

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UNA BEBIDA FERMENTADA DE BASE VEGETAL EN LA LÍNEA CELULAR CHO-K1: ROL DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA

Branca, Bruno Ezequiel – LU133359

Ingeniería en Alimentos

Tutor:

Charif, Santiago (PhD), Instituto de Tecnología (INTEC) - Universidad
Argentina de la Empresa (UADE)

2023

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera principalmente agradecer a mi padres, María y Bruno, que me mostraron con el ejemplo y la palabra el camino del esfuerzo y dedicación para poder alcanzar aquellos objetivos personales.

Gracias a mi mujer Evana, mis dos hijas Martina y Julieta, que estuvieron para apoyarme en todo momento, cada una desde su lugar brindándome su amor para llevar adelante este proyecto.

Gracias a mis hermanas, Patricia y Andrea, que estuvieron siempre ahí para cuando las necesite. A mis tíos/as, primos/as, amigos que me alentaron a seguir adelante.

Gracias a mis jefes del servicio de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular del Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Elisabet y Pablo, no sólo por su comprensión, sino por transmitirme el amor por la ciencia con pasión y entusiasmo. A mis compañeros, Natalia y Jorge, que siempre estuvieron para cubrirme en el trabajo cuando los necesité.

Gracias a la Universidad Argentina de la Empresa, sobre todo, a los técnicos de UADE Labs, Guille, Carla y Pablo, unos genios con una predisposición increíble.

Por último, un especial agradecimiento a mi director del PFI, el Dr. Santiago Elías Charif por darme su confianza y permitirme formar parte de su proyecto de investigación. Gracias por transmitirme tranquilidad cuando las cosas no salían, por explicarme con paciencia, por sentarse conmigo a analizar protocolos y resultados.

RESUMEN

El estado de estrés oxidativo se conoce como un desbalance severo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes celulares, inclinando la balanza a favor de los oxidantes. Este estado genera una pérdida del control en el daño celular y una disrupción de la señalización redox, alterando biomoléculas del organismo. Esto se ha vinculado con el desarrollo de diversas patologías. La incorporación de compuestos antioxidantes dietarios colabora con el mantenimiento de los niveles fisiológicos de ROS. Existen numerosas investigaciones sobre compuestos presentes en alimentos fermentados de origen vegetal (carotenoides, polifenoles, vitaminas, flavonoides) que se han relacionado con importantes mecanismos de inactivación de ROS en estados de estrés oxidativo. En Argentina la industria de alimentos fermentados de origen vegetal crece de forma constante con el desarrollo de productos novedosos que intentan sustituir a la leche de vaca. Todos estos productos apuntan a abarcar un nicho de mercado para aquellas personas con dietas especiales, por ejemplo, aquellos con ciertos trastornos fisiológicos como los intolerantes a lactosa, aquellos que presentan hipercolesterolemia (colesterol alto en sangre) o simplemente, aquellos que por diferentes razones deciden no consumir alimentos derivados de animales. En el presente trabajo se evaluaron los efectos antioxidantes de una bebida fermentada de base vegetal (BFBV) desarrollada en la Universidad Argentina de la Empresa (UADE) sobre la línea celular CHO-K1 sometida a un estrés oxidativo inducido con el oxidante paraquat. La BFBV se desarrolló en la planta piloto de producción de lácteos de la empresa Christian Hansen ubicada en UADE, dentro del marco de investigación y desarrollo de productos novedosos y alternativos. Para su formulación se utilizó un extracto acuoso de almendras, una base de proteínas de habas y el inóculo bacteriano Yoflex[®]YF-L02 DA de Cristian Hansen. Para el análisis de la capacidad antioxidante de la BFBV, se aplicó un protocolo de medición de actividad de la enzima catalasa basado en el seguimiento por espectroscopía ultravioleta de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y, además, un ensayo de viabilidad celular mediante el ensayo de exclusión de trypan blue. Los resultados de este trabajo demostraron que los compuestos antioxidantes de la BFBV colaboran en el control de la sobreproducción de ROS en células CHO-K1 inducida por paraquat, impactando sobre la actividad de la enzima catalasa sin afectar negativamente *per*

se la viabilidad celular; más aún, en las células no tratadas con paraquat, la BFBV no afectó la actividad enzimática ni la viabilidad. Este trabajo asimismo permitió destacar los potenciales beneficios de un producto alimenticio novedoso como fuente natural de antioxidantes protectores frente al daño molecular por estrés oxidativo, colaborando ello en su promoción para la profundización del estudio de sus efectos en el consumo humano y ulteriormente una potencial participación en el mercado. El desarrollo de este PFI está incluido dentro del proyecto de investigación código P21T05 a cargo del Dr. Santiago Elías Charif (PhD-UBA, CONICET, INTEC-UADE).

ABSTRACT

Oxidative stress is known as a severe imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and cellular antioxidant defenses, tipping the balance in favor of oxidants. This state generates a loss of control of cellular damage and a disruption of redox signaling, altering the organism's biomolecules. This has been linked to the development of several pathologies. The intake of dietary antioxidant compounds collaborates with the maintenance of physiological levels of ROS. Many studies on compounds present in fermented foods of plant origin (carotenoids, polyphenols, vitamins, flavonoids) have been related to important mechanisms of ROS inactivation in states of oxidative stress. In Argentina, the plant-based fermented foods industry is growing constantly with the development of novel products that attempt to replace cow's milk. All of these products aim to cover a market niche for those people with special diets, for example, those with certain physiological disorders such as lactose intolerance or hypercholesterolemia (high blood cholesterol), or simply people who for different reasons decide not consume animal derived food. In the present work, the antioxidant effects of a plant-based fermented beverage (BFBV) developed at the Universidad Argentina de la Empresa (UADE) on the CHO-K1 cell line subjected to paraquat-induced oxidative stress were evaluated. The BFBV was developed in the dairy production pilot plant of the Christian Hansen company located at UADE, within the framework of research and development of novel and alternative products. For its formulation, an aqueous extract of almonds, a bean protein base and the bacterial inoculum Yoflex®YF-L02 DA from Cristian Hansen were used. The *in vitro* experimental design consisted of cells treated with paraquat, a BFBV extract, or a sequential incubation of both. For the analysis of the antioxidant capacity of BFBV, a protocol for measuring the activity of the catalase enzyme was employed, based on ultraviolet spectroscopy monitoring of the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂) and, in addition, a cell viability assay using the trypan blue exclusion assay. The results of this work demonstrated that the antioxidant compounds of BFBV collaborate in the control of paraquat-induced ROS overproduction, impacting on the activity of catalase without affecting cell survival; Furthermore, in cells not treated with paraquat, BFBV did not affect enzymatic activity nor

viability. This work also highlighted the potential benefits of a novel food product as a natural source of antioxidants that protect against molecular damage due to oxidative stress, thus collaborating in its promotion for the deepening of the study of its effects on human consumption and subsequently a potential market share. The development of this PFI is included within the research project code P21T05 led by Dr. Santiago Elías Charif (PhD-UBA, CONICET, INTEC-UADE).

CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS 2

RESUMEN..... 3

ABSTRACT 5

INTRODUCCIÓN..... 9

1. OBJETIVO 9

 1.1 Objetivo general 9

 1.2 Objetivos específicos 9

2. ANTECEDENTES 10

 2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)..... 10

 2.1.1 Radicales libres 11

 2.1.2 Especies reactivas no radicales 13

 2.2 Fuentes de especies reactivas de oxígeno..... 14

 2.3 Estrés oxidativo 16

 2.4 Antioxidantes..... 17

 2.4.1 Antioxidantes endógenos celulares..... 18

 2.4.2 Antioxidantes de origen dietario 23

 2.5 Alimentos fermentados de origen vegetal 25

3. HIPÓTESIS 29

4. MATERIALES Y MÉTODOS..... 30

 4.1 Desarrollo de la bebida fermentada de base vegetal..... 30

 4.2 Lugar de trabajo y factibilidad 31

 4.3 Línea celular y condiciones de cultivo 31

 4.4 Tratamientos 32

 4.5 Lisis celular 33

 4.6 Cuantificación de proteínas 33

 4.7 Ensayo de actividad de la enzima catalasa 34

 4.8 Determinación de la viabilidad celular 35

 4.9 Análisis estadístico 35

5. RESULTADOS	36
5.1 Respuesta de la actividad de la catalasa al tratamiento con paraquat.....	36
5.1.1 Análisis de viabilidad celular frente al paraquat.....	37
5.2 Efecto de la BFBV sobre la actividad de la enzima catalasa.....	38
5.2.1 Análisis de viabilidad en células tratadas con la BFBV	39
6. DISCUSIÓN	40
7. BIBLIOGRAFÍA	44

INTRODUCCIÓN

1. OBJETIVO

1.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la evaluación *in vitro* de las propiedades antioxidantes de una bebida fermentada de base vegetal (BFBV) desarrollada en UADE, sobre células CHO-K1 sometidas a un estrés oxidativo con el oxidante paraquat.

1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un diseño experimental *in vitro* que permita estudiar los efectos antioxidantes de una BFBV.
- Determinar una concentración de paraquat que genere un estado de estrés oxidativo sin impactar en la viabilidad de células CHO-K1.
- Estimar la actividad de la enzima catalasa en células CHO-K1 bajo un estrés oxidativo inducido por la concentración de paraquat escogida, y el efecto de una posterior incubación con un extracto de la BFBV, así como el efecto *per se* de la BFBV sobre las células.
- Evaluar la viabilidad celular luego del tratamiento con paraquat, BFBV o ambos en orden secuencial mediante una prueba de exclusión de tinción con trypan blue.

2. ANTECEDENTES

2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

A lo largo de la historia de la vida en la tierra surgieron organismos capaces de utilizar el oxígeno como molécula aceptora final de electrones en el llamado “metabolismo oxidativo”. Esto generó sistemas de producción de energía eficaces, otorgando una ventaja evolutiva a los organismos aeróbicos, pero trajo consigo la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Martinez *et al.*, 2003).

La producción de ROS en los organismos aeróbicos puede ser explicada por el principio de exclusión de Pauli, dos electrones no pueden existir en el mismo estado cuántico (es decir, poseer los mismos números cuánticos), por lo que deben al menos diferir en su spin (Allinger *et al.*, 1991). El O₂ en su estado más estable (oxígeno triplete) tiene dos electrones desapareados en su último orbital molecular con el mismo número de *spin* (+1/2) aunque se encuentran en distintos suborbitales. Afortunadamente, este estado de oxígeno triplete impide que la molécula capte dos electrones de forma simultánea en las reacciones que interviene, ya que la ganancia de electrones debe hacerse de a uno por vez para ir completando los orbitales moleculares desapareados (proceso denominado “reducción monovalente”). Esto genera una molécula de oxígeno con una reactividad relativamente baja. Sin esta característica, el deterioro celular o envejecimiento sería mucho más rápido de lo normal, pero tiene como contrapartida que algunas reducciones monovalentes son incompletas con la consecuente producción de ROS (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Las ROS podrían definirse entonces, como metabolitos de oxígeno parcialmente reducidos con capacidad para producir oxidación en las macromoléculas de su entorno (Mittal *et al.*, 2014). Dentro de las ROS se incluyen los radicales libres y moléculas no radicales. En el grupo de los radicales libres se encuentran el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), los radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), peroxilo ($\text{RO}_2\bullet$) y alcoxilo ($\text{RO}\bullet$). Existen también moléculas no radicales con elevada capacidad prooxidante como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HOCl), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y los peróxidos orgánicos (ROOH) (Carvajal, 2019)

2.1.1 Radicales libres

Los radicales libres son moléculas capaces de una existencia independiente que contienen un electrón de valencia desapareado, lo que permite que sean especies sumamente reactivas con capacidad de transformar (en reacción en cadena) a otras moléculas en especies reactivas, con el potencial de causar daño a diferentes componentes celulares (Martínez *et al.*, 2003). La concentración de los radicales libres puede incrementarse por variadas causas, como el metabolismo de los alimentos, el ejercicio físico, la contaminación, consumo de tabaco, exposición a radiaciones, a pesticidas y herbicidas (Molina, 2012). Asimismo, los radicales libres pueden generarse a partir de la ruptura simétrica en las uniones covalentes de una molécula, dejando dos moléculas “hijas” con un electrón desapareado en cada una de ellas. Este proceso es conocido como fisión homolítica (Halliwell y Gutteridge, 2015).

No fue hasta 1969 que se comprobó la existencia de elementos derivados del O₂ con capacidad de generar daños a las células cuando estos se encontraban en exceso. Desde entonces el estudio del metabolismo oxidativo y el descubrimiento de enzimas antioxidantes dio lugar a la investigación de las ROS y su implicancia en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Phaniendra, 2015).

