

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Hidrolizados proteicos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtenidos por un
método de digestión gastrointestinal estático *in vitro* y evaluación de su
capacidad quelante de hierro (Fe^{2+})**

Tesis presentada por el Bachiller:

Quegüe Montalvo, Kevin Anthony

ORCID: 0009-0008-1409-5676

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

Dra. Gálvez Ranilla, Lena

ORCID: 0000-0002-7261-3303

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 13 de Octubre del 2025

Dictamen: 011360-C-EPIB-2025

Visto el borrador del expediente 011360, presentado por:

2018247071 - QUEGÜE MONTALVO KEVIN ANTHONY

Titulado:

**HIDROLIZADOS PROTEICOS DE TARWI (LUPINUS MUTABILIS SWEET) OBTENIDOS POR UN
MÉTODO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL ESTÁTICO IN VITRO Y EVALUACIÓN DE SU
CAPACIDAD QUELANTE DE HIERRO (FE²⁺)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29213630 - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**72172854 - FLORES CALLA SUSAN SOFIA
DICTAMINADOR**



Hidrolizados proteicos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtenidos por un método de digestión gastrointestinal estático in vitro y evaluación de su capacidad quelante de hierro (Fe²⁺)

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
4	web10.unl.edu.ar:8080 Fuente de Internet	1%
5	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad de Burgos UBUCEV Trabajo del estudiante	<1%
7	repositorio.chapingo.edu.mx Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, por iluminarme y guiarme en cada paso de este camino. La fuerza y sabiduría que me brindas me permite enfrentar cualquier reto con esperanza, confianza y fe.

A mis padres, por su amor incondicional, sacrificio y apoyo constante en cada etapa de mi vida. Gracias por sus enseñanzas, paciencia y por las oportunidades que me han podido brindar, siendo un gran ejemplo para mí.

A mis hermanos, por su cariño, comprensión y por estar siempre presentes, brindándome ánimo en cada etapa de este camino.

A mi pareja Romina, que siempre me motiva a ser mejor en cada aspecto de mi vida. Gracias por tu cariño, apoyo y por estar a mi lado en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Mi completo agradecimiento a la Dra. Lena Gálvez Ranilla, por brindarme la oportunidad de ser su tesista, por su mentoría, confianza, dedicación y apoyo durante todo el desarrollo de mi tesis, Su orientación fue fundamental en cada etapa del proceso.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Rosana Chirinos Gallardo y al Mg. Andrés Figueroa Merma del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM, por su compromiso con el proyecto y sus valiosas contribuciones en el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. Jesús Poccohuanca Gutiérrez, por su disposición, conocimientos y colaboración que hizo que este proceso fuera más llevadero, contribuyendo a la culminación de mi tesis.

También me gustaría agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la UCSM, a Michael, Alessandra, Jefferson, Itzeli y Daniela, por su apoyo y los momentos de compañerismo que permitieron que las jornadas en el laboratorio fueran más amenas.

AGRADECIMIENTO A PROCIENCIA-CONCYTEC

Mi completo agradecimiento al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto “Una alternativa de la fortificación con hierro: Obtención, purificación y caracterización de péptidos con capacidad queladora de Fe^{2+} , A partir de la proteína de tarwi (*Lupinus mutabilis*), Empleando enfoques *in vitro* e *in silico*” con contrato N° PE501082412-2023-PROCIENCIA.



RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados proteicos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtenidos de digestión gastrointestinal estática *in vitro* siguiendo el protocolo INFOGEST. Adicionalmente, se analizaron el contenido de proteína soluble y el grado de hidrólisis durante las etapas de digestión gástrica e intestinal, incluyendo a la caseína como proteína control con fines comparativos.

Se implementó el modelo de digestión estático *in vitro* INFOGEST, permitiendo simular las condiciones de digestión gastrointestinal humanas a través del uso de enzimas digestivas como pepsina y pancreatina, fluidos simulados gástrico e intestinal, bilis y controlando parámetros fisiológicos relevantes.

El contenido de proteína soluble y la capacidad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados generados a partir de la proteína de tarwi se incrementó moderadamente en la fase gástrica, alcanzando valores superiores a los observados en la proteína control (caseína) al final de la digestión (7,87 mg/mL y 2,97 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ respectivamente).

En la etapa de digestión intestinal, los hidrolizados de la proteína de tarwi presentaron un mayor grado de hidrólisis al final de la digestión (32,81 %), frente a la caseína (18,61 %). La capacidad quelante de Fe^{2+} también fue superior en los hidrolizados de la proteína de tarwi alcanzando un valor máximo de 48,84 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ a los 100 min, en comparación con la caseína (32,56 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ a los 80 min), para finalizar en valores de 34,29 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ y 22,98 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ al final de la etapa intestinal respectivamente. Por lo anterior, la proteína de tarwi genera hidrolizados con mayor capacidad quelante de Fe^{2+} que la caseína a nivel intestinal.

Estos resultados constituyen la base científica preliminar para investigaciones futuras a nivel *in vivo* e investigación aplicada dirigida al diseño de nuevos suplementos de hierro con base en los péptidos de la proteína de tarwi. Esto podría contribuir a las estrategias nutricionales orientadas a mejorar la absorción de hierro y combatir la anemia, además de revalorar cultivos andinos subutilizados como alternativa funcional frente a la desnutrición.

Palabras clave: Digestión *in vitro*, tarwi, capacidad quelante de Fe^{2+} .

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the Fe^{2+} -chelating capacity of hydrolysates derived from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) protein subjected to static *in vitro* gastrointestinal digestion following the INFOGEST protocol. Additionally, soluble protein content and degree of hydrolysis were assessed during the gastric and intestinal phases, including casein as a control protein for comparative purposes.

The static INFOGEST *in vitro* digestion model was implemented to simulate human gastrointestinal conditions using digestive enzymes like pepsin and pancreatin, simulated gastric and intestinal fluids, bile and by maintaining physiologically relevant parameters.

Both the soluble protein content and Fe^{2+} -chelating capacity of tarwi protein hydrolysates moderately increased during the gastric phase, reaching values higher than those of the control protein (casein) at the end of digestion (7.87 mg/mL and 2.97 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg BSA}$, respectively).

In the intestinal phase, tarwi protein hydrolysates exhibited a higher degree of hydrolysis at the end of digestion (32.81%) compared to casein (18.61%). The Fe^{2+} -chelating capacity was also greater in tarwi hydrolysates, with a maximum value of 48.84 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg BSA}$ at 100 minutes, compared to 32.56 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg BSA}$ for casein at 80 minutes. Final values were 34.29 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg BSA}$ for tarwi and 22.98 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg BSA}$ for casein, confirming the superior chelating potential of tarwi protein hydrolysates at the intestinal level.

These findings provide a preliminary scientific basis for future *in vivo* studies and applied research aimed at the development of iron supplements based on tarwi-derived peptides. This could support nutritional strategies to improve iron absorption and combat anemia, while also promoting the revalorization of underutilized Andean crops as functional alternatives to address malnutrition.

Keywords: *In vitro* digestion, tarwi, Fe^{2+} -chelating capacity.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

HIPÓTESIS..... 3

OBJETIVOS..... 4

Objetivo general 4

Objetivos específicos..... 4

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES 5

CAPÍTULO I..... 6

1. MARCO TEÓRICO 7

 1.1. *Lupinus mutabilis* Sweet..... 7

 1.1.1. Taxonomía y descripción 7

 1.1.2. Producción 8

 1.1.3. Biodiversidad 9

 1.1.4. Composición química 11

 1.1.5. Proteína de tarwi 13

 1.2. Estrategias para contrarrestar la anemia 14

 1.2.1. Vía intravenosa 15

 1.2.2. Vía fortificación de alimentos..... 16

 1.3. Capacidad quelante de Fe²⁺..... 18

 1.4. Digestión gastrointestinal 20

 1.4.1. Fase oral 20

 1.4.2. Fase gástrica..... 21

 1.4.3. Fase intestinal..... 21

1.4.4.	Sistema de digestión in vitro.....	21
1.5.	INFOGEST.....	23
1.5.1.	Amilasa salival.....	24
1.5.2.	Pepsina.....	24
1.5.3.	Lipasa gástrica.....	24
1.5.4.	Pancreatina.....	24
1.5.5.	Sales biliares.....	24
CAPÍTULO II.....		26
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....		27
2.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	27
2.2.	MATERIALES.....	27
2.2.1.	Material de estudio.....	27
2.2.2.	Reactivos.....	28
2.2.3.	Sales biliares.....	28
2.2.4.	Enzimas.....	29
2.2.5.	Material de laboratorio.....	29
2.2.6.	Equipos.....	29
2.3.	METODOLOGÍA.....	30
2.3.1.	Implementación del método de digestión gastrointestinal estático in vitro.....	30
2.3.2.	Etapas previas al método INFOGEST.....	30
2.3.3.	Implementación y aplicación del método de digestión gastrointestinal INFOGEST para la evaluación de la proteína de tarwi y proteína de control.....	38
2.3.4.	Métodos de análisis de los hidrolizados.....	37
2.3.5.	Análisis estadístico.....	42
CAPÍTULO III.....		43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		44

3.1. Implementación del método de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	
INFOGEST.....	44
3.1.1. Actividad enzimática de pepsina	44
3.1.2. Actividad enzimática de tripsina.....	45
3.1.3. Concentración de sales biliares.....	46
3.1.4. Ajuste de pH y proporciones a usar en los tubos de reacción del método INFOGEST.....	47
3.2. Evaluación del contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe ²⁺ en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi y la proteína control (caseína) durante etapas de digestión oral y gástrica	47
3.2.1. Contenido de proteína soluble	48
3.2.2. Grado de hidrólisis.....	50
3.2.3. Capacidad quelante de Fe ²⁺	53
3.3. Determinación del contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe ²⁺ en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi y la proteína control (caseína) durante la etapa de digestión intestinal	57
3.3.1. Contenido de proteína soluble	57
3.3.2. Grado de hidrólisis.....	59
3.3.3. Capacidad quelante de Fe ²⁺	63
CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

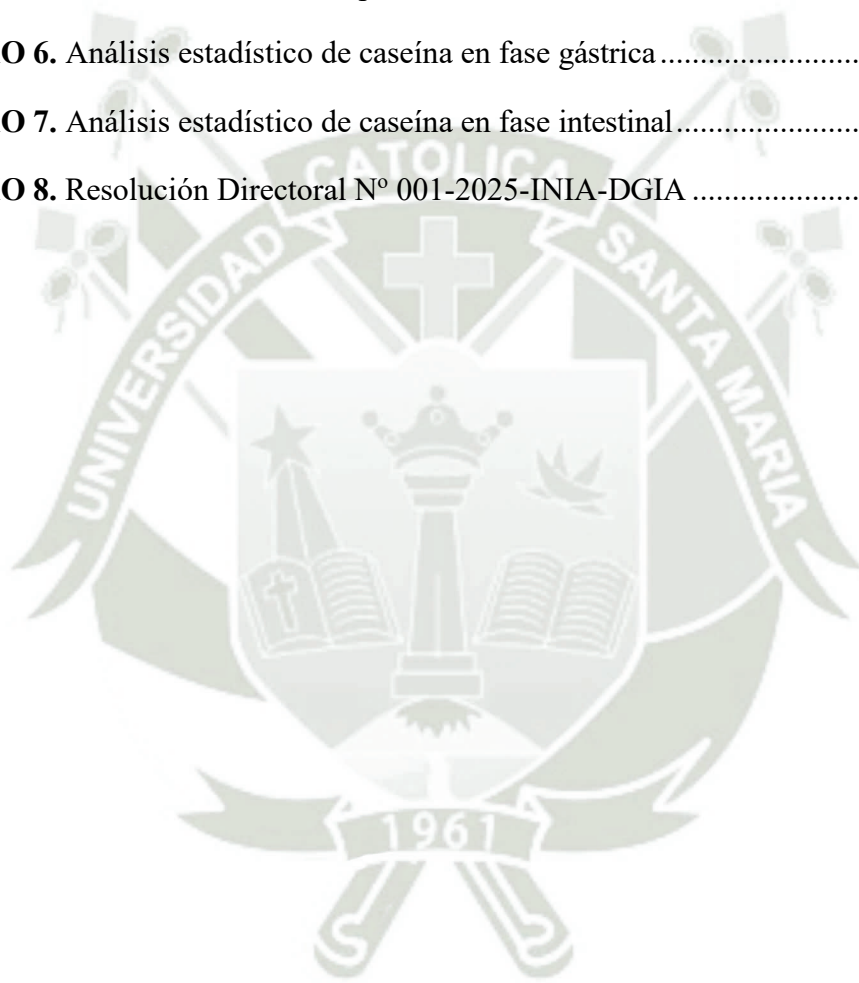
Figura 1. Variabilidad fenotípica de planta y semilla de tarwi	10
Figura 2. Hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina	30
Figura 3. Hidrólisis enzimática del TAME.....	32
Figura 4. Reacción redox de los ácidos biliares y NAD ⁺	34
Figura 5. Protocolo general del método de digestión estático in vitro	38
Figura 6. Diseño experimental aplicado en la presente investigación	39
Figura 7. Digestión in vitro fase oral y gástrica aplicado a la proteína de tarwi y la proteína control.....	35
Figura 8. Digestión in vitro hasta fase intestinal aplicado a la proteína de tarwi y la proteína control.....	36
Figura 9. Formación del complejo Ferrozina-Fe ²⁺	37
Figura 10. Reacción de la proteína con el ion cúprico.....	39
Figura 11. Reacción de TNBS con grupos aminos primarios	40
Figura 12. Relación entre la concentración de pepsina y su actividad enzimática	45
Figura 13. Cinética de la actividad enzimática de la tripsina	46
Figura 14. Contenido de proteína soluble durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b)	48
Figura 15. Grado de hidrólisis durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b).....	50
Figura 16. Capacidad quelante de Fe ²⁺ durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b).....	53
Figura 17. Contenido de proteína soluble durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b)	57
Figura 18. Grado de hidrolisis durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b).....	60
Figura 19. Capacidad quelante de Fe ²⁺ durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b).....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de variables e indicadores	5
Tabla 2. Producción de tarwi en el Perú al 2022	8
Tabla 3. Macronutrientes en la semilla del tarwi y soya	11
Tabla 4. Minerales presentes en la semilla de tarwi por cada 100 g de base seca.....	12
Tabla 5. Contenido de aminoácidos esenciales en tarwi	13
Tabla 6. Métodos para la evaluación de la capacidad quelante de Fe ²⁺ en péptidos de diferentes fuentes proteicas	19
Tabla 7. Concentraciones de las soluciones stock.....	35
Tabla 8. Volumen de solución stock y concentración final de las sales en los fluidos simulados.	36
Tabla 9. Actividad enzimática de pepsina.....	44
Tabla 10. Actividad enzimática de la tripsina	46
Tabla 11. Determinación del contenido de sales biliares en la bilis.....	47
Tabla 12. Proporciones para la obtención de FSS 1x.....	86
Tabla 13. Proporciones para la obtención de FSG 1x	86
Tabla 14. Proporciones para la obtención de FSI 1x.....	86
Tabla 15. Proporciones por tubo para la Fase oral	87
Tabla 16. Proporciones por tubo para la Fase gástrica	87
Tabla 17. Proporciones por tubo para la Fase intestinal.....	87

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Proporciones de los fluidos simulados para el ajuste de pH.....	86
ANEXO 2. Proporciones por tubo de las fases de digestión	87
ANEXO 3. Curvas de calibración de los métodos analíticos	88
ANEXO 4. Análisis estadísticos de proteína de tarwi en fase gástrica	89
ANEXO 5. Análisis estadístico de proteína de tarwi en fase intestinal.....	90
ANEXO 6. Análisis estadístico de caseína en fase gástrica	92
ANEXO 7. Análisis estadístico de caseína en fase intestinal.....	93
ANEXO 8. Resolución Directoral N° 001-2025-INIA-DGIA	95



INTRODUCCIÓN

La salud pública ha presentado varios desafíos en los últimos años, especialmente en regiones rurales de muchos países, entre ellos destaca el problema de la desnutrición. En el caso de Latinoamérica la desnutrición crónica en niños menores de 5 años alcanzó el 11,3% en el año 2020 (1,2). Esto conlleva a una deficiencia de micronutrientes muy importantes para el desarrollo del ser humano, como el hierro, yodo y zinc, presentando consecuencias adversas, desde el bajo peso al nacer, bajo desarrollo, incluyendo el aumento del riesgo de enfermedades crónicas al llegar a una edad avanzada (3).

La anemia por deficiencia de hierro o anemia ferropénica, es un problema que afecta principalmente a la población infantil (4,9). En el caso de nuestro país, la anemia ferropénica afecta al 43,1% de los niños de 6 a 35 meses, siendo Puno y Ucayali las regiones más afectadas, mientras que Arequipa hasta el 2023 presentó un 40,2% (5-7). Se han implementado algunas estrategias aceptadas como la fortificación con sales de hierro, pero las desventajas que presentan han llevado a la búsqueda de alternativas más eficaces (8). Una de las alternativas que está en constante investigación es el uso de moléculas orgánicas, específicamente péptidos con capacidad quelante de Fe^{2+} , provenientes de la hidrólisis de diversas fuentes proteicas como una posible solución (8,9).

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), es una leguminosa nativa de los Andes que presenta un contenido proteico superior incluso al de la soya dependiendo de la variedad, y podría ser una fuente importante de péptidos con capacidad quelante de Fe^{2+} , sin embargo, no existe información científica sobre este aspecto, y además este recurso, es muy poco aprovechado a nivel productivo y comercial (10,11). Se reportado que el tarwi posee propiedades bioactivas beneficiosas para la salud humana, además de presentar una buena adaptabilidad para crecer en diversos ecosistemas (12,13). A pesar de este potencial, no se le ha dado una adecuada atención.

En la presente investigación se implementó el método estático de digestión gastrointestinal *in vitro* según el protocolo INFOGEST, se evaluó la capacidad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados generados a partir de la proteína de tarwi bajo este sistema *in vitro*, y se determinó su variabilidad durante las diferentes etapas de la digestión.

Los resultados de esta investigación constituyen la base científica para futuros trabajos que permitan la identificación de los péptidos asociados con esta propiedad, los mecanismos moleculares involucrados, y estudios de biodisponibilidad a nivel *in vitro* e *in vivo*. La

importancia de la implementación del protocolo INFOGEST en esta investigación, radica en que es un método consensuado a nivel internacional elaborado con el objetivo de estandarizar y simular con precisión las condiciones digestivas *in vitro*, permitiendo comparaciones más adecuadas de los resultados entre diferentes investigaciones (15).

Los resultados de este estudio contribuirán con las iniciativas de la investigación científica sobre la diversidad alimentaria del Perú, como es el caso del tarwi, y abren una línea de investigación importante que podría derivar en una alternativa prometedora en la lucha contra la anemia ferropénica y la desnutrición infantil. No solo dando un valor agregado a este cultivo, sino que también se resalta la importancia de aprovechar los recursos de nuestro país como solución potencial a problemas de alcance global.



HIPÓTESIS

La proteína del tarwi sometida a un sistema de digestión gastrointestinal estático *in vitro* implementado, es una fuente de hidrolizados con capacidad quelante de Fe^{2+} . Esta propiedad, junto con el contenido de proteína soluble y el grado de hidrólisis proteica serán variables en el tiempo y en las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal simulada. Lo anterior permitirá dar un mayor valor agregado al tarwi.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener hidrolizados proteicos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) utilizando un método de digestión gastrointestinal estático *in vitro* y evaluar su capacidad quelante de Fe^{2+} .

Objetivos específicos

1. Implementar el método consensuado científicamente y denominado “INFOGEST” de digestión gastrointestinal estático *in vitro* incluyendo las etapas correspondientes a la fase oral, gástrica e intestinal.
2. Evaluar la capacidad quelante de Fe^{2+} , el grado de hidrólisis proteica y la proteína soluble en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi durante la etapa de digestión oral y gástrica.
3. Determinar la capacidad quelante de Fe^{2+} , el grado de hidrólisis proteica y la proteína soluble en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi durante la etapa de digestión intestinal.

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

A continuación, se presenta el cuadro con las variables dependientes e independientes que fueron evaluadas en este proyecto.

Tabla 1. Cuadro de variables e indicadores

VARIABLES	VARIABLE	INDICADORES	UNIDADES
INDEPENDIENTES	Implementación del método gastrointestinal <i>in vitro</i>	Método INFOGEST	-
	Digestión en fase gástrica	pH 3, enzima pepsina porcina, FSG*	-
	Digestión en fase intestinal	pH 7, enzima pancreatina porcina, FSI*	-
	Tiempo	Tiempo del proceso	min
DEPENDIENTES	Capacidad quelante de Fe ²⁺	Cantidad de hierro quelado por el hidrolizado proteico de tarwi	µg Fe ²⁺ /mg de ASB
	Contenido de proteína soluble	Concentración de proteína que reacciona con el reactivo de Folin Ciocalteu	mg/mL
	Grado de hidrólisis	Porcentaje de proteína hidrolizada	%

*Elaboración propia

*FSG: Fluido simulado gástrico, FSI: Fluido simulado intestinal.

*ASB: Albúmina sérica bovina



CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Lupinus mutabilis* Sweet

1.1.1. Taxonomía y descripción

Reino	:	Vegetal
Subreino	:	Fanerogamae
División	:	Espermatophitas
Clase	:	Dicotyledoneae
Orden	:	Rosales
Familia	:	Fabaceae
Subfamilia	:	Faboideae
Tribu	:	Genisteae
Género	:	<i>Lupinus</i>
Especie	:	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet

El tarwi o chocho es una leguminosa de origen andino que es comúnmente cultivada en países de Sudamérica como Perú, Ecuador y Bolivia. Se sugiere que se originó de una mutación de la especie *Lupinus piurensis* y que tuvo una rápida expansión gracias a la población de la época a lo largo de los Andes, desde Colombia hasta el norte de Argentina (16). Esta leguminosa presenta una planta de raíz vigorosa profunda con tallo leñoso, hojas ovaladas a lanceoladas compuestas y una flor que presenta corola con pétalos (17). La planta de tarwi también destaca por su atractivo ornamental, siendo una buena opción para la decoración de ambientes, algunos de sus ecotipos presentan colores muy variados en sus flores que van desde tonos azules hasta rosados, por esta razón es que se le conoce como “*mutabilis*” (18).

Las semillas de tarwi tienen forma ovalada encontrándose dentro de una vaina cubierta por un tegumento duro, dependiendo del ecotipo puede presentar diferentes colores como blanco, amarillo, gris, castaño, etc. Estas semillas destacan por contener altas concentraciones de proteínas, lípidos y minerales, convirtiéndolas en una excelente fuente de estos macronutrientes y micronutrientes, en comparación con algunas leguminosas comúnmente consumidas, como la soya (17,19). Por esta razón la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) consideró al tarwi como una semilla muy nutritiva y completa (20). Además, presenta

un alto contenido de alcaloides, lo que lo hace resistente a ataque de plagas o contaminación bacteriana (16).

El tarwi tiene una muy buena adaptabilidad a diferentes condiciones de cultivos, aunque su desarrollo óptimo se observa en lugares secos de suelos franco arenosos y climas cálidos con escasas lluvias, pero también tiene la capacidad de crecer en zonas con bajas temperaturas donde predominan las precipitaciones. Sin embargo, estas variaciones ambientales pueden influir en el tamaño final de la planta (13,19).

A pesar de contar con estas ventajas en comparación a otros cultivos, el poco conocimiento del sector agrícola limita su producción en los países de origen.

1.1.2. Producción

En los últimos años, la producción del tarwi ha presentado un notorio aumento, siendo cultivadas aproximadamente 1 384 964 toneladas (t) en todo el mundo durante el año 2021. América del Sur destaca como el continente líder en la producción de este cultivo, con países con ecosistemas favorables como lo son Ecuador, Chile, Bolivia y Perú. El cultivo en Perú se da en gran parte en ciertas zonas de la sierra como las regiones de La Libertad y Cusco (20). La importancia del tarwi como cultivo no se limita solo en sus países de origen, ya que despierta un interés considerable en otros continentes, especialmente en Europa y Oceanía (21).

Lamentablemente la pandemia causada por el COVID-19 fue un factor que produjo una disminución en la producción de tarwi en el Perú, llegando a pasar de 16 481 toneladas en 2018 a 15 809 toneladas hasta finales del año 2020 (22). Según el MIDAGRI, hasta finales del año 2022 el Perú produjo un total de 15 084 toneladas de tarwi, siendo el segundo mayor productor en Sudamérica siendo precedido por Chile. En la Tabla 2 se presentan los departamentos que tuvieron una mayor producción hasta el año 2022:

Tabla 2. Producción de tarwi en el Perú al 2022

Departamentos	Producción (t)	Porcentaje
La Libertad	4 532	30,04%
Cusco	3 913	25,94%
Apurímac	1 695	11,24%
Puno	1 545	10,24%

Huánuco	1 407	9,33%
Otros	1 992	13,21%
TOTAL	15 084	100%

*Adaptado de MIDAGRI 2022 (20).

Australia es el mayor productor de tarwi alrededor del mundo, ocupando el 63% de toda la producción del año 2022 según las estadísticas, aunque no se especifica si es únicamente del *mutabilis*, ya que posiblemente se incluya otras especies de lupino (*albus*, *luteus*, *angustifolius*, etc.). Esto indica que lugares fuera de América, como Oceanía y Europa están teniendo un buen manejo de esta leguminosa (20).

Por el momento, ninguno de los continentes ya mencionados comercializa sus cultivos de tarwi, ya que países como Rusia, Alemania, Polonia están investigando y realizando experimentos con *Lupinus mutabilis* para probar las mejores condiciones de cultivo para su adaptabilidad en cada país. A pesar de ello, algunos de los desafíos que enfrentan son la baja producción, el largo ciclo de cultivo, factores bióticos prevalentes en el continente europeo, eso incluye la posible presencia de plagas y enfermedades (13,23).

1.1.3. Biodiversidad

El tarwi tiene un alto nivel de polimorfismo, debido a su alta variabilidad genética, siendo una especie autógama y alógama, esto quiere decir que su reproducción puede llevarse a cabo en la misma flor o entre flores de diferentes plantas (18,24).

Las características fenotípicas que puede presentar el tarwi son muy variadas, esto depende de su forma de reproducción o las condiciones de cultivo como el suelo o clima, las partes que presentan cambios más representativos son las flores, algunas de ellas pueden presentar varios colores como azul, lilas, blancas, como se muestra en la Figura 1, esta variabilidad es considerada macroscópica (19).

Las semillas, por su parte, también exhiben variabilidad fenotípica manifestándose con la presencia de dos colores: uno primario y otro secundario, con una distribución diversa de patrones o manchas. En el caso del color primario, las semillas pueden presentar tonalidades como blanco, amarillo, marrón, negro o verde, mientras que el color

secundario suele inclinarse hacia tonalidades más oscuras, como se observa en la Figura 1 (25).



Figura 1. Variabilidad fenotípica de planta y semilla de tarwi. Tomado de Gulisano (26).

La preservación *in situ* del tarwi se lleva a cabo a través de bancos de germoplasma, cuya finalidad es salvaguardar la diversidad genética de este recurso, el cual es bastante amplio. Los bancos de germoplasma tienen como propósito fundamental establecer una reserva estratégica de material genético con el fin de facilitar procesos como mejoramiento genético, preservación y propagación de ecotipos que enfrentan amenazas de extinción (17).

Asimismo, al mantener una colección diversa de germoplasma, se brinda la posibilidad de estudiar y utilizar recursos genéticos valiosos para abordar desafíos ambientales, agrícolas y de seguridad alimentaria contribuyendo así la sostenibilidad a largo plazo, gracias a estos bancos de germoplasma muchos países europeos realizan sus investigaciones clave en agricultura, aprovechando valiosos recursos genéticos para avanzar en este campo (17,23).

En comparación con otros países andinos, Perú destaca por conservar la mayor cantidad de accesiones o muestras registradas en bancos de germoplasma. Bolivia, por ejemplo, reporta alrededor de 595 accesiones en bancos de germoplasma en las ciudades de La Paz y Cochabamba (27). Ecuador, por su parte, cuenta con una notable colección de más de 634 accesiones resguardadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (28). En el caso de Perú, la conservación abarca cifras de

aproximadamente 4 532 accesiones, de los cuales 1800 accesiones se encuentran en el Centro de Investigaciones en Cultivos Andinos (CICA-CUSCO) de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) (27). Sin embargo, se ha avanzado muy poco con la caracterización integral de esta biodiversidad a diferentes niveles.

1.1.4. Composición química

En los últimos años, las semillas de tarwi han tomado mayor importancia en el ámbito alimenticio, esto es debido a que su composición química es bastante completa, con propiedades beneficiosas para la salud gracias a su alto contenido de nutrientes (26).

