento con CPH15A a 50 y 100 µg/mL durante 24 h en monocitos primarios humanos. Los valores se presentan como la media ± SD (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Efecto del hidrolizado de chía sobre la liberación de citoquinas inflamatorias en monocitos primarios humanos

Con el fin de determinar los posibles efectos antiinflamatorios del CPH15A en monocitos primarios humanos, se estudió la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α y de la IL-10, una citoquina antiinflamatoria. Como se muestra en la **Figura 15**, el LPS aumentó significativamente la producción de IL-1 β (**Figura 15A**), IL-6 (**Figura 15B**) y TNF α (**Figura 15C**) respecto a las células no estimuladas. El aumento de la producción proteica fue reducido en presencia de CPH15A. De forma contraria, el LPS disminuyó de forma significativa la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (**Figura 15D**), observándose que CPH15A a 100 μ g/mL aumentó la producción de IL-10 a niveles del control sin estimular.

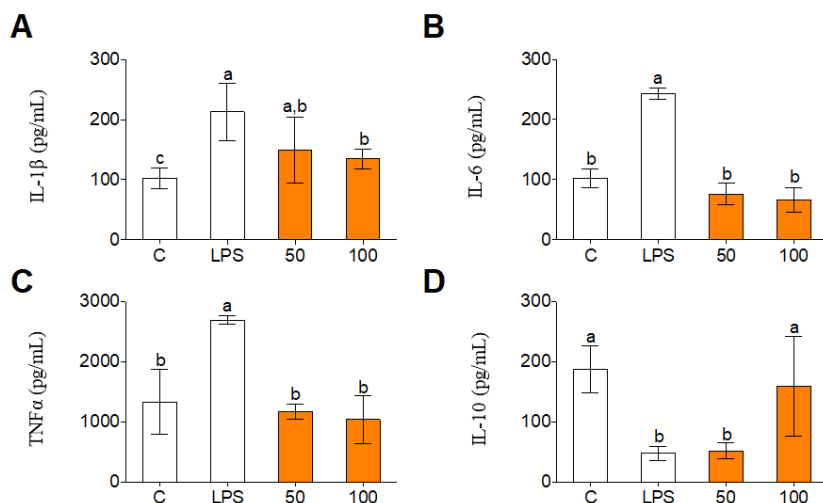


Figura 15. Liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF α (C) y antiinflamatoria IL-10 (D) en monocitos primarios humanos estimulados con LPS (100 ng/mL), después del tratamiento con CPH15A a 50 y 100 μ g/mL durante 24 h. Los valores se presentan como la media \pm SD (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Efecto del hidrolizado de chía sobre la expresión génica de mediadores inflamatorios en monocitos primarios humanos

En línea con los resultados obtenidos en la liberación de citoquinas, se observó que la estimulación con LPS aumentó la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β (Figura 16A), la IL-6 (Figura 16B) y el TNF α (Figura 16C) y disminuyó la expresión génica de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Figura 16D). En todos estos casos, CPH15A disminuyó

significativamente los niveles de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TNF α y aumentó los de IL-10. Por tanto, CPH15A revirtió el estado proinflamatorio inducido por LPS en monocitos primarios humanos, probablemente actuando a nivel del factor de transcripción NF- κ B, aunque los mecanismos moleculares por el cual actúa CPH15A deberán ser estudiados en futuros ensayos.

Este balance de citoquinas en monocitos primarios humanos se ha relacionado con la aparición y desarrollo de enfermedades cardiovasculares, debido al desarrollo del proceso aterosclerótico [166]. Además, el curso de la inflamación crónica con liberación de citoquinas proinflamatorias, se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad y la enfermedad del hígado graso [180, 181].

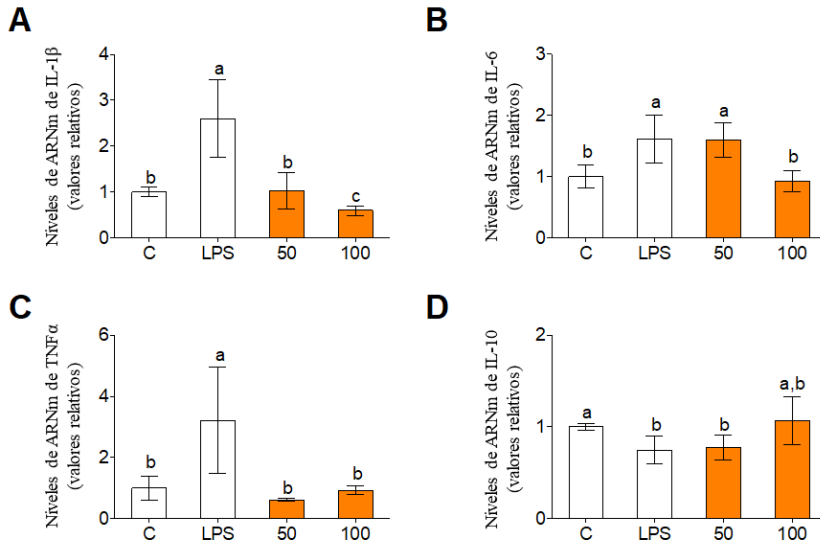


Figura 16. Expresión génica de citoquinas proinflamatorias IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF α (C) y antiinflamatoria IL-10 (D) en monocitos primarios humanos estimulados con LPS (100 ng/mL), después del tratamiento con CPH a 50 y 100 μ g/mL durante 24 h. Los valores se presentan como la media \pm SD (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Efecto del hidrolizado de chía sobre la polarización de macrófagos

Una vez estudiado el efecto de CPH15A en monocitos humanos, se estudió el efecto en la polarización de macrófagos, que depende de diferentes microambientes y señales que promueven fenotipos específicos. Los macrófagos proinflamatorios M1 se forman bajo la influencia de LPS y/o IFN γ , mientras que M2 por exposición a IL-4. Una posible estrategia para controlar la inflamación sería la modulación de la plasticidad de los macrófagos

La expresión relativa de CCR7 (marcador de M1) y MRC1 (marcador de M2) se midió mediante RT-qPCR (**Figura 17**). Los macrófagos M0 se incubaron con LPS más IFN γ (M1), IL-4 (M2) ó LPS más IFN γ más CPH15A a 50 y 100 μ g/mL (M1+50 y M1+100, respectivamente). Los macrófagos M1 mostraron un aumento en los niveles de ARNm de CCR7 (**Figura 17A**) y una disminución en los niveles de ARNm de MRC1 (**Figura 17B**). Los macrófagos M1 tratados con CPH15A disminuyeron los niveles de ARNm de CCR7 mientras que aumentó los niveles de ARNm de MRC1 en comparación con los macrófagos M1 control.

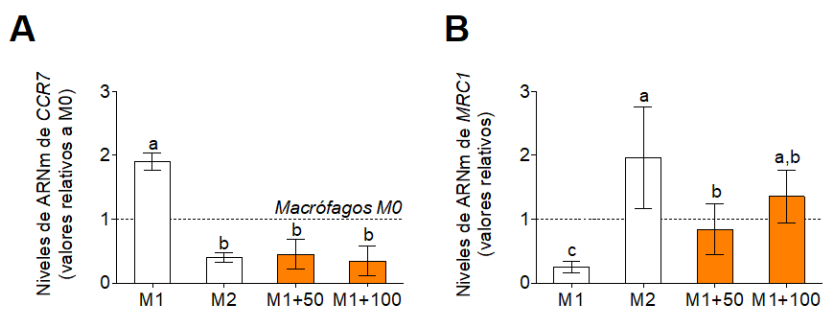


Figura 17. Expresión génica de los marcadores de polarización CCR7, marcador de macrófagos M1 (**A**) y MRC1, marcador de macrófagos M2 (**B**). Los macrófagos M0 fueron incubados con LPS más IFN γ (M1 control), IL-4 (M2 control), o con LPS más IFN γ más CPH (50 y 100 μ g/mL, M1+50 y M1+100, respectivamente) durante 24 h. Los valores se presentan como la media \pm SD (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Por último, para corroborar los resultados en polarización, se estudió la expresión génica y la producción de citoquinas características de M1, como el TNF α y características de M2, como la IL-10 (**Figura 18**). Los macrófagos M1 mostraron un aumento en los niveles de ARNm y liberación de TNF α (**Figura 18A y 18B**, respectivamente) y una disminución en los niveles de ARNm y liberación de IL-10 (**Figura 18C y 18D**, respectivamente). Los macrófagos M1 tratados con CPH15A disminuyeron los niveles de ARNm y liberación de TNF α mientras que aumentó los niveles de ARNm y liberación de IL-10 en comparación con los macrófagos M1 control.