Uno de los radicales libres derivados del O₂ que se encuentra con mayor abundancia en el organismo es el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Este se forma a partir de la captación de un electrón a través de reacciones de autooxidación de biomoléculas como catecolaminas, flavinas, hemoglobina, mioglobina y reacciones de oxidación catalizadas por enzimas, como por ejemplo la xantina oxidasa, la flavin deshidrogenasa, peroxidasas que transfieren un electrón a la molécula de O₂ (Martínez Sánchez, 2005). El $\bullet\text{O}_2^-$ es relativamente de baja reactividad para muchas de las biomoléculas celulares, si se lo compara con otros tipos de radicales libres. Sin embargo, puede reaccionar rápidamente en presencia de otros radicales, por ejemplo, con óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) producido por el endotelio; esto da lugar a la formación de un oxidante fuerte, el peroxinitrito (OONO^-) (Mcintyre *et al.*, 1999). Asimismo, el $\bullet\text{O}_2^-$ puede participar de la reacción de Haber-Weiss junto al peróxido de hidrógeno y iones metálicos ($\text{Fe}^{+2}/\text{Cu}^+$) como catalizadores, que conduce a la formación de especies oxidantes muy reactivas como el radical

hidroxilo (Brent y Rumack, 1993). La sobreproducción del anión superóxido está involucrada en la fisiopatología de algunas enfermedades. Por ejemplo, diferentes investigaciones evidencian un papel importante del $\bullet\text{O}_2^-$ en la patogénesis de la arteriosclerosis, a través de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (White *et al.*, 1994) y la sobreproducción de moléculas de adhesión (Marui *et al.*, 1993). Además, junto a otros posibles mecanismos, se ha propuesto que el exceso de $\bullet\text{O}_2^-$ puede estar directamente implicado en la disfunción endotelial a través de una disminución en la disponibilidad de $\bullet\text{NO}$ cuando el anión superóxido formado excesivamente reacciona con este (McIntyre *et al.*, 1999). Esta condición está caracterizada por una reducción de la capacidad vasorrelajante del endotelio, alteración relevante en la hipertensión arterial (Vanhoutte *et al.*, 2005). Otras investigaciones sugieren que los estados de estrés oxidativo mediados por el $\bullet\text{O}_2^-$ y sus derivados (H_2O_2 , OONO^-) desempeñan un papel importante en la evolución de la insuficiencia cardíaca, contribuyendo indirectamente al deterioro del corazón. Trabajos realizados en cardiomiocitos aislados han demostrado que el $\bullet\text{O}_2^-$ inhibe rápida e irreversiblemente la fuerza contráctil inducida por el Ca^{+2} (Miller y Macfarlane, 1995) y que el OONO^- altera el flujo de Ca^{+2} y daña el aparato contráctil (Ishida *et al.*, 1996). Otra de las patologías que se asocia a la sobreproducción de $\bullet\text{O}_2^-$ es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por una muerte selectiva de las neuronas motoras. Algunos de los casos se deben a una mutación en el gen de una de las principales enzimas encargadas de eliminar los aniones superóxidos ($\bullet\text{O}_2^-$), la superóxido dismutasa tipo 1 (Cu/Zn-SOD1). Los análisis estructurales de la SOD1 mutante sugieren una menor afinidad por el átomo de cobre con una consecuente fuga de este ion hacia otras proteínas afines a él. Esto resulta en una reducción de la capacidad enzimática para eliminar el $\bullet\text{O}_2^-$, con la consecuente acumulación de esta especie radical (Kang y Eum, 2000; Perez y Arancibia, 2017).

El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es uno de lo más potentes encontrado en los organismos, puesto que puede reaccionar con mucha afinidad con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del entorno celular (Brent y Rumack, 1993; Phaniendra *et al.*, 2015). Unas de las principales reacciones celulares generadoras del $\bullet\text{OH}$ se da a través del uso de metales de transición como catalizadores. Un ejemplo de ello es la denominada reacción de Fenton. Este proceso requiere

una mezcla de H_2O_2 e ion ferroso (Fe^{+2}) provenientes de la hemoglobina, ferritina o mioglobina (Korc *et al.*, 1995). Otra reacción importante formadora del $\bullet OH$ se da a través del ion de cobre (Cu^+) que forma parte de biomoléculas celulares; éste reacciona con el H_2O_2 , produciéndose el $\bullet OH$ (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Otros de los radicales derivados del oxígeno son los radicales peroxilo ($RO_2\bullet$) y alcoxilo ($RO\bullet$). Se generan comúnmente como intermediarios en las reacciones de peroxidación de lípidos (Aruoma, 1996). Pueden atraer átomos de hidrógeno desde otras moléculas. A nivel celular, producen una pérdida de la fluidez y una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática (Martínez Sanchez, 2005).

2.1.2 Especies reactivas no radicales

A diferencia de los radicales libres, las especies reactivas no radicales carecen de electrones desapareados en sus orbitales de valencia. Sin embargo, son moléculas prooxidantes que, a elevadas concentraciones, pueden generar un daño en las macromoléculas celulares (Altaf *et al.*, 2023).

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es una molécula estable, que puede producirse en los procesos de transferencia electrónica mitocondrial, metabolismos enzimáticos de lipoxigenasas, y en el citocromo P450, entre otros (Neill *et al.*, 2002). En estos sistemas durante los procesos de transferencia electrónica se puede catalizar la formación de $\bullet O_2^-$ y, mediante reacciones de dismutación (espontanea o mediada por la SOD), generándose H_2O_2 (Cai, 2005). Además, el H_2O_2 puede producirse directamente por donación de un par de electrones a la molécula de oxígeno (Sies y Cadenas, 1983). El H_2O_2 reacciona principalmente con los grupos cisteínas de las proteínas y es capaz de atravesar la membrana plasmática (André *et al.*, 2010). Algunas investigaciones reportaron que los altos niveles de H_2O_2 tienen efecto citotóxico para una amplia gama de células animales, vegetales y bacterianas en cultivos, dependiendo de la dosis aplicada, el estado fisiológico de las células y tiempo de exposición (Imlay y Linn, 1987; Gonzalez-Flecha y Demple, 1997; Hampton y Orrenius, 1997). También en los últimos años se ha descrito que los niveles de H_2O_2 en condiciones fisiológicas normales, cumplen un rol importante en algunos mecanismos de señalización como activación de células inmunitarias y

remodelación vascular en mamíferos (Geiszt y Leto, 2014), proliferación (Foreman *et al.*, 2003), diferenciación (Li *et al.*, 2006) y apoptosis celular (Clementa *et al.*, 1998).

Otra molécula que pertenece al grupo de las especies reactivas no radicales y que se forma a partir de neutrófilos activados en los sitios de inflamación en una reacción entre el H_2O_2 y el ion Cl^- catalizada por la enzima mieloperoxidasa es el ácido hipocloroso (HOCl). Uno de los principales blancos de este agente oxidante es la $\alpha 1$ -antitripsina, molécula circulante que se encarga de proteger a los tejidos de la acción de proteasas como por ejemplo la elastasa. (Martínez Sanchez, 2005).

Por otro lado, cuando una molécula de oxígeno se encuentra excitada electrónicamente puede pasar a estados metaestables, siendo el oxígeno singlete (1O_2) uno de ellos (Phaniendra, 2015). Esta especie molecular es altamente reactiva, y puede generarse a partir de la activación de neutrófilos (Hampton, 1998) y eosinófilos (Kanofsky, 1989). En condiciones patológicas donde se produce en exceso, puede generar daños en el ADN (Sies, 1992) y en proteínas a través de la oxidación de ciertos aminoácidos como triptófano, metionina, histidina y residuos de cisteína (Halliwell y Gutteridge, 2015).

2.2 Fuentes de especies reactivas de oxígeno

Todas las moléculas reactivas nombradas anteriormente, y principalmente las derivadas del oxígeno, tiene una fuente principal de generación que son las mitocondrias. Allí, una molécula de O_2 actúa como último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, reaccionando con cuatro electrones (e^-) y cuatro hidrógenos (H^+) para formar dos moléculas de agua. Si bien más del 90 % del oxígeno es reducido a moléculas de agua, un pequeño porcentaje del oxígeno finaliza con la síntesis de ROS (Korc *et al.*, 1995). Se han descrito otras fuentes endógenas de ROS además del metabolismo mitocondrial (Fig.1). Por ejemplo, como consecuencia de la fagocitosis, los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos generan ROS, que actúan como agentes antimicrobianos y moduladores de su respuesta efectora (Zeng, 2019).

Otra de las fuentes reportadas es la autooxidación de catecolaminas (Cohen, 2002). En determinados procesos isquémicos, se produce liberación de noradrenalina y dopamina por parte del tejido local (Ikeda y Long, 1990). Luego las catecolaminas son degradadas por la

enzima monoamino oxidasa (MAO), lo que genera una elevada producción de e^- . Posterior al proceso isquémico existe una revascularización tisular y el O_2 funciona como un aceptor de los e^- generados, con la consecuente producción de ROS (Drost, 1996). Según Cohen (2002) las ROS y la MAO pueden contribuir a aumentar las tasas de senescencia de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

Asimismo, a través del metabolismo del ácido araquidónico se producen mediadores inflamatorios (endoperóxidos) como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, cuya reacción está catalizada por la enzima ciclooxigenasa. Esto implica la generación de radicales hidroxilos ($\bullet OH$), que controlan de forma secundaria la cascada del ácido araquidónico mediante la regulación de la actividad de la ciclooxigenasa y, por lo tanto, la producción de endoperóxidos (Drost, 1996).

Por otro lado, en el metabolismo de purinas participa la enzima xantina oxidasa (XO), que interviene en la oxidación de la hipoxantina a xantina y de la xantina a ácido úrico. En este proceso, el oxígeno interviene como aceptor de electrones, con la consecuente formación de H_2O_2 y $\bullet O_2^-$ (Schmidt *et al.*, 2019).

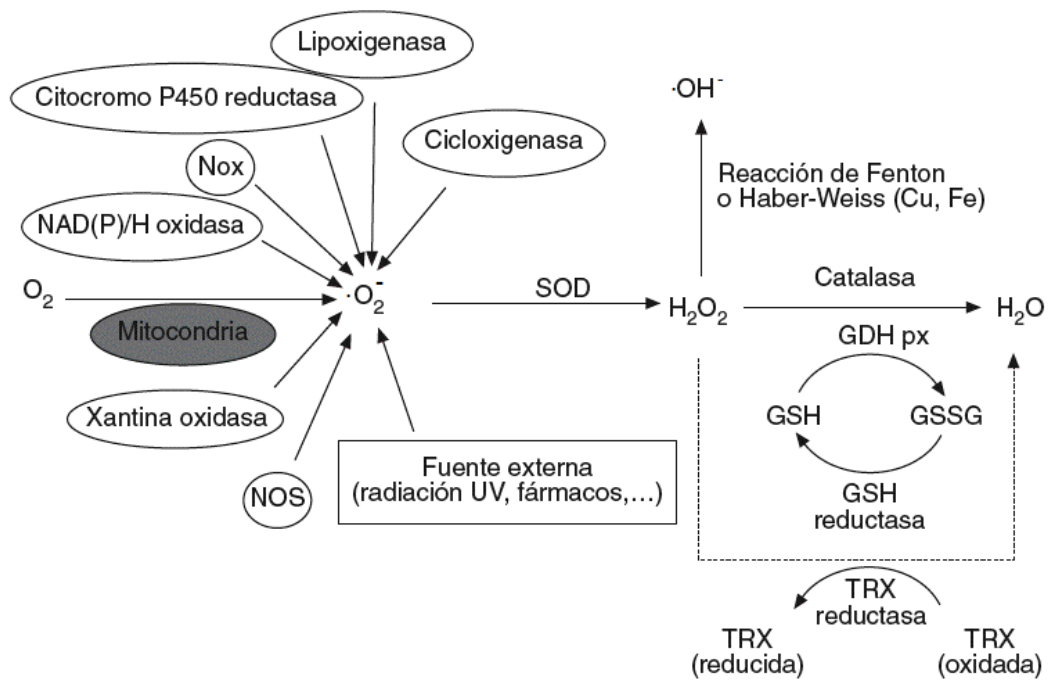


Figura 1: fuentes endógenas celulares de ROS. Fuente: Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005.

2.3 Estrés oxidativo

En condiciones normales, la producción de ROS es controlada y balanceada por las defensas antioxidantes endógenas y los compuestos antioxidantes que incorporamos a través de la dieta. Es importante destacar que el sistema celular antioxidante no elimina completamente a las ROS, sino que los mantiene por debajo de niveles citotóxicos. Las especies reactivas de oxígeno, en concentraciones moderadas, juegan un papel importante en algunas de las vías de señalización celular, por ejemplo, en el metabolismo de fosforilación de enzimas y síntesis de factores de transcripción (Nishida *et al.*, 2012)

El estado de estrés oxidativo se conoce como un desbalance severo en la producción de ROS y las defensas antioxidantes celulares, inclinando la balanza a favor de los oxidantes. Este estado genera una pérdida del control en el daño celular y una disrupción de la señalización redox (Sies y Jones, 2007), generando una alteración de ciertas biomoléculas del organismo (ADN, proteínas, lípidos). Algunas de las causas por la que un organismo puede llegar a un estado de estrés oxidativo son:

- Mutaciones genéticas que pueden generar bajos niveles en la producción de moléculas del sistema de defensa, como GSH y MnSOD.
- Una dieta inapropiada que puede generar deficiencias en el consumo de vitaminas y minerales.
- Enfermedades inflamatorias crónicas que producen una excesiva activación de células fagocíticas.
- Tiempos prolongados de exposición a radiaciones UV o sustancias químicas en concentraciones desproporcionadas como por ejemplo agrotóxicos, etc.

Todas las células del organismo son susceptibles a los daños producidos por los estados de estrés oxidativo. Las células del cerebro en mamíferos son todavía más vulnerables producto de la alta demanda de oxígeno que estas presentan, aproximadamente un 20% del consumo total de oxígeno aportado. Esta demanda de oxígeno está asociada a un elevado

metabolismo energético (síntesis de ATP), donde una parte importante del ATP generado se destina al mantenimiento del gradiente iónico para su correcta transmisión nerviosa, secreción de neurotransmisores por exocitosis, etcétera. Esta elevada demanda de oxígeno genera que las células cerebrales estén más expuestas a daños por la acción de las ROS (Micó *et al.*, 2010). Numerosas investigaciones proponen que las ROS están asociadas a enfermedades neurodegenerativas, ya que, se relacionan con la pérdida de neuronas de poblaciones definidas en el sistema nervioso central (Barnham *et al.*, 2004; Ceccatelli *et al.*, 2007; Epel *et al.*, 2004).

Diversas sustancias de uso cotidiano en la industria agropecuaria han sido directamente relacionadas con la sobreproducción de ROS y enfermedades de relevancia. El herbicida paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es empleado en todo el mundo, siendo clave en países asiáticos y latinoamericanos (Cuartas y Berrouet Mejía, 2016). Esta sustancia ejerce su acción herbicida al interferir con los sistemas celulares de transferencia de electrones, esta interrupción conduce a la formación de ROS, principalmente $\bullet\text{O}_2$ y su derivado H_2O_2 (Suntres, 2002). El paraquat se ha utilizado en diversos estudios como un potente inductor de estrés oxidativo, por ejemplo, en estudios de tolerancia al estrés y respuestas del sistema antioxidante (Lescano *et al.*, 2003), regulación de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (Alexa *et al.*, 1999), estrés oxidativo y muerte de células neuronales (McCarthy *et al.*, 2004).