La composición de las semillas destaca en su elevado contenido de proteínas y lípidos, siendo las proteínas las más importantes debido a su valor nutricional fundamental para el cuerpo (29,30).

a) Macronutrientes

En la actualidad, el tarwi se ha integrado como un ingrediente clave en la producción de diversos alimentos, tales como pan, pastas, leche, papillas y purés (31). Esto tiene como objetivo aumentar los niveles de proteínas y reducir la presencia de gluten en algunos productos alimenticios, ofreciendo opciones más diversas y accesibles para la dieta. Además, se ha convertido en una alternativa para reducir el consumo de la proteína animal, desempeñando el papel de sustituto como fuente proteica (32). Aunque por el momento el comercio de productos derivados de esta leguminosa en nuestro país es muy bajo.

En la Tabla 3, se presenta una comparación en la composición de macronutrientes entre el tarwi, frente a la leguminosa más consumida y comercializada alrededor del mundo, la soya (*Glycine max*), con estos datos se puede observar que el contenido de las proteínas y carbohidratos, es mayor en comparación al de la soya, esto depende de muchos factores como el ecotipo y la condición de cultivo:

Tabla 3. Macronutrientes en la semilla del tarwi y soya

Macronutrientes (%)	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	<i>Glycine max</i>
Proteínas	55.00	40.00
Lípidos	20.00	20.00
Carbohidratos	19.00	15.00

*Adaptado de diversas fuentes (33,34).

b) Minerales

En el caso de los minerales, el tarwi posee una amplia gama de ellos, en la Tabla 4, se presenta la cantidad de minerales presentes en el tarwi:

Tabla 4. Minerales presentes en la semilla de tarwi por cada 100 g de base seca

Mineral	Cantidad (mg)
Potasio (K)	1130 - 1400
Fosforo (P)	600 - 880
Magnesio (Mg)	240 - 330
Calcio (Ca)	120 - 180
Hierro (Fe)	5,0 - 7,3
Zinc (Zn)	3,4 - 3,6

*Adaptado de Campos et al. (31).

c) Alcaloides

El tarwi también tiene un contenido elevado de alcaloides del tipo quinolizidínico con un aproximado de 28,0 g/kg de producto; estos compuestos están presentes de manera natural siendo sintetizadas por la misma planta como mecanismo de defensa contra las plagas, aunque esto dificulta el consumo por ser tóxico para el ser humano, debido a ello se han propuesto diversas estrategias para su eliminación a través del mejoramiento genético, uso de procesos de remojo, lavados continuos, etc. Sin embargo, últimamente se está asociando a estos compuestos con una serie de propiedades saludables dependiendo de su concentración (17,31).

d) Otros compuestos

Adicional a ello, se ha registrado la presencia de algunos compuestos en concentraciones más bajas, sin embargo, estos están altamente relacionados con propiedades funcionales de gran relevancia para la salud desempeñando un papel crucial como antioxidantes, entre estos compuestos se encuentran los carotenoides con 4,51 mg/kg; tocoferoles con 249,8 mg/kg y polifenoles con 12,1 mg/g (35).

En resumen, el tarwi es un alimento con un gran potencial como fuente de nutrientes y compuestos beneficiosos para la salud.

1.1.5. Proteína de tarwi

Como se mencionó en el punto 1.1.4., las semillas de tarwi destacan por su alto contenido de proteínas, alcanzando aproximadamente un 55%, aunque se debe tener en cuenta que este porcentaje puede variar significativamente según diversos factores, como la ubicación geográfica de cultivo, la variedad de tarwi, así como otros factores agroclimáticos y genéticos.

Por ejemplo, las semillas originarias de Ecuador poseen un promedio de 41.40% de proteínas, mientras que las provenientes de Chile poseen un promedio de 51,00% (31). Las globulinas representan la mayor parte de las proteínas en las semillas del tarwi, alcanzando un aproximado de 91-94%, mientras que el 6.4% es de albúminas y existe la posibilidad de que haya presencia de prolaminas y glutelinas, pero en fracciones mínimas (26).

El tarwi también es una fuente rica de aminoácidos esenciales, esto se encuentra más detallado en la Tabla 5:

Tabla 5. Contenido de aminoácidos esenciales en tarwi

Aminoácido	Cantidad (g/100 g)
Leucina	7.0
Lisina	5.8
Isoleucina	4.2
Valina	3.8
Fenilalanina	3.5
Treonina	3.5
Histidina	3.5
Metionina	0.8
Triptófano	0.8

*Tomado de Gulisano et al. (26).

La proteína de tarwi presenta muchos beneficios, por ejemplo, dentro de la fracción de globulinas, se encuentran las conglutinas, las cuales han sido relacionadas con propiedades que favorecen la salud cardiovascular, desempeñan un papel en el control de la resistencia a la insulina e influye en la regulación de ferritina, favoreciendo el almacenamiento adecuado de hierro (26). Además, la proteína de tarwi se ha utilizado

en diversos estudios como complemento nutricional en la formulación de varios alimentos o para la mejora de algunas propiedades funcionales como la antioxidante (36).

Estudios recientes confirman que la proteína de tarwi constituye una fuente de péptidos con propiedades bioactivas y beneficiosas para la salud luego de ser obtenidos por un proceso de hidrólisis. Una propiedad encontrada en ciertas fracciones peptídicas generadas a partir de la hidrólisis de la proteína de tarwi es la capacidad antioxidante la cual depende de la composición de los aminoácidos; asimismo se ha reportado que algunos péptidos de otras especies de lupinos ayudan a estabilizar los minerales, facilitando su transporte y absorción, por lo que el tarwi no sería una excepción (12,60). Se ha demostrado a nivel *in vitro*, que algunos hidrolizados derivados de la proteína de tarwi tienen capacidad antidiabética, llegando a inhibir la dipeptidil peptidasa IV, enzima que modula la cantidad de glucosa en sangre de personas con diabetes tipo 2, pudiendo ser una alternativa natural frente a los fármacos convencionales, cuyo uso continuo produce efectos secundarios a largo plazo (12,37).

También, los hidrolizados proteicos y péptidos del tarwi han mostrado capacidad antihipertensiva por su actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I), que influye en el flujo sanguíneo del cuerpo elevando la presión (38,39). Es por ello que el tarwi se está convirtiendo en un recurso de interés en el campo agrícola y nutracéutico.

1.2. Estrategias para contrarrestar la anemia

El hierro es un mineral importante ya que es participe en la regulación de las vías metabólicas de energía, el transporte de oxígeno, sistema inmune, mantenimiento de las funciones hematopoyéticas, entre otros (9,40). Su deficiencia a largo plazo se encuentra altamente relacionado con la debilidad muscular, problemas respiratorios y un desarrollo motor y mental anormal (41). Además, estudios recientes determinaron que el hierro al tener un papel crucial en el sistema inmunológico, se encuentra asociado con la susceptibilidad a la infección causada por el Sars-CoV-2, así también como otras infecciones virales (42). Con la deficiencia de hierro se desencadena la anemia ferropénica, que es una condición donde la sangre carece de una cantidad de glóbulos rojos sanos, viéndose implicado el poco transporte de oxígeno y desencadenando síntomas como fatiga, dolores de cabeza, debilidad, poco apetito, etc. (43).

Por esta razón se han propuesto algunas estrategias para disminuir los casos de anemia en el mundo ya sea aplicando diferentes fuentes de hierro a nivel intravenoso o a través de la fortificación de los alimentos.

1.2.1. *Vía intravenosa*

Los suplementos intravenosos de hierro no son la mejor alternativa para combatir la anemia, por los efectos secundarios que estos podrían tener, como por ejemplo problemas hepáticos. A pesar de los avances que han tenido, su uso es mayormente dado cuando existe poca tolerancia y eficacia de las terapias comunes, ya que algunos de ellos requieren de muchas dosis (44,45). Entre los suplementos intravenosos más utilizados se encuentran:

a) *Hierro dextrano*

Es un complejo de hierro con dextrano, que actúa como envoltura. Existió una presentación de este suplemento que tenía alto peso molecular que fue sacada del mercado por las reacciones anafilácticas que causaba. El que se usa actualmente, aunque es de bajo peso molecular, se encuentra controlado. Antes de una dosis completa, el paciente debe pasar por una prueba de monitoreo cuidadoso (44).

b) *Gluconato férrico sódico*

Es un complejo de iones hierro unidos con gluconato de sodio, cumpliendo el papel de envoltura molecular de los iones hierro, varios estudios han demostrado buenos resultados en pacientes hospitalizados con anemia e insuficiencia cardíaca, aunque luego de su administración puede dejar hierro libre, lo cual induce al estrés oxidativo (46,47).

c) *Hierro sacarosa*

Es un complejo de hierro en su forma férrica con sacarosa, si bien es de los que tiene unos resultados favorables, sus efectos secundarios son muy variados pudiendo ser leves como cambios en el gusto, a moderados como hipertensión e hipotensión. Hay información que indica que el suplemento aumenta la susceptibilidad a infecciones bacterianas, aunque es un tema contradictorio por el momento (48).

d) *Carboximaltosa férrica*

Es un complejo de hidróxido férrico estabilizado con maltosa, entre los suplementos intravenosos es el que tiene más efectividad, pero tiene un costo más elevado. Tiene efectos secundarios leves, parecidos al de los tratamientos tradicionales, se pueden

presentar dolores de cabeza, mareos, náuseas, reacciones en el lugar de la dosis, etc. (47,49).

1.2.2. *Vía fortificación de alimentos*

Otra estrategia muy aceptada es la fortificación de alimentos, que consiste en la adición del hierro a alimentos que son comúnmente consumidos por la población como vehículos para suplementar las deficiencias nutricionales (50). Los compuestos más usados para fortificar alimentos a nivel comercial y algunos aún a nivel de estudio son:

a) *Sales inorgánicas de hierro*

La fortificación con sales de hierro es la estrategia más utilizada para combatir la anemia. Las sales se pueden dividir en solubles en agua, poco solubles en agua e insolubles en agua. Las solubles en agua, tienen la ventaja de ser más biodisponibles en el organismo a comparación de las poco solubles e insolubles, pero son muy reactivas con los alimentos, entre las sales solubles en agua están: el sulfato ferroso, el bisglicinato ferroso, el lactato ferroso y el cloruro ferroso (50,51). Entre las poco solubles e insolubles en agua, como el fumarato ferroso y el pirofosfato férrico respectivamente, son menos absorbibles, pero tienen la ventaja de tener un menor costo (50).

A pesar de ser muy recomendadas y utilizadas, en general, las sales de hierro tienen una baja biodisponibilidad, un alto costo y varios efectos secundarios. Por ejemplo, altas dosis de estas sales de hierro pueden irritar y dañar la mucosa gástrica a largo plazo (40,52).

b) *Complejos orgánicos*

Estudios recientes indican que ciertas moléculas orgánicas, como péptidos o polisacáridos derivados de la hidrólisis de diversas proteínas y carbohidratos respectivamente, tienen la capacidad de “quelar” minerales como el hierro. Esto resulta en la formación de complejos estables con menos interacciones químicas y de mayor solubilidad (53).

i. *Complejo hierro - polisacáridos*

Los complejos hierro polisacárido, son complejos de polisacáridos con átomos de hierro férrico, su comercialización y estudios están enfocados principalmente al tratamiento de la anemia ferropénica. Tienen menos efectos secundarios que las sales de hierro, pero con la desventaja de que el hierro liberado de estos complejos, tiene menor biodisponibilidad (52).

ii. *Complejo péptidos-Fe²⁺*

Diversos péptidos de varias fuentes, además de presentar propiedades bioactivas como antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antihipertensiva, antidiabética, entre otros, han demostrado también ser un vehículo potencial para minerales como el Fe²⁺ (12,54).

Gracias a estas propiedades, los complejos péptidos-Fe²⁺ han sido objeto de investigación en los últimos años, siendo obtenidos a partir de péptidos derivados de diferentes proteínas alimentarias (9). Estos complejos presentarían ventajas frente a las fuentes de Fe²⁺ convencionales como una mejor absorción, una buena estabilidad, buena biodisponibilidad y sobre todo ser seguras para el organismo (55).

El inicio del proceso para obtener estos complejos implica la selección de proteínas más adecuadas, que incluyan péptidos capaces de exhibir la propiedad de formar complejos con el Fe²⁺. Para ello, las proteínas, ya sea provenientes de hongos, fuentes vegetales o fuentes animales, se someten a un proceso de hidrólisis enzimática (9,54).

La hidrólisis no solo tiene como objetivo la obtención de estos péptidos, sino también el aumento del valor nutricional de las proteínas y de sus propiedades funcionales, químicas y físicas, para ello se utilizan enzimas con actividad endopeptidasa y exopeptidasa (56).

La formación de los complejos péptido-Fe²⁺ también parece tener lugar de forma natural durante el proceso de tránsito gastrointestinal, como resultado del consumo de proteínas y la acción de las proteasas digestivas en el estómago e intestino, sin embargo, no existe mucha información científica sobre este tema y su formación dependería de la fuente proteica, composición, forma de consumo, entre otros factores (57).

Después de confirmar esta funcionalidad, se avanza hacia la purificación de los péptidos con el objetivo de determinar las secuencias completas de aminoácidos. Para ello se utilizan procesos de ultrafiltración mediante el uso de membranas con múltiples repeticiones, seguido de lavados con soluciones específicas, y para la identificación se recurre a la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masa (LC-MS) (58,59).

También se ha prestado mucha atención a la relación estructura-actividad de los complejos péptidos-Fe²⁺, incluyendo los sitios de unión y el proceso dinámico. Los métodos empleados para llevar a cabo este análisis incluyen la espectrometría de masas por ionización de electrospray (ESI-MS), espectroscopía ultravioleta-visible

(UV-vis), espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), entre otros (55).

Debido a que esta fuente potencial de Fe^{2+} aún está en investigación, la absorción y biodisponibilidad aún no han sido evaluadas en ensayos clínicos debido a consideraciones éticas, costos y las dificultades que estos pueden presentar. Sin embargo, ya existe evidencia científica a nivel *in vitro* e *in vivo* con modelos celulares o en animales, respectivamente (54). En un estudio *in vivo*, se evaluó la biodisponibilidad de los complejos péptido- Fe^{2+} obtenido de la proteína de avena en ratas inducidas a anemia ferropénica mediante una dieta baja en hierro, frente a un control (ratas con dieta estándar) (63). Tras el tratamiento con estos complejos péptido- Fe^{2+} , se observó una mejora en la concentración de hemoglobina, un aumento en los niveles de ferritina y una alta actividad antioxidante, con valores similares a la dieta control y contribuyendo al aumento de peso (63).

Se ha planteado teóricamente el proceso de absorción del Fe^{2+} a partir de los complejos péptido- Fe^{2+} en el sistema digestivo humano, donde tras su consumo, el Fe^{2+} sería liberado en el intestino delgado, donde es absorbido por los enterocitos y transportado a los tejidos a través de la sangre (54). Factores como la estabilidad del complejo, su liberación intestinal, la presencia de proteínas transportadoras y las necesidades nutricionales influyen en su absorción (54).

Según lo expuesto previamente, el tarwi, presenta un alto contenido proteico y exhibe péptidos con diversas propiedades funcionales, por lo tanto, podría representar una fuente alimentaria valiosa de péptidos con la capacidad de quelar Fe^{2+} . Aunque no existen estudios científicos específicos sobre esta propiedad en la proteína del tarwi, investigaciones recientes han demostrado que las leguminosas con composición proteica similar, presentan esta capacidad tras ser sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro* (60).

1.3. Capacidad quelante de Fe^{2+}

La capacidad de quelación se relaciona con la habilidad del Fe^{2+} para unirse a otros compuestos. Esta propiedad es importante en el tratamiento de personas con deficiencia o exceso de Fe^{2+} , ya que su inestabilidad propicia la formación de radicales libres. En el ámbito alimentario, la capacidad de quelación juega un papel importante en la absorción del mineral (61,62). La elección y configuración de sistemas de transporte para el Fe^{2+} , que incluyen la formación de complejos que favorecen la absorción y el transporte

eficiente del Fe^{2+} en el organismo, demanda el uso de metodologías específicas para evaluar esta propiedad (53).

La evaluación de la capacidad quelante del Fe^{2+} ha sido objeto de estudio en relación con diversos compuestos, considerando la unión del Fe^{2+} con ácidos orgánicos, polisacáridos, sales y aminoácidos. Entre estos, se ha observado un desempeño más destacado en el caso de los aminoácidos, considerando estos resultados, se ha incrementado la exploración en el uso de péptidos como compuesto de unión para el Fe^{2+} por su estabilidad y alta solubilidad (9,62).

La forma de medición estándar de esta propiedad se realiza promoviendo la unión de Fe^{2+} libre (que no se ha unido al agente quelante) con compuestos con la misma propiedad. En la Tabla 6, se presentan algunos estudios respecto a la capacidad quelante de Fe^{2+} de péptidos derivados de proteínas de diferentes fuentes y los métodos de evaluación respecto a esta propiedad:

Tabla 6. Métodos para la evaluación de la capacidad quelante de Fe^{2+} en péptidos de diferentes fuentes proteicas

Sustrato	Método de evaluación	Referencia
Lenteja (<i>Lens culinaris</i> L.)	Ferrozina como quelador de hierro libre	(14)
Nuez (<i>Juglans</i>)	Fenantrolina como quelador de hierro libre	(40)
Avena (<i>Avena sativa</i> L.)	Diferencia de masas	(63)
Frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>)	Separación de fases por filtración y diferencia de masas	(64)
Colza (<i>Brassica napus</i>)	Ferrozina como quelador de hierro libre	(65)
Levadura (<i>S. cerevisiae</i>)	Espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)	(66)
Maitake (<i>Grifola frondosa</i>)	Ferrozina como quelador de hierro libre	(67)
Yema de huevo	Fenantrolina como quelador de hierro libre	(68)

Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Ferrozina como quelador de hierro libre	(69)
--	--	------

*Adaptado de diversas fuentes.

Los resultados que se reportan en los estudios presentados en la Tabla 6, indican que todos los sustratos analizados presentaron capacidad quelante de Fe^{2+} , aunque con variaciones dependiendo del método utilizado. Los péptidos derivados de la proteína de frijol mungo, yema de huevo y tilapia mostraron la mayor capacidad quelante de Fe^{2+} , seguidos de los provenientes de las demás proteínas presentadas en la tabla. Esto resalta la diversidad de fuentes proteicas con potencial para la quelación de Fe^{2+} (40,63-69).

En estos estudios, los péptidos utilizados para evaluar la propiedad se obtuvieron mediante un proceso de hidrólisis utilizando enzimas comerciales y digestivas. Se reporta también que la propiedad muestra una mayor eficacia en péptidos de bajo peso molecular (40,67).

En general, existen más estudios sobre capacidad quelante de Fe^{2+} en péptidos derivados de proteínas animales, ya que han sido ampliamente investigados en términos de nutrición, digestibilidad y bioactividad, como en el caso de las proteínas de suero, caseína, huevo y tejido muscular (9,53,55). Sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por péptidos provenientes de proteínas vegetales, lo que ha impulsado un aumento en los estudios sobre las proteínas de legumbres, cereales y otras fuentes vegetales como alternativas sostenibles para mejorar la biodisponibilidad del Fe^{2+} (40,60,63). Por último, se destaca la posibilidad de evaluar esta propiedad en residuos orgánicos industriales como medida para prevenir la contaminación ambiental a largo plazo (66).

1.4. Digestión gastrointestinal

La digestión es un proceso vital en el cual los alimentos son descompuestos tanto física como químicamente a macromoléculas, fragmentos más pequeños y otros componentes para su absorción, dando así el aporte de energía necesaria para la supervivencia del ser vivo en cuestión (70,71). La digestión se compone de 3 fases:

1.4.1. Fase oral

La fase oral inicia con la masticación del alimento en la boca, donde el tamaño del alimento es reducido y se inicia la digestión oral con la secreción de saliva. Se da la

formación del bolo alimenticio y luego de la descomposición enzimática, pasa a través del esófago mediante la peristalsis (71).

1.4.2. Fase gástrica

El bolo alimenticio llega al estómago por medio del cardias, que actúa como válvula de entrada, el estómago por su parte actúa como “biorreactor” y mezclador. Es ahí donde se inicia la interacción entre los fluidos gástricos y las enzimas digestivas en condiciones ácidas, promoviendo así la hidrólisis de proteínas y formándose el quimo, para llegar al píloro, que actúa como válvula de salida y seguir con la digestión (71).

1.4.3. Fase intestinal

El quimo llega al intestino delgado dividido en duodeno, íleon y yeyuno. Es aquí donde se descomponen los alimentos en fragmentos pequeños partiendo de macromoléculas, esto se da con ayuda de enzimas pancreáticas. Los movimientos peristálticos mezclan el contenido y ocurre la absorción de nutrientes. Terminado este proceso el colon reabsorbe humedad, electrolitos y sales biliares, fermentando los residuos con ayuda de la microbiota intestinal, para la posterior eliminación por medio de las heces (71).

La digestión gastrointestinal es un proceso complejo e importante, y ha sido objeto de investigación a través de los años con la finalidad de comprender su funcionamiento molecular, anatómico y por su gran relevancia para la salud y nutrición. Sin embargo, existen varios factores que dificultan su estudio utilizando modelos *in vivo* como la necesidad de aprobación de un comité de ética, los elevados costos y el requerimiento de infraestructura especial, es por ello que surge la necesidad de implementar sistemas *in vitro* que faciliten los estudios científicos, que permitan el trabajo con un mayor número de muestras, y que se asemejen lo más posible a un sistema *in vivo* (71,72).

1.4.4. Sistema de digestión *in vitro*

Los sistemas de digestión *in vitro* tienen como objetivo comprender la bioaccesibilidad, que se refiere a la fracción del nutriente que podría ser liberada dentro de la matriz alimentaria y su biodisponibilidad, que corresponde a la fracción bioaccesible disponible para la absorción; siendo su mayor propósito el emular de manera más precisa posible un modelo *in vivo* al proporcionar condiciones similares a los que los alimentos de estudio experimentarían en los órganos que conforman el tracto digestivo, estas condiciones incluyen factores como el tiempo, el movimiento de los órganos, la temperatura, la presencia de sales biliares, enzimas y el pH (72,73).

Los estudios en sistemas de digestión *in vitro* ofrecen beneficios notables, como la facilidad de uso, su simplicidad, su costo más económico y su alto rendimiento, y permite el análisis de un gran número de muestras de interés, a comparación de estudios en modelos *in vivo*. Aunque los sistemas *in vitro* no pueden replicar con precisión todas las condiciones *in vivo*, siguen siendo una herramienta valiosa para la investigación (72). Los sistemas de digestión *in vitro* se basan en modelos los cuales se dividen en:

a) Modelo de digestión in vitro dinámico

Los modelos de digestión *in vitro* dinámicos tienen como objetivo simular las condiciones lo más semejante posible a un modelo *in vivo*, que, a pesar de ser compleja, representa una gran ventaja frente a los modelos estáticos (74). Este modelo permite ser controlado por una computadora, que dirige todo el proceso para simular con la mayor fidelidad posible todo el proceso digestivo, lo que garantiza una mayor precisión en los resultados obtenidos (73). Este modelo puede establecer condiciones tanto fisiológicas como mecánicas y fisicoquímicas. Además, ofrece información sobre la cinética de la digestión, incluyendo posibles cambios estructurales en lípidos o proteínas (70,74).

El modelo se puede clasificar en monocompartimental, donde las reacciones y movimientos ocurren en una única cámara, o en multicompartimental, donde se utilizan varias cámaras de reacción para simular las distintas partes que componen el tracto gastrointestinal (74). La principal desventaja de este modelo radica en su elevado costo y la complejidad que implica, incluso desde la configuración de la computadora de trabajo (75).

b) Modelo de digestión in vitro estático

Un modelo de digestión *in vitro* estático se configura para imitar de manera precisa las fases de digestión humana: oral, gástrica e intestinal. Su utilidad principal está enfocada en la evaluación, análisis y formulación de hipótesis, contribuyendo así al estudio de problemas más amplios y a la creación de productos industriales de interés (73,75).

La principal diferencia de este modelo respecto a uno dinámico es que en todas las etapas de la digestión se llevan a cabo mediante el uso de material de laboratorio, bajo la supervisión y manejo directo del personal a cargo (74). Esto implica que todas las reacciones enzimáticas y las condiciones que afectan la digestión, tales como el pH y la temperatura, son manipuladas por intervención humana (74,75). En el caso

de los procesos que requieren fuerza mecánica, como la simulación de los movimientos peristálticos, se realizan de forma automatizada mediante dispositivos especializados (70).

Las principales ventajas de un modelo estático en comparación a uno dinámico se centran en su simplicidad operativa, la facilidad para evaluar cada fase, su costo accesible y la capacidad de correr un extenso número de muestras, esto último resulta beneficiosa al momento de evaluar los cambios fisicoquímicos, la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (70,74).

La principal desventaja que tiene este tipo de modelo es que, al ser más simple, no puede replicar con precisión los procesos más complejos que ocurren de forma *in vivo*, especialmente los aspectos dinámicos presentes en la digestión, por ese motivo su capacidad se encuentra limitada al momento de analizar algunas de las etapas más complejas de este proceso fisiológico (73,74). Existen varios modelos de digestión estático *in vitro*, como los métodos de la Farmacopea de EE.UU. y el método unificado BARGE. Sin embargo, estos fueron desarrollados para otros fines y no específicamente para la evaluación de productos alimenticios. Por ello, se ha desarrollado el modelo estático *in vitro* INFOGEST, el cual ha ganado amplia aceptación en la comunidad científica (74).

1.5. INFOGEST

Debido a la dificultad en la comparación de resultados por variaciones en la metodología y con la finalidad de estandarizar los parámetros que forman parte de la conformación de un sistema gastrointestinal estático *in vitro*, se crea el protocolo “INFOGEST 1.0”, presentado por el grupo del mismo nombre en el año 2014 (74,76).

Con una versión del protocolo actualizada en el año 2019 (INFOGEST 2.0), es el resultado del trabajo colaborativo de científicos de al menos 17 países (Irlanda, Suiza, Suecia, Portugal, Noruega, Luxemburgo, Francia, España, Dinamarca, Reino Unido, Nueva Zelanda, Turquía, Israel, Polonia, Estados Unidos, Países Bajos, Alemania), que se desarrolló con la finalidad de estandarizar cada proceso semejante al modelo *in vivo* para que pueda ser reproducible alrededor del mundo (15).

La digestión *in vitro* hecha con el protocolo INFOGEST es muy efectiva ya que los resultados que se reportan tienden a asemejarse a los experimentos *in vivo* en animales, aunque para simular una digestión verdadera se debe hacer una combinación con todos los nutrientes que intervienen, pero el método no deja de ser una gran herramienta de estudio (15).

Es por ello que, para lograr la mayor semejanza posible a una digestión *in vivo*, el protocolo INFOGEST incluye biocomponentes que participan en la digestión de los alimentos para permitir una correcta descomposición de los mismos. Los biocomponentes a considerar son:

1.5.1. *Amilasa salival*

La amilasa salival es una enzima que participa en la fase oral, siendo secretada por las glándulas parótidas de la boca y tienen como función principal empezar con la descomposición de carbohidratos a azúcares más simples (77).

1.5.2. *Pepsina*

La pepsina es una enzima que participa en la fase gástrica, siendo secretada por las células principales de la mucosa gástrica en su forma inactiva, siendo activada por el ácido gástrico y tiene como función la descomposición inicial de proteínas (78).

1.5.3. *Lipasa gástrica*

La lipasa gástrica es una enzima que participa en la fase gástrica y es secretada por las células principales de la mucosa gástrica, tiene como función principal la descomposición inicial de lípidos (79).

1.5.4. *Pancreatina*

La pancreatina es un conglomerado de enzimas secretadas por el páncreas y de gran importancia en terapias digestivas. Este conglomerado incluye enzimas que participan en la fase intestinal de la digestión, entre estas enzimas se encuentran la amilasa pancreática encargada de descomponer carbohidratos, la lipasa pancreática encargada de descomponer lípidos y proteasas como la tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa, encargadas de descomponer proteínas (80,81).

1.5.5. *Sales biliares*

Las sales biliares son producidas en el hígado, participan en la fase intestinal de la digestión cumpliendo roles importantes en este proceso respecto al microbiota intestinal, la secreción hepática de lípidos, así también como la digestión y absorción de grasas dietéticas (82).

Muchos de estos biocomponentes usados en el método, son obtenidos a partir de animales como el porcino o bovino, los cuales presentan una composición semejante al humano.

Además, al igual que en otros modelos de digestión, en el protocolo INFOGEST también se toman en consideración parámetros estandarizados como pH, temperatura, tiempo,

etc. Aunque existen pasos críticos antes de poder llevar a cabo este método tales como la determinación de actividad enzimática de las enzimas partícipes y pruebas de ajuste de pH para cada fase de digestión en función a las muestras a evaluar (15).

En publicaciones recientes, se ha observado un aumento en el uso del método INFOGEST en el campo nutracéutico. Este método demuestra una gran versatilidad al aplicarse tanto en alimentos ricos en proteínas (83), como en pruebas para evaluar la digestión de hongos filamentosos (84). Además, destaca como un excelente método para la evaluación de diversas propiedades de compuestos alimentarios obtenidos después del proceso digestivo (83).





CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencia de los alimentos (F-404) del Pabellón F del campus central de la Universidad Católica de Santa María (UCSM).

2.2. MATERIALES

2.2.1. *Material de estudio*

La proteína de tarwi fue proporcionada por el Área de Biotecnología Industrial y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM, Lima). La proteína ha sido elaborada a partir del tarwi ecotipo “Cholo Fuerte” procedente del Programa de Leguminosas y Oleaginosas (UNALM, Lima). Para la obtención de la proteína de tarwi, los granos del ecotipo mencionado fueron sometidos a un proceso inicial de molienda y tamizado, obteniendo una harina que luego fue desgrasada. Posteriormente, la harina pasó por procesos de centrifugación, precipitación isoeléctrica y recolección para la extracción de la proteína. Para finalizar la proteína fue suspendida en agua destilada y liofilizada, obteniendo un concentrado proteico de tarwi con un 76.6% de proteína y 6.8% de grasa. Los granos de tarwi utilizados para la obtención de la proteína, han sido accedidos bajo la RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 001-2025-INIA-DGIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria-Dirección de Gestión de la Innovación Agraria), donde se ha dado autorización a la Universidad Nacional Agraria La Molina para el acceso, sin fines comerciales, a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), cuya titularidad y soberanía es ejercida exclusivamente por el Estado Peruano, con el objeto de su uso exclusivo para la ejecución del proyecto: “Una alternativa en la fortificación con hierro: Obtención, purificación y caracterización de péptidos con capacidad queladora de Fe^{2+} , a partir de proteína de tarwi (*Lupinus mutabilis*), empleando enfoques *in vitro* e *in silico*” (Anexo 8).

Se consideró el uso de una proteína láctea Caseína (C3400, Sigma Aldrich), como proteína control con fines comparativos para el ensayo de digestión y los métodos de análisis. Esta proteína está compuesta de todas sus fracciones principales ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β y κ).

2.2.2. *Reactivos*

- Ácido clorhídrico (Merck)
- Ácido tricloro-acético (TCA) (Sigma-Aldrich)
- Albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma-Aldrich)
- Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Buffer Tris (Sigma-Aldrich)
- Buffer Tris-HCl (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de amonio (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de calcio dihidratado (Merck)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich)
- Ferrozina (Ácido (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico, hidrato de sal monosódica)) (Sigma-Aldrich)
- Folin Ciocalteu 2N (Merck)
- Fosfato de sodio dihidratado (Merck)
- Fosfato hidrógeno dibásico (Merck)
- Fosfato monopotásico (Sigma-Aldrich)
- Hemoglobina de sangre bovina (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Kit de ensayo de ácidos biliares (Sigma-Aldrich)
- Lauril sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich)
- Leucina (L-leucine) (Sigma-Aldrich)
- Sulfato cúprico anhidro (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado (Fisher Scientific)
- TAME (N- α -p-tosil-L-arginina metil éster) (Sigma-Aldrich)
- Tartrato de sodio y potasio (Sigma-Aldrich)
- TNBS (Solución de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico) (Sigma-Aldrich)

2.2.3. *Sales biliares*

- Bilis Bovina (EC 232-369-0), de bovino – seca, no fraccionada. (Sigma-Aldrich, Alemania).

2.2.4. *Enzimas*

- Enzima pancreatina porcina (EC 232-468-9), de páncreas porcino – 8 x USP, (Sigma-Aldrich, Alemania).
- Enzima pepsina porcina (EC 3.4.23.1), de mucosa gástrica porcina – liofilizado en polvo, ≥ 2500 U/mg proteína, (Sigma-Aldrich, Alemania).

2.2.5. *Material de laboratorio*

- Barra de agitación magnética
- Beakers de 50, 100 y 250 mL
- Cintas Parafilm
- Cubetas de cuarzo de 1.4 y 3.6 mL
- Cubetas desechables de poliestireno de 4.5 mL
- Cuchara de plástico
- Cucharas y espátulas de metal
- Fiolas de 10, 25, 50, 100 mL
- Micropipetas de 0.1-2.5, 2-20, 20-200, 100-1000, 500-5000 μ L
- Microplacas de poliestireno de 96 pocillos, rango UV-VIS
- Microplaca de poliestireno negras con fondo claro de 96 pocillos
- Papel filtro Whatman N° 1
- Probetas de 10 y 50 mL
- Puntas de micropipetas de 20, 200, 1000, 5000 μ L
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL.

2.2.6. *Equipos*

- Agitador magnético (Cimarec+, Thermo Scientific, EE.UU.)
- Agitador termomixer (Thermomixer f2.0, Eppendorf, Alemania)
- Agitador vórtex (Wizard Advance IR, Velp Scientifica, Italia)
- Balanza analítica (Explorer, Ohaus, EE.UU.)
- Balanza de precisión (Pioneer, Ohaus, EE.UU.)
- Centrífuga (Universal 320R, Hettich, Alemania)
- Congelador (LT51SGD, LG, Corea del Sur)
- Congelador -25°C (BDF-25V268, Biobase, China)
- Espectrofotómetro UV-VISIBLE (Genesys 150, Thermo Scientific, EE.UU.)
- Estufa (UF55, Memmert, Alemania)

- Incubadora (WIG-32, Witeg, Alemania)
- Lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek, EE.UU.)
- Potenciómetro (HI 3220, Hanna, Italia)
- Rotador (Tube Revolver, Thermo Scientific, EE.UU.)
- Sonicator (Branson CPX2800-E, Branson, EE.UU.)

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Implementación del método de digestión gastrointestinal estático *in vitro*

El método fue implementado de acuerdo al protocolo propuesto por el grupo científico INFOGEST publicado por Minekus (76), con modificaciones adicionales hechas por Brodkorb (15) y se adaptó para la evaluación de muestras del tipo proteína. El proceso de implementación fue dividido en las siguientes etapas:

2.3.2. Etapas previas al método INFOGEST

a) Determinación de la actividad enzimática de pepsina

El objetivo de este ensayo fue conocer la actividad específica expresada en unidades de actividad enzimática por miligramo (U/mg), lo que permitió definir la cantidad necesaria de pepsina a utilizar en el ensayo para alcanzar una actividad de trabajo de 2000 U/mL en la fase gástrica de la digestión *in vitro* (15).

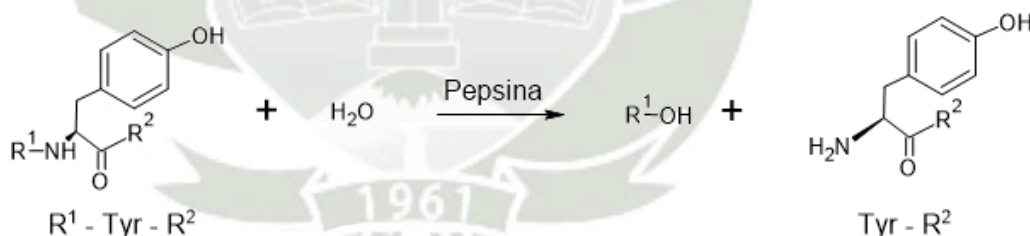


Figura 2. Hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina. Adaptado de Brodkorb et al. (15).

Este ensayo se basa en la hidrólisis de la hemoglobina bovina en medio ácido, lo que permite la liberación de restos peptídicos que contienen tirosina, tal como se muestra en la Figura 2. Estos restos peptídicos son solubles en ácido tricloro-acético (TCA) y sus absorbancias son leídas a 280 nm, donde una unidad (U) produce 0,001 de absorbancia a pH 2 y a 37°C (76).

Para llevar a cabo este ensayo, fue preparada una solución stock de pepsina disolviendo 10 mg en 10 mL de buffer tris a un pH de 6.5 (preparada por la mezcla de Tris 10 mM y NaCl 150 mM, ajustando su pH con HCl 5 M y 1 M) alcanzando una concentración de 1 mg/mL de pepsina. A partir de la solución stock se prepararon diferentes concentraciones de enzima (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 $\mu\text{g/mL}$) utilizando como solvente HCl 10 mM, las cuales se mantuvieron sobre hielo hasta su uso. Como sustrato se utilizó hemoglobina bovina al 2% cuyo pH fue ajustado a 2 con HCl 300 mM y para detener la reacción se preparó una solución de TCA al 5%. Se tomó en consideración la preparación de blancos para cada una de las concentraciones (cambiando el orden de adición de cada reactivo, iniciando con la hemoglobina, seguida del TCA y al final la concentración de enzima respectiva).

La reacción inició con la incubación y centrifugación de 500 μL de hemoglobina al 2% a 37°C por 5 min y a 500 rpm en un equipo Thermomixer. Transcurrido el tiempo, se agregaron 100 μL de cada una de las concentraciones y se incubó por 10 min a 37°C (exceptuando los blancos). Luego de este tiempo, para detener la reacción se agregó 1 mL de TCA al 5% (en el caso de los blancos, luego de la adición del TCA, se agregaron los 100 μL de cada una de las concentraciones de enzima). Se centrifugaron todas las muestras a 6000 $\times g$ por 30 min a 20°C, se recolectaron los sobrenadantes y la lectura se hizo a 280 nm en el espectrofotómetro utilizando cubetas de cuarzo (15,85).

Para que los resultados sean expresados en unidades de actividad enzimática por miligramo (U/mg), se utilizó la siguiente ecuación:

$$U/mg = \frac{(A_{280}Muestra - A_{280}Blanco) * 1000}{\Delta t * X * 0.001}$$

Donde:

U/mg = Actividad específica de pepsina.

A_{280} = Absorbancia a 280 nm.

Δt = Tiempo de reacción.

X = Cantidad de pepsina en polvo (μg) en 1 mL de la solución de ensayo.

1000 = Factor de dilución para la conversión de μg a mg .

0.001 = ΔA_{280} por unidad de tripsina (según hoja de especificación del producto).

b) Determinación de la actividad enzimática de tripsina

El objetivo de este ensayo fue conocer la actividad específica de la tripsina expresada en unidades de actividad enzimática por miligramo (U/mg), que permitió definir la cantidad necesaria de pancreatina a utilizar para alcanzar una actividad enzimática de trabajo para la tripsina de 100 U/mL en la fase intestinal de la digestión *in vitro* (15).

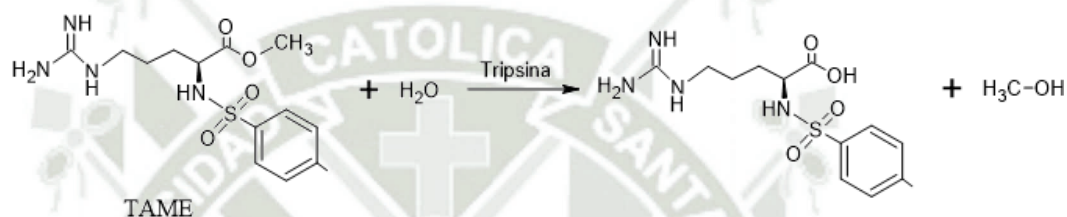


Figura 3. Hidrólisis enzimática del TAME. Adaptado de Hummel (86).

El método se basa en la hidrólisis del TAME en medio alcalino (siendo el TAME un sustrato específico para la tripsina), liberándose metanol y residuos de p-Toluenosulfonil-L-arginina, como se muestra en la Figura 3.

Las absorbancias del producto son leídas a 247 nm en un tiempo de 10 min con intervalos de lectura de 10 s, generándose una curva cinética en función a los cambios en la absorbancia a través del tiempo, se toman las pendientes, considerando únicamente la parte lineal de la curva para los cálculos, donde una unidad (U) hidroliza 1 μmol de TAME por minuto a 25°C a pH 8.1 (76,86).

Para llevar a cabo este ensayo, se preparó una solución stock de pancreatina disolviendo 10 mg en 1 mL de HCl 1 mM por medio de vortex, esta dilución fue sometida a ultrasonido por 5 min y fue centrifugada a $3000 \times g$ por 5 min a 20°C, recolectándose el sobrenadante. A partir de la solución stock se prepararon diferentes concentraciones de enzima (450, 500, 550 $\mu\text{g/mL}$) utilizando HCl 1 mM como solvente, las cuales se mantuvieron sobre hielo hasta su uso. Se preparó un buffer Tris-HCl a pH 8.1 (Preparada por la mezcla de Tris-HCl 46 mM y $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 11,5 mM, ajustando su pH con NaOH 5 M) para proporcionar el medio alcalino para la enzima y como sustrato TAME a 10 mM.

La reacción inició con la mezcla de 2.6 mL de buffer Tris-HCl con 300 μ L de TAME a 10 mM, siendo mezclada por inversión e incubada a 25°C por 5 min. Terminado el tiempo de incubación, se agregó 100 μ L de la concentración de enzima analizada de la cual rápidamente se recolectó 1 mL y se llevó a una cubeta de cuarzo para su lectura a 247 nm por un tiempo de 10 min con intervalos de lectura de 10 s. A partir de las lecturas de absorbancia, se generó una curva cinética siendo el eje de las abscisas el tiempo y el eje de las ordenadas las absorbancias. A partir de esta curva se calculó la pendiente de la porción lineal inicial. Para el Blanco del ensayo se reemplazó los 100 μ L de enzima por buffer Tris-HCl (15,85).

Para que los resultados sean expresados en unidades de actividad enzimática por miligramo (U/mg), se utilizó la siguiente ecuación:

$$U/mg = \frac{(\Delta A_{247} \text{Muestra} - \Delta A_{247} \text{Blanco}) * 1000 * 3}{540 * X}$$

Donde:

U/mg = Actividad específica de Tripsina

ΔA_{247} = Pendiente de la porción inicial de la curva

540 = Coeficiente de extinción molar ($L * mol^{-1} * cm^{-1}$) del TAME a 247 nm.

X = Cantidad de tripsina en la mezcla de la reacción final (mg).

3 = Volumen (mL) de la mezcla final de reacción (TRIS-HCl + TAME + enzima).

c) Determinación del contenido de sales biliares en la bilis

El objetivo de este ensayo fue conocer los milimoles de sales biliares por gramo de bilis (mmol/g), lo que permitió definir la cantidad necesaria de bilis para alcanzar una concentración de trabajo de 10mM en la fase intestinal de la digestión *in vitro* de acuerdo al protocolo INFOGEST (15).

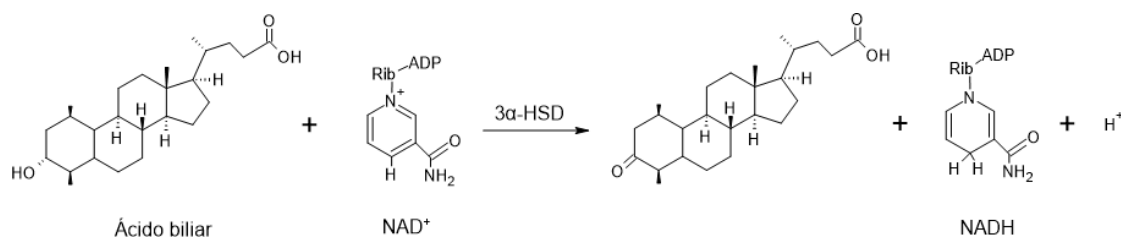


Figura 4. Reacción redox de los ácidos biliares y NAD⁺. Adaptado de Hanson et al. (87)

El método se divide en dos reacciones redox. La primera inicia por la reacción de la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD) con los doce ácidos biliares presentes en la bilis bovina, utilizando NAD⁺ como cofactor, el cual es reducido a NADH, tal como se muestra en la Figura 4.

La segunda reacción redox se da por parte del NADH generado, el cual reacciona con la diaforasa, siendo oxidado a NAD⁺ y transfiriendo electrones al agente fluorógeno, emitiendo una señal de fluorescencia siendo proporcional a la cantidad de NADH que a su vez es proporcional a la concentración de ácidos biliares (87,88).

Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el kit de determinación de ácidos biliares (MAK309) de Sigma-Aldrich, el cual contiene un estándar interno (colato de sodio), a una concentración de 80 μ M, y se preparó una dilución de 4 μ L del estándar en 46 μ L de agua ultrapura. Se preparó un reactivo de trabajo, mezclando 450 μ L de buffer de ensayo, 48 μ L de NAD, 24 μ L de probe (agente fluorógeno), 6 μ L de enzima A (3 α -HSD) y 6 μ L de enzima B (diaforasa). Además, se preparó un reactivo blanco con la misma composición del reactivo de trabajo, pero sin la inclusión de la enzima A.

La reacción se llevó a cabo en microplacas negras de fondo plano y transparente, reservando tres pocillos para la muestra, el blanco y el estándar respectivamente. En cada pocillo se colocaron 20 μ L de bilis bovina a una concentración de 15 μ g/mL. A los pocillos correspondientes a la muestra y blanco se les añadieron 5 μ L de agua ultrapura, mientras que al pocillo del estándar se le añadió 5 μ L del estándar interno. Luego, se añadieron 80 μ L del reactivo de trabajo a los pocillos de la muestra y estándar interno, mientras que al de blanco se le añadió 80 μ L del reactivo blanco. Se aplicó agitación por 10 s en el lector de microplacas, seguido de una incubación a 25°C durante 20 min. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de fluorescencia con longitudes de excitación de 530 nm y de emisión de 585 nm en una microplaca oscura/negra con fondo claro (88).

Para que los resultados sean expresados milimoles por gramo de bilis (mmol/g), se utilizó la siguiente ecuación:

$$mmol/g = \left(\frac{F_M - F_B}{F_I - F_M} * 20 \right) * X$$

Donde:

mmol/g = Milimoles por gramo de bilis.

F_M = Fluorescencia de la muestra.

F_B = Fluorescencia del blanco.

F_I = Fluorescencia del estándar interno.

20 = Concentración efectiva del estándar interno (μM)

X = Concentración inversa de bilis bovina ($mL/\mu g$)

d) *Preparación de fluidos simulados*

El objetivo de la preparación de los fluidos simulados, es poder alcanzar las concentraciones de iones secretados por los órganos que participan en la digestión, basándose en la información de los sistemas *in vivo*. Además, los fluidos simulados proporcionan el medio acuoso necesario para el correcto desempeño de las enzimas (76).

Los fluidos simulados se dividen en Fluido Simulado Salival (FSS), Fluido Simulado Gástrico (FSG) y Fluido Simulado Intestinal (FSI). Estos fluidos están compuestos en su totalidad por sales, que partieron de soluciones stock a diferentes concentraciones tal como se indica en la Tabla 7:

Tabla 7. Concentraciones de las soluciones stock.

Sal	Concentración
Cloruro de potasio - KCl	0,5 M
Fosfato monopotásico - KH_2PO_4	0,5 M
Bicarbonato de sodio - $NaHCO_3$	1 M
Cloruro de sodio - NaCl	2 M
Cloruro de magnesio hexahidratado - $MgCl_2 \cdot (H_2O)_6$	0,15 M
Carbonato de amonio - $(NH_4)_2CO_3$	0,5 M
Cloruro de calcio dihidratado - $CaCl_2 \cdot (H_2O)_2$	0,3 M

*Adaptado de Brodkorb et al. (15).

A partir de estas soluciones stock se prepararon los tres fluidos simulados utilizando las siguientes proporciones:

Tabla 8. Volumen de solución stock y concentración final de las sales en los fluidos simulados.

Sal	Fluido simulado salival (FSS)		Fluido simulado gástrico (FSG)		Fluido simulado intestinal (FSI)	
	mL	mM	mL	mM	mL	mM
KCl	1,51	15,1	0,69	6,9	0,68	6,8
KH ₂ PO ₄	0,37	3,7	0,09	0,9	0,08	0,8
NaHCO ₃	0,68	13,6	1,25	25	4,25	85
NaCl	-	-	1,18	47,2	0,96	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,05	0,15	0,04	0,12	0,11	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,006	0,06	0,05	0,5	-	-
Agua ultrapura	37,34	-	36,70	-	33,92	-

*Adaptado de Brodkorb et al. (15).

Estas concentraciones corresponden a un volumen final de 40mL alcanzando una concentración de 1,25x para cada uno de los fluidos simulados.

El cloruro de calcio dihidratado no formó parte de los fluidos simulados con la finalidad de evitar su precipitación, por lo que, esta sal fue añadida exclusivamente durante el ajuste de pH y al momento del ensayo de digestión *in vitro* alcanzando las concentraciones deseadas para las fases oral, gástrica e intestinal (1,5 mM, 0,15 mM y 0,6 mM respectivamente).

En el ensayo de digestión *in vitro*, las enzimas, bilis, CaCl₂·(H₂O)₂, ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), completaron la composición de los fluidos simulados, alcanzando la concentración de 1x (15).

e) *Ajuste de pH en cada fase de digestión*

El objetivo del ensayo del ajuste de pH, fue conocer las cantidades exactas y necesarias de HCl y NaOH para obtener los valores de pH adecuados para cada fase de digestión (gástrica: pH 3, intestinal: pH 7), con la finalidad de proporcionar el

medio adecuado para las enzimas y tengan un correcto desempeño en el proceso hidrolítico (15).

Para el ajuste de pH es necesario utilizar cada componente del proceso de digestión (incluyendo la muestra de interés), a excepción de las enzimas. En 5 tubos cónicos de 15 mL, se pesaron 50 mg de la proteína de tarwi que fue suspendida en 950 μ L, completando 1 g de muestra. Según lo indicado por Brodkorb (15), las proporciones al momento de ingresar a cada una de las fases de digestión debe ser de 1:1 (muestra : fluido simulado). Por lo anterior, se utilizaron las proporciones descritas en el Anexo 1, las cuales permitieron que los fluidos simulados se encuentren a la concentración de 1x, el $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ alcance la concentración adecuada para cada fase y se cumpla la mezcla de 1:1.

A cada uno de los tubos con 1 g de la proteína de tarwi resuspendida se le añadió 1 mL de FSS siendo llevados a incubación a 37°C en el rotador de tubos a una velocidad de 40 rpm por 2 min. Pasado este tiempo a cada tubo se le añadió 2 mL de FSG siendo homogenizados por inversión y tomando el valor inicial de pH. Luego, según el valor inicial de pH, se procedió a agregar volumen en microlitros de HCl 5 M y 1 M, cerrando y mezclando por inversión para luego ir midiendo el pH, esto fue repetido varias veces, hasta que se encontró un volumen exacto que dio un valor de pH 3. Para confirmar que el volumen fue el adecuado, a los tubos restantes se le añadió la misma cantidad de HCl 5 M y 1 M.

Para la fase intestinal, el proceso fue repetido partiendo desde el añadido del FSS a 1g de muestra, seguido del FSG y el valor de HCl 5 M y 1 M para alcanzar el pH deseado. Luego, los tubos fueron llevados a incubación a 37°C en el rotador de tubos a una velocidad de 40 rpm por 2 h. Pasado este tiempo a cada tubo se le añadió 4 mL de FSI, siendo homogenizados por inversión y tomando el valor de pH inicial. Según el valor inicial de pH, se agregó volumen en microlitros de NaOH 5 M, cerrando y mezclando los tubos por inversión para ir midiendo el pH, esto fue repetido en varias ocasiones hasta que se alcanzó el valor de pH 7. A modo de confirmación, a los tubos restantes se le añadió la misma cantidad de NaOH 5 M (15). Todo este procedimiento fue repetido para la proteína control (caseína)

2.3.3. *Implementación y aplicación del método de digestión gastrointestinal INFOGEST para la evaluación de la proteína de tarwi y proteína de control*

Para la implementación del método INFOGEST, se llevó a cabo el proceso digestivo incorporando la muestra de interés (proteína de tarwi y proteína de control caseína) según lo indicado por Brodkorb (15) con algunas modificaciones. Dado que el material de estudio consistía casi su totalidad por proteína, se adaptó el protocolo según la siguiente figura:

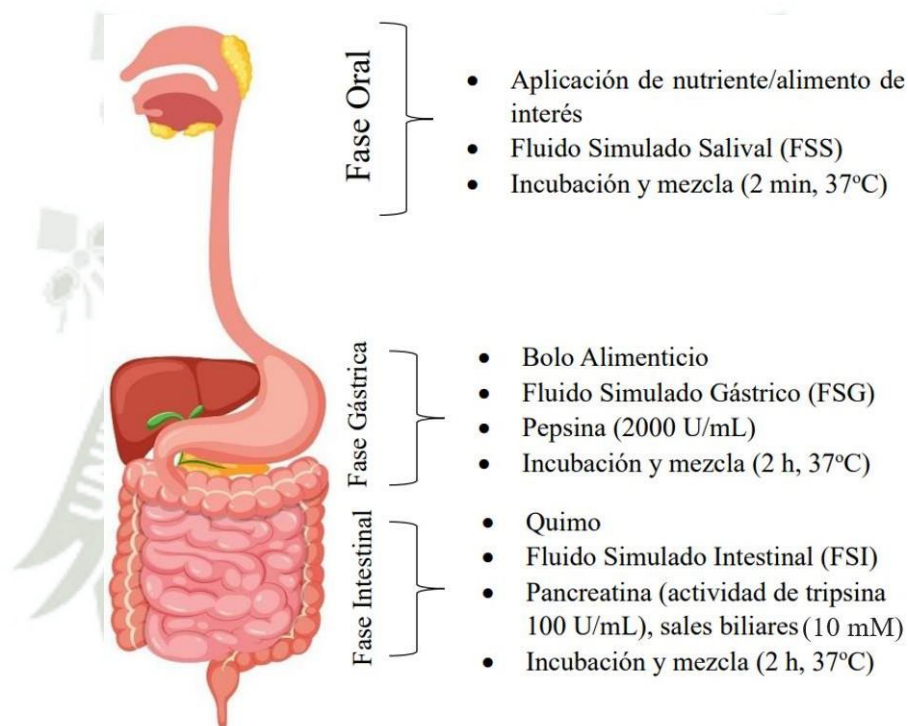


Figura 5. Protocolo general del método de digestión estática *in vitro*. Adaptado de Brodkorb et al. (15).

El método de digestión *in vitro* fue aplicado a cada una de las proteínas de interés y se evaluó el comportamiento de las variables en cada una de las fases de digestión (gástrica e intestinal) a diferentes tiempos de hidrólisis. Se realizaron cuatro réplicas biológicas

para cada tiempo seleccionado. El diseño experimental de la investigación se presenta en la Figura 6.

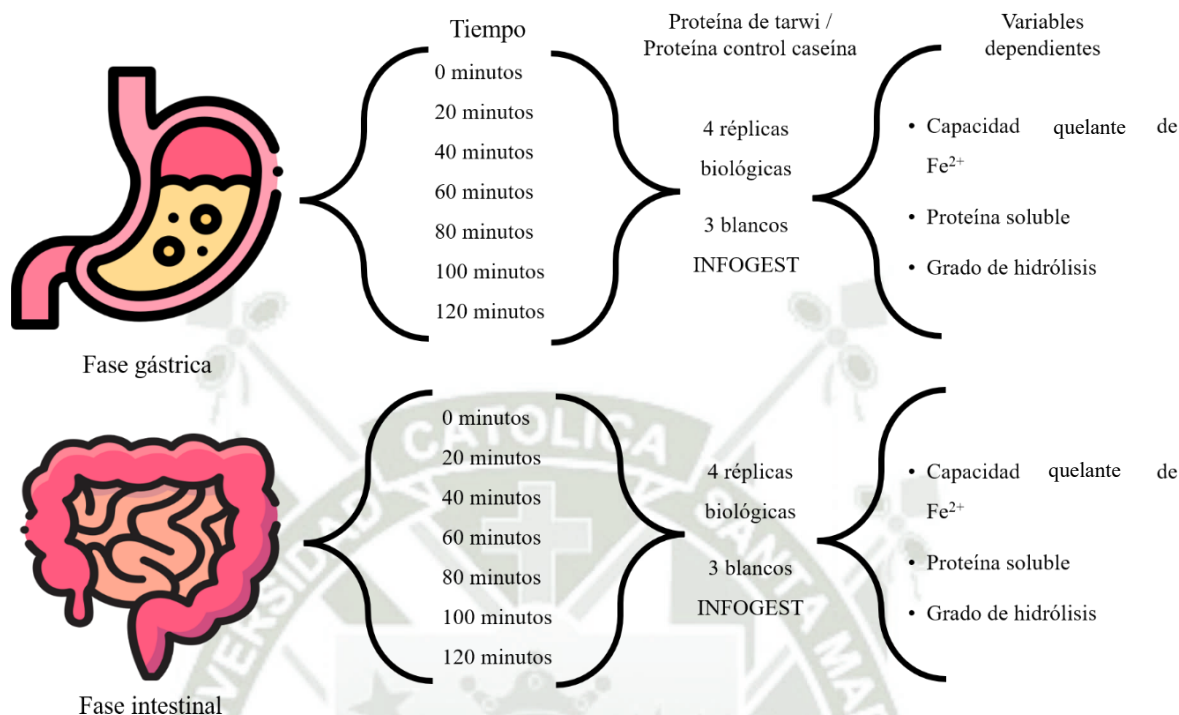


Figura 6. Diseño experimental aplicado en la presente investigación. Elaboración propia.