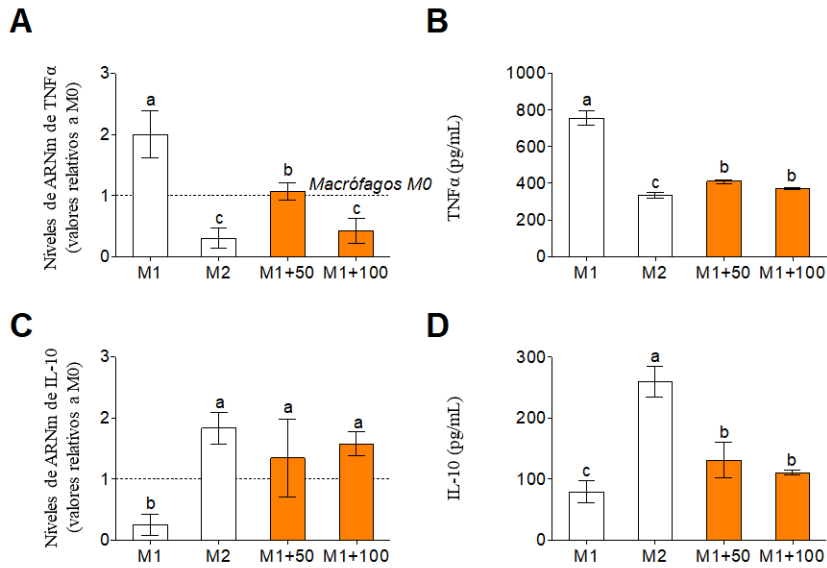
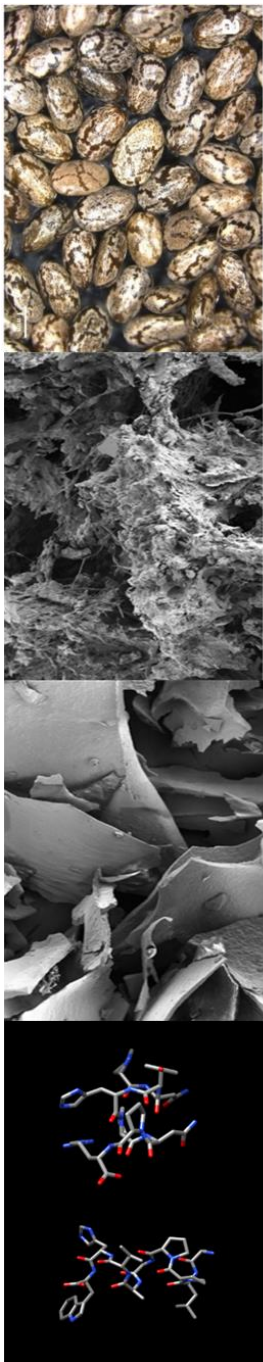


Figura 18. Expresión génica y liberación de citoquinas características de M1, como el TNF α (**A** y **B**, respectivamente) y características de M2, como la IL-10 (**C** y **D**, respectivamente). Los macrófagos M0 fueron incubados con LPS más IFN γ (M1 control), IL-4 (M2 control), o con LPS más IFN γ más CPH (50 y 100 μ g/mL, M1+50 y M1+100, respectivamente) durante 24 h. Los valores se presentan como la media \pm SD (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Por tanto, CPH15A indujo la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 antiinflamatorio, aumentando la expresión génica de MRC1 e IL-10 y la liberación de esta citoquina antiinflamatoria. Además, disminuyó la expresión génica de CCR7 y TNF α , marcadores característicos del fenotipo M1 proinflamatorio. La regulación de estos marcadores y citoquinas derivadas de

macrófagos polarizados desempeñan un papel clave en una variedad de enfermedades inflamatorias humanas [105, 179, 182].

Tomados en conjunto estos resultados, es tentador especular que la ingestión del CPH15A conteniendo péptidos bioactivos biodisponibles a nivel sistémico puede intervenir en la reprogramación de monocitos y la activación de macrófagos en tejidos humanos inflamados.



5.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- A partir de semillas de chía se han obtenido, harina desengrasada y aislado proteico, con un alto contenido en proteína, 34.6 y 82.8% respectivamente, y un alto contenido en fibra, parte de la cual es fibra soluble (mucílago), 50.46 y 11.01% respectivamente.

2.- La curva de solubilidad proteica de las proteínas de chía, demuestra que existe una importante diferencia entre el punto de máxima y mínima solubilidad de dichas proteínas y que, en este último, precipitan la mayor parte de las proteínas extraídas. Por tanto, las proteínas de chía son idóneas para emplear el método clásico de obtención de aislados proteicos, mediante extracción alcalina y precipitación ácida, ampliamente usado en la industria.

3.- El proceso de obtención de aislados proteicos de chía a nivel de planta piloto demuestra ser un proceso sostenible y rentable desde el punto de vista de la industria alimentaria, con un porcentaje de recuperación proteico (46.4%) y rendimiento en peso (18.5%), similares a los obtenidos en otros aislados proteicos a partir de semillas emergentes, como cáñamo, quinoa o amaranto.

4.- A partir de aislado proteico de chía, se han obtenido 4 hidrolizados proteicos con Alcalase 2.4 L (CPH15A, CPH30A, CPH45A y

CPH60A) y ocho usando Flavourzyme 1000 L. (CPH15F, CPH30F, CPH45F, CPH60F, CPH75F, CPH90F, CPH105F y CPH120F), de entre los cuales CPH15A, con las mejores propiedades antihipertensivas y antioxidantes, se utilizó para las determinaciones posteriores.

5.- CPH15A tiene una riqueza proteica del 73.5%, menor que la del aislado, ya que tiene un mayor contenido en cenizas, debido al uso de ácido clorhídrico e hidróxido sódico para mantener el pH de la reacción enzimática. El tamaño molecular de las proteínas de CPH15A es menor que el del aislado proteico, por la rotura de los enlaces peptídico en la reacción con Alcalase, desapareciendo las proteínas globulares y apareciendo en mayor cantidad los polipéptidos.

6.- Los análisis de composición de aminoácidos demuestran que los valores obtenidos para los productos de proteína de chía fueron más altos que los requerimientos de los adultos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud/Universidad de las Naciones Unidas (FAO/WHO/UNU) para los aminoácidos dietéticos esenciales, siendo los predominantes los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), parte poderosa del sistema antioxidante

celular, y los aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). En términos generales, no se observaron diferencias significativas entre harina desengrasada de chía, aislado proteico y CPH15A, lo que indica que el proceso de hidrólisis enzimática es un proceso que no daña los diversos aminoácidos ni produce metabolitos secundarios.

7.- Debido a su alto contenido en proteína y fibra dietética soluble, CPH15A, con un grado de hidrólisis del 36.2%, mostró una capacidad emulsionante similar y una capacidad espumante y estabilidad emulsionante superior a los producidos por otros hidrolizados de proteína limitados con un grado de hidrólisis inferior, de los cuales generalmente se admite que tienen propiedades funcionales.

8.- Se evaluó la biodisponibilidad de los péptidos de CPH15A en un sistema celular de absorción intestinal tipo transwell utilizando la línea celular Caco-2 y se analizó su peptidoma por primera vez, en relación al hidrolizado original mediante LC-TIMS-MS/MS.

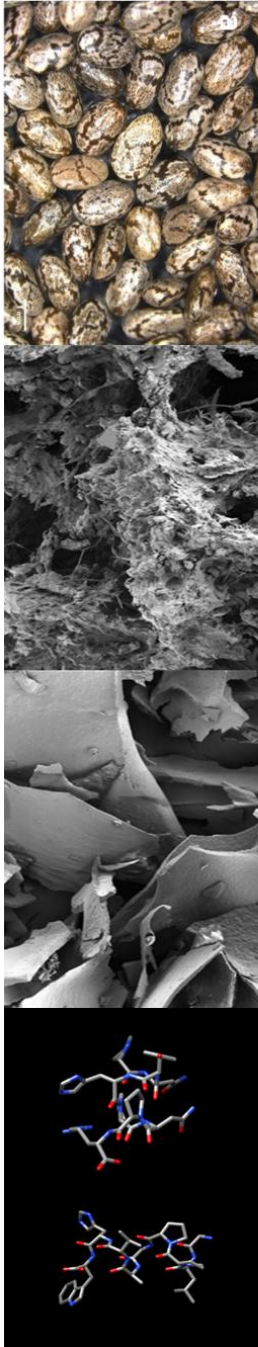
9.- El análisis *in silico* de los 20 péptidos biodisponibles seleccionados por su peso molecular <1 kDa y $-10\log P$, demostró que los péptidos PNYHPNPR y ALPPGAVHW son altamente antioxidantes y antihipertensivos, y además se encuentran, tanto en CPH15A, como en la fracción biodisponible, lo que indica su

resistencia a las condiciones de absorción y sugiere su potencial para llegar al torrente sanguíneo y ejercer su bioactividad en los órganos diana

10.- CPH15A disminuyó el estrés oxidativo en monocitos humanos primarios, disminuyó la expresión génica y liberación de citoquinas proinflamatorias, aumentó la expresión génica y liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 e indujo la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2 antiinflamatorio, al aumentar la expresión génica de *MRC1* y disminuir la de *CCR7*, sugierendo que la ingestión del CHP15A puede intervenir en la reprogramación de monocitos y activación de macrófagos en tejidos humanos inflamados.

11.- CPH15A presenta un marco inicial ideal para continuar el estudio de su funcionalidad en modelos pre-clínicos y clínicos, que estudian la prevención y el tratamiento de afecciones relacionadas con la inflamación y evaluar su posible incorporación como ingrediente funcional, en matrices alimentarias destinadas a una nutrición de precisión como compuesto bioactivo natural.

Con todo ello, se logra alcanzar el objetivo general de la presente tesis de estudiar la funcionalidad *in vitro* de un hidrolizado proteico de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre el estado oxidativo e inflamatorio en monocitos primarios humanos, ofreciendo una alternativa eficaz a la farmacoterapia clásica en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias por su potencial inmunomodulador.