2.4 Antioxidantes

Un antioxidante es toda molécula capaz de interactuar con los radicales libres y especies oxidantes que se generan en el metabolismo celular; inhibiendo o retrasando el efecto nocivo que generan sobre otras moléculas de su entorno (Molina, 2012). A lo largo de la evolución, las células han aprovechado la capacidad de estas moléculas para contrarrestar los efectos dañinos que pueden generar las ROS y otras especies oxidantes. Los antioxidantes celulares se pueden agrupar en: antioxidantes endógenos celulares y antioxidantes de origen dietario.

2.4.1 Antioxidantes endógenos celulares

En general los sistemas antioxidantes endógenos están integrados por enzimas y moléculas pequeñas (Kohen, 2000). La primera línea de defensa contra un estresor oxidativo es un conjunto de enzimas que tienden a contrarrestar los efectos inmediatos de estos agentes. Se destaca la enzima catalasa (CAT), un tetrámero formado por cuatro grupos hemo, que se encuentra distribuida en los peroxisomas de las células del organismo, principalmente en el hígado. Su función es la inactivación del H₂O₂ que se produce por el metabolismo celular (Goyal y Basak, 2010). A través de una óxido-reducción mediada por la CAT, dos moléculas de H₂O₂ se transforman en dos moléculas de H₂O y una de O₂ (reacción denominada dismutación). Este proceso ocurre en dos etapas, utilizando Fe (III) del grupo hemo unido al sitio activo de la catalasa como cofactor. En la primera etapa, el Fe (III) es oxidado a Fe (IV) por una molécula de H₂O₂ formando un intermediario llamado compuesto I y H₂O. Luego en la segunda etapa, otra molécula de H₂O₂ reducirá al compuesto I (regresando a la CAT a su estado inicial), generándose O₂ y una nueva molécula de H₂O (Halliwell y Gutteridge, 2015). (Fig. 2).

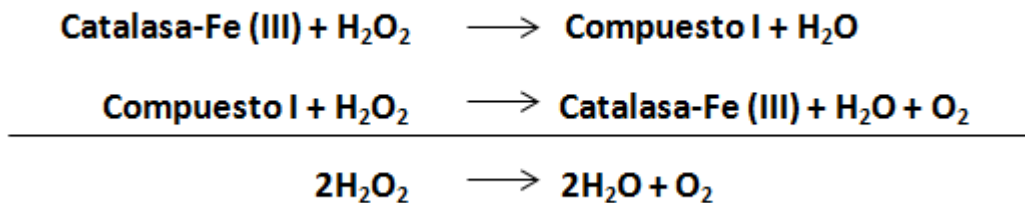


Figura 2: etapas de la óxido-reducción mediada por la catalasa, en la que dos moléculas de H₂O₂ se transforman en dos moléculas de H₂O y una de O₂. Fuente: Halliwell y Gutteridge, 2015.

Un proceso clave en la protección ante un estrés oxidativo es la inactivación del radical •O₂⁻. Esto se logra catalizando la dismutación entre dos moléculas de •O₂⁻ mediante la enzima SOD, con la consecuente formación de oxígeno y peróxido de hidrogeno (Mccords y Fridovich,

1969). Existen tres tipos de SOD en los mamíferos, diferenciadas entre sí por el elemento presente en su sitio activo y su localización dentro y fuera de la célula (Fig. 3). La variante SOD1 o Cu/Zn-SOD está constituida por dos subunidades, y cada una de ellas une un átomo de cobre y zinc. Se expresa en casi todas las células eucariotas, principalmente en el citosol. (Fridovich, 1983). Otra variante tiene unido un átomo de manganeso, y se denomina SOD2 o MnSOD. Su estructura es tetramérica y se expresa principalmente en la mitocondria (Zelko, Mariani y Folz, 2002). Finalmente, en el espacio extracelular se encuentra la SOD3 o EC-SOD, que ejerce su efecto catalítico contra los radicales superóxidos que allí se generan (Nguyen *et al.*, 2019). El aislamiento y secuenciación del gen que codifica la SOD3 ha demostrado que se trata de una proteína de secreción y con un 50% de homología con los dos tercios finales de la secuencia de aminoácidos de la SOD2 (Hjalmarsson, 1987).

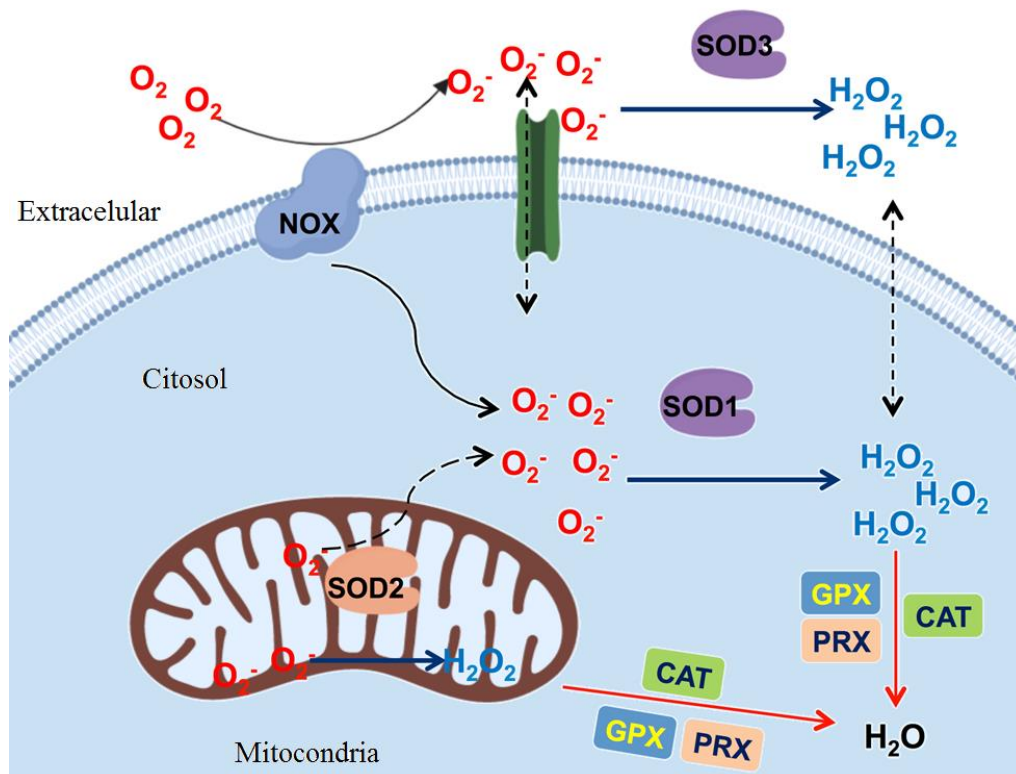


Figura 3: familia de las SOD ejerciendo su función catalítica sobre los radicales superóxidos de origen endógeno y exógeno. Fuente: Nguyen *et al.*, 2019.

Otro de los elementos que participan de la defensa antioxidante celular es el sistema glutatión que está formado por un conjunto de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión-s-transferasa (GST) y la glutatión reductasa (GR) (Bonola Gallardo *et al.*, 2014). El sustrato de todas es el glutatión, un tripéptido formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (Bachhawat *et al.*, 2013). En la célula, esta molécula se encuentra principalmente en su forma reducida (GSH), y en mucha menor proporción, en su estado oxidado como disulfuro de glutatión (GSSG). Una de las funciones relevantes del sistema glutatión es la inactivación del peróxido de hidrogeno intracelular (Depote, 2013). Este proceso comienza con la conjugación del GSH al H₂O₂ mediante la GST. A continuación, el H₂O₂ es neutralizado hacia dos moléculas de H₂O, formándose GSSG, gracias a la acción de la GPx (Sheehan *et al.*, 2001).

La GR es un tetrámero homodimérico que posee cuatro átomos de selenio unidos covalentemente, y requiere del cofactor flavin adenín dinucleótido (FAD). Se expresa principalmente en el citosol de las células, aunque también se expresa dentro de la mitocondria (Couto, Wood y Barber, 2016). Su función es mantener elevados los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) (Carlberg y Mannervik, 1985). Esto es de vital importancia, ya que la GPx utiliza como donador de electrones al GSH, quedando como glutatión oxidado (GSSH) luego de la interacción con el H₂O₂. (Fig. 4).

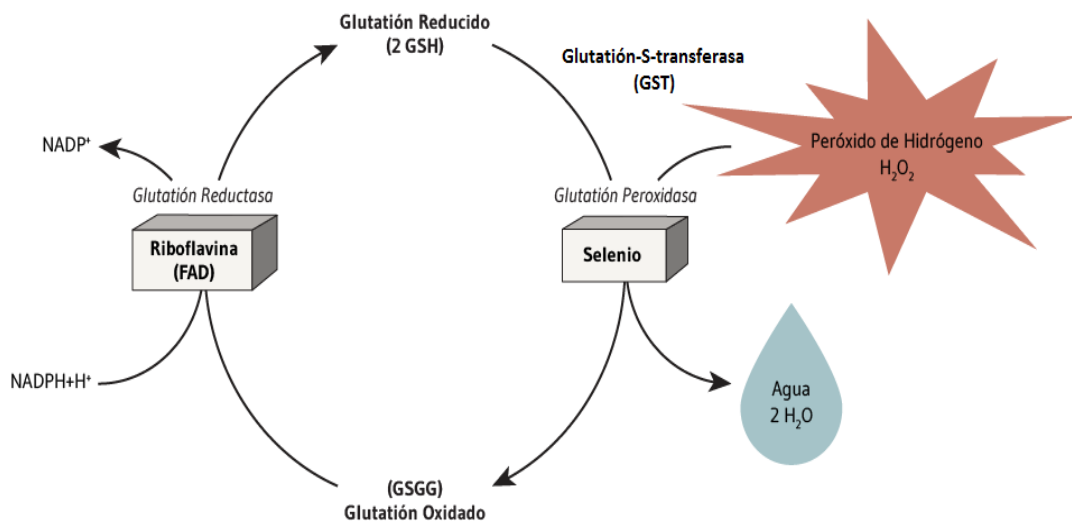


Figura 4: una molécula de peróxido de hidrogeno se reduce en dos moléculas de agua, mientras que dos moléculas de glutatión reducido (GSH) se oxidan en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx). El glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la glutatión reductasa (GR), enzima dependiente de FAD. Fuente: Ramirez *et al.*, 2007.

Asimismo, existen muchas moléculas de bajo peso molecular que se generan en el metabolismo celular de los mamíferos capaces de actuar como importantes antioxidantes. Una de ellas es la bilirrubina, como lo demuestra Fereshtehnejad *et al.* (2012) en su investigación, donde sugiere que la bilirrubina puede desempeñar un papel antioxidante en los neonatos protegiéndolos contra la excesiva generación de radicales libres como consecuencia de la elevada presión de oxígeno en las arterias y vías respiratorias cuando el bebé comienza a respirar (hiperoxia). Además, otras investigaciones han propuesto que estados leves de hiperbilirrubinemia puede ser beneficioso para proteger contra enfermedades cardiovasculares en adultos. Estos mecanismos incluyen los efectos antioxidantes y depuradores de radicales libres capaces de generar un daño en las células del tejido muscular cardiaco (Riter, 2012).

En los últimos años ha cobrado relevancia la melatonina como molécula pequeña antioxidante (Reiter, 2005). Esta hormona, sintetizada en la glándula pineal del cerebro de los vertebrados, regula eventos fisiológicos como el ciclo vigilia-sueño y la reproducción en animales estacionales (Haimov *et al.*, 1995). Algunas investigaciones demostraron que la melatonina ejerce un efecto antioxidante directo sobre los radicales libres (Li *et al.*, 1997); (Tan *et al.*, 1998) e indirecto por estimular la síntesis de las enzimas SOD, GPx y CAT (Reiter, 2001). El trabajo de Pablos *et al.* (1995) acerca del efecto indirecto sugiere considerar a la melatonina como estimulante para la síntesis de glutatión peroxidasa (GPx) en el cerebro de los mamíferos. Al mismo tiempo, Albarran *et al* (2001) establecen una relación entre la melatonina y el aumento nocturno en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). En este trabajo se evaluó el ritmo endógeno de la SOD en tres diferentes tejidos (corteza cerebral, hígado y pulmón) de polluelos (*Gallus domesticus*) expuestos a diferentes períodos de luz-oscuridad en cada etapa del estudio. En una primera etapa los polluelos estuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad de 12-12 hs. Aquí la SOD mostro un máximo de actividad en el período de oscuridad, coincidente con los picos máximos de melatonina plasmática. En una segunda etapa, los polluelos estuvieron

expuestos a luz constante, esto eliminó el ritmo de la melatonina, así como los picos de actividad de la SOD. Así Albarran *et al.* (2001) sugirieron que la melatonina podría estar estimulando la síntesis de SOD en corteza cerebral, hígado y pulmón de los polluelos en estudio. Estas y otras investigaciones sugieren que la melatonina es un modulador directo e indirecto de los estados de estrés oxidativo.

Otra de las moléculas que presenta carácter antioxidante es el ácido úrico. Este resulta del catabolismo de las purinas (adenina y guanina), y a pH fisiológico se encuentra ionizado como urato. Los humanos y otros primates a lo largo de la evolución han perdido la capacidad de transformar el urato en productos de degradación como la urea y el ácido glioxílico, ambas sustancias más solubles que el urato (Nieto *et al.*, 2000). Esta incapacidad se debe a una mutación en la región promotora del gen que codifica la síntesis de la enzima urato oxidasa, generando niveles más elevados de ácido úrico en aquellos organismos que presentan dicha mutación (Alcaino *et al.*, 2011). En 1981, Ames *et al.* reportaron la gran capacidad del ácido úrico para eliminar radicales libres y oxígeno singlete *in vitro*. Por este motivo, se propuso la hipótesis que esta mutación ha sido ventajosa para mejorar los mecanismos de protección antioxidante. Además, Davies *et al.* (1986) demostraron que otra de las capacidades antioxidantes del ácido úrico se debe a la formación de complejos estables con Fe^{+3} , estos complejos urato- Fe^{+3} inhiben la oxidación plasmática del ascorbato por parte del Fe^{+3} libre, así como la peroxidación de lípidos en liposomas.