El método de digestión *in vitro* con la proteína de tarwi y la proteína control, se inició con la suspensión de 50 mg de la muestra en 950 μ L de agua ultrapura en tubos cónicos, alcanzando 1 g de muestra (para cada uno de los tiempos evaluados se consideraron 3 blancos de digestión, los cuales consistían en 1 mL de agua reemplazando el gramo de muestra).

Se prepararon los fluidos simulados y se calentaron por medio de incubación a 37°C hasta su uso. Terminado los procesos descritos previamente, se procedió a la digestión *in vitro* siendo dividido en las siguientes fases:

a) Fase oral

Esta fase marca el comienzo del proceso de digestión. En esta fase, la muestra suspendida en agua se mezcló con el FSS, CaCl₂·(H₂O)₂ y agua, en diferentes proporciones (Anexo 3) y se colocaron en el rotador de tubos a condiciones adecuadas. Al terminar esta fase se dio la formación del bolo alimenticio.

b) Fase gástrica

En esta fase se llevó a cabo la mezcla del bolo alimenticio con el FSG, HCl, CaCl₂·(H₂O)₂, agua y pepsina porcina, en diferentes proporciones (Anexo 3) y se

colocaron en el rotador de tubos a condiciones adecuadas. Terminada el tiempo de esta fase se dio la formación del quimo.

c) Fase intestinal

En esta fase, se llevó a cabo la mezcla del quimo obtenido en la fase anterior con el FSI, NaOH, $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, sales biliares, agua y pancreatina, a diferentes proporciones (Anexo 3), fueron colocados en el rotador de tubos a condiciones adecuadas.

El procedimiento fue dividido en dos partes con el objetivo de evaluar la variabilidad de la capacidad quelante de Fe^{2+} , el contenido de proteína soluble y el grado de hidrólisis proteico en cada fase digestiva a los diferentes tiempos según lo indicado en la Figura 6.

Las fases digestivas evaluadas fueron la digestión hasta la fase gástrica y una digestión completa. Al finalizar el proceso digestivo en los tiempos establecidos los hidrolizados se sometieron a inactivación enzimática en agua a 95°C durante 10 min. Luego, se enfriaron en un baño de agua fría por 5 min y se centrifugaron a $5000 \times g$ por 15 min a 5°C . Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20°C . Las Figuras 7 y 8 muestran los procesos de digestión de las fases evaluadas.

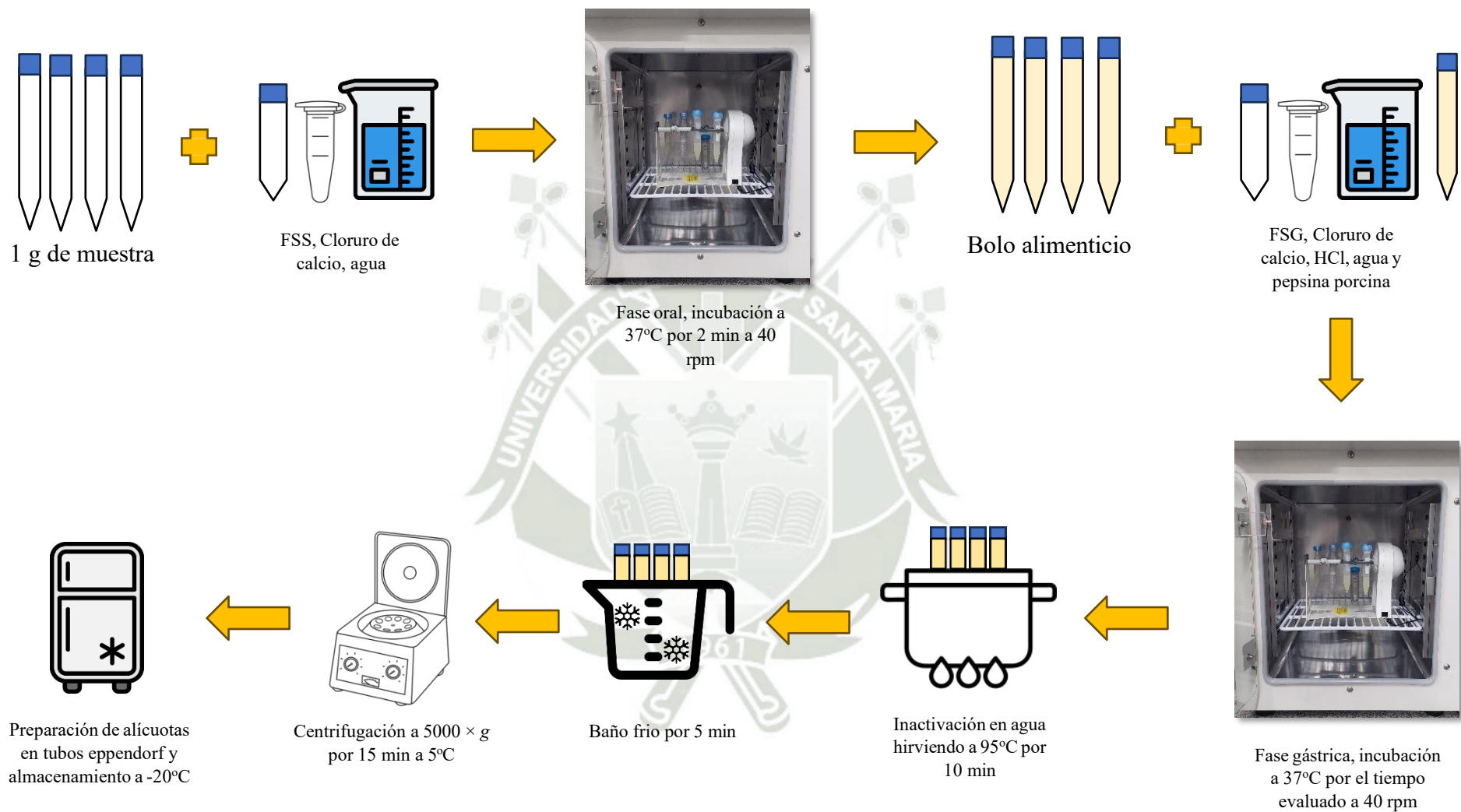


Figura 7. Digestión in vitro fase oral y gástrica aplicado a la proteína de tarwi y la proteína control. Elaboración propia.

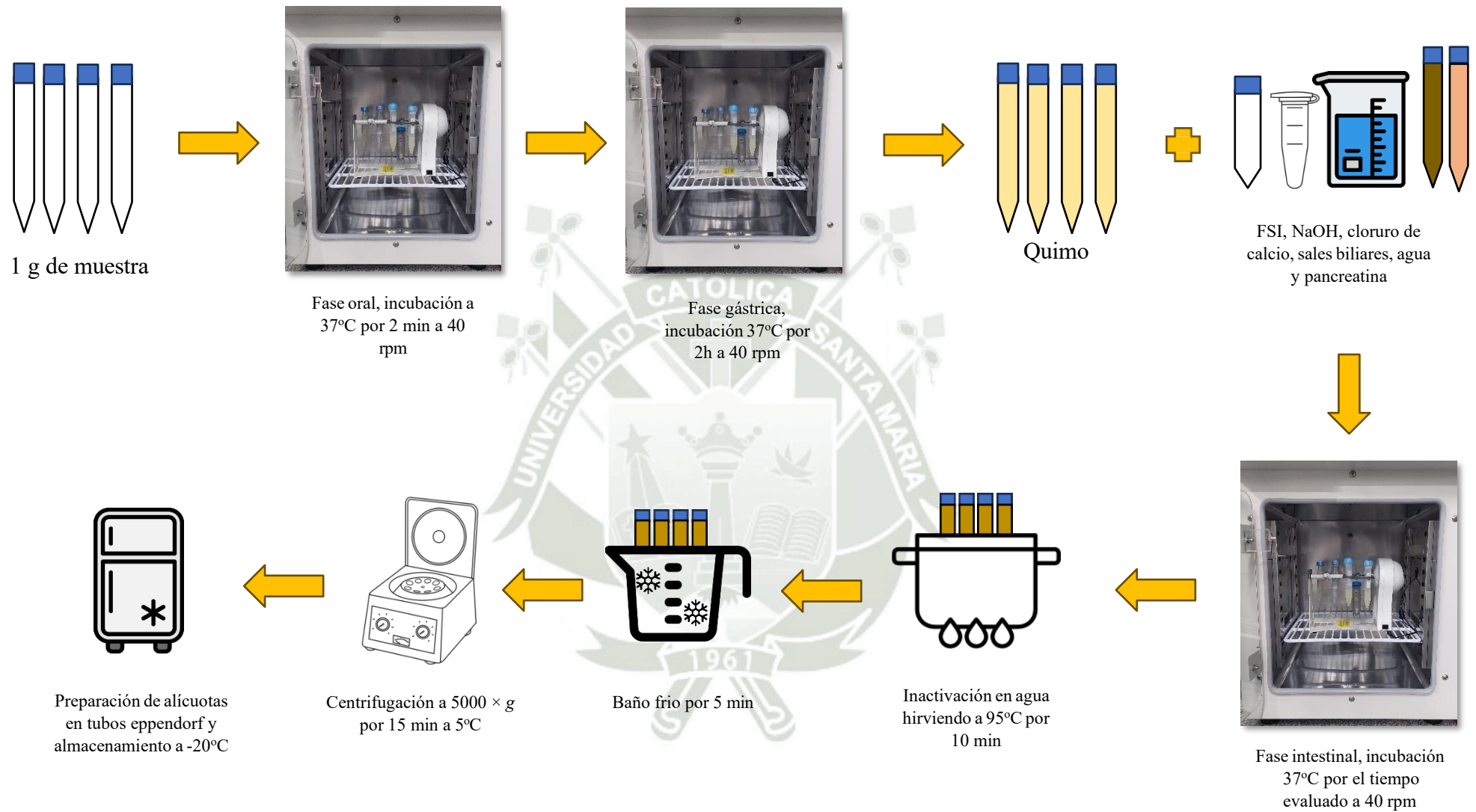


Figura 8. Digestión in vitro hasta fase intestinal aplicado a la proteína de tarwi y la proteína control. Elaboración propia.

2.3.4. Métodos de análisis de los hidrolizados

a) Capacidad quelante de Fe^{2+}

La capacidad queladora fue determinada por el método utilizado por Arise (89) con algunas modificaciones. Esta metodología se basa en la reacción de la Ferrozina con el hierro libre presente en la muestra de estudio, luego de que se le haya suministrado una fuente ferrosa (sulfato ferroso).

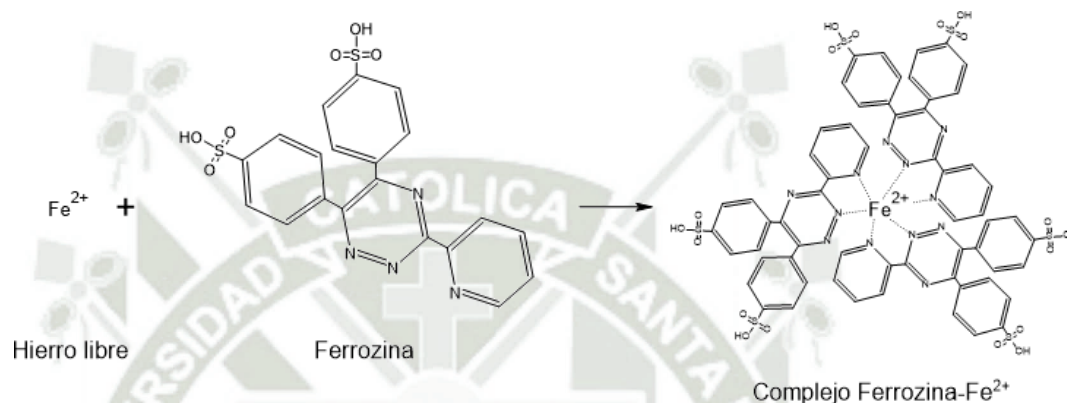


Figura 9. Formación del complejo Ferrozina- Fe^{2+} . Tomado de Smith et al. (90).

La ferrozina actúa como agente quelante del hierro en su forma ferrosa, al reaccionar, se formará un complejo que presenta coloración violeta tal como se muestra en la Figura 9. La absorbancia de este complejo es medida por medio de un lector de microplacas a una longitud de onda de 562 nm. En el caso de los péptidos, la capacidad quelante de Fe^{2+} se determinó de forma indirecta y se expresó en función de la menor formación del complejo Ferrozina- Fe^{2+} . Una menor intensidad de color indica una mayor capacidad quelante, calculada como la diferencia entre el valor obtenido y un control (91).

Para llevar a cabo este análisis, se mezclaron 1000 μL de la muestra diluida, con un factor de dilución obtenido previamente, con 50 μL de sulfato ferroso heptahidratado 2 mM, iniciando su tiempo de reacción de 60 min. Dentro del tiempo de reacción, se añadió 1,85 mL de agua ultrapura y se mantuvo cubierto de la luz. Al final de los 60 min, se añadió 100 μL de Ferrozina 5 mM y se transfirió 200 μL de la solución de reacción a una microplaca que fue leída a una longitud de onda de 562 nm. Para una mayor especificidad, se realizó el mismo ensayo para el tubo blanco del método de

digestión, llamado control solvente de extracción, en el que se utilizó el mismo factor de dilución de la muestra y siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente. Para este ensayo se incluyó un control, reemplazando la muestra por agua ultrapura. Además, se hizo un blanco de reacción, en el que se reemplazó la muestra y la fuente de hierro por agua ultrapura. Se realizó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de sulfato ferroso como fuente de hierro (89).

Los resultados fueron expresados como microgramos de hierro (II) por miligramos de proteína expresada como ASB ($\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$), para lo cual se realizó la siguiente serie de cálculos:

$$HNQM = (HC - HM) - (HC - HCSE)$$

Donde:

HNQM: Hierro neto quelado por la muestra ($\mu\text{g de Fe}^{2+}$).

HC: Hierro del control ($\mu\text{g de Fe}^{2+}$, hallado por medio de la curva).

HM: Hierro de la muestra ($\mu\text{g de Fe}^{2+}$, hallado por medio de la curva).

HCSE: Hierro del blanco de digestión ($\mu\text{g de Fe}^{2+}$, hallado por medio de la curva).

Para la expresión final fue necesario conocer el valor de proteína soluble, el cual fue determinado por el método de Lowry (descrito en el siguiente punto) resultado es expresado en mg ASB/mL. Luego, se determinó la cantidad de proteína que ingresó en la reacción de capacidad queladora, utilizando la siguiente ecuación:

$$P = PS * \frac{1}{FD}$$

Donde:

P: Cantidad de proteína que ingresó a la reacción (mg ASB).

PS: Contenido de proteína soluble en función al ASB (mg/mL).

FD: Factor de Dilución.

Por último, se realizó el siguiente cálculo:

$$CQ = \frac{HNQM}{P}$$

Donde:

CQ = Capacidad quelante de Fe^{2+} ($\mu g Fe^{2+}/mg$ ASB).

HNQM = Hierro neto quelado por la muestra (μg de Fe^{2+}).

P = Cantidad de proteína que ingresó a la reacción (mg ASB).

Además, los resultados también fueron expresados como porcentaje de inhibición (%), para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$PI = \left(\frac{A_c - A_m}{A_c} \right) * 100$$

Donde:

PI: Porcentaje de inhibición (%), porcentaje de hierro quelado por la muestra).

A_c : Absorbancia neta del control a 562 nm.

A_m : Absorbancia neta de la muestra a 562 nm.

b) Determinación del contenido de proteína soluble

El contenido de proteína soluble fue determinado por el método planteado por Lowry (92).

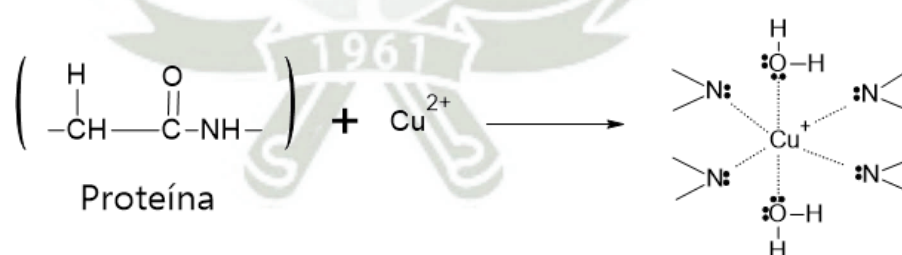


Figura 10. Reacción de la proteína con el ion cúprico. Adaptado de Lowry et al. (92).

Este método se divide en dos partes y ocurre en condiciones alcalinas. La primera parte del ensayo inicia con la reacción de la proteína con iones cúprico (Cu^{2+}), resultando en la formación de un complejo de proteína y cobre en su estado cuproso (Cu^+), tal como se muestra en la Figura 10.

En la segunda parte del ensayo ocurre una reacción redox en la cual el reactivo Folin-Ciocalteu se reduce en presencia de ciertos aminoácidos aromáticos y Cu^+ , produciendo Cu^{+2} y un complejo reducido de coloración azul, cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 750 nm (93).

Para llevar a cabo este análisis, se mezclaron 400 μL de la muestra diluida, con un factor de dilución obtenido previamente, con 2 mL de Reactivo C. El Reactivo C es una mezcla de soluciones de carbonato de sodio al 2% (preparado en 0.1 M de NaOH), tartrato de sodio y potasio al 1% y sulfato cúprico al 0.5%, en una proporción de 100:1:1. La mezcla de la muestra y el Reactivo C se dejó en reposo por 10 min., pasado este tiempo se le añadió 200 μL del reactivo Folin Ciocalteu 1N. La solución fue incubada por 60 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. El contenido de proteína soluble de la muestra se calculó mediante una curva de calibración usando Albumina Sérica Bovina (ASB), como muestra a diferentes concentraciones y los resultados fueron expresados en miligramos por mililitro (mg/mL) en función a la ASB (Anexo 3a) (92).

c) Determinación de grado de hidrólisis proteico

La determinación del grado de hidrólisis proteico fue realizado por el método de Adler-Nissen (94).

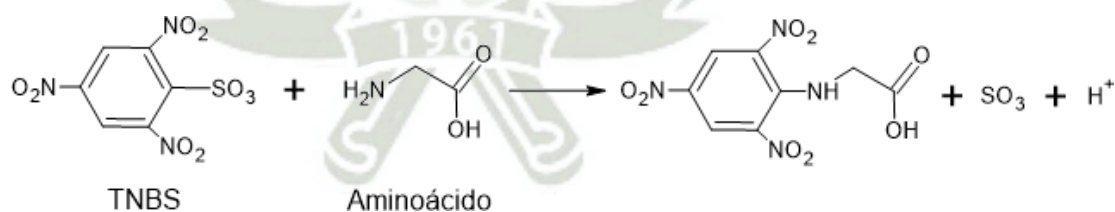


Figura 11. Reacción de TNBS con grupos aminos primarios. Tomado de Adler-Nissen (94).

Como se muestra en la Figura 11, la reacción se da entre la solución del ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) con los grupos aminos primarios presentes en los hidrolizados en condiciones alcalinas, haciendo que el TNBS libere su ion 2,4,6-trinitrofenil (TNF), que al unirse a los grupos aminos, forma un derivado trinitrofenil-

amino, que resulta en la formación de un complejo coloreado, cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 340 nm (94,95).

Para llevar a cabo este análisis, se mezclaron 63 μ L de la muestra diluida, con un factor de dilución obtenido previamente, con 0,5 mL de buffer fosfato de sodio 0,2125 M (pH 8,2). Posterior a ello, se añadieron 0,5 mL de TNBS al 0,1% con vortex y se dejó a incubar a 50°C por 60 min protegido de la luz en un baño maría. La reacción fue detenida con 1 mL de HCl 0,1 N y se mantuvo en reposo durante 20 min aun protegido de la luz, luego se agregó 2 mL de agua ultrapura y se dejó reposar por 10 min protegido de la luz. La lectura de absorbancia se hizo a una longitud de onda de 340 nm. Se realizó una curva de calibración usando L-leucina a diferentes concentraciones para calcular el contenido de aminoácidos derivados de la reacción hidrolítica como mM de leucina (Anexo 3b) (94).

Posteriormente, los resultados fueron expresados en “mg de Leucina/g de proteína”, para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{mg de Leucina/g de proteína} = \text{mM} * 131,17 * \left(\frac{V}{G}\right) * \text{FD1} * \text{FD2}$$

Donde:

mM: mmoles de Leucina por litro, obtenidos a partir de la curva de calibración (mmol/L)

131,17: Peso molecular de L-leucina (g/mol)

V: Volumen de reacción del proceso hidrolítico (L)

G: Cantidad de proteína presente en la muestra inicial (g), en base al porcentaje proteico (determinado por micro Kjeldahl de la mezcla total del tubo de digestión).

FD1: Factor de dilución del proceso hidrolítico.

FD2: Factor de dilución aplicado en el ensayo.

Para que los resultados sean expresados en términos de porcentaje (%), fue necesario conocer el valor de una hidrólisis total de todos los reactivos y biocomponentes que forman parte de la digestión. Este procedimiento se realizó por medio de una hidrólisis química total de la muestra, los fluidos simulados, las enzimas y las sales biliares. Esta hidrólisis química total se realizó con HCl 6M a 110°C por 24 horas, para luego pasar por un proceso de filtración en papel Whatman N° 1 y ser

neutralizado con NaOH 2N. Una vez obtenido este dato, se utilizó la siguiente ecuación:

$$GH = \left(\frac{HI}{HQ}\right) * 100$$

Donde:

GH = Grado de hidrólisis en porcentaje (%).

HI = Muestra hidrolizada por el proceso hidrolítico de interés (mg de Leucina/g de proteína)

HQ = Muestra hidrolizada completamente por un proceso químico (mg de Leucina/g de proteína)

2.3.5. *Análisis estadístico*

Los análisis estadísticos se realizaron con el software R (versión 4.4.1.). Primero se evaluaron los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (test de Levene). Cuando ambos supuestos se cumplieron, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En los casos donde no se cumplieron, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Posteriormente, cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), se realizaron pruebas de comparación múltiple: test HSD de Tukey para ANOVA y Bonferroni para Kruskal-Wallis.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Implementación del método de digestión gastrointestinal *in vitro* INFOGEST

3.1.1. Actividad enzimática de pepsina

Tal como se menciona en el punto 2.3.2., la actividad enzimática de la pepsina fue evaluada a diferentes concentraciones y, los resultados son presentados en la Tabla 9. Como se observa, se ve un comportamiento similar respecto a la actividad entre cada una de las concentraciones, dando un valor promedio de 3143,7 U/mg \pm 102,8, valor superior a lo obtenido por Wang (84), quienes obtuvieron una actividad específica de 2661 U/mg.

En la Figura 12 se observa la relación entre la concentración de pepsina y su actividad enzimática, mostrando una tendencia lineal, lo que indica que la actividad se mantiene constante con el incremento de la concentración de la enzima. El valor promedio mencionado fue utilizado para determinar la cantidad necesaria de la enzima a utilizar en todos los ensayos de digestión en la fase gástrica.

Tabla 9. Actividad enzimática de pepsina. Elaboración propia.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Δ Abs. (280 nm)	Actividad (U/mg)
10	0.301	3010.0
15	0.486	3240.0
20	0.616	3080.0
25	0.794	3176.0
30	0.916	3053.3
35	1.103	3151.4
40	1.318	3295.0

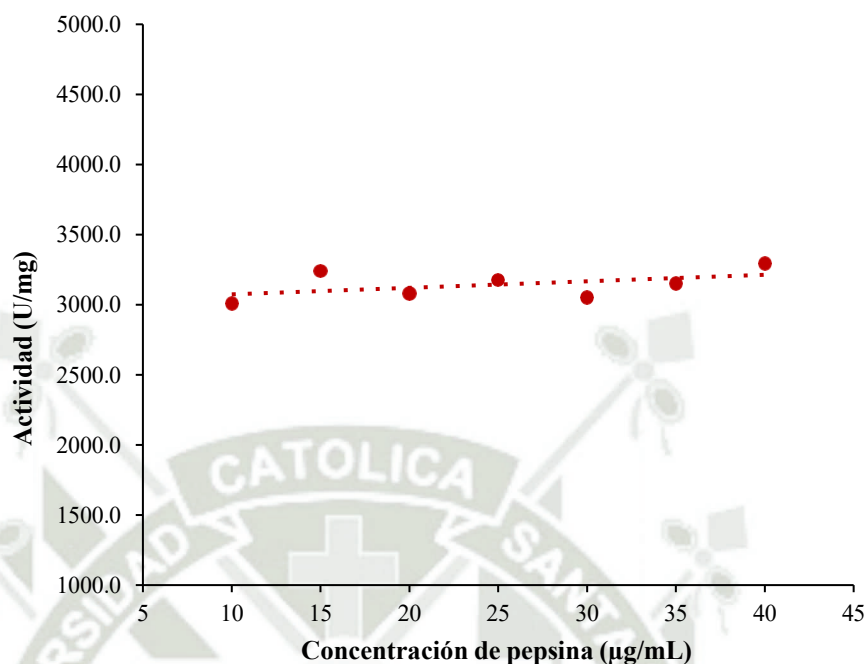


Figura 12. Relación entre la concentración de pepsina y su actividad enzimática.

Elaboración propia.

3.1.2. *Actividad enzimática de tripsina*

La actividad enzimática de la tripsina fue evaluada a 3 diferentes concentraciones, la cinética enzimática se puede observar en la Figura 13. Los resultados de este ensayo se observan en la Tabla 10. Los valores oscilaron entre 7,25 y 7,40 U/mg, obteniendo un valor promedio de $7,33 \text{ U/mg} \pm 0,08$, este valor fue superior a lo obtenido por Costa-Santos (96) y por Wang (84) quienes encontraron un valor de 5,4 U/mg y 6,1 U/mg respectivamente. Por lo que la determinación de las actividades enzimáticas es crucial para el cálculo de la cantidad de enzima a utilizar en la fase intestinal y gástrica en el caso de la pepsina, ya que puede ocurrir variabilidad de la actividad por lote de producción aún del mismo fabricante, o por otros factores (15). Este valor de actividad específica fue utilizado para la preparación de la enzima en todos los ensayos de digestión.

Tabla 10. Actividad enzimática de la tripsina

Concentración (mg/mL)	Cantidad de tripsina (mg)	Pendiente del blanco	Pendiente de la enzima	Actividad (U/mg)
0,450	0,045	0,00	0,059	7,34
0,500	0,050		0,066	7,40
0,550	0,055		0,072	7,25

* Elaboración propia.

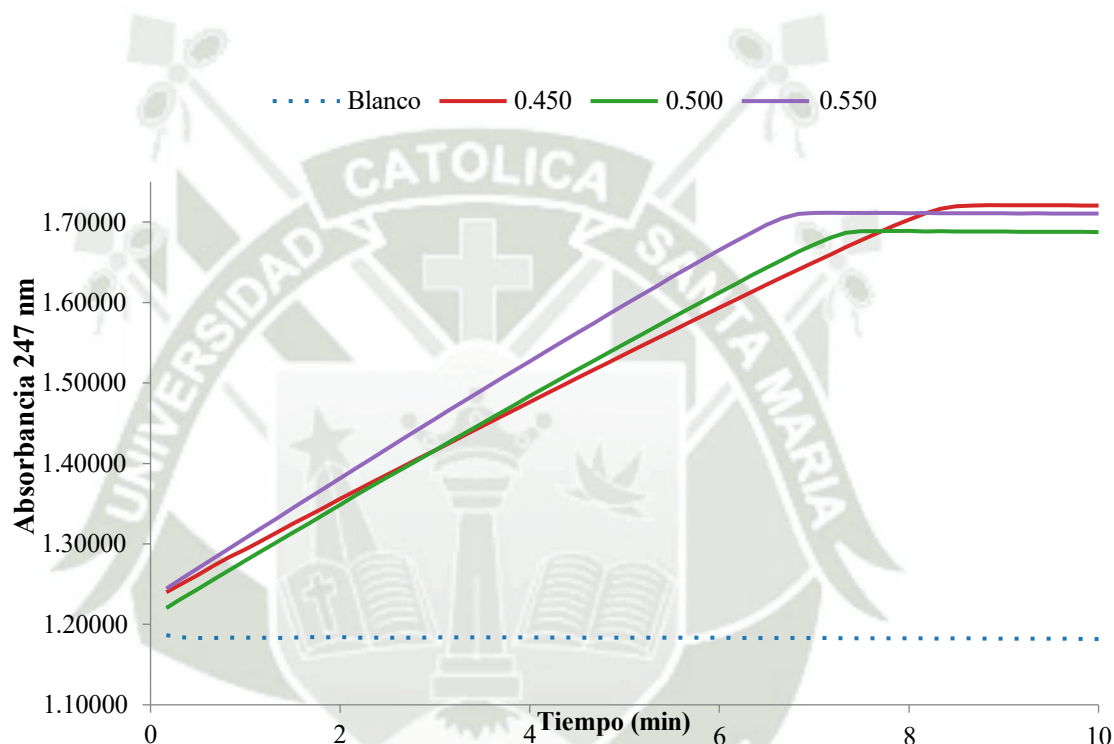


Figura 13. Cinética de la actividad enzimática de la tripsina. Elaboración propia.