7.-REFERENCIAS

REFERENCIAS

- [1] Motyka, S.; Koc, K.; Ekiert, H.; Blicharska, E.; Czarnek, K.; Szopa, A. The Current State of Knowledge on *Salvia hispanica* and *Salviae hispanicae semen* (Chia Seeds). *Molecules*, **2022**, *27*, 1207. <https://doi.org/10.3390/molecules27041207>
- [2] Mondor, M. Chia (*Salvia Hispanica*) Seed Oil Extraction By-Product and Its Edible Applications. *Foods reviews international*, **2023**, 1-20. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2160457>
- [3] Mordor Intelligence-Chia Seed Market-Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022–2027). Disponible online: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/chia-seeds-market> (último acceso 9 junio 2023)
- [4] Ferreira, D. M.; Nunes, M. A.; Santo, L. E.; Machado, S.; Costa, A. S. G.; Álvarez-Ortí, M.; Pardo, J. E.; Oliveira, M. B. P. P.; Alves, R. C. Characterization of Chia Seeds, Cold-Pressed Oil, and Defatted Cake: An Ancient Grain for Modern Food Production. *Molecules*, **2023**, *28*, 723. <https://doi.org/10.3390/molecules28020723>
- [5] Hrnčič, M. K.; Ivanovski, M.; Cör, D.; Knez, Ž. Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An Overview-Phytochemical Profile, Isolation Methods, and Application. *Molecules*, **2020**, *25*, 11.

<https://doi.org/10.3390/molecules25010011>

[6] Palma-Rojas, C.; Gonzalez, C.; Carrasco, B.; Silva, H.; Silva-Robledo, H. Genetic, cytological and molecular characterization of chía (*Salvia hispanica* L.) provenances. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2017**, *73*, 16-21.

<https://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2017.05.003>

[7] Muñoz, L. A.; Vera C. N.; Zúñiga-López, M. C.; Moncada, M.; Haros, C. M. Physicochemical and functional properties of soluble fiber extracted from two phenotypes of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2021**, *104*, 104138.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104138>

[8] Rodríguez-Abello D. C.; Navarro-Alberto J. A.; Ramírez-Avilés L.; Zamora-Bustillos, R. The effect of sowing time on the growth of chia (*Salvia hispanica* L.): What do nonlinear mixed models tell us about it?. *PLOS ONE*, **2018**, *13*(11): e0206582.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206582>

[9] Rossi, R.; Bochicchio, R.; Labella, R.; Bitella, G.; Amato, M. Fodder yield, quality and growth of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by sowing density and top-dressing nitrogen fertilization.

Agronomy, **2020**, *10*, 1980.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10121980>

[10] Hassani, M.; Piechota, T.; Atamian, H. S. Prediction of Cultivation Areas for the Commercial and an Early Flowering Wild Accession of *Salvia hispanica* L. in the United States. *Agronomy*, **2022**, *12*, 1651. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071651>

[11] Gravé, G.; Mouloungui, Z.; Poujard, F.; Cerny, M.; Pauthe, C.; Koumba, I. S.; Diakaridja, N.; Merah, O. Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro© released in France. *Oilseeds Fats Crops Lipids*, **2019**, *26*, 50. <https://doi.org/10.1051/ocl/2019037>

[12] Tichy, H. V.; Bruhs, A.; Palisch, A. Development of Real-Time Polymerase Chain Reaction Systems for the Detection of So-Called “Superfoods” Chia and Quinoa in Commercial Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, *68*, 14334–14342. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02441>

[13] Kulczyński, B.; Kobus-Cisowska, J.; Taczanoeski, M.; Kmiecik, D.; Gramza-Michalowska, G. The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds-Current State of Knowledge. *Nutrients*, **2019**, *11*, 1242. <https://doi.org/10.3390/nu11061242>

- [14] Ying, X.; Agyei, D.; Udenigwe, C.; Adhikari, B.; Wang, B. Manufacturing of Plant-Based Bioactive Peptides Using Enzymatic Methods to Meet Health and Sustainability Targets of the Sustainable Development Goals. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, **2021**, *5*, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.769028>
- [15] Non-communicable diseases risk factors collaboration (NCD-Risc). Data downloads. (2022, June). <http://ncdrisc.org/data-downloads.html>
- [16] Kakkar, S.; Tandon, R.; Tandon, N. The rising status of edible seeds in lifestyle related diseases: A review. *Food Chemistry*, **2023**, *402*, 134220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134220>
- [17] Palmieri, N.; Nervo, C.; Torri, L. Consumers' attitudes towards sustainable alternative protein sources: Comparing seaweed, insects and jellyfish in Italy. *Food Quality and Preference*, **2023**, *104*, 104735. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104735>
- [18] Informes de expertos- Informe del Mercado mundial de alimentos funcionales. Disponible online: <https://www.informesdeexpertos.com/informes/Mercado-de-alimentos-funcionales> (Último acceso 8 de mayo de 2023)

- [19] Motyka, S.; Skała, E.; Ekiert, H.; Szopa, A. Health-promoting approaches of use of chia seeds. *Journal of Functional Foods*, **2023**, 103, 105480. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105480>
- [20] Melo, D.; Machado, T. B.; Oliveira, M. B. P.P. Chia Seeds: an ancient grain trending in modern human diets. *Food & Function*, **2019**, 10 (6), 3068-3089. <https://doi.org/10.1039/c9fo00239a>
- [21] van den Driessche, J. J.; Plat, J.; Mensink, R. P. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: A systematic review of human intervention trials. *Food & Function*, **2018**, 9, 1944–1966. <https://doi.org/10.1039/c7fo01792h>
- [22] Vuksan, V.; Jenkins, A. L.; Brissette, C.; Choleva, L.; Jovanovski, E.; Gibbs, A. L.; Ho, H. V. T.; Hanna, A. Salba-chia (*Salvia hispanica* L.) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, **2017**, 27, 138–146. <https://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2016.11.124>
- [23] Martínez-Leo, E. E.; Martín-Ortega, A. M.; Acebedo-Fernández, J. J.; Moo-Puc, R.; Segura-Campos, M. R. Peptides from *Mucuna pruriens* L., with protection and antioxidant *in vitro* effect on HeLa

cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2019**, *99*, 4167-4173. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9649>

[24] Enes, B. N.; Moreira, L. P. D.; Silva, B. P.; Grancieri, M.; Lúcio, H.; Venâncio, V. P.; Mertens-Talcott, S. U.; Rosa, C. O. B.; Martino, H. S. D. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) effects and their molecular mechanisms on unbalanced diet experimental studies: A systematic review. *Journal of Food Science*, **2020**, *85* (2), 226. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15003>

[25] Rabail, R.; Sultan M. T.; Khalid, A. R.; Sahar, A. T.; Zia, S.; Kowalczewski, P. L.; Jezowski, P.; Shabbir, M. A.; Aadil, R. M. Clinical, Nutritional, and Functional Evaluation of Chia Seed-Fortified Muffins. *Molecules*, **2022**, *27*, 5907. <https://doi.org/10.3390/molecules27185907>

[26] López-Moreno, M., Garcés-Rimón, M., Miguel M. Antinutrients: Lectins, goitrogens, phytates and oxalates, friends or foe?. *Journal of Functional Foods*, **2022**, *89*, 104938. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104938>

[27] Yano, H.; Fu, W. Hemp: a sustainable plant with high industrial value in food processing. *Foods*, **2023**, *12*(3), 651. <https://doi.org/10.3390/foods12030651>

- [28] Falco, B.; Incerti, G.; Bochicchio, R.; Phillips, T. D.; Amato, M.; Lanzotti, V. Metabolomic analysis of *Salvia hispanica* seeds using NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Industrial Crops and Products*, **2017**, *99*, 86-96. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.019>
- [29] Zhang, S.; Liu, S. X.; Wu, Q. J.; Wang, Z. H.; Liu, H.; Dong, C.; Kuai, T. T.; You, L. L.; Xiao, J. Association of dietary fiber with subjective sleep quality in hemodialysis patients: a cross-sectional study in China. *Annals of medicine*, **2023**, *55*, 558-571. <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2076541>
- [30]. Ang, M. E.; Cowley, J. M.; Yap, K.; Hahn, M. G.; Mikkelsen, D.; Tucker, M. R.; Williams, B. A.; Burton, R. A. Novel constituents of *Salvia hispanica* L. (chia) nutlet mucilage and the improved *in vitro* fermentation of nutlets when ground. *Food & Function*, **2023**, *14*, 1401. <https://doi.org/10.1039/d2fo03002k>
- [31] USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. 2018. Available online: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> (poner último acceso cerca fecha entrega)

[32] Rodriguez-Martin, N. M.; Toscano, R.; Villanueva, A.; Pedroche, J.; Millan, F.; Montserrat-de la Paz, S.; Millan-Linares, M. C. Neuroprotective protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Food & Function*, **2019**, *10*, 6732–6739. <https://doi.org/10.1039/c9fo01904a>

[33] Khalid W.; Arshad M. S., Aziz A.; Rahim M. A.; Qaisrani T. B.; Afzal F.; Ali A.; Ranjha M. M. A. N., Khalid M. Z., Anjum F. M. Chia seeds (*Salvia hispanica* L.): A therapeutic weapon in metabolic disorders. *Food science and nutrition*, **2022**, *11*, 3-16 <https://doi.org/10.1002/fsn3.3035>

[34] da Silveira Ramos, I. F.; Magalhaes, L. M.; do O Pessoa, C.; Ferreira, P. M. P.; dos Santos Rizzo, M.; Osajima J. A.; Silva-Filho, E. C.; Nunes, C.; Raposo, F.; Coimbra, M. A.; Ribeiro, A. B.; Costa M. P. New properties of chia seed mucilage (*Salvia hispanica* L.) and potential application in cosmetic and pharmaceutical products. *Industrial Crops and Products*, **2021**, *171*, 113981. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113981>