La coenzima Q (CoQ₁₀) es sintetizada endógenamente, presenta un carácter lipofílico y actúa principalmente en el transporte de electrones de la membrana mitocondrial a través de mecanismos de óxido-reducción (Smith *et al.*, 2004). La CoQ₁₀ tiene la capacidad de interaccionar con el ácido dihidrolipoico, este le trasfiere un par de electrones, ayudando a mantenerla en su estado reducido (ubiquinol) (Kozlov *et al.*, 1999). El ubiquinol presenta una gran capacidad antioxidante fuera de la membrana mitocondrial, donde no solo participa en la regeneración de enzimas antioxidantes, sino que además puede afectar la iniciación y propagación de ROS (Turunen *et al.*, 2004).

2.4.2 Antioxidantes de origen dietario

Dentro de los compuestos antioxidantes de origen dietario se encuentran las vitaminas que cumplen un rol de gran importancia en el sistema de defensa antioxidante celular (Fu *et al.*, 2022). Las podemos encontrar en las frutas, verduras, cereales, lácteos, huevos, carnes y pescados. Según la *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación* (2020) una dieta variada y equilibrada puede aportar todas las vitaminas que el cuerpo necesita para mantenerse sano. Por ejemplo, la vitamina C (ácido ascórbico) es una molécula hidrofílica que –como toda vitamina- debe ser incorporada a través de la dieta ya que los humanos carecemos de la ruta metabólica para su síntesis endógena. Su principal fuente son las frutas cítricas, entre las que se destacan naranjas, pomelos y kiwi (National Institutes of Health, 2019). Su habilidad para donar electrones en muchas reacciones enzimáticas y no enzimáticas, junto a su relativa estabilidad, hace del ácido ascórbico un importante componente detoxificante de ROS (Andre *et al.*, 2010). Otra vitamina que participa del sistema antioxidante no enzimático es una molécula hidrofóbica denominada vitamina E. Comprende a un conjunto de ocho moléculas entre tocoferoles y tocotrienoles, cuya acción más importante se encuentra en la prevención de la peroxidación de lípidos. Dentro de los alimentos más importantes como fuentes de vitamina E se encuentran los aceites vegetales, por ejemplo, los aceites de germen de trigo y girasol. Además, los frutos secos como las almendras, maníes y avellanas aportan importantes cantidades de vitamina E para la dieta de las personas (National Institutes of Health, 2020). Su acción antioxidante implica la eliminación de ROS formados durante la peroxidación de lípidos. La vitamina E por ser lipofílica, se encuentra principalmente en el interior de membranas celulares y lipoproteínas (Muller, Theile y Bohm, 2010).

Asimismo, existen los pigmentos orgánicos liposolubles denominados carotenoides, que son sintetizados por plantas y algunos organismos fotosintéticos. Éstos se agrupan en aquellos que no presentan oxígeno en su estructura (carotenos) y los que sí poseen oxígeno formando parte de sus anillos terminales (xantófilas). Dentro de los carotenos podemos destacar aquellos que son precursores de vitamina A, siendo el β -caroteno uno de los más abundantes en la dieta humana (Carranco Jáuregui *et al.*, 2011). Sus fuentes principales son las

zanahorias y hortalizas verdes, como la espinaca y la rúcula. Otro carotenoide relevante es el licopeno, siendo el tomate una de las principales fuentes, pero también está presente en la sandía y la papaya (Meléndez-Martínez, 2017). Investigaciones realizadas *in vitro* e *in vivo* han indicado la relevancia del licopeno para reducir el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedad coronaria (Paiva y Russell, 1999; Rao y Agarwal, 1999; Johnson, 2002). Además, un estudio ha revelado que, entre los carotenoides de origen dietario comunes, el licopeno presentó el mayor poder antioxidante *in vitro* contra las especies de oxígeno singlete (Gerster, 1997). En su conjunto, los hallazgos han demostrado que el principal mecanismo benéfico de los carotenoides para la salud de los organismos que lo consumen es a través de su acción antioxidante.

La familia de los polifenoles está integrada por más de 8000 moléculas diferentes de elevado, aunque variable poder antioxidante. Su estructura comprende uno o más anillos aromáticos que llevan uno o más grupos hidroxilos (Stefani y Rigacci, 2014). Dentro de los polifenoles, los flavonoides son los más abundantes en la dieta de las personas, encontrándose en frutas, verduras, semillas, así como en la cerveza, el vino y el té. También se encuentran en extractos de plantas como *Ginkgo biloba*, cardo y arándano (Martínez-Flores *et al.*, 2002). Se producen en las plantas como producto secundario de su metabolismo, y cumplen importantes funciones fisiológicas y de defensa en las células vegetales (Singh *et al.*, 2017). Por ejemplo, la catequina y la quercetina ejercen un efecto antioxidante directo sobre $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 y HOCl . El grupo fenólico de estas moléculas captura a los electrones desapareados de las ROS. Este mecanismo de inactivación de radicales libres genera un radical flavínico mucho menos reactivo, ya que ahora el electrón desapareado se encuentra deslocalizado en los anillos fenólicos (Quiñones *et al.*, 2012). Otro polifenol relevante es el kaempferol, presente en el té negro, té verde, vino, manzana, peras y brócoli, entre otros (Seifrieda *et al.*, 2007; Somerset y Johannot, 2008). Se lo ha relacionado con importantes mecanismos de regulación en células cancerosas como la inhibición en la proliferación celular y angiogénesis (Luo *et al.*, 2008), y como un potente promotor de apoptosis en células cancerosas (Ramos, 2007). Existe evidencia basada en estudios epidemiológicos que sugieren que dietas ricas en flavonoides reducen el

riesgo de enfermedad coronaria y disminuyen la presión arterial y la inflamación debido a su actividad antioxidante (Liu *et al.*, 2000; Joshipura *et al.*, 2001).



2.5 Alimentos fermentados de origen vegetal

En los últimos años surgieron cambios en los hábitos alimentarios de las sociedades, impulsados entre otras cosas por la evidencia científica que demuestra cómo a través de una dieta y/o determinados componentes de los alimentos se pueden modular funciones fisiológicas para favorecer el bienestar y la salud del organismo (Jiménez-Colmenero, 2013). Los cambios actuales en la alimentación de las personas con dietas abocadas al consumo de productos de origen vegetal han permitido la clasificación de estos consumidores en tres grupos: los vegetarianos, los veganos y los flexitarianos. Los vegetarianos son aquellos que basan su dieta en productos de origen vegetal, consumiendo algunos alimentos derivados de los animales como lácteos y huevos. Los veganos son los más rigurosos, y basan su dieta en el consumo de productos de origen 100% vegetal. Los flexitarianos son aquellas personas que siguen una dieta vegetariana principalmente, pero con un consumo esporádico de carne. Este último es sin duda el grupo más amplio, tentando a la industria de los alimentos a desarrollar y producir cada vez más productos con matrices vegetales (Ekmeiro-Salvador y Arévalo-Vera, 2021). De acuerdo con Pérez Casar (2020), los consumidores cada vez más eligen saber qué contienen y cómo fueron obtenidos los productos que llevan a sus mesas, basando sus elecciones en la conciencia ambiental, bienestar animal y dietas más saludables. Esto se enmarca en la tendencia al consumo de productos naturales y menos procesados. Dentro de este marco, las legumbres y sus productos derivados parecen ocupar un lugar privilegiado para abastecer este mercado en auge.

Según la Secretaría de Agricultura Argentina en “*Tendencias de Consumo*”, en los últimos años los negocios de origen vegetal o veganos se han duplicado, por ejemplo, restaurantes vegetarianos, dietéticas, parrillas vegetarianas, entre otros. En Argentina la industria de alimentos fermentados de origen vegetal crece de forma constante con el desarrollo de productos novedosos que buscan ofrecer una alternativa al consumo de leche de vaca. Éstos pueden surgir a partir de extractos acuosos de cereales (arroz, avena, quinoa), provenir de frutos

secos (avellanas, almendras, nueces) o de legumbres (soja y el maní). Las grandes ventajas que presentan estos extractos es su composición: tienen un 90% de agua, y aunque presentan grasas mono y poliinsaturadas, no contienen colesterol por tratarse de derivados de materia vegetal. Por último, carecen del disacárido lactosa y en general no presentan trigo, avena, cebada y centeno (T.A.C.C.), fuentes del complejo proteínico conocido como *gluten*.

Actualmente en el mercado de Argentina se pueden encontrar distintas opciones de productos vegetales fermentados. Todos estos productos intentan abarcar un nicho de mercado para aquellas personas con dietas especiales, por ejemplo, aquellos con ciertos trastornos fisiológicos como los intolerantes a lactosa o aquellos que presentan hipercolesterolemia (colesterol alto en sangre), o simplemente, aquellos que deciden no consumir alimentos derivados de animales. Las empresas están al tanto de esta situación, y cada vez son más las industrias que invierten en investigación y desarrollo para este tipo de productos, y así poder satisfacer las necesidades de los clientes. Algunos de los alimentos fermentados de base vegetal, en este caso de tipo yogur, que podemos encontrar en el mercado se muestran en la *Tabla I*.

Nombre del producto	Empresa	Base	Azúcar agregada	Presentación	Ingredientes	Producto
QUIMYA living food®	QUIMYA YOG S.A.S.	Extracto acuoso de coco y frutilla	No	160 g	Agua, coco, frutillas, gelificante (agar), antioxidante (ácido ascórbico), estabilizante (goma xántica), sal, remolacha, sabor natural frutilla, sucralosa	
COCO IOGO®	QUFOOD	Extracto acuoso de coco deshidratado saborizado	No	160 g	Coco deshidratado, agua filtrada, gelatina vegetal (agar agar), cultivos activos (<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>).	



COLCHÓN®	FELICES LAS VACAS	Extracto acuoso de almendras con pulpa de frutos del bosque	No	190 g	Agua, preparado de frutos del bosque, almendras, almidón, concentrado de uva, aceite de coco, goma guar, lecitina de girasol, stevia, cultivos activos, sal.	
SILK®	DANONE	Crema de coco y agua	Si	190 g	Azúcar de caña, almidón modificado de maíz, fermentos naturales, vitamina C y E, estabilizante (agar agar), acidulante (ácido cítrico)	

Tabla I: productos fermentados de base vegetal presentes en el mercado de Argentina.

Algunos procesos tecnológicos en la elaboración de productos listos para consumo pueden disminuir la capacidad y cantidad de los compuestos antioxidantes (Cordova-Ramos *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los procesos de fermentación pueden mejorar las características antioxidantes de los alimentos de base vegetal que consumimos. Esto puede deberse a microorganismos fermentadores capaces de generar enzimas que transforman compuestos bioactivos conjugados en sus formas libres. Estos compuestos bioactivos libres presentan un mayor potencial para la eliminación de ROS (Ajila *et al.*, 2012; Frias *et al.*, 2020). Numerosas investigaciones no solo sugieren que la fermentación aumenta la capacidad antioxidante de los alimentos, sino que también el tipo de cepa utilizada influye en el tipo y cantidad de compuesto bioactivo generado en el proceso fermentativo (Dachery *et al.*, 2019; Dos Reis *et al.*, 2014; Laaksonen *et al.*, 2017);

Es sabido que las bacterias ácido lácticas son aplicadas en diferentes procesos fermentativos en la industria de los alimentos. El potencial que estas presentan en los alimentos fermentados de base vegetal estaría dado por la lisis enzimática de las paredes vegetales, esto permitiría la liberación de compuestos constituyentes bioactivos con poder antioxidante (Hur *et al.*, 2014). Por ejemplo, Rizzello *et al.* (2017) encontraron que la fermentación de harina de quinoa por un inóculo seleccionado de bacterias ácido lácticas produjo una mayor actividad antioxidante que la harina fermentada de forma espontánea. Adicionalmente, Lia *et al.* (2020)

demonstraron que la fermentación de estado sólido de harina de soja entera con *Lactobacillus casei* mejoro el contenido fenólico y de isoflavonas. Estos resultados indican que la fermentación bacteriana ácido láctica cumple un rol importante en el mejoramiento de la actividad antioxidante de los alimentos de base vegetal.

Los cambios de hábitos alimenticios en las sociedades hacia productos saludables, comprometidos con el bienestar animal y el medioambiente generan un interés particular en los investigadores que intentan dar un base y sustento científico a los beneficios que presentan estos productos de base vegetal. Además, aquellas empresas que apuestan a este tipo de productos, a través de sus departamentos de investigación y desarrollo invierten todos sus esfuerzos para poder aplicar una ciencia traslacional en sus esquemas laborales que permita unificar la ciencia básica con la industria.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos antioxidantes de los alimentos que incorporamos a través de la dieta junto con el sistema de defensa antioxidante de las células cumplen un rol importante en el mantenimiento de los niveles de ROS producidos en el metabolismo celular. La hipótesis de este trabajo es que la BFBV proporcionaría compuestos bioactivos que modularían *in vitro* el estado de estrés oxidativo inducido por paraquat, impactando en la actividad de una de las principales enzimas del sistema antioxidante endógeno, la catalasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Desarrollo de la bebida fermentada de base vegetal

El producto utilizado en este trabajo de investigación fue desarrollado en la planta piloto de producción de lácteos de la empresa Christian Hansen (CrH) instalada en la UADE. Para su elaboración se utilizó una base de extracto acuoso de almendras (Green Food Makers®), a la cual se le agregó proteína de habas (Ingredion®), almidón modificado (Ingredion®) y azúcar. Esta base formulada fue tratada con un inóculo bacteriano (Yoflex® YF-L02 DA de CrH) que permitió el proceso fermentativo. El proceso de elaboración se esquematiza en la Fig.5

En la base formulada del producto se realizó una estandarización de sólidos (proteínas, materia grasa, etc.), luego una homogenización que previene la separación de grasas y mejora la textura, y un tratamiento térmico (UHT) para darle una calidad microbiológica apta. A continuación, se inoculó el cultivo activo para que ocurra la fermentación hasta un pH de 4.6 y finalmente un enfriamiento en placa hasta una temperatura de 10°C.