3.1.3. Concentración de sales biliares

Utilizando el kit y el procedimiento según Sigma-Aldrich (88), luego de la lectura y los cálculos respectivos, se logró encontrar la concentración específica de sales biliares en la bilis bovina con valores que son presentados en la Tabla 11, del cual se obtuvo un valor promedio de 1,64 mmol/g, valor cercano a lo obtenido por Sabet (97) con una concentración de 1,4 mmol/g, aunque superior a lo obtenido por Costa-Santos (84) quienes obtuvieron una concentración de 0,667 mmol/g. Este valor fue utilizado para calcular la cantidad de bilis bovina a utilizar en todos los ensayos de digestión.

Tabla 11. Determinación del contenido de sales biliares en la bilis

Réplica	Fluorescencia			Concentración	Concentración
	Muestra	Blanco	Estándar	(μM)	(mmol/g)
1	25572	3275	42745	25,97	1,73
2	26096	3163	45932	23,12	1,54

*Elaboración propia.

3.1.4. Ajuste de pH y proporciones a usar en los tubos de reacción del método INFOGEST

El ajuste de pH fue el paso final como parte de las etapas previas y de la implementación del método INFOGEST, resultando en un valor de 17 μL y 24 μL de HCl 5 M y 1 M respectivamente para la proteína de tarwi, mientras que para la caseína fue de 12 μL y 20 μL , esto correspondiente al ingreso de la fase gástrica de ambas proteínas.

Para la fase intestinal, fue necesario usar 19 μL de NaOH 5 M para la proteína de tarwi, mientras que para la caseína se utilizó 0,5 μL de NaOH 1 M.

Luego de obtener los valores de ácido y base para alcanzar el pH objetivo, se pudo determinar las proporciones que se utilizaran en cada tubo de reacción para la proteína de tarwi y para la caseína (Anexo 2).

Lo que corresponde al término de la implementación del método INFOGEST, que incluye la digestión en cada una de las fases, las proporciones de cada componente y todo el proceso que forma parte del mismo, se encuentra detallado en el Capítulo 2 de Materiales y métodos (Punto 2.3.3.)

3.2. Evaluación del contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe^{2+} en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi y la proteína control (caseína) durante etapas de digestión oral y gástrica

Luego de la implementación del método de digestión gastrointestinal *in vitro* INFOGEST, la proteína de tarwi fue sometida a este proceso de digestión estático y se contrastó con una proteína de control como la caseína (origen animal). En la fase oral no se utilizó la enzima alfa amilasa por la naturaleza de las muestras (proteína de tarwi y caseína) las cuales tuvieron un 76% y 99% de contenido de proteína respectivamente, por lo que únicamente las muestras fueron homogenizadas por 2 min. Por lo tanto, no hubo digestión en esta fase.

Durante el proceso de digestión gástrica, se tomaron muestras de los hidrolizados generados de cada proteína y se evaluaron el contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe^{2+} .

3.2.1. Contenido de proteína soluble

En la Figura 14 se presenta la evolución del contenido de proteína soluble en las muestras de hidrolizados de la proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase gástrica.

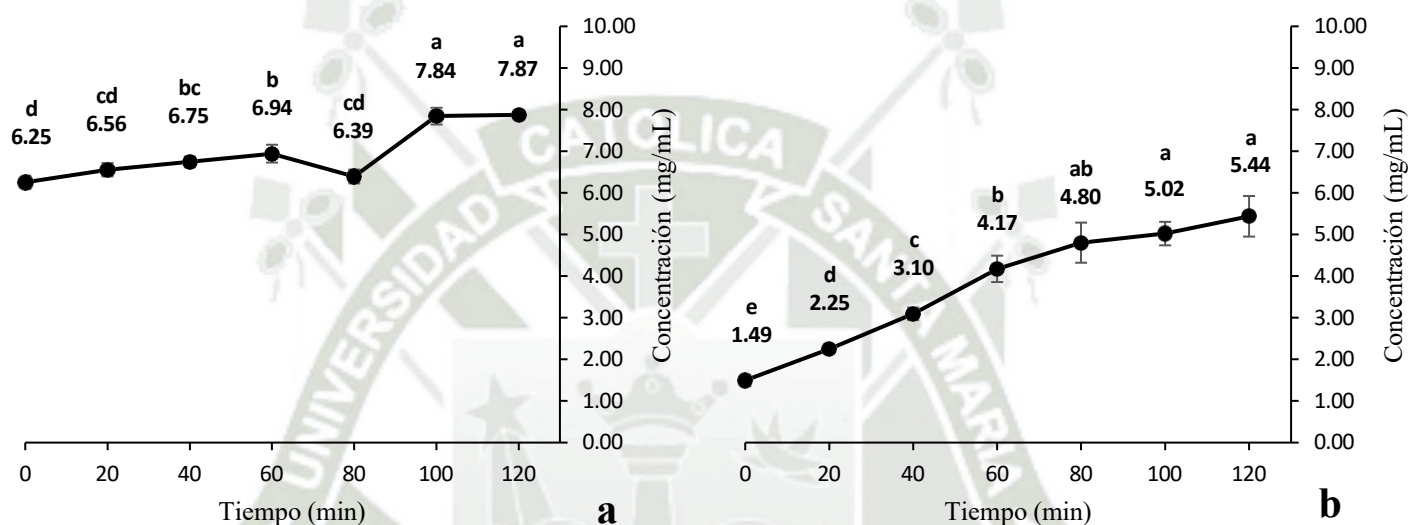


Figura 14. Contenido de proteína soluble durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión ($p < 0.05$). Elaboración propia.

El contenido de proteína soluble en el caso de la proteína de tarwi tuvo una tendencia casi constante desde el tiempo 0 min ($6,25 \text{ mg/mL} \pm 0,15$) hasta los 80 min ($6,39 \text{ mg/mL} \pm 0,17$), para luego aumentar significativamente a los 100 min ($7,84 \text{ mg/mL} \pm 0,20$), permaneciendo constante hasta el final de la digestión gástrica. Por otro lado, en el caso de la caseína la proteína soluble tuvo un aumento continuo desde el tiempo 0 min ($1,49 \text{ mg/mL} \pm 0,13$) finalizando a los 120 min ($5,44 \text{ mg/mL} \pm 0,49$), aumentando su valor en aproximadamente 4 mg/mL al término del tiempo de digestión gástrica.

No se han encontrado estudios específicos sobre la evolución del contenido de proteína soluble durante la hidrólisis de la proteína de tarwi o de otras leguminosas bajo la acción

de pepsina. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparables a los reportados en estudios previos para proteínas lácteas, como la caseína.

El aumento progresivo en el contenido de proteína soluble observado para el caso de la caseína fue consistente con los hallazgos de Miltenburg et al. (103), quienes reportaron un incremento similar al hidrolizar leche de vaca con pepsina, con un valor inicial de 7 % hasta alcanzar un valor de 30 % de proteína soluble al terminar los 60 min de digestión, utilizando el método de ácido bicinónico (BCA). Respecto a otras proteínas, la caseína, es una proteína menos resistente a la acción de la pepsina, debido a su estructura menos compacta y conformación más desordenada, lo que facilita su digestión en la fase gástrica (104). Asimismo, en otra investigación, Ren et al. (105) al hidrolizar una mezcla en proporción de 80:20 de caseína y suero de leche con pepsina, observó un leve aumento del valor de proteína soluble desde 4 mg/mL al iniciar la digestión (0 min) hasta 5 mg/mL tras 60 min de digestión.

En el presente trabajo, el contenido inicial (0 min) de proteína soluble en el caso de la proteína de tarwi fue mayor que el de la caseína. Esto puede ser debido a la naturaleza más hidrofílica de la proteína del tarwi, compuesta principalmente por globulinas y en menor proporción por albúminas. Las albúminas son solubles en agua, mientras que las globulinas, presentan solubilidad en soluciones salinas (26,120). La caseína, en cambio, forma estructuras micelares compactas que resisten la solubilización inicial, lo que limita la liberación de proteína soluble al comenzar la digestión (115). La exposición de las proteínas a los fluidos simulados (INFOGEST) pudo haber promovido la apertura parcial de sus estructuras tridimensionales por la acción de los iones, facilitando un leve incremento de la solubilidad en el tarwi y un ascenso progresivo en la caseína (98,115).

Sin embargo, el contenido de proteína soluble fue más estable en el tiempo en el caso del tarwi en comparación con la caseína, indicando un menor efecto de la acción de la pepsina sobre esta proteína vegetal. Las proteínas animales presentan una mayor digestibilidad a nivel gástrico en comparación con las vegetales, lo que se atribuye a su estructura menos compacta y una mayor accesibilidad a la acción de enzimas como la pepsina (104,124). En contraste, componentes característicos de las matrices vegetales, como inhibidores de proteasas y antinutrientes (por ejemplo, fitatos y taninos), pueden interferir con la actividad enzimática y reducir la eficiencia del proceso digestivo (124,125). Estos resultados se relacionan con el menor grado de hidrólisis observado en

la proteína de tarwi versus la caseína al final del proceso gástrico, como será presentado más adelante.

Durante la fase gástrica, el aumento de proteína soluble en ambas muestras (aunque menor en el caso de la proteína de tarwi) se debió tanto a la acción progresiva de la pepsina, que hidroliza enlaces peptídicos, como a la desestabilización de las estructuras proteicas (78). La pepsina tiene un rango de pH de actividad óptima de 1,5 – 2,5, cercano al valor inicial observado en el presente estudio facilitando, por lo tanto, la hidrólisis proteica y, por ende, la liberación de fragmentos solubles (78). La caseína presentó un incremento más sostenido debido a la desestructuración progresiva de sus micelas frente a la acción de la enzima y por la acidificación del medio (115).

3.2.2. Grado de hidrólisis

En la Figura 15 se presenta la evolución del grado de hidrólisis en las muestras de hidrolizados de proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase gástrica.

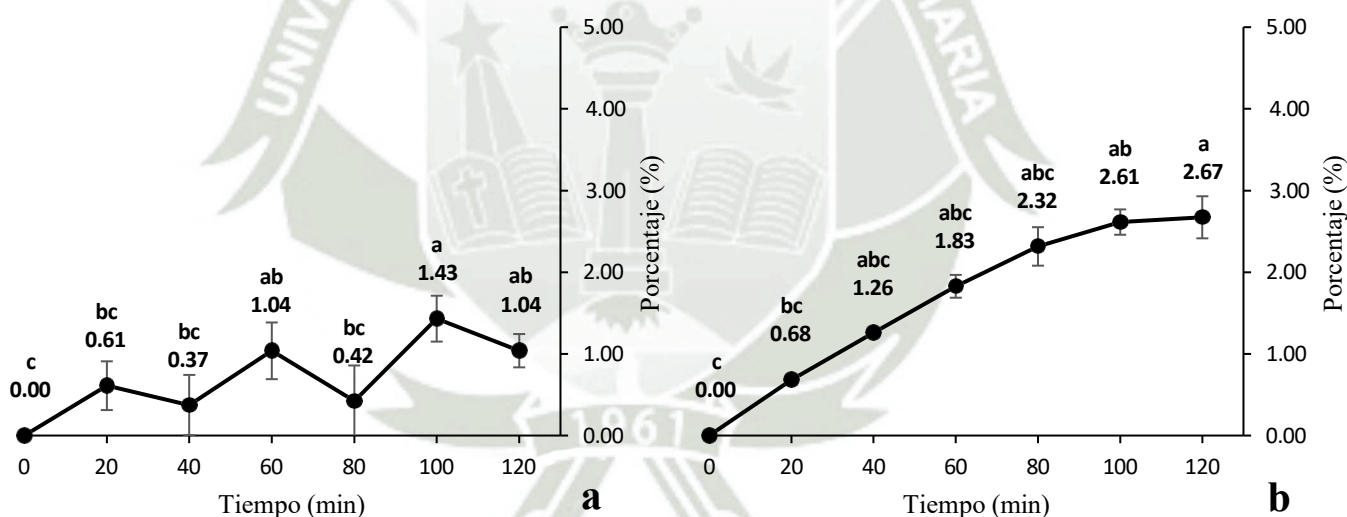


Figura 15. Grado de hidrólisis durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar (n = 4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión (p < 0.05).

Elaboración propia.

El grado de hidrólisis de la proteína de tarwi por acción de la pepsina tuvo una tendencia variable, aumentando levemente a los 100 min (1,43 % \pm 0,28), manteniéndose a un valor similar hasta el final de la fase gástrica. Lo contrario fue observado en el caso de

la caseína, donde el grado de hidrólisis tuvo un aumento progresivo al aumentar el tiempo de digestión, alcanzando un nivel máximo a los 120 min ($2,67 \% \pm 0,26$), valor superior comparado al alcanzado en el caso de la proteína de tarwi. Las leves variaciones en 60 y 100 min podrían deberse a fluctuaciones del sistema estático *in vitro*, donde la limitada difusión y el menor contacto de la pepsina con el sustrato generan diferencias puntuales.

Varios estudios han determinado el grado de hidrólisis de diversas proteínas vegetales utilizando pepsina, lo cual permite establecer comparaciones con la proteína de tarwi. Un valor similar al obtenido en el presente trabajo fue reportado por Reynaud et al. (101), quienes evaluaron tofu (derivado de soya) utilizando el protocolo INFOGEST. En dicho estudio, el grado de hidrólisis fue de 0,5 % al primer minuto, alcanzando un máximo de 1,9 % a los 120 min, con una tendencia variable a lo largo del tiempo de forma similar a lo observado en la proteína de tarwi del presente estudio.

Asimismo, Budseekoad et al. (99), evaluaron la hidrólisis con pepsina de la proteína de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) con un porcentaje proteico de 85 % de pureza, obteniendo un grado de hidrólisis de aproximadamente 4 % a los 120 min. Mientras que la hidrólisis con pepsina de un aislado proteico de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alta pureza (88%), presentó una variación del grado de hidrólisis de 4 % a 7% desde el inicio al término de la digestión (90 min) (102). Las diferencias pueden deberse a diversos factores como la naturaleza de cada tipo de proteína. Adicionalmente, las condiciones de hidrólisis en los 2 estudios previos no corresponden a los utilizados en el método INFOGEST, lo cual también puede explicar las diferencias observadas. Además, los estudios de esta variable utilizando el método INFOGEST como modelo de digestión *in vitro* son escasos.

En cuanto a las proteínas lácteas, Abrahamse et al. (127) realizaron digestión por medio del método INFOGEST a proteína de leche materna (lactoferrina, fracciones de caseína y suero de leche) y fórmulas lácteas para infantes (compuesta en su mayoría por fracciones de caseína y fracciones de suero), en ambos casos reportaron un grado de hidrólisis del 6 % luego de 120 min de digestión a nivel gástrico. Wu et al. (106) indicaron que la proteína de suero de leche alcanzó un 3 % de hidrólisis a los 60 min y un 6 % a los 120 min bajo acción de pepsina, lo cual pone en evidencia la mayor

susceptibilidad de las proteínas lácteas a esta enzima, posiblemente por su composición aminoacídica más favorable.

Asimismo, Shun et al. (128) aplicaron el protocolo INFOGEST para evaluar la digestibilidad de diversas fuentes proteicas, incluyendo tres aislados de proteínas vegetales (soya, guisante y garbanzo) y dos proteínas lácteas (caseína y suero de leche). Tras la fase gástrica, los grados de hidrólisis obtenidos para los aislados vegetales fueron de 3,60 %, 3,21 % y 3,32 %, respectivamente. En contraste, las proteínas lácteas presentaron valores de 4,61 % para la caseína y 2,82 % para el suero, siendo notable la mayor hidrólisis de la caseína. Adicionalmente, Jadhav et al. (129) evaluaron el grado de hidrólisis de proteína de guisante y de suero de leche mediante el protocolo INFOGEST, obteniendo valores al término de la fase gástrica de 2,63 % y 9,43 %, respectivamente. Estos resultados confirman que las proteínas de origen animal presentan una mayor susceptibilidad a la hidrólisis gástrica en comparación con las proteínas vegetales.

Los resultados de la presente investigación sugieren que la caseína es más susceptible a la hidrólisis gástrica que la proteína de tarwi bajo las condiciones del método INFOGEST, lo cual puede estar relacionado principalmente a la composición aminoacídica de cada proteína. La pepsina es una endopeptidasa, y actúa preferentemente sobre enlaces peptídicos adyacentes a aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano (99). La caseína presenta una mayor proporción de estos aminoácidos (11,28 %) mientras que la proteína de tarwi contiene un 7,8 %, lo que representa una diferencia a favor de la proteína de origen animal (26,121). Esto sugiere que las proteínas animales contienen una mayor cantidad de aminoácidos aromáticos en comparación con las proteínas vegetales, aunque esto puede variar según la fuente y naturaleza de la proteína (126).

En general, el grado de hidrólisis alcanzado para ambas proteínas evaluadas no superó al 3 % al final de la fase gástrica, niveles bajos comparados con los alcanzados al final de la fase intestinal. Estas diferencias en el grado de hidrólisis al final de una digestión gástrica e intestinal también fueron reportadas por Reynaud, Abrahamse y Shun (101, 127,128).

En el presente estudio se observó un aumento del pH de 3,10 (tiempo cero) a 4,22 (tiempo 120 min) durante la hidrólisis de la caseína, y de 3,02 (tiempo cero) a 3,76

(tiempo 120 min) para el caso de la proteína de tarwi. El rango de actividad óptima de la pepsina gástrica varía de 1,5 y 2,5 (78), por lo que el cambio ligero de pH pudo haber afectado la actividad de la pepsina en el sistema *in vitro* utilizado. En el organismo vivo, el pH gástrico se incrementa tras la ingesta de alimentos, alcanzando un valor cercano a pH 6 (100). Este valor se regula aproximadamente una hora después de la digestión, descendiendo a pH 3,1 y posteriormente se estabiliza en un rango entre 1,5 y 2,5 hasta finalizar la fase gástrica (100). Este ajuste dinámico no pudo reproducirse en el presente estudio debido a que el método INFOGEST corresponde a un sistema cerrado y estático.

Adicionalmente, los bajos niveles de grado de hidrólisis en ambas proteínas podría estar relacionada con el estado físico de las proteínas, ya que fueron utilizadas como sólidos suspendidos en agua, sin ningún pretratamiento previo. Esta condición puede dificultar la difusión y acceso de la pepsina hacia los sitios específicos de corte, reduciendo su hidrólisis (101). En el sistema *in vitro*, el movimiento generado por el rotador de tubos es más limitado y uniforme, caso contrario a lo que ocurre en un sistema *in vivo*, donde los movimientos peristálticos del estómago permiten una mezcla intensa con secreción de fluidos continua, entre el contenido sólido y la pepsina, facilitando su difusión (122,123).

3.2.3. Capacidad quelante de Fe^{2+}

En la Figura 16 se presenta la capacidad quelante de Fe^{2+} evaluada en las muestras de hidrolizados de proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase gástrica.

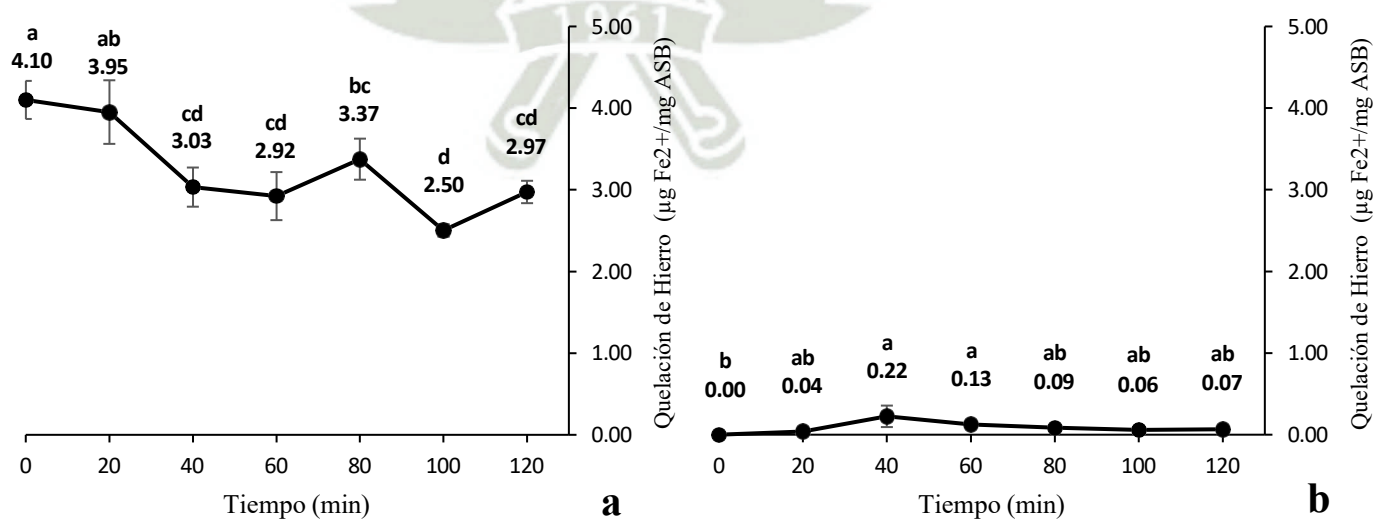


Figura 16. Capacidad quelante de Fe^{2+} durante la digestión a nivel gástrico de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar (n

= 4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión ($p < 0.05$). Elaboración propia.

La proteína de tarwi presentó capacidad quelante de hierro ($4,10 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 0,23$) aún antes de la digestión (tiempo cero), mientras que la caseína no mostró esta propiedad. Posiblemente la composición aminoacídica de la proteína sea un factor involucrado. La proteína de tarwi es rica en residuos como ácido aspártico, glutámico e histidina, que tienen afinidad natural por el hierro, permitiendo la formación de complejos incluso sin ruptura en péptidos (9,26). Además, la proteína de tarwi empleada en este estudio presenta un contenido proteico del 76%, pudiendo contener trazas de compuestos bioactivos, como polifenoles y antioxidantes, así como antinutrientes característicos de leguminosas, como fitatos y taninos, que pueden quelarse al hierro (130,131). Por lo tanto, la capacidad queladora observada podría derivar no solo de las proteínas o péptidos liberados durante la hidrólisis, sino también de estos compuestos. En contraste, la caseína, al ser una proteína animal, carece de estos compuestos, lo que podría explicar su menor capacidad queladora en condiciones no hidrolizadas.

En relación a la tendencia de la capacidad quelante de Fe^{2+} durante la hidrólisis gástrica, el valor inicial presentado por los hidrolizados de la proteína de tarwi descendió a $2,92 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 0,30$ a los 60 min, para luego casi estabilizarse hasta los 120 min ($2,97 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 0,14$). En general, la tendencia fue a la disminución de este parámetro durante la digestión a nivel gástrico. Por otro lado, en el caso de la caseína, se presentó una capacidad queladora casi nula, observándose un ligero incremento a los 40 min ($0,22 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 0,13$), pero con una disminución progresiva posterior hasta valores cercanos a cero al finalizar la digestión gástrica.

Budseekoad et al. (99), evaluaron la capacidad quelante de Fe^{2+} de hidrolizados de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) a diferentes tiempos de hidrólisis con pepsina. A pesar de aplicar una digestión extendida por hasta 8 horas, la capacidad queladora que inició con un valor de 0, permaneció constante con un valor de 0,144 mg/g proteína, independientemente del tiempo de hidrólisis. Asimismo, Jaiswal et al. (108) reportaron una disminución progresiva en la capacidad quelante de Fe^{2+} al aumentar el tiempo de hidrólisis de la α -caseína con enzimas comerciales (alcalasa, corolasa PP y flavourzyme).

Luo et al. (109) reportaron la misma tendencia de disminución respecto a la capacidad quelante de Fe^{2+} al aumentar el tiempo de la hidrólisis de caseinato de sodio utilizando enzimas digestivas (pancreatina y tripsina) y una enzima vegetal (papaína). Aunque el grado de hidrólisis fue mayor con esta última enzima, la capacidad queladora fue menor al final del proceso digestivo, demostrando que no necesariamente estas dos variables se encuentran correlacionadas.

En la presente investigación, no se observó correlación entre esta propiedad y el grado de hidrólisis para ambas proteínas ($r = 0,16$ y $r = -0,63$ para caseína y proteína de tarwi respectivamente), lo que sugiere que un mayor grado de hidrólisis no necesariamente está relacionado con una mayor capacidad quelante de hierro.

De acuerdo a estudios moleculares, la capacidad de quelación de hierro está mediada por la interacción entre ciertos grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los péptidos y el ion Fe^{2+} . Estos grupos como los tioles ($-\text{SH}$) de la cisteína, los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), amino ($-\text{NH}_2$) e imidazol (de la histidina) pueden actuar como donadores de electrones, formando enlaces de coordinación con el hierro (9,53). Estos enlaces no son covalentes clásicos, sino interacciones reversibles, que pueden debilitarse o romperse en función de cambios en el pH, la fuerza iónica del medio o la presencia de agentes quelantes competidores (como otros iones), provocando la disociación del complejo péptido-hierro (53,102).

En ambos hidrolizados se observó una tendencia a la baja de la capacidad quelante de hierro. Esta disminución podría atribuirse a varios factores, entre ellos la competencia con otros iones divalentes presentes en los fluidos simulados, como el calcio (Ca^{2+}) o magnesio (Mg^{2+}), además de algunos antinutrientes que pueden estar presentes en la proteína de tarwi, los cuales pueden interferir en la formación de complejos péptido-hierro (113,130).

Asimismo, la presencia de estas sales puede haber contribuido al aumento de la fuerza iónica del medio. Según lo reportado por Smialowska et al. (107), una alta fuerza iónica puede inhibir la unión de hierro debido al efecto de *salting out*, que reduce la disponibilidad de los sitios de interacción en los péptidos. Esto podría explicar la tendencia a la baja en la quelación observada a lo largo del proceso digestivo gástrico en ambas proteínas.

Además, otro factor que podría haber afectado esta propiedad en ambos hidrolizados es la protonación de los grupos funcionales en condiciones de pH ácido, como las que predominan al final de la digestión gástrica. En esas condiciones, los grupos funcionales queladores pueden encontrarse protonados, como los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), lo cual limita su capacidad para actuar como donadores de electrones y, por tanto, formar complejos con el hierro [107]. Según lo reportado por Yuanqing et al. (63), al evaluar la quelación de hierro con hidrolizados de proteína de avena bajo diferentes condiciones de pH, se observó que el rango óptimo para una mayor capacidad quelante se encuentra entre pH 6 y 7, mientras que en condiciones ácidas (pH 3-4) la quelación fue significativamente menor.

Por otro lado, las diferencias observadas entre la proteína de tarwi y la caseína podrían explicarse por la composición y estructura de los péptidos liberados durante la hidrólisis. Si bien el grado de hidrólisis fue bajo en ambas proteínas, los péptidos derivados del tarwi podrían poseer una estructura más favorable para la quelación, debido a su composición aminoacídica rica en residuos funcionales capaces de unirse al hierro (26). Por ejemplo, la proteína de tarwi contiene aproximadamente un 65,1 % de aminoácidos quelantes, mientras que la caseína presenta un 51,2 % de aminoácidos con capacidad quelante de hierro (26,121). Esto sugiere que no solo la cantidad de péptidos generados, sino también la composición del hidrolizado y la accesibilidad de sus grupos funcionales influyen significativamente en la capacidad queladora (9,53).

En contraste, los péptidos derivados de la caseína podrían presentar menos residuos adecuados para la quelación, como histidina y cisteína. En comparación, la proteína de tarwi contiene un 3,5 % de histidina y un 1,6 % de cisteína, mientras que la caseína presenta solo un 2,6 % y 0,3 % respectivamente, lo que limita su eficiencia para unirse al hierro (26,121).

Además, dado la actividad de la pepsina se dirige mayormente hacia residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano), es probable que la hidrólisis gástrica no haya generado muchos péptidos que expongan residuos quelantes clave, como la histidina o el ácido aspártico, que son clave para una adecuada coordinación con el Fe^{2+} (99,102). La proteína de tarwi contiene un 7,8 % de aminoácidos aromáticos, mientras que la caseína tiene un 11,28 %, aunque en general las proteínas animales suelen tener más

aminoácidos aromáticos que las vegetales, esto puede variar según la proteína específica (26,121,126).

Es importante señalar que, hasta donde se tiene registro, no existen los estudios que hayan abordado la evaluación de la capacidad quelante de hierro en hidrolizados proteicos de tarwi, por lo que los resultados de la presente investigación son los primeros en ser reportados.

3.3. Determinación del contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe^{2+} en los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi y la proteína control (caseína) durante la etapa de digestión intestinal

Luego de la digestión gástrica se procedió inmediatamente a la digestión intestinal. Se tomaron muestras de los hidrolizados generados de cada proteína y se evaluaron el contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe^{2+} .

3.3.1. Contenido de proteína soluble

En la Figura 17 se presenta la evolución del contenido de proteína soluble en las muestras de los hidrolizados de proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase intestinal.