[35] Santos Fernandes, S.; Salas Mellado, M. M. Development of Mayonnaise with substitution of oil or egg Yolk by the addition of

chía (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Journal of Food Science*, **2018**, 83, 74-83. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13984>

[36] Martínez-Villaluenga, C.; Peñas, E.; Hernández-Ledesma, B. Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and chemical toxicology*, **2020**, 137, 111178. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111178>

[37] Czerwonka, M.; Białek, A. Fatty Acid Composition of Pseudocereals and Seeds Used as Functional Food Ingredients. *Life*, **2023**, 13, 217. <https://doi.org/10.3390/life13010217>

[38] Miranda-Ramos, K.; Millán-Linares, M. C.; Haros, C. M. Effect of Chia as Breadmaking Ingredient on Nutritional Quality, Mineral Availability, and Glycemic Index of Bread. *Foods*, **2020**, 9, 663. <https://doi.org/10.3390/foods9050663>

[39] Alarcon, G.; Sierra, L.; Roco, J.; Van Nieuwenhove, C.; Medina, A.; Medina, M.; Jerez, S. Effects of Cold pressed chia seed oil intake on hematological and biochemical biomarkers in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **2022**, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01036-4>

- [40] Nehdi, I. A., Hadj-Kali, M. K., Sbihi, H. M., Tan, C. P., Al-Resayes, S. I. Characterization of Ternary Blends of Vegetable Oils with Optimal ω -6/ ω -3 fatty Acid Ratios. *Journal of Oleo Science*, **2019**, 11, 1041-1049. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19111>
- [41] Fernández-Tomé, S.; Ashaolu, T. J.; Hernández-Ledesma, B. Exploration of the Nutritional and Functional Properties of Underutilized Grains as an Alternative Source for the Research of Food-Derived Bioactive Peptides. *Nutrients*, **2023**, 15, 351. <https://doi.org/10.3390/nu15020351>
- [42] Sandoval-Oliveros M. R.; Paredes-López O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**; 61:193-201. <https://dx.doi.org/10.1021/jf3034978>
- [43] Orona-Tamayo, D.; Valverde, M. E.; Nieto-Rendón, B.; Paredes-López, O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT-Food Science and Technology*, **2015**, 64:236-242. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.033>
- [44] Sofi, S. A.; Rafiq, S.; Singh, J.; Mir, S., A.; Sharma, S.; Bakshi, P.; McClamens, D. J.; Khaneghah, A. M.; Das, B. N. Impact of

germination on structural, physicochemical, techno-functional, and digestion properties of desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. *Food Chemistry*, **2023**, 405, 135011.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135011>

[45] FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 92. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 2013. ISSN 0254-4725.

[46] Böger, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *The Journal of Nutrition*, **2007**, 137, 1650S-1655S.
<https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1650S>

[47] Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids*, **2013**, 45:413-418.
<https://doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4>

[48] McCormack, W. P.; Hoffman, J. R.; Pruna, G. J.; Jajtner, A. R.; Townsend, J. R.; Stout, J. R.; Fukuda, D. H. Effects of L-alanyl-L-glutamine ingestion on one hour run performance. *Journal of the American College of Nutrition*, **2015**, 34:488-496.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1009193>

[49] Kalogianni, A.I.; Lazou, T.; Bossis, I.; Gelasakis, A.I. Natural phenolic compounds for the control of oxidation, bacterial spoilage,

and foodborne pathogens in meat. *Foods*, **2020**, 9, 794.

<https://doi.org/10.103390/foods9060794>

[50] Manual de nutrición y dietética. Ángeles Carbajal Azcona. Departamento de nutrición. Facultad de farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2017. Disponible online: <https://ucm.es/data/cont/docs/458-2017-12-02-cap-10minarals-2017.pdf>.

[51] Gravel, A.; Dubois-Laurin, F.; Doyen, A. Effects of hexane on protein profile and techno-functional properties of pea protein isolates. *Food Chemistry*, **2023**, 406, 135069. <https://doi.org/10.1016/j.foodcem.2022.135069>.

[52] Wang, Y.; Wang, S.; Li, R.; Wang, Y.; Xiang, Q.; Li, K.; Bai, Y. Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, **2022**, 124, 107351. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107351>

[53] Lqari, H.; Vioque, J.; Pedroche, J.; Millán, F. *Lupinus angustifolius* protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, **2002**; 76:349-356. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00285-0)

- [54] López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., Boeris, V., Spelzini, D. Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *LWT-Food Science and Technology*, **2018**, 90, 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.060>
- [55] Timilsena, Y. P.; Adhikari, R.; Barrow, C. J.; Adhikari, B. Physicochemical and Functional Properties of Protein Isolate Produced from Australian Chia Seeds. *Food Chemistry*, **2016**, 212, 648–656. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>
- [56] Martínez-Maqueda, D.; Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Miralles, B.; Gómez-Ruiz, J. A. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. “Proteomics in Foods: Principles and Applications, Food Microbiology and Food Safety 2”, **2013**, (Toldrá, F. and Nollet, L. M. L. Eds). Springer Science + Bussines Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1-2>.
- [57] Fang, B.; Chang, L.; Ohm, J. B.; Chen, B.; Rao, J. Structural, functional properties, and volatile profile of hemp protein isolate as affected by extraction method: Alkaline extraction–isoelectric precipitation vs salt extraction. *Food Chemistry*, **2023**, 405, 135001. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135001>

- [58] Miranda C. G.; Speranza P.; Kurozawa L. E.; Kawazoe-Sato A.C. Lentil protein: impact of different extraction methods on structural and functional properties. *Heliyon*, **2022**, 8, e11775. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11775>
- [59] Fatima, K.; Imran, M.; Ahmad, M.H.; Khan, M.K.; Khalid, W.; AL-Farga, A.; Alansari, W.S.; Shamlan, G.; Eskandrani, A.A. Ultrasound-Assisted Extraction of Protein from *Moringa oleifera* Seeds and Its Impact on Techno-Functional Properties. *Molecules*, **2023**, 28, 2554. <https://doi.org/10.3390/molecules28062554>
- [60] Floret, C.; Monnet, A. F., Micard, V.; Walrand, S.; Michon, C. Replacement of animal proteins in food: How to take advantage of nutritional and gelling properties of alternative protein sources. *Critical reviews in food science and nutrition*, **2023**, 63 (7), 920-946. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1956426>
- [61] Pietsch, V. L.; Emin, M. A.; Schuchmann, H. P. Process conditions influencing wheat gluten polymerization during high moisture extrusion of meat analog products. *Journal of Food Engineering*, **2017**, 198, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.027>

- [62] Malav, O. P.; Talukder, S.; Gokulakrishnan, P.; Chand, S. Meat analog: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2015**, *55*(9), 1241–1245.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.689381>
- [63] Li, M.; Kong, J.; Chen, Y.; Li, Y.; Xuan, H.; Liu, M.; Zhang, Q.; Liu, J. Comparative interaction study of soy protein isolate and three flavonoids (Chrysin, Apigenin and Luteolin) and their potential as natural preservatives. *Food Chemistry*, **2023**, *414*:135738.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135738>
- [64] Mollakhalili-Meybodi, N.; Arab, M.; Zare, L. Harmful compounds of soy milk: characterization and reduction strategies. *Journal of Food Science and Technology*, **2021**, *59*(10), 3723-3732.
<https://doi.org/10.1007/s13197-021-05249-4>
- [65] Zhang, J.; Liu, L.; Jiang, Y.; Faisal, S.; Wang, Q. A new insight into the high-moisture extrusion process of peanut protein: From the aspect of the orders and amount of energy input. *Journal of Food Engineering*, **2020**, *264*, 109668.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.015>.
- [66] Wang, Y.; Zhao, J.; Zhang, S.; Zhao, X.; Liu, Y.; Jiang, J.; Xiong, Y. L. Structural and rheological properties of mung bean protein

emulsion as a liquid egg substitute: The effect of pH shifting and calcium. *Food Hydrocolloids*, **2022**, 126, 107485.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107485>

[67] Boukid, F.; Gagaoua, M. Vegan Egg: A future-Proof Food Ingredient?. *Foods*, **2022**, 11, 161.
<https://doi.org/10.3390/foods11020161>

[68] Ge, A.; Iqbal, S.; Chen, X. D. Alteration in rheology and microstructure of O/W emulsions using controlled soy protein isolate-polysaccharide aggregation in aqueous phases. *Journal of Food Engineering*, **2022**, 317, 110872.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110872>

[69] Guiotto, E. N.; Tomás, M. C.; Haros, C. M. Development of Highly Nutritional Breads with By-Products of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Foods*, **2020**, 9, 819.
<https://doi.org/10.3390/foods9060819>

[70] Borges, V. C.; Fernandes, S. S.; Zavareze, E. R.; Haros, C. M.; Hernandez, C. P.; Guerra Dias, A. R.; Salas-Mellado, M. M. Production of gluten free bread with flour and chia seeds (*Salvia hispanica* L). *Food Bioscience*, **2021**, 43, 101294.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101294>

[71] Montone, C. M.; Zenezini-Chiozzi, R.; Marchetti, N.; Cerrato, A.; Antobelli, M.; Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Piovesana, S.; Laganà, A. Peptidomic Approach for the Identification of Peptides with Potential Antioxidant and Anti-hypertensive Effects Derived From Asparagus by-Products. *Molecules*, **2019**, *24*, 3627–3650. <https://doi.org/10.3390/molecules24193627>

[72] Rodriguez-Martin, N. M.; Montserrat-de la Paz, S.; Toscano, R.; Grao-Cruces, E.; Villanueva, A.; Pedroche, J.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Hemp (*Cannabis sativa L.*) Protein Hydrolysates Promote Anti-Inflammatory Response in Primary Human Monocytes. *Biomolecules*, **2020**, *10*, 803. <https://doi.org/10.3390/biom10050803>

[73] Montserrat-de la Paz, S.; Rodriguez-Martin, N. M.; Villanueva, A.; Pedroche, J.; Cruz-Chamorro, I.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Evaluation of Anti-Inflammatory and Atheroprotective Properties of Wheat Gluten Protein Hydrolysates in Primary Human Monocytes. *Foods*, **2020**, *9*, 854. <https://doi.org/10.3390/foods9070854>

[74] Montserrat-de la Paz, S.; Martinez-Lopez, A.; Villanueva-Lazo, A.; Pedroche, J.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Identification and Characterization of Novel Antioxidant Protein Hydrolysates from

Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Antioxidants*, **2021**, 10, 645.