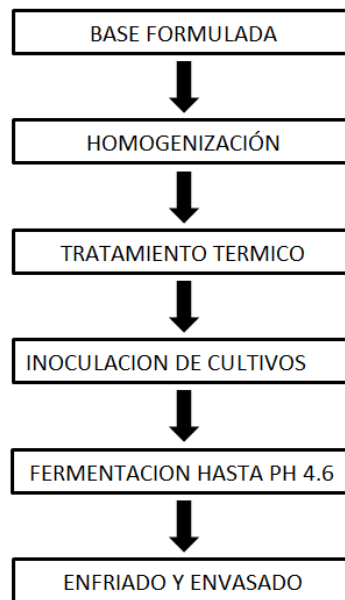


Figura 5: diagrama de flujo de elaboración de la bebida fermentada vegetal.

Este desarrollo estuvo en el marco del proyecto de elaboración de prototipos fermentados de base no láctea a cargo de la Licenciada Marta Gozzi, investigadora del INTEC-UADE.

4.2 Lugar de trabajo y factibilidad

Se utilizaron los laboratorios del 9^{no} y 10^{mo} piso de los UADE Labs (Instituto de Tecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Argentina de la Empresa). En este espacio se llevaron a cabo tareas como planificación de actividades, análisis, puesta a punto y desarrollo de los protocolos experimentales. Se contó con un amplio equipamiento y mesadas de trabajo para poder desarrollar los experimentos y obtener los resultados de la investigación. Asimismo, los reactivos e insumos descartables y no descartables fueron obtenidos con el PID P21T05 otorgado por UADE al director de la tesis y responsable del proyecto, Dr. Santiago Charif.

4.3 Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular CHO-K1 fue propuesta como modelo biológico para analizar el efecto antioxidante del producto. La línea celular CHO-K1 es un subclon de la línea parental CHO (Chinese hamster ovary) iniciada a partir de una biopsia de ovario de hámster chino adulto. El medio completo utilizado para el cultivo de las células se preparó con un 90% de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Invitrogen), 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) y 1% antibiótico-antimicótico (Gibco). Los viales con las células fueron descongelados de forma progresiva con medio de cultivo completo a 37°C, hasta obtener una dilución 1/10 del stock. Luego, se centrifugó por 5 minutos a 1200 r.p.m., el sobrenadante se descartó y el precipitado celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo completo fresco. Las células crecieron en placas de Petri de 10 cm de diámetro, en una estufa de calor húmedo a 37°C y con 5% de CO₂. Cuando se alcanzó una confluencia del 70%, los cultivos se mantuvieron por repique en nuevas placas. Para ello, se descartó el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS 1X estéril (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH = 7,4) para remover inhibidores de la enzima tripsina presentes en el

suero. Las células se desprendieron por incubación con 1ml de tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco) durante 2 minutos a 37°C. La actividad enzimática se detuvo con el agregado de medio completo fresco, llevando al volumen adecuado para la realización de subcultivos. Todos los insumos fueron previamente templados en un baño termostático a 37°C para prevenir el estrés celular.

Para la preservación de la línea celular, las mismas se recuperaron por tratamiento con tripsina como se describió anteriormente. Se las resuspendió en medio de cultivo completo con el agregado de 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Se fraccionaron las células en alícuotas de 1 ml en viales de congelación y se las congelo a -70 °C en ultrafreezer. Transcurridas 24 hs los viales de congelación fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

4.4 Tratamientos

En un primer experimento se determinó el efecto de la concentración de trabajo del paraquat sobre la actividad de la enzima catalasa y la viabilidad celular. Tomando en cuenta la investigación de Black *et al.* (2008), Izumi *et al.* (2015) y Chen *et al.* (2008) se emplearon dos concentraciones diferentes de paraquat para la inducción del estrés oxidativo (100 µM y 400 µM). Para dicho experimento se utilizaron 1×10^5 células por pocillo con medio de cultivo completo en placas de 24 pocillos. Se incubó en estufa a 37 °C por 24hs en condiciones controladas de humedad y CO₂ al 5%. A continuación, se retiró el medio y se agregó medio completo (control) o la concentración correspondiente de paraquat (Sigma) disuelto en medio completo. Al día siguiente, las células se cosecharon con 100 µl de tripsina-EDTA 0.05 % y la reacción se detuvo con 400 µl de medio completo. Finalmente se determinó la actividad de catalasa y la viabilidad celular (ensayo de exclusión del colorante trypan blue; ver sección 4.8, más adelante).

Una vez establecida la concentración de trabajo capaz de inducir un estrés oxidativo sin causar una reducción drástica en el número de células vivas y que permita registrar la actividad enzimática, se procedió a la segunda etapa de este trabajo de investigación. Para ello se emplearon cuatro tratamientos por cuadruplicado: grupo control, paraquat, BFBV y paraquat + BFBV.

La cantidad de células y condiciones de crecimiento iniciales fueron las mismas que en la primera etapa. Luego a los grupos control y BFBV, se les cambió el medio por medio de cultivo completo nuevo, mientras que al grupo paraquat se lo trató con la concentración elegida. Se incubó en estufa a 37 °C por 24hs y CO₂ al 5%. Antes de completar las 24 hs, a los grupos BFBV y paraquat + BFBV se los trató con una dilución 1/10 en medio completo de un extracto metanólico de la bebida fermentada de base vegetal durante 2 horas. Luego de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo, se lavó cada pocillo con 1ml de PBS 1X, y las células se desprendieron por tripsinización (100 µl de tripsina-EDTA al 0.05%). La reacción se detuvo con el agregado de 400 µl de medio completo y la suspensión celular se trasvasó a un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml. Nuevamente, se evaluó la actividad de la enzima catalasa y la viabilidad celular.

4.5 Lisis celular

La suspensión celular se centrifugó a 1200 r.p.m por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 µl de buffer hipotónico (HEPES 10 mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0.5 mM, PMSF disuelto en isopropanol 0.2 mM), y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Luego, el lisado celular fue ultracentrifugado a 420g durante 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante se descartó. Se procedió entonces a resuspender el pellet en 400 µl de buffer hipotónico, y a la lisis mecánica. Ésta consistió en 5 pasajes del lisado a través de una jeringa y aguja calibre 30G. Finalmente, la solución se centrifugó a 11000g durante 20 minutos a 4°C, y del sobrenadante se alicuotó 75 µl para posteriormente determinar la concentración de proteínas, mientras que el resto de la solución se utilizó para evaluar la actividad de la enzima catalasa. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

4.6 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas de extractos celulares se utilizó el kit de análisis de proteínas BCA Pierce® (Thermo Fisher). Este método combina la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ por proteínas en un medio alcalino con la detección colorimétrica del catión cuproso (Cu¹⁺) por el

ácido bicinconínico (BCA). La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra. Para cada determinación, se elaboró una curva de calibración de nueve puntos de distintas concentraciones de albumina de suero bovino (20-2000 ug/ml), con un R^2 aproximado de 0.997. Tanto las muestras experimentales como los puntos de la curva se procesaron por duplicado sobre placas de 96 wells. Brevemente, por pocillo se mezclaron 25 ul de muestra o standard con 200 ul del reactivo de trabajo, y luego se incubó a 37 °C en una estufa de calor seco por 1 hora. Transcurrido ese tiempo, el desarrollo de color se detectó con un lector de microplacas (iMark[®] Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad) a una longitud de onda de 595 nm. A partir de la absorbancia y concentraciones de la curva de calibración, se realizó una regresión lineal para obtener una recta cuya ecuación permite interpolar la absorbancia registrada, y así poder cuantificar las muestras incógnitas. Con ello se obtuvo la concentración proteínica de los extractos celulares, expresada en µg/ml.

4.7 Ensayo de actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa se evaluó por medición espectrofotométrica a 240 nm, de la descomposición del peróxido de hidrógeno en función del tiempo por parte de la actividad de la enzima catalasa presente en la muestra (Claiborne y Fridovich, 1978). El método fue adaptado del trabajo de Bai et al. (1999). Para el ensayo se hizo reaccionar un volumen necesario de muestra que contenga 10 ug de proteínas completando hasta 1 ml de volumen final con una solución de H₂O₂ 19 mM. Dicha solución se preparó con 0.215 ml H₂O₂ 30% ^{v/v} completando hasta 100 ml con buffer fosfato de potasio 50 mM. Para la preparación de dicho buffer se disolvió 0.422 g KH₂PO₄ y 0.331 g K₂HPO₄ en agua destilada, llevando a un volumen final de 100 ml. La reacción se debió mantener a una temperatura de 25°C, para ello el espectrofotómetro se conectó a un baño termostático de circulación de agua (Julabo) el cual cuenta con un sistema cerrado de circulación que permite mantener una temperatura constante en la cubeta de reacción durante todo el ensayo. La lectura se realizó en espectrofotómetro UV visible (UV-1280, Shimadzu) a 240 nm de longitud de onda en cubetas de cuarzo de 1.0 ml. Las absorbancias de cada muestra fueron registradas a 0 segundos y a los 60 segundos. Los

grupos experimentales fueron tratados por triplicado. La actividad específica de catalasa se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\text{Actividad de Catalasa (U/mg/min)} = \frac{\Delta A_{\text{min}240 \text{ nm}} \times 1000}{43.6 \times \frac{\text{mg proteina}}{\text{ml mezcla de reacción}}}$$

Donde 43.6 (M⁻¹cm⁻¹) es el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a 240 nm. Finalmente, la actividad de la enzima catalasa de los grupos tratados fue relativizada de forma porcentual respecto al control.

4.8 Determinación de la viabilidad celular

Para poder evaluar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de azul de tripano (trypan blue). Esta técnica permite diferenciar células vivas de células muertas, a través de la incorporación del colorante azoico azul de tripano por parte de células muertas. Esto se debe a que dicho colorante puede atravesar su membrana plasmática, pero esto no es posible en células vivas (que presentan una membrana intacta). Para ello, se mezclaron 50 ul de la suspensión celular más 50 ul de reactivo de azul de tripano al 0.4% (Gibco) y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se registró en cámara de Neubauer el número de células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de azul). Para calcular el porcentaje de células viables se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{Recuento de células vivas}}{\text{Recuento total de células}} \times 100$$

4.9 Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism (La Jolla, CA, EE. UU.) para realizar el análisis de la varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) seguido por la prueba *post-hoc* de

comparación múltiple de Tukey en los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$. Todos los resultados se muestran con la media \pm el error estándar de la media (SEM).

5. RESULTADOS

5.1 Respuesta de la actividad de la catalasa al tratamiento con paraquat

Para establecer qué concentración de paraquat es efectiva para inducir un cambio en la actividad de la enzima catalasa como respuesta al estrés oxidativo, células CHO-K1 fueron tratadas con dos concentraciones de paraquat (100 μ M y 400 μ M). El grupo control consistió en células incubadas únicamente con medio completo. Como resultado, se observó que las células tratadas con paraquat 100 μ M presentaron una actividad de la enzima catalasa significativamente mayor, en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Por otro lado, el tratamiento con paraquat 400 μ M causó una disminución de la actividad de esta enzima, respecto de los restantes grupos (Fig. 6).

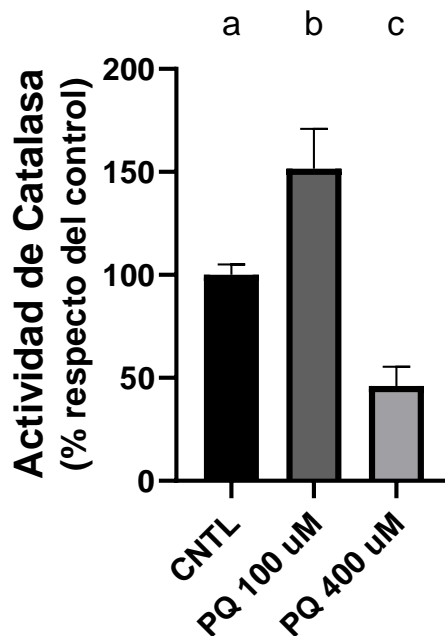


Figura 6: actividad de la enzima catalasa en células CHO-K1 en respuesta a dos dosis de paraquat. Dicha actividad en los grupos tratados fue relativizada de forma porcentual respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Tukey en los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$. Letras diferentes representan diferencias significativas. CNTL=control, PQ=paraquat.

5.1.1 Análisis de viabilidad celular frente al paraquat

Se realizó el ensayo de exclusión de trypan blue para evaluar la viabilidad celular en el estudio de la respuesta al paraquat. En este ensayo los grupos experimentales fueron los mencionados anteriormente. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células viables en el tratamiento con paraquat 400 μ M. Este grupo presentó una reducción de la proporción de células vivas respecto de los otros tratamientos (Fig. 7). Notablemente la incubación con paraquat 100 μ M no alteró el porcentaje de viables respecto del grupo control.

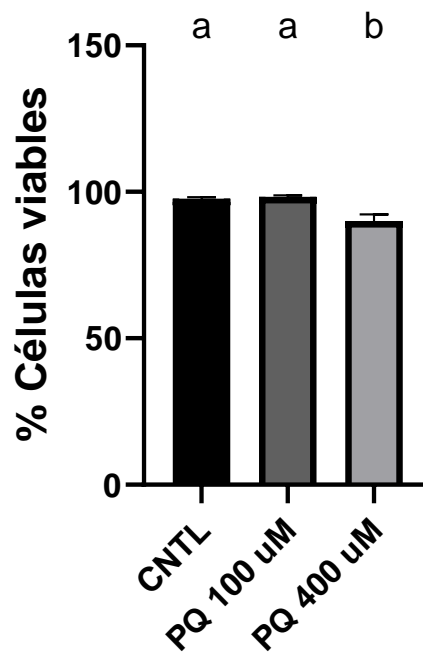


Figura 7: ensayo de viabilidad celular mediante por exclusión de trypan blue en células CHO-K1 tratadas con dos dosis de paraquat. Los datos representan la media \pm SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Tukey en los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$. Letras diferentes representan diferencias significativas. CNTL=control, PQ=paraquat.