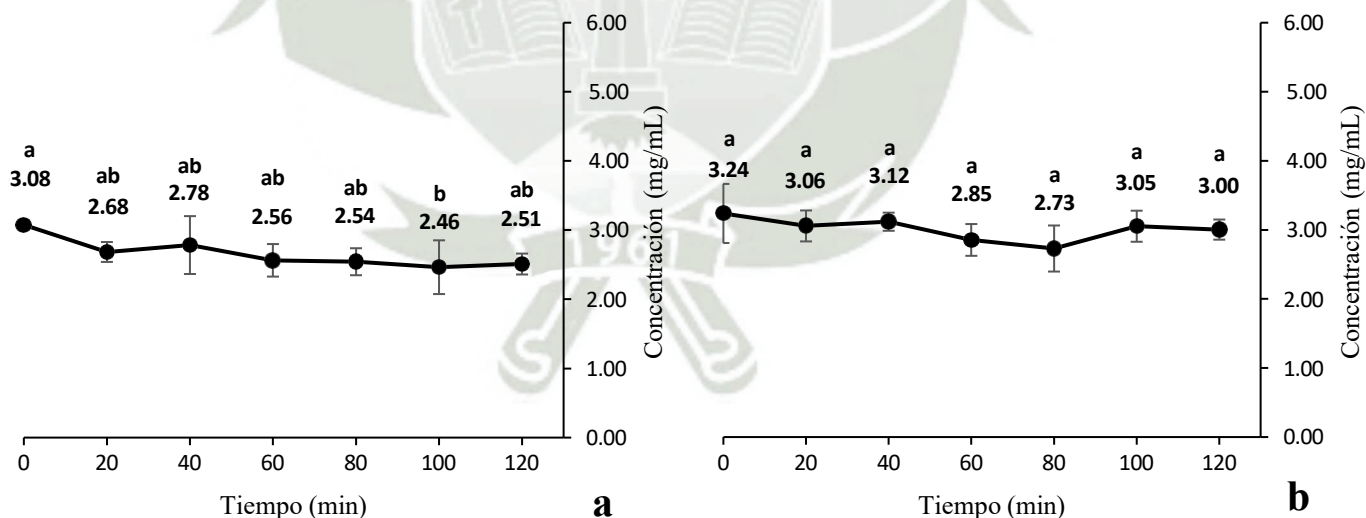


Figura 17. Contenido de proteína soluble durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión ($p < 0.05$). Elaboración propia.

En el caso de la digestión intestinal, el contenido de proteína soluble presentó una tendencia decreciente en ambas proteínas evaluadas. En la fase intestinal, el contenido de proteína soluble mostró una tendencia decreciente en ambas proteínas evaluadas. Para la proteína de tarwi, se observó un valor inicial de $3,08 \text{ mg/mL} \pm 0,07$ (0 min), el cual descendió levemente hasta estabilizarse en $2,51 \text{ mg/mL} \pm 0,15$ al finalizar la digestión. De manera similar, la caseína presentó una disminución desde $3,24 \text{ mg/mL} \pm 0,43$ hasta $2,73 \text{ mg/mL} \pm 0,33$ (80 min), seguida de una ligera recuperación, estabilizándose en $3,00 \text{ mg/mL} \pm 0,15$ al término de la fase intestinal. A diferencia de lo observado en la fase gástrica, donde ambas proteínas mostraron un aumento en su solubilidad, en esta etapa se evidenció una disminución general de esta variable. Sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas por efecto del tiempo en ninguno de los casos.

La disminución del contenido de proteína soluble durante la digestión intestinal puede explicarse principalmente por la acción de la pancreatina, cuyas enzimas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas) hidrolizan tanto las fracciones solubles como insolubles de las proteínas, generando péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres (137). Como resultado, los productos generados dejan de clasificarse como proteínas intactas, lo que conlleva a una reducción del contenido de proteína soluble medido.

Este descenso no puede atribuirse al pH del medio, ya que el protocolo INFOGEST establece un pH intestinal cercano a 7, mientras que el punto isoeléctrico (pI) de la caseína y de la proteína de tarwi se encuentra entre pH 4 y 6 (132,133). A este pH, ambas proteínas presentan carga neta negativa, lo que favorece su solubilidad. Por lo tanto, la reducción observada no se debería a una precipitación inducida por pH, sino a mecanismos relacionados con la hidrólisis enzimática y la formación de agregados.

En el caso específico de la proteína de tarwi, se ha reportado que sus globulinas presentan una alta tendencia a formar agregados estables bajo ciertas condiciones de fuerza iónica y composición del medio, lo que puede limitar su solubilidad y digestibilidad durante la fase intestinal (120,132). Además, durante la hidrólisis se liberan péptidos y aminoácidos hidrofóbicos característicos de proteínas de legumbres, que favorecen interacciones hidrofóbicas y la formación de agregados insolubles (98). Estas interacciones podrían haberse intensificado tras la apertura estructural inducida en

la fase gástrica, afectando negativamente la solubilidad proteica durante la digestión intestinal (26,98).

En el caso de la caseína, la acción de enzimas pancreáticas como tripsina y quimotripsina, presentes en la pancreatina, promueve la liberación de caseinofosfopéptidos (CPPs), los cuales poseen afinidad por el calcio (130). La interacción de estos péptidos con los iones calcio presentes en los fluidos simulados puede favorecer la formación de complejos insolubles de fosfato de calcio, contribuyendo a la disminución del contenido de proteína soluble (113-115). Asimismo, estudios como el de Ren et al. (134) indican que, durante la digestión intestinal simulada, las micelas de caseína pueden reorganizarse tras su desestabilización parcial en la fase gástrica, formando agregados en presencia de calcio que reducen su solubilidad.

Finalmente, Zou et al. (104) también reportaron una mayor disminución de proteína soluble durante la fase intestinal en comparación con la gástrica en diferentes tipos de leche (materna, bovina y de camello), efecto atribuido principalmente a la caseína. En ese estudio, se sugiere que la formación de coágulos en el estómago limita el acceso de las enzimas pancreáticas en la etapa intestinal, lo que disminuye la solubilidad de la proteína residual.

3.3.2. Grado de hidrólisis

En la Figura 18 se presenta la evolución del grado de hidrólisis en las muestras de hidrolizados de proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase intestinal.

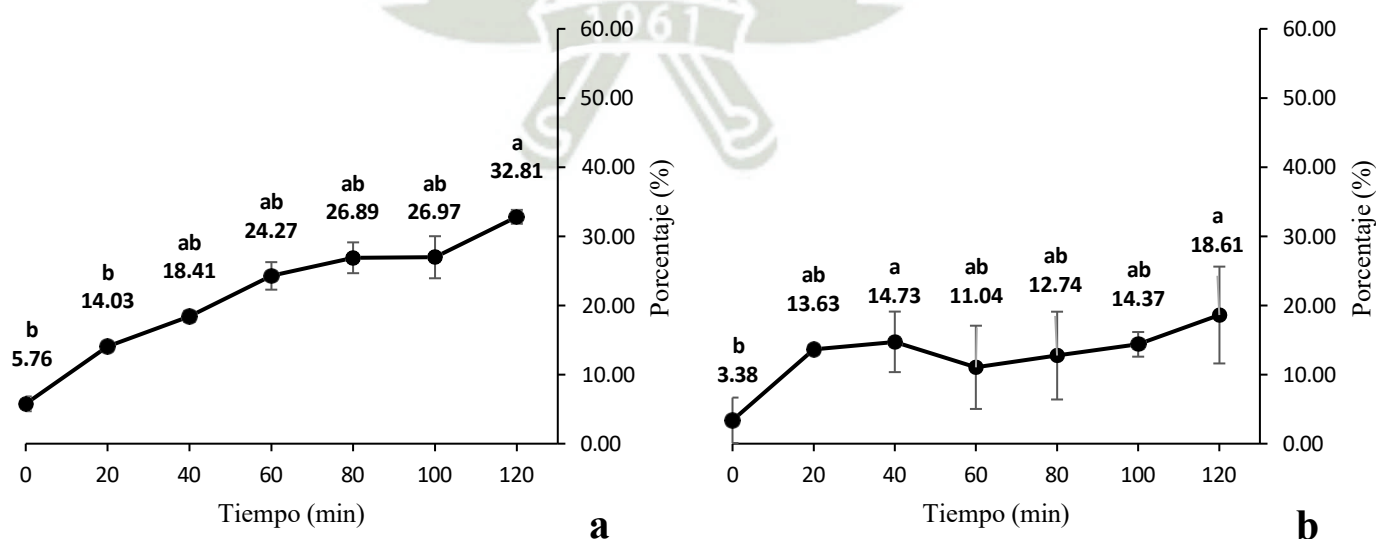


Figura 18. Grado de hidrólisis durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión ($p < 0.05$).

Elaboración propia.

El grado de hidrólisis de la proteína de tarwi por acción de la pancreatina en la fase intestinal, tuvo un aumento progresivo al aumentar el tiempo de digestión alcanzando un valor máximo a los 120 min ($32,81 \% \pm 1,00$). Lo contrario fue observado en el caso de la caseína, donde el grado de hidrólisis tuvo una tendencia variable, aumentando hasta los 40 min ($14,73 \% \pm 4,38$), para luego descender levemente a los 60 min ($11,04 \% \pm 6,02$), aumentando su valor hasta llegar a un valor máximo a los 120 min ($18,61 \% \pm 7,00$), valor inferior comparado al alcanzado en el caso de la proteína de tarwi.

Varios estudios han reportado el grado de hidrólisis de diversas proteínas vegetales utilizando pancreatina, lo cual permite establecer comparaciones con la proteína de tarwi. Un valor cercano al obtenido en el presente trabajo fue reportado por Reynaud et al. (101), al hidrolizar de forma secuencial (gástrica-intestinal) 2 matrices por medio del método INFOGEST, los cuales fueron tofu (derivado de soya) y un aislado de guisantes comercial, iniciando con valores de grado de hidrólisis de 14 % y 21 % respectivamente luego del primer minuto de la fase intestinal, alcanzando valores máximos de 33,1 % y 38 % respectivamente al finalizar la digestión. Por el contrario, Auer et al. (135), reportaron valores de grado de 60,7 %; 80,2 % y 73,7 %, al evaluar de concentrados proteicos comerciales de guisante, haba y soya, respectivamente, utilizando el método INFOGEST y al final de la hidrólisis gástrica-intestinal. Estos valores son superiores a los obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, Budseekoad et al. (99), evaluaron la hidrólisis con pancreatina y alcalasa (enzima comercial mayormente utilizada en hidrólisis enzimática) de la proteína de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) con un porcentaje proteico de 85 % de pureza, obteniendo un grado de hidrólisis de aproximadamente del 30 % para ambas enzimas. En la investigación de Chirinos et al. (12), se evaluó la hidrólisis de proteína de tarwi con un 89,2 % de pureza, utilizando tres enzimas comerciales: alcalasa, neutrasa y flavourzyme. Los mejores resultados se obtuvieron con alcalasa, alcanzando un grado de hidrólisis de 36,93 % luego de los 120 min de hidrólisis, valor comparable al obtenido

para la proteína de tarwi en el presente estudio con una concentración de 76,6%. Esto puede deberse a que, la alcalasa presenta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos, característica similar a una de las enzimas proteolíticas presentes en la pancreatina, como es la quimotripsina (12,136).

Las diferencias que se presentan entre los resultados de los estudios previos y los del presente trabajo, pueden deberse a diversos factores como la naturaleza de la proteína y el tipo de procesamiento que se realizó para obtener las muestras empleadas en cada estudio (135).

En el caso de las proteínas lácteas, Abrahamse et al. (127) evaluaron la digestibilidad de proteína de leche materna y fórmulas infantiles mediante el protocolo INFOGEST. Reportaron un grado de hidrólisis inicial del 6 % inmediatamente después de la fase gástrica, alcanzando valores de 26,82 % y 42,92 % al cabo de 120 min de digestión intestinal, para la leche materna y la fórmula infantil, respectivamente. Estos resultados evidencian una hidrólisis progresiva y significativa durante la fase intestinal, de forma similar a lo observado en el actual estudio.

Luo et al. (109) evaluaron la hidrólisis de caseinato de sodio (una forma salina de la caseína) utilizando pancreatina como una de las enzimas principales, luego de 10 min de digestión se obtuvo un valor de 9,42% de grado de hidrólisis alcanzando un valor del 10,57% luego de 60 min de digestión, comparable al valor de 11,04 % (60 min) obtenido en el presente estudio. Por otro lado, Jaiswal et al. (108) estudiaron la hidrólisis de alfa-caseína empleando enzimas comerciales como alcalasa, flavourzyme y corolase, obteniendo grados de hidrólisis de 12 %, 15 % y 17 %, respectivamente, luego de 2 horas de digestión. Estos valores resultan inferiores al 18,61 % alcanzado en el presente estudio mediante el uso de enzimas digestivas en el protocolo INFOGEST, lo que podría atribuirse a diferencias en el tipo de enzimas, el sustrato utilizado o las condiciones experimentales.

Asimismo, Ariëns et al. (111) aplicaron el protocolo INFOGEST para evaluar la hidrólisis completa (oral, gástrica e intestinal) de un concentrado de proteína de guisante experimental y concentrado de proteína de suero, obteniendo un 33% de grado de hidrólisis para el concentrado proteico de guisante, y de 31,2 % para el concentrado de suero. Jadhav et al. (129) evaluaron el grado de hidrólisis de proteína de guisante y de suero de leche mediante el protocolo INFOGEST, obteniendo valores al término de la

digestión intestinal de 53,62 % y 52,62 %, valores cercanos entre sí, similar al estudio previo.

Adicionalmente, Shun et al. (128), hidrolizó diferentes aislados proteicos vegetales (soya, guisante y garbanzo) mediante el método INFOGEST, obteniendo valores de grado de hidrólisis de 13,28 %; 9,12 % y 9,09 % al término de la digestión intestinal. En el mismo estudio, también se evaluaron dos proteínas lácteas (caseína y suero de leche) con valores de grado de hidrólisis de 15,71 % y 16,20%, respectivamente al término de la digestión a nivel intestinal.

Sin embargo, la tendencia de los resultados de la presente investigación fue diferente, ya que el grado de hidrólisis alcanzado por la proteína de tarwi fue superior al de la proteína control (caseína). Una posible explicación podría estar relacionada con su composición aminoacídica, ya que las enzimas pancreáticas utilizadas tienen especificidad por determinados residuos. Por ejemplo, la tripsina actúa sobre arginina y lisina (presentes en un 19,4 % en tarwi y 11,1 % en caseína); la quimotripsina tiene mayor afinidad por aminoácidos aromáticos (7,8 % en tarwi y 11,3 % en caseína); la carboxipeptidasa reconoce residuos como leucina, alanina e isoleucina (14,8 % en tarwi y 17,3 % en caseína); y la elastasa actúa sobre serina, leucina, alanina y valina (19,7 % en tarwi y 23,5 % en caseína) (26,121,136). Estos valores sugieren que, si bien algunas afinidades favorecerían a la caseína, el conjunto de la secuencia y accesibilidad estructural pudo haber facilitado una hidrólisis más eficiente en el tarwi, valores comparables a los reportados por autores como Shun y Ariëns para proteínas de otras leguminosas (111,128).

Otro factor por el cual la hidrólisis de caseína pudo verse afectada, se relaciona con los procesos aplicados para obtener la caseína. Con la finalidad de preservar su composición y estabilidad, el uso de procesos adicionales a nivel industrial como el secado por aspersión, tratamientos térmicos, precipitación ácida, hoogenización para su comercialización o incluso el almacenamiento prolongado pueden haber inducido cambios estructurales, que podrían haber ocasionado una menor accesibilidad de la acción enzimática (101).

En general, en este estudio ambas proteínas tuvieron valores superiores respecto al grado de hidrólisis alcanzado al final de la fase gástrica, esto se debe principalmente a la hidrólisis por parte de la pancreatina, que es un conglomerado de enzimas, conteniendo

enzimas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa (80,81). Además, las cuatro enzimas en conjunto cuentan con acción endopeptidasa y exopeptidasa, lo que permitió una mejor hidrólisis en ambas proteínas (99,136). En este estudio, el pH durante la hidrólisis intestinal se mantuvo en 7,29 para la proteína de tarwi, mientras que en la caseína descendió de 7,15 a 7,07 (120 min). Aunque estos valores no alcanzan el óptimo (7,5–8,5), las proteasas pancreáticas utilizadas aún conservan actividad en este rango, permitiendo una hidrólisis eficiente (136).

La hidrólisis proteica a nivel intestinal también se favorece por la presencia de la bilis. Si bien la bilis, interviene principalmente en la digestión de los lípidos, también mejora la solubilidad de otros macronutrientes, en este caso a ambas proteínas, permitiendo una mejor difusión por parte de las proteasas de la pancreatina y por consiguiente un mejor acceso a los sitios de corte de la proteína favoreciendo el proceso hidrolítico (101,110).

3.3.3. Capacidad quelante de Fe^{2+}

En la Figura 19 se presenta la capacidad quelante de Fe^{2+} en las muestras de hidrolizados de proteína de tarwi y caseína durante la digestión en la fase intestinal.

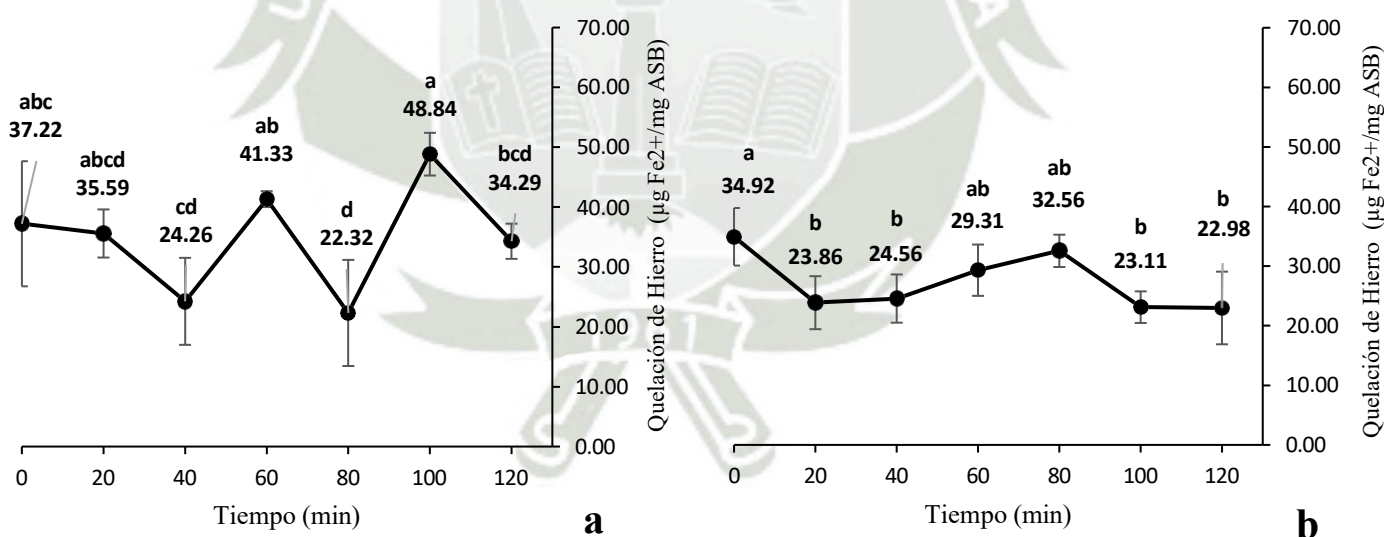


Figura 19. Capacidad quelante de Fe^{2+} durante la digestión a nivel intestinal de la proteína de tarwi (a) y la caseína (b). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar ($n = 4$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos de digestión ($p < 0.05$). Elaboración propia.

La capacidad quelante de Fe^{2+} durante la hidrólisis intestinal de la proteína de tarwi mostró una tendencia variable. Esta propiedad inició con un valor de $37,22 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 10,45$ (tiempo 0), disminuyó a los 40 min ($24,26 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 7,27$) y luego presentó fluctuaciones, alcanzando un valor máximo de $48,84 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 3,57$ a los 100 min, antes de descender nuevamente a $34,29 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 2,94$ al final del proceso (120 min). En contraste, la proteína control (caseína) mostró una capacidad queladora más estable a lo largo de la digestión intestinal, iniciando con $34,92 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 4,83$, con leves variaciones hasta alcanzar $32,56 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 2,71$ a los 80 min, y disminuyendo a un valor de $22,98 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB} \pm 6,10$ a los 120 min.

Las variaciones significativas (40, 80 y 100 min) podrían relacionarse con la limitada difusión del sistema estático *in vitro*, que provoca una liberación heterogénea de péptidos y un contacto irregular con la pancreatina, generando fluctuaciones en la capacidad quelante de Fe^{2+} , como el incremento puntual a los 100 min (101,122).

Udeh et al. (112) realizaron un estudio comparando la efectividad de los péptidos liberados tras la hidrólisis de proteína de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando pepsina con pancreatina de forma secuencial, frente a la enzima comercial alcalasa. Los resultados mostraron una mayor capacidad quelante de hierro en los hidrolizados obtenidos con enzimas digestivas, alcanzando un valor del 30 %, en comparación con el 18 % obtenido con la enzima comercial. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que la alcalasa actúa únicamente como endopeptidasa, generando una menor diversidad de péptidos quelantes.

De manera similar, Budseekoad et al. (99) evaluaron la hidrólisis de proteína de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) con enzimas comerciales (alcalasa, flavourzyme) y digestivas (pepsina, tripsina y pancreatina), con el objetivo de analizar la capacidad quelante de hierro de los hidrolizados. Los resultados indicaron que los hidrolizados obtenidos con pancreatina a los 90 min presentaron una alta capacidad de quelación ($1,84 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína), con una ligera disminución a los 120 min ($1,73 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína), sin embargo, este valor fue mayor a los niveles obtenidos con otras enzimas ($1,27 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína para alcalasa; $0,70 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína para flavourzyme; $0,25 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína para tripsina y $0,18 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{g}$ de proteína para pepsina).

En cuanto a las proteínas lácteas, Mandacka et al. (118) evaluaron la capacidad quelante de hierro en hidrolizados de caseína obtenidos mediante hidrólisis con una proteasa de

serina. Se observó un valor de $64,4 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$ a los 60 min, el cual aumentó ligeramente conforme avanzó la digestión, alcanzando un máximo de $66,1 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$ a los 180 min. Este comportamiento se atribuye a la acción específica de la proteasa con un residuo de serina en su sitio activo, favoreciendo la liberación de péptidos ricos en este aminoácido. La serina ha sido asociada como uno de los aminoácidos con mayor capacidad de quelación de Fe^{2+} (53,119).

Por otro lado, Luo et al. (109) evaluaron la capacidad quelante de hidrolizados de caseinato de sodio utilizando enzimas digestivas (pancreatina y tripsina) y una enzima vegetal (papaína). Los resultados mostraron que los hidrolizados obtenidos con enzimas digestivas presentaron una mayor capacidad queladora, alcanzando aproximadamente el 80 % en ambos casos, mientras que los obtenidos con papaína mostraron valores ligeramente menores, en torno al 70 %. Sin embargo, en los tres tratamientos se observó una disminución progresiva en la capacidad queladora con el tiempo de hidrólisis.

Respecto al presente estudio, ambas proteínas mostraron resultados favorables en comparación con la fase gástrica, lo que puede atribuirse a una mayor disponibilidad de sitios de unión para el hierro debido a una hidrólisis más eficiente por parte de la pancreatina. Este proceso libera péptidos que contienen aminoácidos con capacidad quelante, como la histidina, cisteína, ácido glutámico y ácido aspártico, los cuales poseen grupos funcionales capaces de formar enlaces de coordinación con el hierro de manera efectiva (99,102). La liberación de estos péptidos facilita la formación de complejos estables con el mineral, aumentando así la capacidad de quelación observada en los hidrolizados (53).

Otro factor que favorece la quelación de hierro es el tamaño de los péptidos generados durante la hidrólisis enzimática. En el caso de la caseína y la proteína de tarwi, la acción de la pancreatina permitió liberar péptidos de menor tamaño y peso molecular, lo que posiblemente ha mejorado su accesibilidad para interactuar con el hierro (40). Estos péptidos de bajo peso molecular también se asocian con una mayor solubilidad y estabilidad del mineral, lo que favorece su quelación (62).

Por otro lado, un pH neutro del sistema de reacción evita la protonación de los grupos funcionales de los aminoácidos involucrados en la quelación de hierro (107). En este estudio, los rangos de pH en el sistema de digestión intestinal variaron entre 7,29 y 7,07. Estos valores son cercanos a la neutralidad, lo que ha favorecido la desprotonación de

los sitios de coordinación, promoviendo una mayor capacidad quelante en comparación con los hidrolizados obtenidos tras la fase gástrica, en donde el pH ácido produjo la protonación de dichos sitios, reduciendo la afinidad de los péptidos de los hidrolizados por el hierro (58,116).

Las variaciones observadas en la capacidad de quelación, más notorias en la proteína de tarwi, podrían estar influenciadas por el aumento de la fuerza iónica durante la fase intestinal. En esta etapa, la adición de sales como el carbonato de sodio en el fluido intestinal incrementa la concentración de iones en el medio, lo que puede afectar negativamente la interacción entre los péptidos y el hierro. Según Smialowska (107), una alta fuerza iónica puede provocar un efecto de *salting out*, reduciendo la disponibilidad de los grupos funcionales responsables de la unión metálica y, con ello, la eficiencia de la quelación.

Asimismo, Jaiswal et al. (108) señaló que la hidrólisis excesiva puede afectar negativamente la capacidad quelante de Fe^{2+} , ya que el sobrecorte de los péptidos puede comprometer su estabilidad estructural y modificar sitios funcionales importantes como los de fosforilación. En línea con ello, Zambrowicz et al. (117) reportaron que, tras hidrolizar proteína de yema de huevo con enzimas digestivas como tripsina y pepsina, los péptidos generados con tripsina mostraron una mayor capacidad quelante de hierro, alcanzando un pico de $40 \mu\text{g } Fe^{2+}/\text{mg}$ de proteína tras una hora de digestión. Sin embargo, esta actividad disminuyó ligeramente con el tiempo, alcanzando $38 \mu\text{g } Fe^{2+}/\text{mg}$ a las dos horas y $34 \mu\text{g } Fe^{2+}/\text{mg}$ a las tres horas, con una leve recuperación al finalizar las cuatro horas ($39 \mu\text{g } Fe^{2+}/\text{mg}$), evidenciando un comportamiento fluctuante durante la digestión.

Si bien ambas proteínas presentaron una capacidad quelante de hierro luego de la hidrólisis, la proteína de tarwi alcanzó un valor superior en comparación con la caseína. Esta diferencia, en parte, puede atribuirse a su perfil aminoacídico, posiblemente a la mayor presencia de aminoácidos hidrofílicos como serina, arginina y lisina (24,9 % en tarwi y 16,33 % en caseína), los cuales han sido expuestos por las enzimas pancreáticas (26,121,136). Diversos estudios han reportado que estos aminoácidos, especialmente la lisina, poseen grupos funcionales capaces de interactuar con iones metálicos, favoreciendo la formación de complejos estables con el hierro, incrementando la capacidad quelante del hidrolizado (9,53,68).

Asimismo, aunque en menor cantidad, la proteína de tarwi contiene más cantidad de aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y cisteína, cuyas cadenas laterales (carboxilo, grupos amina o sulfhidrilo respectivamente) muestran alta afinidad por metales de transición como el hierro. Esta diferencia en la composición podría contribuir a su mayor capacidad queladora, ya que estos aminoácidos representan el 37,7% del total en tarwi, frente al 30,24 % en la caseína (26,53,121).

Por otro lado, la hidrólisis de la caseína en la fase intestinal promueve la liberación de caseinofosfopéptidos (CPPs), péptidos reconocidos por su afinidad hacia minerales como el hierro, aunque también capaces de unirse a otros minerales, lo que podría contribuir a la variabilidad de esta proteína respecto a la capacidad quelante observada a diferentes tiempos (113,114). Además, como ha sido señalado previamente, los CPPs generados por la acción de algunas enzimas pancreáticas (tripsina y quimotripsina) muestran una afinidad predominante por el calcio, lo cual puede influir en su interacción con otros minerales (130). Para dilucidar adecuadamente el efecto de la composición de aminoácidos de los péptidos de los hidrolizados generados durante la fase intestinal, serían necesarios estudios a futuro con técnicas de espectrometría de masas, que permitan revelar las respectivas secuencias aminoacídicas.