<https://doi.org/10.3390/antiox10050645>

[75] Coelho, M. S.; de Araujo Aquino S.; Machado Latorres, J.; Salas-Mellado M. D. M. *In vitro* and *in vivo* antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. *Food Hydrocoll*, **2019**; 91, 19-25.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.018>

[76] Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in food and nutrition research*, 2017, 81, 109-159.

<https://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>

[77] Ward O P. 3.49 - Proteases. In: *Comprehensive Biotechnology*". 2nd edition 2011. Ed: Moo-Young M. Burlington: Academic Press.

[78] Han, J.; Zhang, Q.; Luo, W.; Wang, Z.; Pang, Y.; Shen, X. *In vitro* digestion of whole chía seeds (*Salvia hispanica* L.): Nutrient bioaccessibility, structural and functional changes. *International Journal of Food Science and Technology*, **2022**, 57, 3727–3734.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.15698>.

[79] López, D. N.; Galante, M.; Raimundo, G.; Spelzini, D.; Boeris, V. Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolysates. *Food Research*

International, **2019**; 116, 419-429.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056>

[80] Karami, Z.; Akbari-adergani, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, **2019**, 56, 535-547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>

[81] Akbarian, M.; Khani, A.; Eghbalpour, S.; Uversky, V.N. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal Molecular Sciences*. **2022**, 23, 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>

[82] Möller, N. P.; Scholz-Ahrens, K. E.; Roos, N.; Schrezenmeir, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*, **2008**, 47(4), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>.

[83] Saadi, S.; Saari, N.; Anwar, F.; Hamid, A. A.; Ghazali, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology advances*. **2015**, 33(1), 80-116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>.

- [84] Millan-Linares, M. C.; Lemus-Conejo, A.; Yust, M. M.; Pedroche, J.; Carrillo-Vico, A.; Millán, F.; Montserrat-de la Paz, S. GPETAFLR, a novel bioactive peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate, reduces osteoclastogenesis. *Journal Functional Foods*, **2018**, 47, 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.069>.
- [85] Montserrat-de la Paz, S.; Carrillo-Berdasco, G.; Rivero-Pino, F.; Villanueva-Lazo, A.; Millan-Linares, M. C. Hemp Protein Hydrolysates Modulate Inflammasome-Related Genes in Microglial Cells. *Biology*, **2023**, 12, 49. <https://doi.org/10.3390/biology12010049>
- [86] Martinez-Lopez, A.; Millan-Linares, M. C.; Rodriguez-Martin, N. M.; Millan, F.; Montserrat-de la Paz, S. Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Functional Foods*, **2020**, 65, 103735. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019>
- [87] León Madrazo, A.; Segura Campos, M. R. *In silico* prediction of peptide variants from chía (*S. hispanica* L.) with antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential. *Computational Biology and Chemistry*, **2022**, 98, 107695 <https://doi.org/10.1016/j.compbiochem.2022.107695>

- [88] Aguilar-Toalá, J. E.; Vidal-Limon, A.; Liceaga, A. M. Multifunctional Analysis of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Bioactive Peptides Using Peptidomics and Molecular Dynamics Simulations Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23*, 7288. <https://doi.org/10.3390/ijms23137288>
- [89] Ozón, B.; Cotabarren, J.; Valicenti, T.; Graciela Parisi, M.; David Obregón, W. Chia expeller: A promising source of antioxidant, antihypertensive and antithrombotic peptides produced by enzymatic hydrolysis with Alcalase and Flavourzyme. *Food Chemistry*, **2022**, 380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132185>
- [90] Villanueva-Lazo, A.; Montserrat-de la Paz, S.; Grao-Cruces, E.; Pedroche, J.; Toscano, R.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Antioxidant and Immunomodulatory Properties of Chia Protein Hydrolysates in Primary Human Monocyte–Macrophage Plasticity. *Foods*, **2022**, *11*, 623. <https://doi.org/10.3390/foods11050623>
- [91] Grancieri, M.; Verediano, T. A.; Sant’Ana, C. T.; de Assis, A.; Toledo, R. L.; de Mejia, E. G.; Martino, H. S. D. Digested protein from chia seed (*Salvia hispanica* L) prevents obesity and associated inflammation of adipose tissue in mice fed a high-fat diet.

PharmaNutrition, **2022**, 21, 100298.

<https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100298>.

[92] FitzGerald, R. J.; Murray, B. A.; Walsh, D. J. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, **2004**, 134(4), 980S-988S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S>.

[93] Montserrat-de la Paz, S.; Rivero-Pino, F.; Villanueva, A.; Toscano-Sanchez, R.; Martin, M. E.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Nutritional composition, ultrastructural characterization, and peptidome profile of antioxidant hemp protein hydrolysates. *Food Bioscience*, **2023**, 53, 102561. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102561>

[94] Lin, L., He, Y. l. He, Liu, Y., Hong, P., Zhou, C., Sun, S., Qian, Z. J. Comparative *in silico* and *in vitro* study of the stability and biological activity of an octapeptide from microalgae *Isochrysis zhanjiangensis* and its truncated short peptide. *Food & Function*, **2023**, 14, 3659. <https://doi.org/10.1039/d3fo00129f>

[95] Arulrajah, B.; Qoms, M. S.; Muhialdin, B. J.; Zarei, M.; Hussin, A. S. M.; Hasan, H.; Chau, D. M.; Ramasamy, R.; Saari, N. Antifungal efficacy of kenaf seed peptides mixture in cheese, safety assessment and unravelling its action mechanism against food

spoilage fungi. *Food Bioscience*, **2023**, 52, 102395.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102395>

[96] Gardner, M. L. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-a neglected field?. *Biological Reviews*, **1984**, 59, (3), 289-331. <https://doi.org/10.1111/j.469-185X.984.tb00708.x>.

[97] Gardner, M. L. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual review of nutrition*, **1988**, 8(1), 329-350. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.01553>

[98] Hara, H.; Funabiki, R.; Iwata, M.; Yamazaki, K. I. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *The Journal of nutrition*, **1984**, 114 (6), 1122-1129. <https://doi.org/10.093/jn/114.6>

[99] Webb Jr K. E.. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *Journal of Animal Science*, **1990**, 68 (9), 3011-3022. <https://doi.org/10.2527/1990.6893011x>

[100] He, Y.; Shen, L.; Ma, C.; Chen, M.; Pan, Y.; Yin, L.; Zhou, J.; Lei, X.; Ren, Q.; Duan, Y.; Zhang, H.; Ma, H. Protein Hydrolysates' Absorption Characteristics in the Dynamic Small Intestine In Vivo. *Molecules*, **2018**, 23 (7), 1591.

<https://doi.org/10.3390/molecules23071591>

- [101] Chakrabarti, S.; Guha, S.; Majumder, K. Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, **2018**, 10 (11), 1738. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- [102] Lundquist, P.; Artursson, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2016**, 106, 256-276. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.007>.
- [103] Cicero, A. F. G.; Fogacci, F.; Colletti, A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British journal of pharmacology*, **2017**, 174, (11), 1378-1394. <https://doi.org/10.1111/bph.13608>.
- [104] Chalamaiah, M.; Yu, W.; Wu, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, **2018**, 245, 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
- [105] Montserrat-de la Paz, S.; Naranjo, M. C.; Lopez, S.; Abia, R.; Muriana, F. J. G.; Bermudez, B. Niacin and its metabolites as master regulators of macrophage activation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2017**, 39, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.09.008>

[106] Millán-Linares, M. C.; Bermudez, B.; Martín, M. E.; Muñoz, E.; Abia, R.; Millán, F.; Muriana, F. J. G.; Montserrat-de la Paz, S. Unsaponifiable fraction isolated from grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil attenuates oxidative and inflammatory responses in human primary monocytes. *Food Function*, **2018**, *9*, 2517-2523. <https://doi.org/10.1039/c8fo00063h>

[107] Montserrat-de la Paz, S.; Lemus-Conejo, A.; Toscano, R.; Pedroche, J.; Millán, F.; Millán-Linares, M. C. GPETAFLR, an octapeptide isolated from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate, promotes the skewing to M2 phenotype in human primary monocytes. *Food Function*, **2019**, *10*, 3303. <https://doi.org/10.1039/c9fo00115h>

[108] Kiewiet, M. B. G.; Faas, M. M.; De Vos, P. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. *Nutrients*, **2018**, *10*, (7), 904. <https://doi.org/10.3390/nu10070904>

[109] Millán-Linares, M.; Bermúdez, B.; Yust, M.; Millán, F.; Pedroche, J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *Journal of Functional Foods*, **2014**, *8*, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.020>.