5.2 Efecto de la BFBV sobre la actividad de la enzima catalasa

Una vez establecida la concentración de paraquat que promueve el efecto deseado, se estudió de manera *in vitro* el efecto antioxidante de la BFBV sobre la actividad de la enzima catalasa. Para ello, células CHO-K1 fueron tratadas con paraquat 100 μ M, extracto de BFBV, o paraquat 100 μ M y luego extracto de BFBV. Los resultados mostraron que el grupo paraquat 100 μ M exhibió niveles significativamente elevados de actividad enzimática en comparación con los restantes grupos. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con paraquat 100 μ M y luego con BFBV, la actividad de la enzima catalasa se restituyó a valores de actividad similares a los del control (Fig. 8). El efecto *per se* de la BFBV sobre la actividad enzimática no mostro diferencias respecto a los restantes grupos con excepción al tratado con paraquat 100 μ M.

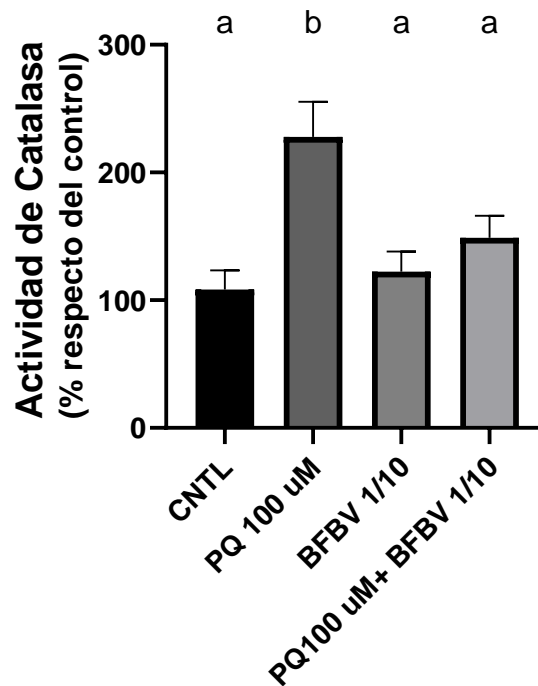


Figura 8: estudio del efecto de un extracto metanólico de la BFBV sobre la actividad de la enzima catalasa en cultivo de células CHO-K1. Dicha actividad en los grupos tratados fue relativizada de forma porcentual respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Tukey en los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$. Letras diferentes representan diferencias significativas. CNTL=control, PQ=paraquat.

5.2.1 Análisis de viabilidad en células tratadas con la BFBV

Para continuar con el estudio de los antioxidantes de la BFBV y poder evaluar la viabilidad celular, se realizó el ensayo de trypan blue. Como resultado, se observó que los grupos tratados no mostraron diferencias significativas respecto al control ni entre ellos, indicando la ausencia de efectos citotóxicos (Fig. 9).

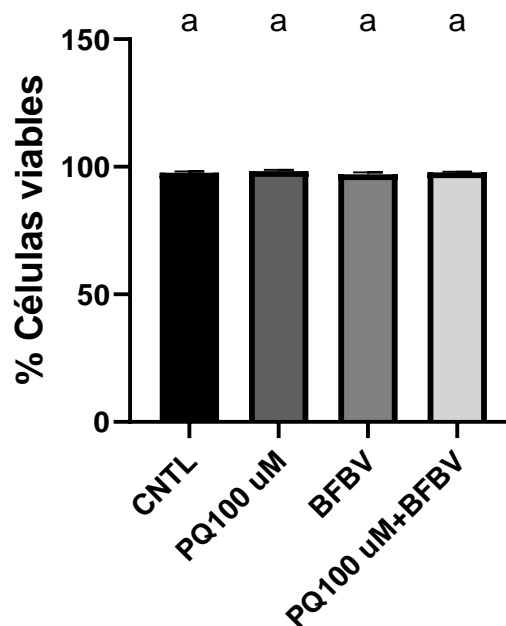


Figura 9: ensayo de viabilidad celular mediante una prueba de exclusión de tinción con trypan blue en células CHO-K1 en respuesta a un extracto metanólico de la BFBV. Los datos representan la media \pm SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA seguido por la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Tukey en los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$. Letras diferentes representan diferencias significativas. CNTL=control, PQ=paraquat.

6. DISCUSIÓN

Muchas investigaciones han demostrado que el estrés oxidativo celular inducido por paraquat genera una alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, incluyendo la enzima catalasa. Por ejemplo, Alexa *et al.* (1999) en la línea celular muscular C2C12 genera un aumento en la transcripción y actividad de la enzima GPx (aproximadamente 5 veces) y CAT (aproximadamente 4 veces) con respecto a las células no tratadas. Estos incrementos dependieron tanto del tiempo de exposición como de la dosis del prooxidante, y se correlacionaron con aumentos en el daño celular resultante del tratamiento oxidante. Además,

Bayir *et al.* (2022) encontraron que en peces cebra (*Danio rerio*) tratados con paraquat la actividad de la enzima catalasa se encuentra aumentada respecto de sus controles. De la misma manera, Brioukhanov *et al.* (2006) evidencian mediante el estudio de la expresión génica y actividad de CAT y SOD en cultivos de arqueas anaerobias estrictas bajo estrés oxidativo también inducido por paraquat, que ambas enzimas están reguladas al alza. El paraquat es un robusto inductor de estrés oxidativo, pero según las investigaciones citadas, la dosis/tiempo que se necesita para generar un estado de estrés oxidativo puede variar según el tipo de organismo utilizado para el estudio. Es por ello, que en esta investigación se necesitó de una etapa de puesta a punto en la que se pudo determinar la concentración adecuada de la sustancia estresora para nuestro trabajo. Los resultados de esta etapa muestran que el tratamiento con paraquat 100 μM causa un aumento significativo de la actividad enzimática respecto al control. Esto coincide con lo reportado por Black *et al.* (2008), donde se observó en cultivos primarios de queratinocitos de ratón que hay una regulación positiva (sobreactividad) de la enzima catalasa y otras enzimas del sistema antioxidante endógeno en respuesta al estrés oxidativo inducido por paraquat 100 μM . Asimismo, Izumi *et al.* (2015) observaron un aumento en la expresión del ARNm y actividad de la enzima catalasa en células PC12 tratadas con paraquat en la misma concentración. Por otro lado, sorprendentemente la incubación de células CHO-K1 con paraquat 400 μM causó una disminución de la actividad de la catalasa.

El objetivo de esta primera etapa fue determinar la concentración de paraquat de trabajo que genere un estado de estrés oxidativo, pero que la dosis/tiempo utilizada no sea letal para las células en estudio. Los resultados mostraron que para el grupo de 400 μM hubo una disminución del porcentaje de células vivas, el cual, podría explicar el descenso en la actividad de la enzima catalasa evidenciado en la primera parte del estudio. Esto también se asemeja a lo reportado por Chen *et al.* (2008), donde el porcentaje de células vivas respecto al control se vio reducido al trabajar con la dosis de paraquat antes mencionada. Por lo tanto, por tratarse de un efecto citotóxico que podría interferir con los resultados de actividad enzimática, en esta investigación la dosis de paraquat 400 μM fue desestimada. Sorprendentemente, el porcentaje de células viables del grupo tratado con paraquat 100 μM no mostró diferencias significativas respecto al control, por lo cual, se determinó que la concentración de paraquat a emplear que

permite contar con células en cantidad similar a las no tratadas, y así evaluar específicamente la actividad enzimática sin otra variable que intervenga, es la de paraquat 100 μM . Más aún, la solución de paraquat 100 μM y su efecto sobre la actividad de la enzima catalasa no parece responder al número de células viables en cultivo, sino a un estado celular alterado por el estrés oxidativo generado con el oxidante paraquat.

Como se detalló en la introducción, nuestro organismo además de contar con defensas antioxidantes endógenas también cuenta con compuestos antioxidantes que incorpora a través de los alimentos, los cuales colaboran con el mantenimiento de los niveles de ROS (Halliwell y Gutteridge, 2015). Algunas investigaciones demuestran que existen procesos tecnológicos que pueden disminuir la capacidad y cantidad de los compuestos antioxidantes de los alimentos (Cordova-Ramos *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). Sin embargo, la fermentación para los alimentos de base vegetal no sólo no parece tener un efecto detrimental sobre el poder antioxidante, sino que existen numerosas investigaciones que han demostrado que el proceso fermentativo permite incluso **mejorar** las características antioxidantes de este tipo de alimentos. Por ejemplo, Limon *et al.* (2015) concluyeron que la tecnología de fermentación fomentó el aumento en la obtención de compuestos bioactivos de extractos solubles de frijoles, lo que condujo a su utilidad en alimentos funcionales de valor agregado. Asimismo, Xiao *et al.* (2014) encontraron que la fermentación en estado sólido de garbanzos con *Cordyceps militaris* SN-18 poseía mayor contenido fenólico y actividad antioxidante en comparación con muestras no fermentadas. Esta mejora en las características antioxidantes puede deberse a que los microorganismos fermentadores son capaces de generar enzimas que transforman compuestos bioactivos conjugados en sus formas libres. En este sentido, Liu *et al.* (2017) proponen que la fermentación del arroz de salvado con bacterias ácido lácticas aumentó la capacidad antioxidante debido a un aumento de los compuestos fenólicos conjugados libres y solubles. Además, Bei *et al.* (2020) demostraron que la hidrólisis y fermentación simultánea de la avena mejoraba la composición fenólica y actividad antioxidante. En el presente trabajo, por tratarse de un producto fermentado de base vegetal, la BFBV en estudio se propone como fuente de compuestos bioactivos que pueden colaborar en la protección frente al estrés oxidativo, impactando en la actividad de la enzima de primera línea de defensa, la catalasa. Los resultados

sugieren que la acción de la BFBV sería sobre las ROS sobreproducidas y no sobre la actividad enzimática de manera directa, puesto que el tratamiento sólo con el extracto de la bebida no mostró variaciones en la actividad de la catalasa respecto del control. Notablemente, el post-tratamiento con BFBV, luego de una incubación con paraquat 100 μM reestableció los valores de la actividad enzimática a niveles similares a los del control. Sumado a que en los estudios de viabilidad no se registraron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, en conjunto valida la hipótesis de la investigación.

En síntesis, los resultados de este trabajo contribuyen significativamente al conocimiento acerca del rol de los compuestos antioxidantes de los productos fermentados de base vegetal como colaboradores en el mantenimiento y control de los estados de estrés oxidativo celular. Futuros estudios deberán hacer foco en detallar los mecanismos moleculares involucrados. Por ejemplo, estudiar la participación de otros actores del mecanismo antioxidante celular endógeno, y de esta manera poder comprender la complejidad en la regulación de las ROS por parte de los compuestos antioxidantes de este tipo de alimentos. Además, trabajos de este estilo otorgan una base científica y un sostén empírico a productos novedosos que contienen compuestos que pueden actuar sobre estados de daño celular que podrían llevar a enfermedades. Asimismo, este soporte podría impulsar el desarrollo de nuevos productos con compuestos que se generan durante su producción o que se puedan agregar, en base a la premisa de que el consumo de alimentos basados en vegetales representa una fuente rica en antioxidantes que tienen un efecto biológico benéfico, como el demostrado en el presente trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

ADARMES, Héctor y GALLEGUILLOS, Marco. Envejecimiento biológico: procesos metabólicos que afectan la homeostasis celular. *TecnoVet* [en línea]. 2005, vol. 11, n. 1 [consulta 26 may. 2021]. < <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/38989> >. ISSN: 0718-1817.

AJILA, C. M., GASSARA, F., SATINDER K. B., VERMA, M., TYAGI, R. D., VALERO, J. R. Polyphenolic Antioxidant Mobilization in Apple Pomace by Different Methods of Solid-State Fermentation and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Food and Bioprocess Technology* [en línea]. 2012, Vol. 2, p. 2697-2702 [consulta 27 sep. 2023]. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-011-0582-y#citeas>>. ISSN: 1935-5149.

ALBARRAN, M. T., LOPEZ-BURILLO, S., PABLOS, M. I., REITER R. J., AGAPITO, M. T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *Journal of Pineal Research* [en línea]. 2001, vol. 30, n. 4, p. 227-233 [consulta 16 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11339512/> >. ISSN: 1600-079X.

ALCAINO, Hernan, GREIG, Douglas, CASTRO, Pablo, VERDEJO, Hugo, MELLADO, Rosemarie, GARCIA, Lorena, DIAZ-ARAYA, Guillermo, QUIROGA, Clara, CHIONG, Mario, LAVANDERO, Sergio. Ácido úrico: una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca. *Revista Médica de Chile* [en línea]. 2011, vol. 139, p. 505-515 [consulta 16 jul. 2021]. < https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000400014 >. ISSN: 0717-6163.

ALEXA, Franco A., RAANAN, Odom S. y RANDO, Thomas A. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine* [en línea]. 1999, vol. 27, n. 9/10, p. 1122-1132 [Consulta 10 jul. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10569645/> >. ISSN: 0891-5849.

ALTAF, Sidra, ABBAS, Zahid R., AKHTAR, Tayyaba, SIDDIQUE, Faisal, MAHMOOD, Muhammad S., KHAN, Muhammad K., ZIAF, Khurram. Antioxidant rich

medicinal plants as a potential candidate to treat gastric ulcer. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas* [en línea]. 2023, vol. 22, n. 5, p. 560-580 [consulta 26 sep. 2023]. < <http://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/359/369> >. ISSN: 0717 7917.

ALLINGER, Norman L., CAVA, Michael P., DE JONGH, Don C., JOHNSON, Carl R., LEBEL, Norman A., STEVEN, Calvin L. *Química Orgánica* [en línea]. 2a. ed. España: Reverte S.A, 1991. 1316 p. [consulta 23 dic. 2021]. <<https://es.scribd.com/document/468348195/Quimica-Organica-Norman-L-Allinger-2ed-pdf>> ISBN: 84-291-7015-4.

AMES, Bruce M., CATHCART, Richard, SCHWIERS, Elisabeth, HOCHSTEIN, Paul. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea]. 1981, vol. 78, n. 11, p. 6858-6862 [consulta 16 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6947260/> >. ISSN: 1091-6490.

ANDRE, Christelle M., LARONDELLE, Yyan, EVERS, Daniele. Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. *Current Nutrition & Food Science* [en línea]. 2010, vol. 6, n. 1, p 2-12 [consulta 7 jul. 2021]. <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnf/2010/00000006/00000001/art00002>>. ISSN: 1573-4013.