CONCLUSIONES

1. Se logró implementar el método *in vitro* de digestión gastrointestinal estático INFOGEST, adaptado para muestras con altos contenidos de proteína, permitiendo una simulación de la digestión gastrointestinal, y la obtención de resultados, reproducibles. Con este método, se pudo evaluar la digestión de dos tipos de proteína (tarwi y control-caseína) y monitorear parámetros como el contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis y la capacidad quelante de Fe^{2+} en cada fase digestiva y a diferentes tiempos de proceso.
2. El contenido de proteína soluble, el grado de hidrólisis proteica y la capacidad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados derivados de la proteína de tarwi fueron variables durante la etapa de digestión gástrica, alcanzando valores de 7,87 mg/mL, 1,04 % y 2,97 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$ respectivamente. Los valores de proteína soluble y capacidad quelante de Fe^{2+} fueron superiores a los alcanzados por la proteína control (caseína).
3. En la etapa de digestión intestinal, el contenido de proteína soluble de los hidrolizados del tarwi mostró una disminución progresiva debido a la acción de la pancreatina, alcanzando un valor de 2,51 mg/mL, al final de la digestión, el grado de hidrólisis aumentó significativamente (32,81 %) y la capacidad quelante de Fe^{2+} alcanzó un valor máximo de 48,84 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg ASB}$. Estos valores fueron superiores a los obtenidos con la proteína control (caseína), sugiriendo un mayor potencial funcional de los péptidos liberados de la proteína de tarwi en relación a la capacidad quelante de Fe^{2+} respecto a la caseína en esta fase.
4. La capacidad quelante de Fe^{2+} de los hidrolizados obtenidos a partir de las proteínas de tarwi y la caseína fue mayor en la fase intestinal respecto a la fase gástrica. Esto sugiere que las enzimas intestinales desempeñan un papel más efectivo en la generación de péptidos bioactivos con potencial de quelación de Fe^{2+} .

RECOMENDACIONES

- Evaluar otras propiedades funcionales y compuestos bioactivos en los alimentos al final del proceso de digestión *in vitro* mediante el protocolo INFOGEST.
- Analizar la capacidad quelante de los péptidos generados de la proteína de tarwi frente a otros metales de interés nutricional como zinc, calcio o cobre.
- Aplicar técnicas de caracterización e identificación de péptidos, como la espectrometría de masas y otras metodologías complementarias, con el fin de determinar la secuencia específica de aminoácidos y posibilitar su síntesis.
- Evaluar la capacidad quelante de hierro de los péptidos derivados de la proteína de tarwi mediante estudios *in vivo*, con el fin de confirmar su funcionalidad y biodisponibilidad en condiciones fisiológicas reales.
- Promover la revalorización de cultivos andinos poco aprovechados, como el tarwi, fomentando su uso en la industria alimentaria y contribuyendo al incremento de su producción y consumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) World Health Organization [Internet], Malnutrition: Newsroom, Factsheets, Details; 2023 Dic 20. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/malnutrition>
- (2) OPS [Internet], Informe ONU: 131 millones de personas en América Latina y el Caribe no pueden acceder a una dieta saludable, Noticias; 2023 Ene 19. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/19-1-2023-informe-onu-131-millones-personasamerica-latina-caribe-no-pueden-acceder-dieta>
- (3) OPS [Internet], Micronutrientes, Temas; Micronutrientes. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/micronutrientes>
- (4) World Health Organization [Internet], Anaemia: Newsroom, Factsheets, Deatils; 2023 May 01. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/anaemia>
- (5) GOB [Internet], Puno disminuyo en 3.2% anemia en niños menores de 3 años en el 2022; 2023 Abr 18. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/744005-puno-disminuyo-en-3-2-anemia-en-ninos-menores-de-3-anos-en-el-2022>
- (6) Sub Gerencia de Planificación y Estadística, Estadístico Regional: Boletín No 02, Ucayali; 2023. p.6-7. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4412528/Boletin%20Estadistico%200Febrero%202023.pdf>
- (7) INEI, Encuesta Demográfica y de Salud Familiar – ENDES, Lima; 2023. p.50, p.219. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1950/libro.pdf
- (8) Sarlak S, Ali TS, Toghyani M, Foroozandeh SAD, Goli M, Habibian M. Effects of Replacing Inorganic with Organic Iron on Performance, Egg Quality, serum and egg yolk lipids, Antioxidant status and Iron accumulation in eggs of Laying Hens, Biological Trace Element Research; 2021. 199, 1986-1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02284-8>
- (9) Caetano SME, Netto FM, Bertoldo PMT, Alegria A, Cilla A. Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing Bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals, Critical Reviews in Food Science and Nutrition; 2020. 61:9, 1470-1489. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761770>
- (10) Guardian SJ, Trujillo VI. Cadena de Suministro para la exportación de granos andinos

- a Estados Unidos, Ingeniería Industrial No 37, ISSN 1025-9929, pp. 15-31; 2019.
DOI: <https://doi.org/10.26439/ing.ind2019.n037.4540>
- (11) MIDAGRI, Manejo Agronómico: Prácticas de conservación de Suelos, Producción, Comercialización y Perspectivas de Granos Andinos, Lima; 2018. p.5. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1338558/Manejo%20Agronómico%20de%20Granos%20Andinos.pdf>
- (12) Chirinos R, Cerna E, Pedreschi R, Calsin M, Aguilar GA, Campos D. Multifunctional in vitro bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chemistry*; 2020. 98(2): 423-433. DOI: <https://doi.org/10.1002/cche.10382>
- (13) Guilengue N, Alves S, Talhinhos P, Neves MJ. Genetic and Genomic Diversity in a Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) Germplasm Collection and Adaptability to Mediterranean Climate Conditions, *Agronomy*; 2020. 10(1):21. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10010021>
- (14) Evcan E, Gulec S. The development of Lentil derived protein-iron complexes and their effects on Iron deficiency anemia in in vitro, *Food Funct*; 2020. 11: 4185-4192. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0FO00384K>
- (15) Brodkorb A, Egger L, Alminger M. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nat. Protoc*; 2019. 14:991-1014. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- (16) Chalampunte FD, Tapia BC, Sorensen M. The Andean Lupine-“El Chocho” or “Tarwi” (*Lupinus mutabilis* Sweet), *Biodiversity Online J.* 2021. 1(4). DOI: <http://dx.doi.org/10.31031/BOJ.2021.01.000520>
- (17) Iris ZA. *Lupinus mutabilis* (Tarwi): Leguminosa andina con gran potencial industrial, Fondo Editorial de la Universidad Nacional mayor de San Marcos; 2018. 1:12-14.
- (18) Chirinos AC. Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential, *Revista BioCiencias*; 2015. 3(3): 163-172. DOI: <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.03.03.03>
- (19) Guilengue N, Alves S, Talhinhos P, Neves MJ. Genetic and Genomic Diversity in a Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) Germplasm Collection and Adaptability to Mediterranean Climate Conditions, *Agronomy*; 2020. 10(1):21. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10010021>
- (20) MIDAGRI, Producción y comercio del Tarhui; 2023. Disponible en:

- <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/1398/1/Producci%C3%B3n%20y%20comercio%20del%20Tarhui.pdf>
- (21) Gulisano A, Alves S, Rodriguez D, Murillo A, van Dinter BJ, Torres AF, Gordillo RM, Torres MdL, Neves MJ, Paulo MJ, Trindade LM. Diversity and Agronomic Performance of *Lupinus mutabilis* Germplasm in European and Andean Environments, *Front. Plant. Sci.* Vol. 13; 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.903661>
- (22) MIDAGRI, Análisis de Mercado: Tarwi; 2021. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2194218/Análisis%20de%20Mercao%20-%20Tarwi%202021.pdf>
- (23) Bebeli PJ, Lazaridi E, Chatzigeorgiou T, Suso MJ, Hein W, Alexopoulos AA, Canha G, van Haren RJF, Johannsson MH, Mateos C, Neves MJ, Prins U, Setas F, Simioniuc DP, Talhinhos P, van den Berg M. State and Progress of Andean Lupin Cultivation in Europe: A Review, *Agronomy*; 2020. 10(7): 1038. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10071038>
- (24) Singh DP, Singh AK, Singh A. Chapter 2 – Mode of reproduction in crop plants, *Plant Breeding and Cultivar Development*; 2021. 25-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817563-7.00002-7>
- (25) Vera VM, Jimenez DJ, Zolla G. The micronutrient content in underutilized crops: the *Lupinus mutabilis* Sweet case, *Scientific Reports* 12 Art. No 15162; 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19202-8>
- (26) Gulisano A, Alves S, Neves MJ, Trindade LM. Genetics and Breeding of *Lupinus mutabilis*: An Emerging Protein Crop, *Front. Plant Sci.* 10:1385; 2019. DOI: <https://doi.org/10.0.13.61/fpls.2019.01385>
- (27) Rodriguez OD, Zambrano JL, Pereira LS, Torres A, Murillo A. *Lupinus mutabilis* Breeding in the Andes of Ecuador, Peru and Bolivia: A Review, *Agronomy*; 2024. 14(94). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy14010094>
- (28) Gob. Del Ecuador [Internet], El banco de Germoplasma del INIAP conserva el patrimonio genético para la soberanía alimentaria nacional, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Disponible en: <https://www.iniap.gob.ec/el-banco-de-germoplasma-deliniap-conserva-el-patrimonio-genetico-para-la-soberania-alimentaria-nacional/>
- (29) Huasasquiche SL, Moreno DP, Jimenez DJ. Caracterización y Evaluación del Potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de Tarwi, *Ecol. Apl.*, Lima;

2020. 19(2):66. DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v19i2.1557>
- (30) Czubinski J, Grygier A, Siger A. Lupinus mutabilis seed composition and its comparison with other lupin species, Journal of Food Composition and Analysis Vol. 99. Poland; 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103875>
- (31) Campos D, Chirinos R, Gálvez RL, Pedreschi R. Bioactive potential of andean fruits, sedes and tubers. Advances in Food and Nutrition Research; 2018. 84: 287-343. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.005>
- (32) Carvajal LFE. Nutritional, rheological and sensory evaluation of Lupinus mutabilis food products – a Review, Czech Journal of Food Sciences; 2019. 37:301-311. DOI: <https://doi.org/10.17221/4/2019-CJFS>
- (33) De la Cruz YS, Vidaurre RJ, Alcázar AS, Encina ZCR, Cabezas DM, Correa MJ. Sprouted Andean grains: an alternative for the development of nutritious and functional products, Food Reviews International; 2022. 39(8): 5583-5611. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2083158>
- (34) Singer WM, Lee YC, Shea Z, Canella VC, Lee D, Li X, Cunicelli M, Kadam SS, Waseem KMA, Shannon G, Rouf MMA, Nguyen HT, Zhang B. Soybean genetics, genomics and breeding for improving nutritional value and reducin aninutritional traits in food anf feed, The plant genoma; 2023. 16(4). DOI: <https://doi.org/10.1002/tpg2.20415>
- (35) Briceño BL, Glorio PP, Basso C, Scarafoni A, Camarena F, Hidalgo A, Brandolini A. Chemical Composition, Tocopherol and Carotenoid Content of Seeds from Different Andean Lupin (*Lupinus mutabilis*) Ecotypes, Plant Foods for Human Nutrition; 2021. 98- 104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00880-0>.
- (36) Curti C, de Carvalho FL, Olivares LAP, Badán RAP, da Cunha T, Vinderola G, Costa AAE, Ramon A. The addition of Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) protein concéntrate enhances the nutritive value and the antioxidant activity of yogurt, Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics; 2022. 26(1): e1406. DOI: <https://doi.org/10.14306/renhyd.26.S1.1406>

- (37) Segui DM. Uso de Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 en pacientes con diabetes en situaciones especiales, *Medicina de Familia: SEMERGEN*; 2018. 44(S1): 18-25. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(18\)30371-X](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(18)30371-X)
- (38) Gigliola OPB, Nina MGL, Navia CNA, Mena GEP, Hurtado UR, Salcedo OL. *In vitro* antihypertensive activity by bioactive components of Andean grains, *Journal of the Selva Andina Research Society*; 2023. 14(1): 10-23. DOI: <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2023.140100010x>
- (39) Mayo Clinic [Internet], Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; 2021. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/high-bloodpressure/in-depth/ace-inhibitors/art-20047480>.
- (40) Fan C, Wang X, Song X, Sun R, Liu R, Sui W, Jin Y, Wu T, Zhang M. Identification of a Novel walnut Iron Chelating Peptide with Potential High Antioxidant Activity and Analysis of Its Possible Binding Sites. *Foods*; 2023. 12(1): 226. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12010226>
- (41) Abdo SJS, Amer AY. Association of Zinc Deficiency with Iron Deficiency Anemia and its Symptoms: Results from a Case – control Study, *Cureus* 11(4):c20; 2019. DOI: <https://doi:10.7759/cureus.3811>
- (42) Sibel AE, Aydin H, Tekin YK, Keles S, White KN, Hekim N. Association between iron metabolism and SARS-COV-2 infection, determined by ferritin, hephaestin and hypoxia-induced factor-1 alpha levels in COVID-19 patients, *Mol. Bio. Rep.*; 2023. 50(3): 2471-2478. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs11033-022-08221-3>
- (43) Mayo Clinic [Internet], Iron deficiency anemia, *Diseases & Conditions*; 2022. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/iron-deficiency-anemia/symptomscauses/syc-20355034>
- (44) Hampson K, Nguyen T. A review of Intravenous Iron Replacement Medications for nurse practitioners, *The journal for nurse practitioners*; 2020. 16(3):224-227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.09.009>
- (45) Rottembourg J, Rostoker G. Utilisation des dérivés injectables du fer au cours de la maladie rénale chronique: intérêts, limites et conseils pour un bon usage, *Néphrologie & Thérapeutique*; 2015. 11(7): 531-542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2015.04.009>
- (46) Liu H, Yu Q, Ma Y, Liu B, Pan H. Cyclic voltammetry: A simple method for determining contents of total and free iron ions in sodium ferric gluconate complex, *J.*

- Electrochem. Sci. Eng.; 2020. 10(3): 281-291. DOI: <http://dx.doi.org/10.5599/jese.749>
- (47) Borreda I, Zukermann R, Epstein D, Marcusohn E. IV Sodium Ferric Gluconate Complex in Patients Hospitalized due to Acute Decompensated Heart Failure and Iron Deficiency, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*; 2022. 27. DOI: <https://doi.org/10.1177/10742484211055639>
- (48) Macdougall IC, Comin CJ, Breyman C, Spahn DR, Koutroubakis IE. Iron Sucrose: A Wealth of Experience in Treating Iron Deficiency, *Advances in Therapy*; 2020. 37: 1960-2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01323-z>
- (49) Lyseng WKA, Keating GM. Ferric Carboxymaltose; A Review of its Use in Iron-Deficiency Anaemia, *Drugs*; 2009. 69(6): 739-56. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-200969060-00007>
- (50) Kaur N, Agarwal A, Sabharwal M. Food fortification strategies to deliver nutrients for the management of iron deficiency anaemia, *Current Research in Food Science*; 2022. 5: 2094-2107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.10.020>
- (51) Kumari A, Kumar CA. Iron nanoparticles as a promising compound for food fortification in iron deficiency anemia: A review, *Journal of Food Science and Technology*; 2023. 59(9): 3319-3335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05184-4>
- (52) Ebea UPO, Vidyasagar S, Connor JR, Frazer DM, Knutson MD, Collins JF. Oral iron therapy: Current concepts and future prospects for improving efficacy and outcomes, *British society for Haematology*; 2024. 00:1-15. DOI: <https://doi.org/10.1111/bjh.19268>
- (53) Kazemi TZ, Varidi M. Food-based iron delivery systems: A review, *Trends in Food Science & Technology*; 2021. 116:75-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.005>
- (54) Ashaolu TJ, Lee CC, Ashaolu JO, Pourjafar H, Jafari SM. Metal-binding peptides and their potential to enhance the absorption and bioavailability of minerals, *Food Chemistry*; 2023. 428: 136678. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136678>
- (55) Wu W, Yang Y, Sun N, Bao Z, Lin S. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability, *Food Research International*; 2020. 131:108976. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108976>

- (56) Ghosh BC, Prasad LN, Saha NP. Enzymatic hydrolysis of whey and its análisis, *Journal of Food Science and Technology*; 2017. 54(6): 1476-1483. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z>
- (57) Hu S, Lin S, He X, Sun N. Iron delivery systems for controlled release of iron and enhancement of iron absorption and bioavailability, *Critical Reviews in Food Science and nutrition*; 2023. 63(29): 10197-10216. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2076652>
- (58) Athira S, Mann B, Sharma R, Pothuraju R, Kumar BR. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: An alternative approach for chemical iron fortification, *Food Research International*; 2021. 141: 110133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110133>
- (59) Ding X, Li H, Mengdan X, Li X, Li M. Peptide composition analysis, structural characterization, and prediction of iron binding modes of small molecular weight peptides from mung bean, *Food Research International*; 2024. 175: 113735. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113735>
- (60) Zhang YY, Stockmann R, Ng K, Ajlouni S. The role of legume peptides released during different digestion stager in modulating the bioaccessibility of exogenous iron and zinc: An *in vitro* study, *Current Research in Food Science*; 2021. 4: 737-745. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.10.004>
- (61) Palumbo GA, Galimberti S, Barcellini W, Cilloni D, Di Renzo N, Elli EM, Finelli C, Maurillo L, Ricco A, Musto P, Russo R, Latagliata R. From Biology to Clinical Practice: Iron Chelation Therapy with Deferasirox, *Front. Oncol.*; 2021. 11:752192. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.752192>
- (62) Miao J, Liao W, Pan Z, Wang Q, Duan S, Xiao S, Yang Z, Cao Y. Isolation and Identification of Iron-chelating peptides from Casein Hydrolysates, *Food & Function*; 2019. 10:2372-2381. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8FO02414F>
- (63) Yuanqing H, Pengyao Y, Yangyang D, Min C, Rui G, Yuqing, Haihui Z, Haile M. The preparation, antioxidant activity evaluation and Iron-deficient anemic improvement of Oat (*Avena sativa* L.) peptides-ferrous chelate. *Front. Nutr.*; 2021. 8:687133. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.687133>
- (64) Zhang Y, Ding X, Li M. Preparation, characterization and in vitro stability of ironchelating peptides from mung beans, *Food Chemistry*; 2021. 349:123101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129101>

- (65) Beaubier S, Durand E, Lenclume C, Fine F, Aymes A, Framboisier X, Kapel R, Villeneuve P. Chelating peptides from rapeseed meal protein hydrolysates: identification and evaluation of their capacity to inhibit lip oxidation, *Food Chemistry*; 2023. 422:136187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136187>
- (66) Oliveira AS, Ferreira CMH, Pereira JO, Sousa S, Faustino M, Durao J, Pereira AM, Pintado ME, Carvalho AP. Production of iron-peptide complexes from spent yeast for nutraceutical industry, *Food and Bioprocess Technology*; 2023. 140:200-211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.06.006>
- (67) Yuan B, Zhao C, Cheng C, Huang D, Cheng S, Cao C, Chen G. A peptide-Fe(II) complex from *Grifola frondosa* protein hydrolysates and its immunomodulatory activity, *Food Bioscience*; 2019. 32:100459. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100459>
- (68) Liu Y, Wang Z, Kelimu A, Korma SA, Cacciotti I, Xiang H, Cui C. Novel iron-chelating peptide from egg yolk: Preparation, characterization and iron transportation, *Food Chemistry*; 2023. X(18): 100692. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100692>
- (69) Lin S, Hu X, Li L, Yang X, Chen S, Wu Y, Yang S. Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes, *LWT-Food Science and Technology*; 2021. 149:111796. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111796>
- (70) Sensoy I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models, *Current Research in Food Science*; 2021. 4:308-319. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>
- (71) Lee S, Jo K, Jeong HG, Choi YS, Yong HI, Jung S. Understanding protein digestion in infants and the elderly: Current *in vitro* digestion models, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2023. 63(7): 975-992. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1957765>
- (72) Duijsens D, Pälchen K, Guevara ZJM, Verkempinck SHE, Infantes GMR, Hendrickx ME, Van Loey AM, Grauwet T. Strategic choices for in vitro food digestion methodologies enabling food digestion design, *Trends in Food Science & Technology*; 2022. 126:61-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.017>
- (73) Cheng L, Wenwen Y, Peng W, Xiao DC. Current in vitro digestion systems for

- understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract, Trends in Food Science & Technology; 2020. 96:114-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- (74) Wang R, Mohammadi M, Mahboubi A, Taherzadeh MJ. In-vitro digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for in-vitro digestion in fish, Bioengineered; 2021. 12(1) 3040-3064. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1940769>
- (75) Rodriguez MD, León AE, Bustos MC. Starch Digestion in Infants: An Update of Available In Vitro Methods-A mini Review, Plant Foods for Human Nutrition; 2022. 77:345-352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01001-1>
- (76) Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance, Bohn T, Bouliou C, Carriere F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Menard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies, Brodkorb A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus, Food Funct; 2014. 5:1113. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3fo60702>
- (77) Lowe ME. Amylase, Encyclopedia of Gastroenterology; 2004. 57-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00025-3>
- (78) Raufman JP. Pepsin, Encyclopedia of Gastroenterology; 2004. 147-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00561-X>
- (79) Keller J. Gastrointestinal digestion and absorption, Encyclopedia of Biological Chemistry; 2013. 354-359. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00106-7>
- (80) Asare E, Yang Z, Yang H, Wang Z. Evaluation of dietary Pancreatin as an exogenous enzyme on growth performance, gene expression, immunological responses, serum immunoglobins, and intestinal morphology in cockerels, Journal of Applied animal research; 2022. 50(1): 61-68. DOI: <https://doi.org/10.1080/09712119.2021.2019044>
- (81) Karpinska M, Czauderna M. Pancreas – Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals’ Organism, Gastrointestinal Sciences – Frontiers in Physiology; 2022. 13:807632. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
- (82) Dawson PA. Chapter 41 – Bile Formation and the Enterohepatic Circulation, Physiology of the Gastrointestinal tract (Six edition); 2018. 931-956. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00041-4>

- (83) Sousa R, Recio I, Heimo D, Dubois S, Moughan PJ, Hodgkinson SM, Portmann R, Egger L. In vitro digestibility of dietary proteins and in vitro DIAAS analytical workflow base on the INFOGEST static protocol and its validation with in vivo data, *Food Chemistry*; 2023. 404(B): 134720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134720>
- (84) Wang R, Sar T, Mahboubi A, Fristedt R, Taherzadeh MJ, Undeland I. *In vitro* protein digestibility of edible filamentous fungi compared to common food protein sources, *Food Bioscience*; 2023. 54: 102862. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102862>
- (85) El SN, Karakaya S, Simsek S, Dupont D, Menfaatli E, Eker AT. *In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides, *Food & Function*; 2015. 6: 2322-2330. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5FO00357A>
- (86) Hummel BC. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin, *Canadian Journal of biochemistry and physiology*; 1959. 37(12): 1393-1399. DOI: <https://doi.org/10.1139/o59-157>
- (87) Hanson NQ, Freier EF. Effect of protein on the determination of total bile acids in serum, *Clinical Chemistry*; 1983. 29(1): 171-175. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.1.171>
- (88) Sigma-Aldrich [Internet], Bile Acid Assay Kit – Technical Bulletin. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/583/mak309bul.pdf>.
- (89) Arise AK, Alashi AM, Nwachukwu IF, Ijabadeniyi OA, Aluko RE, Amonsou EO. Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions, *Food & Function*; 2016. 7: 2431-2437. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6FO00057F>
- (90) Smith GL, Reutovich AA, Srivastava AK, Reichard RE, Welsh CH, Melman A, Bou-Abdallah F. Complexation of ferrous ions by ferrozine, 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline: Implication for the quantification of iron in biological systems, *Journal of Inorganic Biochemistry*; 2021. 220:111460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111460>
- (91) Guo L, Harnedy PA, Li B, Hou H, Zhang Z, Zhao X, FitzGerald RJ. Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology*; 2014. 37(2):92-

105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.007>
- (92) Lowry O, Rosebough N, Lewistarr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal Biological Chemical*; 1951. 193:265-275. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- (93) Yan Y, Zhang M, Gao J, Qin L, Wan J. Comparison of methods for detecting protein extracted from excess activated sludge, *Enviromental Science and Pollution Research*; 2023. 30:60967-60975. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26455-x>
- (94) Adler NJ. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *Journal Agric. Food Chem*; 1979. 27(6): 1256-1262. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- (95) Rutherford SM. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review, *Journal of AOAC International*; 2019. 93(5): 1515-1522. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- (96) Costa Santos AC, Rebellato AP, Orlando EA, Lima PJA. Characterization and estimation of the bioaccessibility of essential elements in organic milk by INFOGEST protocol, *Food Chemistry*; 2024. 433: 137327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137327>
- (97) Sabet S, Kirjoranta SJ, Lampi AM, Lehtonen M, Pulkkinen E, Valoppi F. Addressing criticalities in the INFOGEST static *in vitro* digestion protocol for oleogel analysis; *Food Research International*; 2022. 160: 111633. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111633>
- (98) Ramos CME, Ramírez AJL, Vargas SJW, Penteado SM, Piler CCW. Chemical characterization of White Lupin (*Lupinus albus*) Flour Treated by Extrusion Cooking and Aqueous Debittering Processes, *Plant Foods for Human Nutrition*; 2023. 78: 292-298. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01050-0>
- (99) Budseekoad S, Takahashi YC, Sirinupong N, Aluko RE, Youravong W. Structural and functional characterization of calcium and iron-binding peptides from mung bean protein hydrolysate, *Journal of Functional Foods*; 2018. 49: 333-341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.041>
- (100) Kong F, Singh RP. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach; *Journal of Food Science*; 2008. 73(5): R67-R80. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- (101) Reynaud Y, Lopez M, Riaublanc A, Souchon I, Dupont D. Hydrolysis of plant

- proteins at the molecular and supra-molecular scales during *in vitro* digestion, Food Research International; 2020.134:109204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109204>
- (102) Carrasco CJ, Hernández AAJ, Jiménez MC, Hernández CJ, Alaiz M, Girón CJ, Vioque J, Dávila OG. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates, Food Chemistry; 2012. 135: 1789-1795. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.016>
- (103) Miltenburg J, Bastiaan NS, Hoppenbrouwers T, Wichers H, Hettinga K. Gastric Clot formation and digestion of milk proteins in static *in vitro* infant gastric digestion models representing different ages, Food Chemistry; 2024. 432: 137209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137209>
- (104) Zou Z, Duley JA, Cowley DM, Reed S, Arachchige BJ, Koorts P, Shaw PN, Bansal N. Digestibility of proteins in camel milk in comparison to bovine and human milk using and *in vitro* infant gastrointestinal digestion system, Food Chemistry; 2022. 374: 131704. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131704>
- (105) Ren Q, Liu Y, Keijzer P, Wichers HJ, Hettinga KA. Effect of lipid droplet size on the digestion of goat milk proteins with different casein:whey protein ratios, Food Hydrocolloids; 2025.163:111128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111128>
- (106) Wu Y, Wang Y, Ma Z, Mu G, Qian F. Novel insights into whey protein peptide-iron chelating agents: Structural characterization, *in vitro* stability and functional properties, Food Bioscience; 2024. 60: 104317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104317>
- (107) Smialowska A, Matia ML, Carr AJ. Assessing the iron chelation capacity of goat casein digest isolates, Journal of Dairy Science; 2017. 100(4): 2553-2563. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12090>
- (108) Jaiswal A, Bajaj R, Mann B, Lata K. Iron (II)-chelating activity of buffalo α s-casein hydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme; Journal of Food Science and Technology; 2015. 52: 3911-3918. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1626-x>
- (109) Luo Y, Pan K, Zhong Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations, Food Chemistry; 2014. 155: 146-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.048>
- (110) Staels B, Fonseca VA. Bile acids and Metabolic regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration, Diabetes Care; 2009. 32(2): 237-245. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc09-S355>

- (111) Ariëns RMC, Bastiaan-Net S, van de Berg-Somhorst DBPM, El Bachrioui K, Boudewijn A, van den Dool RTM, de Jong GAH, Wichers HJ, Mes JJ. Comparing nutritional and digestibility aspects of sustainable proteins using the INFOGEST digestion protocol, *Journal of Functional Foods*; 2021. 87: 104748. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104748>
- (112) Udeh C, Ilfie I, Akpodiete J, Malomo S. Kidney bean protein products as potential antioxidative and antihypertensive alternatives for non-pharmacological inhibition of angiotensin-converting enzymes, *Scientific African*; 2021. 11: e00693. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00693>
- (113) Zidane F, Matéos A, Cakir KC, Miclo L, Rahuel CS, Girardet JM, Corbier C. Binding of divalent metal ions to 1-25 β -caseinophosphopeptide: An isothermal titration calorimetry study, *Food Chemistry*; 2012. 132: 391-398. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.006>
- (114) Chen K, Guo L, Lao L, Ma F, Cao Y, Miao J. Preparation, characterization and enhancement of intestinal iron absorption activity of β -casein phosphopeptides-iron chelate, *Process Biochemistry*; 2024. 146: 401-411. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.09.013>
- (115) Padilla DJ, Zambrano AJC. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión, *CES Medicina veterinaria y zootecnia*; 2021. 16(3): 62-95. DOI: <https://doi.org/10.21615/cesmvz.5231>
- (116) Caetano SME, Bertoldo PMT, Paes LAF, Netto FM. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS, *Food Research International*; 2015. 71: 132-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.008>
- (117) Zambrowicz A, Pokora M, Eckert E, Szoltysik M, Dabrowska A, Chrzanowska J, Trziszka T. Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes, *Functional Foods in Health and Disease*; 2012. 2(12): 487-500. DOI: <https://doi.org/10.31989/ffhd.v2i12.69>