[110] Millán-Linares, M. C.; Millán, F.; Pedroche, J.; Yust, M. M. GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, **2015**, 18, 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.016>.

[111] Cruz-Chamorro, I.; Álvarez-Sánchez, N.; Santos-Sánchez, G.; Pedroche, J.; Fernández-Pachón, M. S.; Millán, F.; Millán-Linares, M. C.; Lardone, P. J.; Bejarano, I.; Guerrero, J. M.; Carrillo-Vico, A. Immunomodulatory and Antioxidant Properties of Wheat Gluten Protein Hydrolysates in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nutrients*, **2020**, 12, 1673. <https://doi.org/10.3390/nu12061673>

[112] Cruz-Chamorro, I.; Álvarez-Sánchez, N.; Álvarez-Ríos, A. I.; Santos-Sánchez, G.; Pedroche, J.; Millán, F.; Carrera-Sánchez, C.; Fernández-Pachón, M. S.; Millán-Linares, M. C.; Martínez-López, A.; Lardone, P. J.; Bejarano, I.; Guerrero, J. M.; Carrillo-Vico, A. Safety and Efficacy of a Beverage Containing Lupine Protein Hydrolysates on the Immune, Oxidative and Lipid Status in Healthy Subjects: An Intervention Study (the Lupine-1 Trial). *Molecular Nutrition & Food Research*, **2021**, 65(14), 2100139. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100139>

[113] Garcés, R.; Mancha, M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry*, **1993**, 211, 139-143.
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1244>

[114] Lee, S. C.; Prosky, L.; De Vries, J.W. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, **1992**, 75, 395-416.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/75.3.395>

[115] Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.; Reber, P.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **1956**, 28, 350-356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

[116] Moores, R. G.; McDermott, D. L.; Wood, T. R. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Analytical Chemistry*, **1948**, 20, 620-624. <https://doi.org/10.1021/ac60119a007>

[117] Alaiz, M.; Navarro, J. L.; Giron, J.; Vioque, E. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of*

Chromatography, **1992**, 591, 181-186. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80236-n](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80236-n)

[118] Yust, M.; Pedroche, J.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Millán, F.; Alaiz, M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, **2004**, 85(2), 317-320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.026>

[119] Salcedo-Chávez, B.; Osuna-Castro, J. A.; Guevara-Lara, F.; Domínguez-Domínguez, J.; Paredes-López, O. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method To Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 6515–6520. <https://doi.org/10.1021/jf020522t>.

[120] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27, 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>

[121] Santos, H. M.; Coutinho, J. P.; Amorim, F. A. C.; Lôbo, I. P.; Moreira, L. S.; Nascimento, M. M.; de Jesus, R. M. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and

microelements determination in guarana samples by ICP OES. *Food Chemistry*, **2019**, *273*, 159–165.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.074>

[122] Martinez-Lopez, A.; Rivero-Pino, F.; Villanueva, A.; Toscano, R.; Grao-Cruces, E.; Marquez-Paradas, E.; Martin, M. E.; Montserrat-de la Paz, S.; Millan-Linares, M. C. Kiwicha (*Amaranthus Caudatus* L.) protein hydrolysates reduce intestinal inflammation by modulating NLRP3 inflammasome pathway. *Food & Function*, **2022**, *13*, 11604. <https://doi.org/10.1039/d2fo02177c>

[123] Lin, M. J. Y.; Humbert, E. S.; Sosulski, F. W. Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, **1974**, *39*, 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>.

[124] Bejosano, F. P.; Corke, H. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and Buckwheat. *Industrial Crops and Products*, **1999**, *10*, 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00021-7)

[125] Fuhrmeister, H.; Meuser, F. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *Journal of Food*

Engineering, **2003**, 56, 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00241-8).

[126] Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*, **2006**, 1, 2423–2427. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.349>

[127] Pastor-Cavada, E.; Juan, R.; Pastor, J. E.; Alaiz, M.; Vioque, J. Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain. *LWT-Food Science and Technology*, **2009**, 42(3), 705–709. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.006>

[128] Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **1986**, 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

[129] Wu, H. C.; Chen, H. M.; Shiau, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research Intrenational*, **2003**, 36, 949–957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)

[130] Li, C.; Mora, L.; Toldrá, F. Structure-function relationship of small peptides generated during the ripening of Spanish dry-cured

ham: Peptidome, molecular stability and computational modelling.

Food Chemistry, **2022**, *375*, 131673.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131673>

[131] Lopez, S.; Montserrat-de la Paz, S.; Lucas, R.; Bermudez, B.; Abia, R.; Morales, J. C.; Muriana, F. J. G. Effect of metabolites of hydroxytyrosol on protection against oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *Journal of Functional Foods*, **2017**, *29*, 238-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.033>

[132] Green, L. C.; Wanger, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, **1982**, *126*, 131-138. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](http://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x)

[133] Castejón, N.; Luna, P.; Señoráns, F.J. Ultrasonic removal of mucilage for pressurized liquid extraction of omega-3 rich oil from chía seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2017**, *65*, 2572-2579. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05726>

[134] Tavano, O. L.; Berenguer-Murcia, A.; Secundo, F.; Fernandez-Lafuente, R. Biotechnological Applications of Proteases in Food

Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2018**, 17, 412–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>

[135] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS F A O
J E C F A M o n o g r a p h s. (2006)

[136] GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES, 1995.
Retrieved from <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/.relativas> a enzimas de uso en alimentación

[137] Qamar, S.; Manrique, Y. J.; Parekh, H.; Falconer, J. R. Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2020**, 60 (16), 2742–2762. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1657062>

[138] Piñuel, L.; Boeri, P.; Zubillaga, F.; Barrio, D. A.; Torreta, J.; Cruz, A.; Vásquez, G.; Pinto, A.; Carrillo, W. Production of White, Red and Black Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd Var. Real) Protein Isolates and Its Hydrolysates in Germinated and Non-Germinated Quinoa Samples and Antioxidant Activity Evaluation. *Plants*, **2019**, 8, 257. <https://doi.org/10.3390/plants8080257>

- [139] Daskaya-Dikmen, C.; Yucetepe, A.; Karbancioglu-Guler, F.; Daskaya, H.; Ozcelik, B. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, **2017**, *9*, 316. <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
- [140] Rudolph, S.; Lunow, D.; Kaiser, S.; Henle, T. Identification and quantification of ACE-inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins. *Food Chemistry*, **2017**, *224*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.039>
- [141] San Pablo-Osorio, B.; Mojica, L.; Urías-Silvas, J. E. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) pepsin hydrolysates inhibit angiotensin-converting enzyme by interacting with its catalytic site. *Journal of Food Science*, **2019**, *84*, 1170-1179. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14503>
- [142] Gupta, N.; Bhagyawant, S. S. Impact of hydrolysis on functional properties, antioxidant, ACE-I inhibitory and antiproliferative activity of *Cicer arietinum* and *Cicer reticulatum* hydrolysates. *Nutrire*, **2019**, *44*, 5. <https://doi.org/10.1186/s41110-019-0095-4>
- [143] Kheeree, N.; Sangtanoo, P.; Srimongkol, P.; Saisavoey, T.; Reamtong, O.; Choowongkomon, K.; Karnchanatat, A. ACE

inhibitory peptides derived from de-fatted lemon basil seeds: optimization, purification, identification, structure–activity relationship and molecular docking analysis. *Food and Function*, **2020**, 11, 8161–8178. <https://doi.org/10.1039/D0FO01240H>

[144] Sung, W. C.; Chiu, E. T.; Sun, A.; Hsiao, H. I. Incorporation of chia seed flour into gluten-free rice layer cake: Effects on nutritional quality and physicochemical properties. *Journal of Food Science*, **2020**, 85, 545–555. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14841>

[145] Thrane, M.; Paulsen, P. V.; Orcutt, M. W.; Krieger, T. M. Soy protein: impacts, production and applications. *Sustainable Protein Sources*. Elsevier Inc., **2017**, 23–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00002-0>.

[146] Ayerza, R.; Coates, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, **2011**, 34, 1366-1371. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.007>

[147] Islam, M. S.; Hongxin, W.; Admassu, H.; Noman, A.; Ma, C., Wei, F. A. Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as

influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Science and Nutrition*, **2021**, 9, 4031–4047. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1903>

[148] Polanco-Lugo, E.; Dávila-Ortiz, G.; Betancur-Ancona, D. A.; Chel-Guerrero, L. A. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* protein isolate. *Food Science and Technology*, **2014**, 34, 441–448. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6349>

[149] Yust, M. M.; Pedroche, J.; Millán-Linares, M. C.; Alcaide-Hidalgo, J. M.; Millán, F. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, **2010**, 122, 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.121>

[150] Muñoz, L. A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J. M. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, **2012**, 108, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>

[151] Liu, W. C. M.; Peng, Q.; Zhong, J.Z.; Liu, W.; Zhong, Y.J.; Wang, F. Molecular and Functional Properties of Protein Fractions and Isolate from Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.).

Molecules, **2018**, *23*, 393.

<https://doi.org/10.3390/molecules23020393>

[152] Ha, H. K.; Lee, W. J. Milk Protein-Stabilized Emulsion Delivery System and Its Application to Foods. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, **2020**, *38*(4), 189–196.