ARUOMA, Okezie L. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radicals Biology and Medicine* [en línea]. 1996, vol. 20, n. 5, p. 675-705 [consulta 25 jun. 2021]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584995021108?casa_token=q4L_CpJiDyy4AAAAA:yh97iSfLr2jaMpzr8ZVcNdQSrdZBUe86Co1h3CqxHWI1NCcEWmRYRjyNsBokuYiajDNb0PMr8>. ISSN: 1873-4596.

ASTORG, Pierre. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. *Trends in Food Science and Technology* [en línea]. 1997, vol. 8, n. 12, p. 406-413 [consulta 20 ago. 2021].

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224497010923>>. ISSN: 0924-2244.

BACHHAWAT, Anand K., THAKUR, Anil, KAUR, Jaspreet, ZULKIFLI, M. Glutathione transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* [en línea]. 2013, vol. 1830, n. 5, p. 3154-3164 [consulta 28 sep. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416512003388>>. ISSN: 0304-4165.

BAI, Jingxiang, RODRIGUEZ, Ana M., MELENDEZ, Andres J. y CEDERBAUM, Arthur I. Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. *The Journal of Biological Chemistry* [en línea]. 1999, vol. 274, n. 37, p. 26217-26224 [Consulta 16 ene. 2023]. <[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)55205-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)55205-X/fulltext)>. ISSN: 0021-9258.

BARNHAM, Kevin J., MASTERS, Colin L. y BUSH, Ashley I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery* [en línea]. 2004, vol. 3, p. 205-214 [consulta 25 jun. 2021]. <<https://www.nature.com/articles/nrd1330#citeas>>. ISSN: 1474-1784.

BAYIR, M., CAPAN, E.C. y KESAN, S. Bioinformatics and mRNA expression of catalase gene and determination of catalase enzyme activity in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the herbicide paraquat. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* [en línea]. 2022, vol.21, n. 5, p. 1278-1297 [consulta 10 sep. 2023]. <https://jifro.areeo.ac.ir/article_128011.html>. ISSN: 1562-2916.

BEI, Qi, WU, Zhenqiang, CHENA, Gong. Dynamic changes in the phenolic composition and antioxidant activity of oats during simultaneous hydrolysis and fermentation. *Food Chemistry* [en línea]. 2020, vol. 305, p. 1-7 [consulta 2 oct. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619313792?via%3Dihub>>. ISSN:1873-7072.

BENTINGER, Magnus, BRISMAR, Kerstin y DALLNER, Gustav. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* [en línea]. 2007, vol. 7, p. S41–S50 [consulta 19 jul. 2021].

< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567724907000517> >. ISSN: 1872-8278.

BERTRAM, John S. Carotenoids and Gene Regulation. *Nutrition reviews* [en línea]. 1999, vol. 57, n. 6, p. 182-191 [consulta 20 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10439631/> >. ISSN: 1753-4887.

BLACK, Adrienne T., GRAY, Joshua P., SHAKARJIAN, Michael P., LASKIN, Debra L., HECK, Diane E., LASKIN, Jeffrey D. Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat. *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea]. 2008, vol 231, n. 3, p. 384–392 [Consulta 14 jul. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X08002366?via%3Dihub> >. ISSN: 1096-0333.

BONOLA GALLARDO, I.F., IRIGOYEN CAMACHO, M.E., VERA ROBLES, L.I., CAMPERO CELIS, A., HAMDAN PARTIDA, A. Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Revista de Ciencias Clínicas* [en línea]. 2014, vol. 15, n. 1, p. 2-8 [consulta 3 jul. 2021]. <<https://www.elsevier.es/es-revista-ciencias-clinicas-399-pdf-S1665138315000038>>. ISSN: 1665-1383.

BRENT, Jeffrey A. y RUMACK, Barry H. Papel de los radicales libres en la lesión hepática tóxica. Bioquímica de los radicales libres. *Revista de Toxicología: Toxicología clínica* [en línea]. 1993, vol. 31, n. 1, p. 131-171 [consulta 21 jun. 2021]. <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15563659309000383?journalCode=ictx19>>. ISSN: 1556-9519.

BRIOUKHANOV, Andrei L., NETRUSOV, Alexander I. y EGGEN, Rik I. The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Microbiology* [en línea]. 2006, vol.152, n. 6, p. 1671-1677 [consulta 10 sep. 2023]. < <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28542-0> >. ISSN: 1465-2080.

CAI, Hua. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research* [en línea]. 2005, vol. 68, n.

1, p 26-36 [consulta 26 may. 2021]. <<https://academic.oup.com/cardiovascres/article/68/1/26/287849?login=true>>. ISSN: 0008-6363.

CARAVAJAL, Carlos. Especies reactivas de oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica* [en línea]. 2019, vol. 36, n. 1, p. 99-100 [consulta 21 jun. 2021]. <https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000100091&script=sci_arttext&tlng=pt#B1>. ISSN 2215-5287.

CARLBERG, Inger Y MANNERVIK, Bengt. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* [en línea]. 1985, vol. 113, p. 484-490 [consulta 29 sep. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687985130624>>. ISSN: 0076-6879.

CARRANCO JUAREGUI, Maria E., CALVO CARRILLO, Maria de la Concepción, PÉREZ, Fernando. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* [en línea]. 2011, vol. 61, n. 3 [consulta 1 jul. 2021]. <http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S000406222011000300001&script=sci_arttext&tlng=en>. ISSN: 0004-0622.

CECCATELLI, Sandra, TAMM, Christoffer, ZHANG, Qing, CHEN, Ming. Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stress. *Physiology and Behavior* [en línea]. 2007, vol. 92, p. 87-92 [consulta 25 jun. 2022]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17628619/>>. ISSN: 0031-9384.

CLAIBORNE, A., FRIDOVICH, I. Purification of the o-Dianisidine Peroxidase from *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry* [en línea]. 1979, vol. 254, n. 10, p. 4245-4252 [Consulta 26 dic. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/374409/>>. ISSN: 0021-9258.

CLEEMENTA, Marie-Veeronique, PONTONB, Andre, PERVAIZ, Shazib. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *Federation of European Biochemical Societies letters* [en línea]. 1998, vol. 440, p. 13-18 [consulta 14 ago. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9862415/>>. ISSN: 1873-3468.

COCOMARKET [en línea]. [Consulta 4 ene. 2023]. < <https://www.cocomarket.com.ar/productos/yogur-leche-de-coco-iogo-crudda-160-gr/> >.

COHEN, Gerald. Oxidative Stress and Parkinson's Disease. En Daniel L. y COLTON, Carol A. *Reactive Oxygen Species in Biological System* [en línea]. Boston: Springer, 2002, p. 593-608 [consulta 28 jun. 2021]. <https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-46806-9_24>. ISBN: 978-0-306-46806-3.

CÓRDOVA-RAMOS, Javier S., GLORIO-PAULET, Patricia, HIDALGO, Alyssa, CAMARENA, Felix. Efecto del proceso tecnológico sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) andino Effect of technological process on antioxidant capacity and total phenolic content of Andean lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Scientia Agropecuaria* [en línea]. 2020, vol. 11, n. 2, p. 157-165 [consulta 26 sep. 2023]. < <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v11n2/2077-9917-agro-11-02-157.pdf> >. ISSN: 2306-6741.

CORRALES, Lucia C y ARIZA, Maira M. Estrés oxidativo: orígenes, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista de Publicación Científica en Ciencias Biomédicas (NOVA)* [en línea]. 2012, vol. 10, n.18 [consulta 25 may. 2021]. ISSN: 1794-2470.

COUTO, Narciso, WOOD, Jennifer y BARBER, Jill. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* [en línea]. 2016, vol. 95, p. 27-42 [consulta 28 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584916000873> >. ISSN: 0891-5849.

CUARTAS, Mateo M., BERROUET MEJÍA, Marie C. Intoxicación por paraquat. *Revista CES Medicina* [en línea]. 2016, vol. 30, n. 1, p. 114-121 [Consulta 14 jul. 2023]. < http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052016000100013 >. ISSN: 0120-8705.

CHEN, Ping, LI, Ang, ZHANG, Mengjie, HE, Meilan, CHEN, Zhen, WU, Xiaokang, ZHAO, Chunjun, WANG, Shilong, LIANG, Liping. Protective effects of a new metalloporphyrin on paraquat-induced oxidative stress and apoptosis in N27 cells. *Acta*

Biochim Biophys Sin [en línea]. 2008, vol. 40, n. 2, p. 125-132 [consulta 20 sep. 2023]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18235974/>>. ISSN: 1745-7270.

CHRISTELLE MARTINE, André, LARONDELLE, Yvan y EVERS, Daniéle. Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. *Current Nutrition & Food Science* [en línea]. 2010, vol. 6, n. 1 [consulta 10 jun. 2021]. <<https://www.eurekaselect.com/85932/article>>. ISSN: 2212-3881.

DACHERY, Bruna, HERNANDES, Karolina C., VERAS, FLÁVIO F., SCHMIDT, Luana, AUGUSTI, Paula R., MANFROI, ZINI, Claudia A., WELKE, Juliane E. Effect of *Aspergillus carbonarius* on ochratoxin a levels, volatile profile and antioxidant activity of the grapes and respective wines. *Food Research International* [en línea]. 2019, vol. 126, p. 1-9 [consulta 27 sep. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919305733>>. ISSN: 0963-9969.

DAVIES, Calvin J. A., SEVANIAN, Alex, MUAKKASSAH-KELLY, Sammar F., HOCHSTEIN, Paul. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochemical Journal* [en línea]. 1986, vol. 235, n. 3, p.747-754 [consulta 16 jul. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3753442/>>. ISSN: 1470-8728.

DEPONTE, Marcel. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* [en línea]. 2013, vol. 1830, n. 5, p. 3217-3266 [consulta 7 jul. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512002735?via%3Dihub>>. ISSN: 0304-4165.

DOS REIS, Bruno A., KOSINSKA-CAGNAZZO, Agnieszka, SCHMITT, Rudolf, ANDLAUER, Wilfried. Fermentation of Plant Material – Effect on Sugar Content and Stability of Bioactive Compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [en línea]. 2014, vol. 64, n. 4, p. 234-244 [consulta 25 sep. 2023]. <<http://journal.pan.olsztyn.pl/pdf-98398-31155?filename=Fermentation%20of%20Plant.pdf>>. ISSN: 2083-6007.

DROST, Gregorio T. Radicales libres en biología y medicina: una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* [en línea]. 1996, vol. 2, n.1, p.44-57 [consulta 26 may. 2021]. < <https://core.ac.uk/download/pdf/71505508.pdf>>. ISSN: 1690-8414.

DULF, Francisc V., VODNAR, Dan C., SOCACIU, Carmen. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food chemistry* [en línea]. 2016, vol. 209, p. 27-36 [consulta 27 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616305337?via%3Dihub>>. ISSN: 1873-7072.

EKMEIRO-SALVADOR, Jesús E. y ARÉVALO-VERA, Cruz R. Vegetarianism: an anthropometric, dietary and motivational. *Revista Salud Pública y Nutrición* [en línea]. 2021, vol. 20, n. 4, p. 57-72 [consulta 28 jun. 2023]. < <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=102016>>. ISSN: 1870-0160.

EPEL, Elissa S., BLACKBURN, Elizabeth H., LIN, Jue, DHABHAR, Firdaus S., ADLER, Nancy E., MORROW, Janson D., CAWTHON, Richard M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea]. 2004, vol. 101, n. 49, p. 17312-17315 [consulta 27 jun. 2022]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15574496/>>. ISSN: 1091-6490.

FELICES LAS VACAS [en línea]. [Consulta 5 ene. 2023]. < <https://feliceslasvacas.com/product/yogur-colchon-de-frutos-del-bosque/>>.

FERESHTEHNEJAD, Sayed M., Poorsattar, BEJEH Mir K., POORSATTAR, Bejeh Mir A., MOHAGHEGHI, Parisa. Evaluation of the Possible Antioxidative Role of Bilirubin Protecting from Free Radical Related Illnesses in Neonates. *Acta Medica Iranica* [en línea]. 2012, vol. 50, n. 3, p.153-163 [consulta 10 jul. 2021]. < <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/3876/3851>>. ISSN: 1735-9694.

FOREMAN, Julia, DEMIDCHIK, Vadim, BOTHWELL, John H. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* [en línea]. 2003, vol. 422, n. 6930, p. 442-446 [consulta 26 may. 2021]. < <https://www.nature.com/articles/nature01485>>. ISSN: 1476-4687.

FRIAS, Juana, MIRANDA, Martha L., DOBLADO, Rosa, VIDAL-VALVERDE, Concepción. Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food chemistry* [en línea]. 2005, vol. 92, n. 2, p. 211-220 [consulta 26 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814604005710?via%3Dihub> >. ISSN: 1873-7072.

FRIDOVICH, Irwin. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [en línea]. 1983, vol. 23, n. 1, p 239-257 [consulta 3 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6307121/>>. ISSN: 1545-4304.

FU, Yan-Hua, WANG, Kai, SHEN, Guang-Bin, ZHU, Xiao-Qing. Quantitative comparison of the actual antioxidant activity of Vitamin C, Vitamin E, and NADH. *Journal of Physical Organic Chemistry* [en línea]. 2022 [consulta 29 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/org/science/article/abs/pii/S0894323022019841>>. ISSN: 0894-3230.

GE, W., ZHANG, Y., HAN, X., REN, J. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration: Role of ER stress. *Free Radical Biology and Medicine* [en línea]. 2010, vol. 49, n. 12, p. 2068-2077 [consulta 10 sep. 2023]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3005836/> >. ISSN: 1873-4596.

GEISZT, Miklós y LETO, Thomas L. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. *The Journal of Biological Chemistry* [en línea]. 2004, vol. 279, n. 50 [consulta 26 may. 2021]. < <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820676025?token=3CC6C4EBE40F0E4F727CEEC1D7AB0435D3C6A1FF4E487A0F001CAD61607229F5FFDA76D8B9C5A52DC1C732E6AE4076B0&originRegion=us-east-1&originCreation=20210626141227>>. ISSN: 0021-9258.

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition* [en línea]. 1997, vol. 16, n. 2, p. 109-126 [consulta 17 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9100211/>>. ISSN: 1541-1087.