- (118) Mandecka A, Dabrowska A, Bobak L, Szoltysik M. Casein Hydrolysate and Casein-Iron Chelate as Natural Bioactive Compounds for Yoghurt Fortification, *Applied Sciences*; 2022. 12: 12903. DOI: <https://doi.org/10.3390/app122412903>
- (119) Wang Y, Cai M, Zeng H, Zhao H, Zhang M, Yang Z. Preparation, Characterization and Iron Absorption by Caco-2 Cells of the Casein Peptides-Iron Chelate, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*; 2022. 28: 116. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10423-z>
- (120) Oluwajuyitan TM, Aluko RE. Structural and functional properties off fava bean albumin, globulin and glutelin protein fractions, *Food Chemistry X*; 2025. 25: 102104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102104>
- (121) Tamaru S, Kurayama T, Sakono M, Fukuda N, Nakamori T, Furuta H, Nagata Y, Tanaka K. Dietary Soybean Peptides Containing a Low-Molecular Fraction can Lower Serum and Liver Triglyceride Levels in Rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*; 2014. 60(6): 436-422. DOI: <https://doi.org/10.3177/jnsv.60.436>
- (122) Rakhshi E, Nau F, Hiolle M, Floury J. Pepsin difusión in complex food matrices, *Journal of Food Engineering*; 2022. 324: 111011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.111011>
- (123) Patricia JJ, Dhamoon AS. *Physiology, Digestion*; 2022. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544242/>
- (124) Kaur L, Mao B, Singh BA, Abhilasha, Kaur R, Ming CF, Singh J. Alternative proteins vs animal proteins: The influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion, *Trends in Food Science & Technology*; 2022. 122: 275-286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.021>
- (125) Popova A, Mihaylova D. Antinutrients in Plant-based Foods: A Review, *The Open Biotechnology Journal*; 2019.13:68. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1874070701913010068>
- (126) Gorissen SHM, Crombag JJR, Senden JMG, Huub WWA, Bierau J, Verdijk LB, van Loon LJC. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates, *Amino Acids*; 2018. 50: 1685-1695. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2640-5>
- (127) Abrahamse E, Thomassen GGM, Renes IB, Wierenga PA, Hettinga KA. Gastrointestinal protein hydrolysis kinetics: Opportunities for further infant formula improvement, *Nutrients*; 2022. 14: 1512. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14071512>

- (128) Shun MW, Jones CP, McBride KE, Fritz EAP, Hirsch J, German JB, Siegel JB. Acid-active proteases to optimize dietary protein digestibility: a step towards sustainable nutrition, *Frontiers in Nutrition*; 2024. Volume 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1291685>
- (129) Jadhav SB, Gaonkar T, Rathi A. *In vitro* gastrointestinal digestion of proteins in the presence of enzyme supplements: Details of antioxidant and antidiabetic properties, *LWT*; 2021. 147: 111650. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111650>
- (130) Walters ME, Esfandi R, Tsopmo A. Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption, *Foods*; 2018. 7(10): 172. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods7100172>
- (131) Nath H, Samtiya M, Dhewa T. Beneficial attributes and adverse effects of major plant-based foods anti-nutrients on health: A review, *Human Nutrition & Metabolism*; 2022. 28: 200147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hnm.2022.200147>
- (132) Carvajal-Larenas FE, Linnemann AR, Nout MJR, Koziol M, van boekel MAJS. *Lupinus mutabilis*: Composition, uses toxicology and debittering, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2016. 56(9): 1454-1487. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.772089>
- (133) Sarode AR, Sawale PD, Khedkar CD, Kalyankar SD, Pawshe RD. Casein and Caseinate: Methods of Manufacture; *Encyclopedia of Food and Health*; 2016. 676-682. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00122-7>
- (134) Ren J, Liao M, Li K, Chen F, Hu X, Ma L, Ji J. The aggregation of casein micelles induced by Ca^{2+} during *in vitro* digestion: effects on the release of loaded anthocyanins, *Food & Function*; 2023. 15: 503-515. DOI: <https://doi.org/10.1039/D3FO03684G>
- (135) Auer J, Alminger M, Marinea M, Johansson M, Zamaratskaia G, Högborg A, Langton M. Assessing the digestibility and estimated bioavailability/bioaccessibility of plant-based proteins and minerals from soy, pea and faba bean ingredients, *LWT – Food Science and Technology*; 2024. 197: 115893. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115893>
- (136) Beck IT. The role of pancreatic enzymes in digestion, *The American Journal of Clinical Nutrition*; 1973. 26(3): 311-325. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/26.3.311>
- (137) Lorieau L, Halabi A, Ligneul A, Hazart E, Dupont D, Floury J. Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during *in vitro* digestion, *Food Hydrocolloids*; 2018. 82: 499-411.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.019>



ANEXOS

ANEXO 1. Proporciones de los fluidos simulados para el ajuste de pH. Adaptado de Brodkorb et al. (15)

Tabla 12. Proporciones para la obtención de FSS 1x

Componente	Volumen
FSS a 1,25x	40 mL
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3 M	250 µL
Agua Ultrapura	9,750 mL
FSS a 1x	50 mL

Tabla 13. Proporciones para la obtención de FSG 1x

Componente	Volumen
FSG a 1,25x	40 mL
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3M	25 µL
Agua Ultrapura	9,975 mL
FSG a 1x	50 mL

Tabla 14. Proporciones para la obtención de FSI 1x

Componente	Volumen
FSI a 1,25x	40 mL
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3M	100 µL
Agua Ultrapura	9,900 mL
FSI a 1x	50 mL

ANEXO 2. Proporciones por tubo de las fases de digestión. Adaptado de Brodkorb et al.

(15).

Tabla 15. Proporciones por tubo para la Fase oral

Componente	Cantidad
Muestra de estudio	1 g
FSS a 1,25x	800 μ L
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3M	5 μ L
Agua ultrapura	195 μ L
Volumen final	2 mL

Tabla 16. Proporciones por tubo para la Fase gástrica

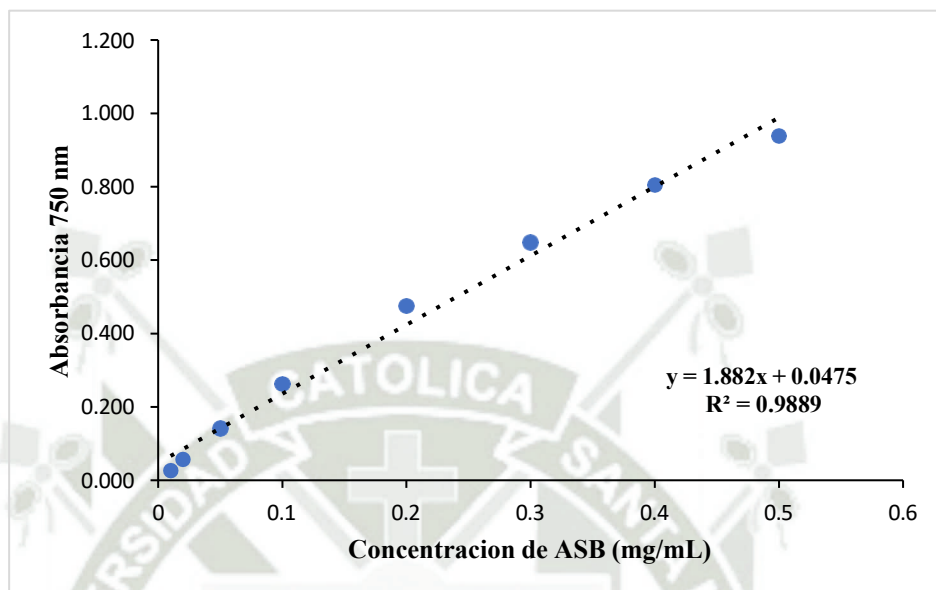
Componente	Cantidad
Bolo alimenticio	2 mL
FSG a 1,25x	1600 μ L
HCl a 5M y 1M (tarwi / caseína)	17 μ L y 24 μ L / 12 μ L y 20 μ L
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3M	1 μ L
Agua ultrapura (tarwi / caseína)	258 μ L / 267 μ L
Pepsina porcina en agua (2000 U/mL)	100 μ L
Volumen final	4 mL

Tabla 17. Proporciones por tubo para la Fase intestinal

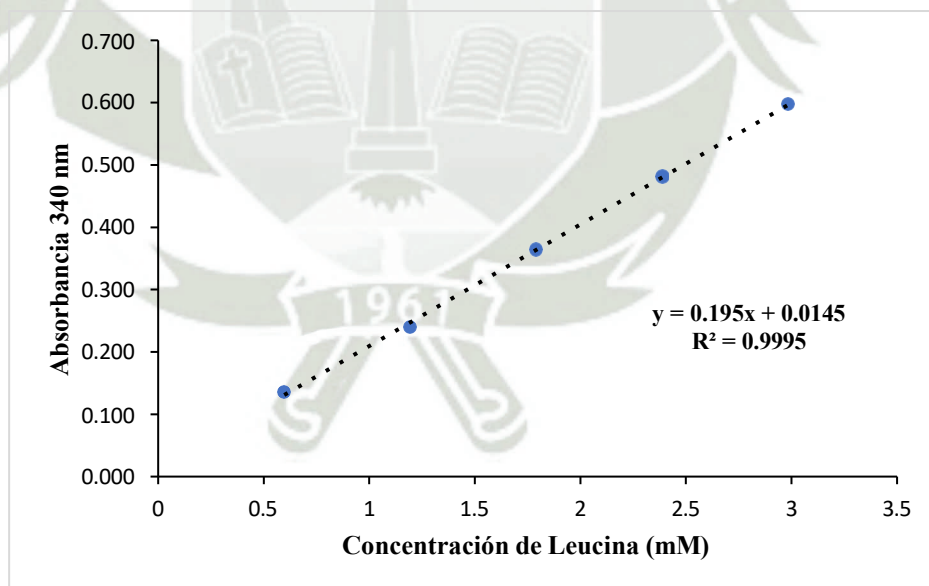
Componente	Cantidad
Quimo	4 mL
FSI a 1,25x	1700 μ L
NaOH 5M / 1M (tarwi / caseína)	19 μ L / 0,5 μ L
CaCl ₂ ·(H ₂ O) ₂ 0,3M	8 μ L
Agua ultrapura (tarwi / caseína)	773 μ L / 792 μ L
Bilis bovina en FSI (10mM)	500 μ L
Pancreatina en FSI (Tripsina: 100 U/mL)	1000 μ L
Volumen final	8 mL

ANEXO 3. Curvas de calibración de los métodos analíticos. Elaboración propia.

Anexo 3a. Curva de calibración de albúmina sérica bovina para proteína soluble



Anexo 3b. Curva de calibración de leucina para grado de hidrólisis



ANEXO 4. Análisis estadísticos de proteína de tarwi en fase gástrica. Elaboración propia.

Anexo 4a. Capacidad quelante de Fe²⁺

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	8.062	1.344	21.31	6.4E-08

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
CER	a
VEI	ab
OCH	bc
CUA	cd
CVE	cd
SES	cd
CIE	d

Anexo 4b. Proteína soluble

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	10.563	1.7605	64.66	1.89E-12

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
CVE	a
CIE	a
SES	b
CUA	bc
VEI	cd
OCH	cd
CER	d

Anexo 4c. Grado de Hidrólisis

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	5.765	0.9608	10.51	2.03E-05

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
CIE	a
CVE	ab
SES	ab
VEI	bc
OCH	bc
CUA	bc
CER	c

ANEXO 5. Análisis estadístico de proteína de tarwi en fase intestinal. Elaboración propia.

Anexo 5a. Capacidad quelante de Fe²⁺

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	2054.1	342.3	8.566	8.84E-05

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
CIE	a
SES	ab
CER	abc
VEI	abcd
CVE	bcd
CUA	cd
OCH	d

Anexo 5b. Proteína soluble

- **ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	1.088	0.18129	2.733	0.0402

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
CER	a
CUA	ab
VEI	ab
SES	ab
OCH	ab
CVE	ab
CIE	b

Anexo 5c. Grado de Hidrólisis

- **SHAPIRO-WILK: TEST DE NORMALIDAD**

data: GIT	
W = 0.92351	p-value = 0.04238

- **KRUSKAL-WALLIS**

Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 24.982	df = 6	p-value = 0.0003441
--------------------------------------	--------	----------------------------

- **DUNN'S TEST BONFERRONI**

Tratamiento	Grupos
CVE	a
CIE	ab
OCH	ab
SES	ab
CUA	ab
VEI	b
CER	b

ANEXO 6. Análisis estadístico de caseína en fase gástrica. Elaboración propia.

Anexo 6a. Capacidad quelante de Fe²⁺

- **SHAPIRO-WILK: TEST DE NORMALIDAD**

data: GIT	
W = 0.77736	p-value = 0.00004367

- **KRUSKAL-WALLIS**

Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 22.53	df = 6	p-value = 0.00097
-------------------------------------	--------	-------------------

- **DUNN'S TEST BONFERRONI**

Tratamiento	Grupos
CUA	a
SES	a
OCH	ab
CVE	ab
CIE	ab
VEI	ab
CER	b

Anexo 6b. Proteína soluble

- **ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	54.05	9.009	90.53	6.61E-14

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
CVE	a
CIE	a
OCH	ab
SES	b
CUA	c
VEI	d
CER	e

Anexo 6c. Grado de hidrólisis

- **TEST DE LEVENE: HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS**

Tratamiento	Grados de libertad	F	Pr(>F)
	6	5.211	0.002008

- **KRUSKAL-WALLIS**

Kruskal-Wallis chi-cuadrado = 25.488	df = 6	p-value = 0.00002772
--------------------------------------	--------	-----------------------------

- **DUNN'S TEST BONFERRONI**

Tratamiento	Grupos
CVE	a
CIE	ab
OCH	abc
SES	abc
CUA	abc
VEI	bc
CER	c

ANEXO 7. Análisis estadístico de caseína en fase intestinal. Elaboración propia.

Anexo 7a. Capacidad quelante de Fe²⁺

- **ANOVA**

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	581.5	96.92	5.238	0.00195

- **HSD TUKEY**

Tratamiento	Grupos
CER	a
OCH	ab
SES	ab
CUA	b
VEI	b
CIE	b
CVE	b

Anexo 7b. Proteína soluble

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	0.6804	0.11340	1.63	0.188

Tratamiento	Grupos
CER	a
CIE	a
CUA	a
CVE	a
OCH	a
SES	a
VEI	a

Anexo 7c. Grado de hidrólisis

- ANOVA

Tratamiento	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medias	F	Pr(>F)
	6	509.1	84.86	3.804	0.0101

- HSD TUKEY

Tratamiento	Grupos
CVE	a
CUA	a
CIE	ab
VEI	ab
OCH	ab
SES	ab
CER	b

ANEXO 8. Resolución Directoral N° 001-2025-INIA-DGIA

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 001-2025-INIA-DGIA

Lima, 29 de abril de 2025

VISTA: La solicitud s/n recepcionada con fecha 13 de diciembre de 2023 presentada por la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** y demás documentos vinculados a dicha solicitud; y,

CONSIDERANDO:

Que, la Constitución Política del Perú establece en su artículo 66 y 68 que los recursos naturales, renovables y no renovables, son Patrimonio de la Nación; siendo el Estado soberano en su aprovechamiento y estableciendo que es su obligación promover la conservación de la diversidad biológica;

Que, el Convenio sobre la Diversidad Biológica y su acuerdo complementario, el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su utilización; se orientan entre otros, a la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos;

Que, el Régimen Común de Acceso a los Recursos Genéticos aprobado por la Decisión N° 391 de la Comunidad Andina de Naciones tiene por objeto regular el acceso a los recursos genéticos de los Países Miembros y sus productos derivados, señalando en su artículo 16 que, todo procedimiento de acceso requerirá de la presentación, admisión, publicación y aprobación de una solicitud, de la suscripción de un contrato, de la emisión y publicación de la correspondiente Resolución y del registro declarativo de los actos vinculados con dicho acceso;

Que, el artículo 38 del citado Régimen Común establece que, una vez adoptado y suscrito el contrato, en unidad de acto, se emitirá la Resolución correspondiente; la que se publicará junto con un extracto del contrato en el Diario o Gaceta Oficial o en un diario de amplia circulación nacional y a partir de ese momento se entenderá perfeccionado el acceso;

- 2 -

Que, el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados (RARG), aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, en su artículo 12 literal b) establece al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) como Autoridad Nacional Competente para los recursos genéticos y sus derivados de las especies cultivadas o domesticadas continentales, así como los microorganismos asociados a estas, que se encuentran en el territorio nacional, incluyendo las áreas naturales protegidas de administración nacional, las áreas de conservación regional y las áreas de conservación privada;

Que, el citado Reglamento en su artículo 16 establece que, la eficacia de las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales se encuentra sujeta a la suscripción de un contrato entre la solicitante y la Autoridad Nacional Competente. Así, en el marco de lo previsto por el RARG, mediante Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM se aprobó el "Formato de contrato para efectos de la eficacia de las autorizaciones de acceso sin fines comerciales";

Que, el RARG, en su artículo 17 numeral 17.1 establece que, la autorización de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales es otorgada por las Autoridades Nacionales Competentes para todas aquellas actividades de investigación científica y/o desarrollo tecnológico de índole no comercial, que no comprendan la comercialización o industrialización de un producto o un proceso;

Que, el Texto Integrado del Reglamento de Organización y funciones del INIA, aprobado mediante Resolución Jefatural N° 006-2025-INIA, establece en su artículo 50 numeral 50.2 que, la Dirección de Gestión de la Innovación Agraria (DGIA), es el órgano de línea a través del cual el INIA ejerce la autoridad administrativa y de registro en las distintas materias bajo su competencia. Asimismo, el artículo 51 literal q) del referido instrumento de gestión estipulada que, la DGIA tiene por función específica dirigir la implementación de las disposiciones técnicas de acceso a los recursos genéticos y sus derivados en el ámbito de su competencia y conforme a la normativa vigente en la materia;

Que, a través del artículo 6 literales b) y c) de la Resolución Jefatural N° 243-2024-INIA, la Jefatura del INIA delega en el Director General de la DGIA, la facultad de suscribir autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales, contratos y formatos que se requiera para su eficacia y aplicación; así como emitir el acto administrativo que corresponda, durante el Ejercicio Fiscal 2025;

Que, mediante solicitud s/n recepcionada con fecha 13 de diciembre de 2023, la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** solicitó al INIA el acceso a recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi) sin fines comerciales;

Que, mediante Memorando N° 061-2024-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDRIA y en concordancia con lo estipulado en el artículo 30 del RARG, se solicitó la publicación del extracto de la citada solicitud por el plazo de quince (15) días calendario en el portal institucional del INIA (www.gob.pe/inia) para fines de su difusión;

Que, mediante el Informe N° 122-2024-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDRIA-ARAPOV e Informe N° 125-2024-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDRIA-ARAPOV los especialistas técnico y legal en acceso a recursos genéticos de la Subdirección de Regulación de la Innovación Agraria (SDRIA), respectivamente, evalúan que la solicitud ha cumplido con el procedimiento y requisitos estipulados en la normativa vigente, emitiendo opinión favorable a la solicitud y recomendando su aceptación;

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 001-2025-INIA-DGIA

- 3 -

Que, a partir de dicha evaluación técnica-legal esta Dirección General declaró **APROBADA** la solicitud de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** a través del Oficio N° 359-2024-MIDAGRI-INIA-DGIA/D y, posteriormente mediante suscripción de documento denominado "ACTA REUNIÓN VIRTUAL DE NEGOCIACIÓN DE BENEFICIOS", de fecha 09 de enero de 2025, se acordaron los detalles y forma de la entrega de los beneficios derivados del acceso y utilización de los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), a otorgarse al INIA en representación del Estado Peruano;

Que, las autorizaciones de acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales deberán contener como mínimo las disposiciones señaladas en el artículo 18 del RARG; las cuales han sido evaluadas mediante Informe Técnico Legal N° 012-2025-MIDAGRI-INIA-DGIA/SDRIA-ARAPOV a fines de la motivación de la presente resolución administrativa;

Que, mediante Informe N° 235-2025-MIDAGRI-INIA-GG/OAJ, la Oficina de Asesoría Jurídica del INIA emite opinión favorable para continuar con el trámite para la suscripción del contrato de acceso;

Con el visto de la Subdirección de Regulación de la Innovación Agraria;

De conformidad con las facultades conferidas en el Reglamento de Organización y Funciones del INIA, aprobado mediante Decreto Supremo N° 014-2024-MIDAGRI que aprueba su Sección Primera; la Resolución Jefatural N° 234-2024-INIA que aprueba su Sección Segunda y, la Resolución Jefatural N° 006-2025-INIA que aprueba su Texto Integrado; el Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM y la Resolución Jefatural N° 243-2024-INIA;

SE RESUELVE:

Artículo 1.- Autorizar a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** el acceso, sin fines comerciales, a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi), cuya titularidad y soberanía es ejercida exclusivamente por el Estado peruano, con el objeto de su uso exclusivo para la ejecución del proyecto: "*Una alternativa en la fortificación con hierro: obtención, purificación y caracterización de péptidos con capacidad queladora de Fe+2, a partir de proteína de tarwi (Lupinus mutabilis), empleando enfoques in vitro e in silico*"; por las razones expuestas en los considerandos de la presente Resolución Directoral.

- 4 -

Artículo 2.- Suscribir el Contrato para el acceso a los recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 001-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA con la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**, el cual tiene por objeto dotar de eficacia a la Autorización contenida en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, conforme a lo dispuesto en el artículo 16 del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM; el cual se ajusta en su integridad a la estructura desarrollada por el Ministerio del Ambiente en la Resolución Ministerial N° 006-2022-MINAM de fecha 10 de enero de 2022.

Artículo 3.- Establecer como prohibiciones para la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** las siguientes:

- a) No ceder o transferir a terceros el acceso, manejo o utilización de los recursos genéticos y sus derivados, sin contar con la autorización del INIA.
- b) No reclamar cualquier tipo de propiedad sobre los recursos genéticos y sus derivados.
- c) No utilizar los recursos genéticos y sus derivados para fines distintos a lo establecido en la presente Resolución Directoral.

Artículo 4.- Establecer como derechos de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** en el marco de la presente autorización, el acceso a los recursos genéticos y sus derivados contenidos en la especie cultivada *Lupinus mutabilis* (tarwi) sin fines comerciales, así como todos aquellos derechos que le otorga la normativa vigente en la materia.

Artículo 5.- Establecer como obligaciones de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** para el uso exclusivo señalado en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, las siguientes:

- a) No ceder o transferir a terceros los derechos y las obligaciones emanadas de la presente autorización.
- b) No trasladar las muestras del recurso genético y sus derivados, fuera del país, salvo para los supuestos contemplados en el Plan de investigación, de corresponder.
- c) Presentar al **INIA** los informes anuales y/o extraordinarios, en idioma español, que le sean solicitados.
Presentar obligatoriamente al **INIA** un (1) informe final sobre los resultados de la investigación y el cumplimiento de la totalidad de obligaciones asumidas en el marco de la presente Resolución, dentro del plazo máximo de sesenta (60) días hábiles siguientes a la culminación del proyecto de investigación, en idioma español. Dicho informe deberá incluir copia de un (01) ejemplar de todas las publicaciones generadas a partir de la ejecución del proyecto de investigación donde se deberá incluir el reconocimiento al origen peruano de los recursos genéticos y sus derivados accedidos; así como, los datos y/o información de estos y la mención del contrato de acceso correspondiente y de la presente Resolución Directoral.
- d) Incluir en los resultados y/o presentación de resultados, el reconocimiento al origen peruano de los recursos genéticos y sus derivados accedidos; así como, los datos y/o información de estos y, la mención del contrato de acceso correspondiente y de la presente Resolución Directoral.
- e) Otorgar los beneficios no monetarios determinados en el artículo 6 de la presente Resolución Directoral.
- f) Informar al **INIA** cualquier cambio o modificación a lo establecido en la autorización o contrato de acceso.

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 001-2025-INIA-DGIA

- 5 -

- g) Cumplir con la totalidad de las obligaciones asumidas en el Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 001-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA; así como cumplir con la totalidad de las obligaciones asumidas en los contratos accesorios suscritos con los proveedores de los recursos biológicos, de corresponder.
- h) Cumplir con las obligaciones pendientes culminado el plazo de vigencia de la presente autorización, sin perjuicio de la facultad del INIA de exigirlos.
- i) Realizar el trámite para el traslado de muestras o colecta para el acceso autorizado, cuando corresponda.
- j) Destruir los remanentes de los recursos genéticos y sus derivados accedidos, resultado de la ejecución y/o culminación del proyecto de investigación con la finalidad de evitar el uso indebido de tales recursos, bajo responsabilidad. Se deberá acreditar la referida destrucción con un informe documentado que incluya la prueba fehaciente de tal hecho.
- k) Si de la ejecución del proyecto se identifica un potencial uso comercial o industrial, la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** deberá solicitar al **INIA** la suscripción de un contrato de acceso con fines comerciales, en concordancia con el procedimiento establecido en el Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado con Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM.
- l) Brindar las facilidades al **INIA** de manera oportuna, para la efectiva supervisión, vigilancia y control e inspección del adecuado uso de los recursos genéticos y sus derivados accedidos.
- m) Hacer de conocimiento del **INIA** cualquier circunstancia, evento o hecho sobre los recursos genéticos y sus derivados accedidos, que represente una infracción al Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, a la Decisión 391 de la CAN y/o a las demás disposiciones legales vigentes sobre acceso a los recursos genéticos y sus derivados.
- n) Las demás obligaciones que establezcan las normas sobre la materia.

Artículo 6.- Determinar como beneficios no monetarios que otorgará a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** al **INIA**, en representación del Estado peruano, por el acceso a los recursos genéticos y sus derivados señalados en el artículo 1 de la presente Resolución Directoral, sin fines comerciales, aquellos establecidos en el artículo 49 numeral 49.1 y numeral 49.2 literal b) del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante D.S. N° 019-2021-MINAM. La distribución justa y equitativa de dichos beneficios se realizará de conformidad con a lo acordado en documento denominado "ACTA REUNIÓN VIRTUAL DE NEGOCIACIÓN DE BENEFICIOS", de fecha 09 de enero de 2025.

- 6 -

Artículo 7.- Establecer como vigencia de la autorización del artículo 1 de la presente Resolución Directoral, el plazo de veinticuatro (24) meses, otorgando a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** un plazo adicional de ciento veinte (120) días hábiles para cumplir con los beneficios no monetarios referidos en el artículo precedente. Este plazo se establece sin perjuicio de la facultad del **INIA** de exigir, por los medios que permite la Ley, el cumplimiento de las obligaciones vencidas.

Artículo 8.- Reconocer el derecho de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA** de tramitar los eventuales derechos de propiedad intelectual que pudieran generarse a partir del proyecto de investigación que le correspondan. Dicha tramitación deberá ser comunicada al **INIA** dentro de los quince (15) días calendario de iniciado el procedimiento, bajo responsabilidad. Las condiciones específicas relativas a la distribución de beneficios derivados de los eventuales derechos de propiedad intelectual que se generen a partir de los proyectos de investigación para los que se autoriza el acceso a los recursos genéticos y sus derivados, se establecen en el contrato de acceso al que se hace referencia en el literal l) del artículo 5 de la presente Resolución de autorización.

Artículo 9.- Otorgar tratamiento confidencial a los resultados obtenidos con la metodología experimental expuesta en el proyecto, en conformidad a las disposiciones contenidas en el artículo 28 del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM.

Artículo 10.- Establecer que las modificaciones a las condiciones de la autorización que se otorga por el artículo 1 de la presente Resolución Directoral; así como la suspensión, cancelación, resolución y extinción se realizará de acuerdo a lo establecido en el Capítulo IV del Título IV del Reglamento de acceso a los recursos genéticos y sus derivados, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2021-MINAM, en lo que corresponda. Las modificaciones a los términos y condiciones establecidas en la presente Autorización se realizan mediante resolución, la cual debe ser publicada dentro de la vigencia de la presente autorización.

Artículo 11.- Encargar a la Subdirección de Regulación de la Innovación Agraria (SDRIA), la supervisión y control del cumplimiento del Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 001-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA, el cual deberá incorporarse en el Registro de Acceso a los Recursos Genéticos a cargo de dicha Subdirección.

Artículo 12.- Disponer que la Unidad de Informática publique la presente Resolución Directoral junto con un extracto del Contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados sin fines comerciales N° 001-2025-MIDAGRI-INIA/DGIA, en el portal institucional de la entidad (www.gob.pe/inia).

Artículo 13.- Remitir una copia de la presente Resolución Directoral al representante de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**, para su conocimiento y fines.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE.

Firmado digitalmente por:
CALDAS CUEVA, Jesus Francisco FAU
201313629994 soft
Fecha: 23/04/2025 16:23:24

JESÚS FRANCISCO CALDAS CUEVA
Director General
Dirección de Gestión de la Innovación Agraria