<https://doi.org/10.22424/jdsb.2020.38.4.189>

[153] Wouters, A. G. B.; Rombouts, I.; Fierens, E.; Brijs, K.; Delcour, J. A. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2016**, *15*, 786–800.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>

[154] Mirzanajafi-Zanjani, M.; Yousefi, M.; Ehsani, A. Challenges and approaches for production of a healthy and functional mayonnaise sauce. *Food Science and Nutrition*, **2019**, *7*, 2471–2484.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.1132>

[155] Karaś, M. Influence of physiological and chemical factors on the absorption of bioactive peptides. *International Journal of Food Science and Technology*, **2019**, *54*, 1486–1496.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.14054>

- [156] Sun, X.; Udenigwe, C. C. Chemistry and Biofunctional Significance of Bioactive Peptide Interactions with Food and Gut Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, *68*, 12972–12977. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07559>
- [157] Aluko, R. E. Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. *Proteins in Food Processing: Second Edition (Second Edition)*, Elsevier Ltd, **2017**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4>
- [158] Aguilar-Toalá, J. E.; Quintanar-Guerrero, D.; Liceaga, A. M.; Zambrano- Zaragoza, M. L. Encapsulation of bioactive peptides: A strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *RSC Advances*, **2022**, *12*, 6449–6458. <https://doi.org/10.1039/d1ra08590e>
- [159] Goulart, A. J.; Bassan, J. C.; Barbosa, O. A.; Marques, D. P.; Silveira, C. B.; Santos, A. F.; Garrido, S. S.; Resende, F. A.; Contiero, J.; Monti, R. Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. *Food Research International*, **2014**, *63*, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.037>

- [160] Rivero-Pino, F.; Espejo-Carpio, F. J.; Guadix, E. M. Production and identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from discarded *Sardine pilchardus* protein. *Food Chemistry*, **2020**, 328, 127096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127096>
- [161] Mune Mune, M. A.; Minka, S. R.; Henle, T. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **2018**, 250, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.001>
- [162] Villanueva-Lazo, A.; Montserrat-De la Paz, S.; Rodriguez-Martin, N. M.; Millan, F.; Carrera, C.; Pedroche, J. J.; Millan-Linares, M. D. C. Antihypertensive and antioxidant activity of chia protein techno-functional extensive hydrolysates. *Foods*, **2021**, 10, 2297. <https://doi.org/10.3390/foods10102297>
- [163] Mooney, C.; Haslam, N. J.; Pollastri, G.; Shields, D. C. Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. *PLOS ONE*, **2012**, 7, e45012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045012>

- [164] Mora, L.; González-Rogel, D.; Heres, A.; Toldrá, F. Iberian dry-cured ham as a potential source of α -glucosidase-inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods*, **2020**, *67*, 103840. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103840>
- [165] Rivero-Pino, F.; Espejo-Carpio, F. J.; Guadix, E. M. Unravelling the α -glucosidase inhibitory properties of chickpea protein by enzymatic hydrolysis and *in silico* analysis. *Food Bioscience*, **2021**, *44*, 101328. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101328>
- [166] Grancieri, M.; Martino, H. S. D.; Gonzalez de Mejia, E. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Total Protein and Protein Fractions Digests Reduce Biomarkers of Inflammation and Atherosclerosis in Macrophages *In Vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2019**, *63*, 1900021. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900021>
- [167] Lu, R. R.; Qian, P.; Sun, Z.; Zhou, X. H.; Chen, T. P.; He, J. F.; Zhang, H.; Wu, J. Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chemistry*, **2010**, *123*, 1210–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.089>

- [168] Rivero-Pino, F.; Pérez-Gálvez, R.; Espejo-Carpio, F. J.; Guadix, E. M. Evaluation of *Tenebrio molitor* protein as source of peptides modulating physiological processes. *Food & Function*, **2020**, *11*, 4376–4386. <https://doi.org/10.1039/d0fo00734j>
- [169] Peredo-Lovillo, A.; Hernández-Mendoza, A.; Vallejo-Cordoba, B.; Romero-Luna, H. E. Conventional and *in silico* approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. *Food Chemistry: X*, **2022**, *13*, 100183 <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100183>
- [170] Ryder, K.; Bekhit, A. E. D.; McConnell, M.; Carne, A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, **2016**, *208*, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.121>
- [171] Alnuaimi, A.; Ajayi, F. F.; Hamdi, M.; Mudgil, P.; Kamal, H.; Gan, C. Y.; Maqsood, S. A comparative analysis of anti-lipidemic potential of soybean (*Glycine max*) protein hydrolysates obtained from different ripening stages: Identification, and molecular interaction mechanisms of novel bioactive peptides. *Food Chemistry*, **2023**, *402*, 134192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134192>

- [172] Rahmani-Manglano, N. E.; Jones, N. C.; Hoffmann, S. V.; Guadix, E. M.; Pérez-Gálvez, R.; Guadix, A.; García-Moreno, P. J. Structure of whey protein hydrolysate used as emulsifier in wet and dried oil delivery systems: Effect of pH and drying processing. *Food Chemistry*, **2022**, 390. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133169>
- [173] Lāce, I.; Bazzi, S.; Uranga, J.; Schirmacher, A.; Diederichsen, U.; Mata, R. A.; Simeth, N. A. Modulating secondary structure motifs through photo-labile peptide staples. *Chembiochem*, **2023**, e202300270. <https://doi.org/10.1002/cbic.202300270>
- [174] Hjalte, J.; Hossain, S.; Hugerth, A.; Sjögren, H.; Wahlgren, M.; Larsson, P.; Lundberg, D. Aggregation behavior of structurally similar therapeutic peptides investigated by ¹H NMR and all-atom molecular dynamics simulations. *Molecular pharmaceutics*, **2022**, 19, 904-917. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00883>
- [175] Almeida, Z. L.; Brito, R. M. M. Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*, **2020**, 25(5), 1195. <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>.
- [176] Zawada, A. M.; Rogacev, K. S.; Schirmer, S. H.; Sester, M.; Böhm, M.; Fliser, D.; Heine, G. H. Monocyte heterogeneity in human

cardiovascular disease. *Immunobiology*, **2012**, 217, 1273–1284.

<https://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.001>

[177] Yang, J.; Zhang, L.; Caijia, Y.; Yang, X. F.; Wang, H.

Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory

monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker*

Research, **2014**, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>

[178] Geissmann, F.; Manz, M. G.; Jung, S.; Sieweke, M. H.; Merad,

M.; Ley, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic

cells. *Science*, **2010**, 327, 656–661.

<https://doi.org/10.1126/science.1178331>

[179] Guilliams, M.; Mildner, A.; Yona, S. Developmental and

Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, **2018**, 49, 595-

613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>

[180] Mirea, A. M.; Tack, C. J.; Chavakis, T; Joosten, L. A. B.;

Toonen, E. J. M. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying

NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends in Molecular*

Medicine, **2018**, 24, 458-471.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.03.005>

[181] Schmidt, F. M.; Weschenfelder, J.; Sander, C.; Minkwitz, J.;

Thormann, J.; Chittka, T.; Mergl, R.; Kirkby, K. C.; Faßhauer, M.;

Stumvoll, M.; Holdt, L. M.; Teupser, D.; Hegerl, U.; Himmerich, H. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLOS ONE*, **2015**, 10, e0121971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone0121971>

[182] Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*, **2014**, 5, 614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>

Curriculum Vitae abreviado (26/06/2023)

Parte A. INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre	Álvaro
Apellidos	Villanueva Lazo
Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)	27/09/1970
DNI	28731209T
Correo electrónico	alvarovillanueva@ig.csic.es
Open Research and Contributor ID (ORCID)	0000-0001-8180-688X

A.1. Posición actual

Posición 24/07/2012- actualidad	Técnico medio especializado de OPIs Esperando nombramiento Técnico Superior especializado de OPIs (BOE 1 Marzo 2022. Resolución de 23 de febrero de 2022)		
Institución	Consejo Superior de Investigaciones Científicas		
Departamento	<u>Instituto de la Grasa</u>		
País	España	Teleph. número	954611550

A.2. Cargos anteriores (interrupciones de la actividad investigadora, art. 45.2.c))

Periodo	Cargo/Institución/País/Causa de interrupción
01/01/1998- 31/01/1999	Ayudante de investigación y laboratorio/CSIC/Instituto de la Grasa/cambio de contrato
01/02/1999- 31/05/1999	Operador de mantenimiento y oficios/CSIC/Instituto de la Grasa/cambio de contrato
01/06/1999- 24/07/2012	Técnico Especializado Interino/CSIC/Instituto de la Grasa/cambio de contrato

A.3. Educación

PhD, Licenciado, Graduado	Universidad/País	Año
Máster en Ciencia y Tecnología de	Universidad Pablo de Olavide /Sevilla/España	2019

Aceites y Bebidas Fermentadas		
Grado en Ingeniería Agrónoma	Universidad de Sevilla/España	2017
Ingeniero Técnico Agrícola	Universidad de Sevilla/España	1998

Parte B. RESUMEN DEL CV

Toda mi vida laboral y por tanto mi labor investigadora siempre ha estado ligada al CSIC y más concretamente al Instituto de la Grasa de Sevilla. Actualmente soy funcionario de carrera en la escala de Técnico especialista OPI, cargo que ocupó desde 2012 y estoy a la espera del nombramiento como Técnico superior especializado de OPIs. Obtuve el título de Ingeniero Técnico Agrícola (1998), tras finalizar el trabajo fin de carrera en el Instituto de la Grasa con la calificación de sobresaliente. En 2017 obtuve el Grado en Ingeniería Agrónoma por la Universidad de Sevilla, con el trabajo fin de grado, realizado también en el Instituto de la Grasa, y con la que obtuve una calificación de matrícula de honor. En 2019 conseguí el grado Máster en Ciencia y Tecnología de Aceites y Bebidas Fermentadas por la Universidad Pablo de Olavide obteniendo la calificación de sobresaliente (9.54). Actualmente estoy realizando mi Tesis Doctoral bajo la Dirección de la Doctora M^a del Carmen Millán-Linares. Mi trabajo se ha centrado en el estudio de compuestos bioactivos vegetales, concretamente en el campo de las proteínas vegetales, mediante la obtención y el desarrollo de aislados e hidrolizados de proteínas, tanto a nivel de laboratorio como de planta piloto, su caracterización y estudio de sus propiedades funcionales para una nutrición de precisión. Este trabajo me ha permitido la participación en más de 40 proyectos de investigación y contratos, tanto con entidades públicas como privadas, 22 congresos nacionales e internacionales, la licencia de dos patentes, la publicación de 17 trabajos de investigación JCR (16 Q1), 2 resúmenes en revistas incluidas en el SCI, 2 capítulos de libros, dos monografías y 55 informes a industrias.

Parte C. MÉRITOS PERTINENTES (*ordenados por tipología*)

C.1. Publicaciones (17).

1. Montserrat-de la Paz, S.; Rivero-Pino, F.; **Villanueva, A.**; Toscano-Sanchez, R.; Martin, M. E.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Nutritional composition, ultrastructural characterization, and peptidome profile of antioxidant hemp protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 2023, 53, 102561. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102561>
2. Rivero-Pino, F.; Millan-Linares, M. C.; **Villanueva-Lazo, A.**; Fernandez-Prior, A.; Montserrat-de-la-Paz, S. In vivo evidences of the health-promoting properties of bioactive compounds obtained from olive by-products and their use as food ingredient, 2023, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2203229>
3. Montserrat-de la Paz, S.; Carrillo-Berdasco, G.; Rivero-Pino, F.; **Villanueva-Lazo, A.**; Millan-Linares, M.C. Hemp protein hydrolysates modulate inflammasome-related genes in microglial cells. *Biology*, 2023, 12, 49. <https://doi.org/10.3390/biology12010049>
4. **Villanueva-Lazo, A.**; Montserrat-de la Paz, S.; Grao-Cruces, E.; Pedroche, J.; Toscano, R.; Millan, F.; Millan-Linares, M. C. Antioxidant and immunomodulatory properties of chia protein hydrolysates in primary human monocyte-macrophage plasticity. *Foods*, 2022, 11, 623. <https://doi.org/10.3390/foods11050623>
5. **Villanueva-Lazo, A.**; Montserrat-de la Paz, S.; Rodriguez-Martin, N. M.; Millán, F.; Carrera, C.; Pedroche, J.; Millan-Linares, M. C. Antihypertensive and Antioxidant Activity of Chia Protein Techno-Functional Extensive Hydrolysates. *Foods*, 2021, 10, 2297. <https://doi.org/10.3390/foods10102297>

C.2. Congreso (22).

1. Toscano-Sánchez, R, **Villanueva, A.**, Rodríguez-Martín, N.M., Lemus-Conejo, A., Pedroche J., Millán, F., Millán-Linares M.C., Montserrat-de la Paz, S. “Antioxidant and anti-inflammatory

properties of protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds”. Oral presentation. XII meeting of Young pharmacologists from Andalusia. Seville. June, 3 2022.

2. Millán-Linares, M. C.; Carrillo Berdasco, G.; **Villanueva-Lazo, A.**; Rodríguez-Martín, N. M.; Pedroche, J.; Montserrat-de la Paz, S.; Millán, F.. “Hempseed peptides exert neuroprotective effect in microglial cells via NLRP3”. Poster. III Conferencia Internacional del grupo Valse-Food NETWORK y VI Simposio Chia-Link 2021. Santiago de Chile, Chile, November, 15-17, 2021.

3. Millán-Linares, M. C.; **Villanueva-Lazo, A.**; Grao-Vruces, E.; Martín-Rubio, M. E.; Toscano Sánchez, R.; Montserrat-de la Paz, S.. Macro and micro characterization of antioxidant protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. Poster. 22nd IUNS-International Congress of Nutrition. Tokyo, Japon, 14-19 septiembre 2021.

4. **Villanueva Lazo, A.**; Montserrat-de la Paz, S.; Rodríguez-Martín, N. M.; Carrillo Berdasco, G.; Millán, F.; Carrera, C.; Pedroche Jiménez, J.; Millán-Linares, M. C. “In vitro antioxidant properties of chia protein hydrolysates”. Poster. First annual congress of doctoral students of the Miguel Hernandez University. Elche, Spain. February, 2, 2021.

5. **Villanueva Lazo, A.**; Rodríguez-Martín, N. M.; Pedroche, J.; Millán, F.; Carrera, C.; Montserrat-de la Paz, S.; Millán-Linares, M. C. “Antihypertensive effect of chia (*Salvia hispanica* L.) protein”. Oral presentation. Congress of doctoral students in chemistry. Seville, Spain. December, 3, 2020.

C.3. Proyectos de investigación (31).

1. Alimentación circular para un envejecimiento saludable a través de la obtención de nuevos ingredientes tecnofuncionales a partir de subproductos de la industria oleícola (ALCESTO). **IP:** Montserrat de la Paz, S.

2. Obtención de un aislado proteico de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) a nivel piloto - primera etapa. Ref. PNIPA-PES-SIAD- PF-000118 Ministerio de la Producción del Perú. Programa Nacional

de Innovación en Pesca y Acuicultura. **IP:** Millán-Linares, M. C. y Pedroche Jiménez, J.. Enero 2019- Diciembre 2022

3. Revalorización de péptidos bioactivos a partir de residuos de productos hidrobiológicos para contribuir a la desnutrición infantil y aumentar la competitividad de la industria pesquera en la Bahía de Sechura-Piura. PNIPA-PES-SIADE-PF-000118 Ministerio de la Producción del Perú. Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura. **IP:** Millán Linares, M. C. y Pedroche Jiménez, J.. Enero 2019- Diciembre 2022

4. Desarrollo de ingredientes alimentarios a partir de cultivos ancestrales iberoamericanos. Ref.: 119RT0567. Programa Cyted Thematics Networks 2018. **IP:** Monika Haros, C. M. IATA- Instituto de la Grasa (CSIC). Enero 2019- Diciembre 2022

5. Desarrollo de nuevos hidrolizados de proteína de arroz de alta calidad, seguros y funcionales para su aplicación en alimentos infantiles. PASCALI. RTC-2017-6672-2 Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. **IP:** Millán Rodríguez, F. Julio 2018- Junio 2021

C.4. Contratos, méritos tecnológicos o de transferencia (15).

1. Obtención de una proteína aislada de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) a nivel de planta piloto - primera etapa. OTT20205674 CSIC-PRO SACHA INCHI. **IP:** Millán-Linares, M. C. y Pedroche Jiménez, J. Noviembre 2020-Febrero 2021.

2. **Invention Patent:** Millán-Linares, M.C.; Montserrat-de la Paz, S.; Millán, F.; Villanueva, A. “Péptidos bioaccesibles anti-inflamatorios de cáñamo”. N° de Solicitud: P202230873. 10/Octubre/2022.

3. **Invention Patent:** Method of obtaining limited and extensive protein hydrolysates from agro-industrial waste. Millán Rodríguez, F.; Pedroche Jiménez, J.; Yust Escobar, M. M.; Alcaide Hidalgo, J. M.; Millán Linares, M. C.; **Villanueva Lazo, A.**; Tejedor del Real, J. L.; Rodríguez Sánchez-Arévalo, A. WO/2012/017123. PCT/ES2011/070571. August, 05, 2010.

4. **Patente de invención:** Péptido y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Millán Rodríguez, F.; Pedroche Jiménez, J.; Yust Escobar, M. M.; Millán Linares, M. C.; **Villanueva Lazo, A.** P201431424. septiembre, 09, 2014.

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes e hipertensión, se cobran la vida de 41 millones de personas todos los años, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos alimentarios como alternativa eficaz al tratamiento farmacológico, pudiendo actuar como inmunomodulador de las enfermedades relacionadas con estados crónicos oxidativos e inflamatorios. En este trabajo se ha obtenido un hidrolizado proteico a partir de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.), considerada hoy en día un superalimento, y de la que existen múltiples evidencias científicas sobre sus propiedades nutricionales y funcionales, así como que, la hidrólisis enzimática de sus proteínas genera péptidos bioactivos con efectos positivos en la salud. En este trabajo, se han demostrado las propiedades tecnofuncionales de un hidrolizado de chía obtenido con la enzima Alcalase, interesantes para su incorporación en diferentes matrices y productos de la industria alimentaria. Por otra parte, se ha secuenciado, identificado y estudiado su biodisponibilidad en un sistema de absorción intestinal tipo transwell utilizando la línea celular Caco-2, mediante el estudio del peptidoma de los hidrolizados proteicos de chía original y tras la absorción intestinal, así como el estudio *in silico* de su potencial bioactivo para la selección de los péptidos responsables de dicha actividad. Por último, y mediante ensayos *in vitro* en monocitos humanos primarios, se ha demostrado que el hidrolizado proteico de chía, disminuyó el estrés oxidativo, la expresión génica y liberación de citoquinas proinflamatorias, aumentó la expresión génica y liberación de marcadores antiinflamatorios favoreciendo la polarización de los macrófagos derivados de monocitos hacia el fenotipo antiinflamatorio M2, pudiendo ser considerado por tanto, un candidato potencial de alimentos funcionales en enfermedades crónicas.