GONZALEZ-FLECHA, Beatriz y DEMPLE, Bruce. Homeostatic Regulation of Intracellular Hydrogen Peroxide Concentration in Aerobically Growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [en línea]. 1997, vol. 179, n. 2, p. 382-388 [consulta 13 ago. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8990289/>>. ISSN: 1098-5530.

GOYAL, Madhur M. y BASAK, Anjan. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell* [en línea]. 2010, vol. 1, n. 10, p. 888-897 [consulta 26 sep. 2023]. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13238-010-0113-z#citeas>>. ISSN: 1674-8018.

GRIENDLING, Kathy K., SORESCU, Dan, LASSÉGUE, Bernard, USHIO-FUKAI, Masuko. Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [en línea]. 2000, vol. 2, n. 10, p. 2175-2183 [consulta 3 jul. 2021]. <<https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.ATV.20.10.2175>>. ISSN: 1524-4636.

HAIMOV, Iris, LAVINE, Peretz, LAUDON, Moshe, HERER, Paula, VIGDER, C, ZISAPEL, Nava. Melatonin Replacement Therapy of Elderly Insomniacs. *Sleep* [en línea]. 1995, vol. 18, n. 7, p. 598-603 [consulta 6 ago. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8552931/>>.ISSN: 1550-9109.

HALLIWELL, Barry y GUTTERIDGE, John M.C. *Free radical of biology and medicine* [en línea]. 5a. ed. United Kingdom: Oxford university press, 2015. p. 21-23. [consulta 24 may. 2021].<<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=3DlKCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=free+radicals&ots=bpjBcSxsiV&sig=GuvrRu1pdt2uzSClQcvvI21wW0#v=onepage&q=free%20radicals&f=false>>. ISBN 978-0-19-871747-5.

HAMPTON, Mark B., KETTLE, Anthony J., WINTERBOURN y Christine C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood* [en línea]. 1998, vol. 92, n. 9, p. 3007-3017 [consulta 8 jun. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120578464?via%3Dihub>>. ISSN: 0006-4971.

HAMPTON, Mark B., ORRENIUS, Sten. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies letters* [en línea]. 1997, vol. 414, n. 3, p. 552-556 [consulta 13 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9323034/> >. ISSN: 1873-3468.

HESSELTINE, C. W. Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* [en línea]. 1972, vol. 14, n. 4, p. 517-532 [consulta 25 sep. 2023]. < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260140402> >. ISSN: 1097-0290.

HJALMARSSON, Karin, MARKLUND, Stefan L., ENGSTROM, Ake, EDLUND, Thomas. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea]. 1987, vol. 84, n. 18, p. 6340-6344 [consulta 22 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3476950/> >. ISSN: 1091-6490.

IKEDA, Yukio y LONG, Donlin M. The Molecular Basis of Brain Injury and Brain Edema: The Role of Oxygen Free Radicals. *Neurosurgery* [en línea]. 1990, vol. 27, n. 1, p. 1-11 [consulta 28 jun. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2198480/> >. ISSN: 1524-4040.

IMLAY, James A., LINN, Stuart. Mutagenesis and Stress Responses Induced in Escherichia coli by Hydrogen Peroxide. *Journal of bacteriology* [en línea]. 1987, vol. 169, n. 7, p. 2967-2976 [consulta 12 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3298208/> >. ISSN: 1098-5530.

ISHIDA, Hideyuki, ICHIMORI, Kohji, HIROTA, Yuki, FUKAHORI, Masami, NAKAZAWA, Hiroe. Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free radical biology and medicine* [en línea]. 1996, vol. 20, n. 3, p. 343-350 [consulta 12 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8720904/> >. ISSN: 1873-4596.

IZUMI, Yasuhiko, YAMAMOTO, Noriyuki, MATSUSHIMA, Sayaka, YAMAMOTO, Takamori, TAKATORI-TAKADA, Yuki, AKAIKE, Akinori, KUME, Toshiaki. 2. Compensatory role of the Nrf2-ARE pathway against paraquat toxicity: Relevance of 26S proteasome activity. *Journal of Pharmacological Sciences* [en línea]. 2015, vol. 129, p.

150-159 [consulta 20 sep. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26598004/> >. ISSN: 1347-8648.

JEWELL, Christopher y O'BRIEN, Nora. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *British Journal of Nutrition* [en línea]. 1999, vol. 81, n. 3, p.235-242 [consulta 18 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10434850/> >. ISSN: 1475-2662.

JOHNSON, Elizabeth J. The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in clinical care: an official publication of Tufts University* [en línea]. 2002, vol. 5, n. 2, p. 56-65 [consulta 17 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12134711/> >. ISSN: 1523-5408.

JOSHIPURA, Kaumudi, HU, Frank B., MANSON, Joann E., STAMPFER, Meir J., RIMM, Eric B., SPEIZER, Frank E., COLDITZ, Graham, ASCHERIO, Alberto, ROSNER, Bernard, SPIEGELMAN, Donna, WILLETT, Walter C. The Effect of Fruit and Vegetable Intake on Risk for Coronary Heart Disease. *Annals of internal medicine* [en línea]. 2001, vol.134, n. 12, p. 1106-1114 [consulta 25 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412050/> >. ISSN: 1539-3704.

KANG, Jung H. y EUM, Won S. Enhanced oxidative damage by the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn-superoxide dismutase mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* [en línea]. 2000, vol. 1524, n. 2-3, p. 162-170 [consulta 23 dic. 2021]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416500001537?via%3Dihub> >. ISSN: 0304-4165.

KANOFSKY, Jeffrey R. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions* [en línea]. 1989, vol. 70, p. 1-28 [consulta 12 jun. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0009279789900598?via%3Dihub>>. ISSN: 0009-2797.

KOHEN, Ron, VELLAICHAMY, Elangovan, HRBAC, Jan, GATI, Irith, TIROSH, Oren. Quantification of the overall reactive Oxygen Species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biology and Medicine* [en línea]. 2000, vol.28, n. 6, p. 871-879 [consulta 25 jun. 2021]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490000191X?casa_token=Jya91>

[DVFUu8AAAAA:lzGRuP6HauOidmJDZbjE3eZhkXzCeD-9KAo6O2D8NFozWNHq9Aoc-LwK6D7QxR5nSHTOA0qnaQ](https://doi.org/10.15446/revista.11.2.2.es) >. ISSN: 0891-5849.

KORC, Israel, BIDEGAIN Margarita, MARTELL Miguel. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes. Implicancia en la patología neonatal. *Revista Médica del Uruguay* [en línea].1995, vol. 11, n.2, p.121-135 [consulta 21 may. 2021]. <<http://www.rmu.org.uy/revista/11/2/2/es/>>. ISSN: 1688-0390.

KOZLOV, Andrey V., GUILLE Lars, STANIEK Katrine y NOHL Hans. Dihydrolipoic Acid Maintains Ubiquinone in the Antioxidant Active Form by Two-Electron Reduction of Ubiquinone and One-Electron Reduction of Ubisemiquinone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [en línea]. 1999, vol. 363, n. 1, p. 148-154. [Consulta 20 mar. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986198910645?via%3Dihub>>. ISSN: 1096-0384.

LAAKSONEN, Oskar, KULDJARV, Rain, PAALME, Toomas, VIRKKI, Mira, YANG, Baoru. Impact of apple cultivar, ripening stage, fermentation type and yeast strain on phenolic composition of apple ciders. *Food chemistry* [en línea]. 2017, vol. 233, p. 29-37 [consulta 27 sep. 2023]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28530577/>>. ISSN: 1873-7072.

LEE, JIN H., HWANG, Seung-Ryul, LEE, Yeon Hee, KIM, Kyun, CHO, Kye Man, LEE, Yong Bok. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. *Food chemistry* [en línea]. 2015, vol. 185, p. 205-211 [consulta 27 sep. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615005208?via%3Dihub>>. ISSN: 1873-7072.

LERI, Manuela, SCUTO, María, ONTARIO, María L., CALABRESE, Vittorio, CALABRESE, Edward J., BUCCIANINI, Mónica, STEFANI, Massimo. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *International journal of molecular sciences* [en línea]. 2020, vol. 21, n. 4, p. 1-39 [consulta 22 jul. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32070025/>>. ISSN: 1422-0067.

LESCANO, Ramiro H., MELCHIORE, Mariana N., LUNA, Cecilia M., TRIPPI, Victorio S. Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Science* [en línea]. 2003, vol. 165, n. 5, p. 841-848 [Consulta 10 jul. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945203000736> >. ISSN: 1873-2259.

LI, Jian, STOUFF, Michael, SERRANDER, Lena. The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation. *Molecular Biology of the Cell* [en línea]. 2006, vol. 7, n. 9 [consulta 26 may. 2021]. < <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e05-06-0532> >. ISSN: 1939-4586.

LI, Xue-Jun, ZHANG, Ling-Me, GU, Jing, ZHANG, An-Zhong, SUN, Feng-Ya. Melatonin decreases production of hydroxyl radical during cerebral ischemia-reperfusion. *Acta pharmacologica Sinica* [en línea]. 1997, vol. 18, n.5, p. 394-396 [consulta 12 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10322924/> >. ISSN: 1671-4083.

LIA, Songllin, JIN, Ziyi, HUA, Dianjie, YANGA, Wenwen, YANA, Yongyong, NIEA, Xiaobao, LIN, Jing, ZHANGA, Qingyu, GAI, Di, JIA, Yuxiang, CHENA, Xiaoming. Effect of solid-state fermentation with *Lactobacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour. *LWT - Food Science and Technology* [en línea]. 2020, vol. 125, p. 1-8 [consulta 26 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820302528?via%3Dihub> >. ISSN: 0023-6438.

LIMÓN, Rocio I., PEÑAS, Elena, TORINO, Inés M., VILLALUENGA-MARTINEZ, Cristina, DUEÑAS, M., FRIAS, Juana. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry* [en línea]. 2015, vol.172, p. 343-352 [consulta 2 oct. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25442563/> >. ISSN: 1873-7072.

LINNANE, Anthony W. y EASTWOOD, Hayden. Cellular redox poise modulation; the role of coenzyme Q10, gene and metabolic regulation. *Mitochondrion* [en línea]. 2004, vol. 4, p. 779-789 [consulta 16 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120432/> >. ISSN: 1872-8278.

LIU, Lei, ZHANG, Ruifen, DENG, Yuanyuan, ZHANG, Yan., XIAO, Juan, HUANG, F, WEN, Wei, ZHANG, Mingwei. Fermentation and complex enzyme hydrolysis enhance total phenolics and antioxidant activity of aqueous solution from rice bran pretreated by steaming with α -amylase. *Food Chemistry* [en línea]. 2013, vol.221, p. 636-643 [consulta 2 oct. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616319756?via%3Dihub>>. ISSN: 1873-7072.

LIU, Simin, MANSON, Joann E., LEE, I-Min, COLE, Stephen R., HANNEKENS, Charles H., WILLETT, Walter C., BURING, Julie E. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: The Women's Health Study. *The American journal of clinical nutrition* [en línea]. 2000, vol. 74, n. 4, p. 922-928 [consulta 22 ago. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11010932/>>. ISSN: 1938-3207.

LUO, Haitao, JIANG, Bing-Hua, KING, Sarah M., CHEN, Yi Charlie. Inhibition of Cell Growth and VEGF Expression in Ovarian Cancer Cells by Flavonoids. *Nutrition and Cancer* [en línea]. 2008, vol. 60, n. 6, p. 800-809 [consulta 22 ago. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005980/>>. ISSN: 1532-7914.

MARTÍNEZ SANCHEZ, Gregorio. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista cubana de farmacia* [en línea]. 2005, vol. 39, n. 3 [consulta 26 may. 2021]. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300009>ISSN: 1561-2988.

MARTINEZ, Claudia D., VARGAS Concepción R. y ARANCIBIA Selva R. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México* [en línea]. 2003, vol 46, n. 6, p.229-235 [consulta 19 may. 2021]. <https://www.researchgate.net/profile/Claudia-Dorado-Martinez/publication/232083857_Estres_oxidativo_y_neurodegeneracion/links/561309d108aedee13b5c0cd5/Estres-oxidativo-y-neurodegeneracion.pdf>. ISSN: 0026-1745.

MARTINEZ-FLÓRES, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M. y TUÑÓN, J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* [en

línea].2002, vol. 6, p. 271-278 [Consulta 26 dic. 2021]. < <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/midias/ibc-16750> >. ISSN: 0212-1611.

MARUI, Nobuyuki, OFFERMANN, Margaret K., SWERLICK, Robert, KUNSCH, Charles, ROSEN, Craig A., AHMAD, Mushtaq, ALEXANDER, Wayne R., MEDFORD, Russell M. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Gene Transcription and Expression Are Regulated through an Antioxidant-sensitive Mechanism in Human Vascular Endothelial Cells. *The Journal of clinical investigation* [en línea]. 1993, vol. 92, n. 4, p. 1866-1874 [consulta 10 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7691889/> >. ISSN: 1558-8238.

McCARTHYA, S., SAMAYAJULUA, M., SIKORKAB, M., BOROWY-BOROWSKIB H., PANDEYA S. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea]. 2004, vol. 201, n. 1, p. 21-31 [Consulta 14 jul. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15519605/> >. ISSN: 1096-0333.

MCCORDS, Joe M. y FRIDOVICH, Irwin. Superoxide Dismutase. *The journal of Biological Chemistry* [en línea]. 1969, vol. 244, n. 22, p. 6049-6055 [consulta 28 jun. 2023]. < [www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)63504-5/fulltext](http://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)63504-5/fulltext) >. ISSN: 0021-9258.

McINTYRE, Martin, BOHR, David F. y DOMINICZAK, Anna F. Endothelial Function in Hypertension: The Role of Superoxide Anion. *Hypertension* [en línea]. 1999, vol. 34, p. 539-545 [consulta 10 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10523323/> >. ISSN: 1524-4563.

MCINTYRE, Martin, BOHR, David F., DOMINICZAK, Anna F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* [en línea].1999, vol. 34, n. 4, p. 539-545 [consulta 21 jun. 2021]. <<https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.HYP.34.4.539> >. ISSN: 14735598.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J. *Carotenoides en agroalimentación y salud* [en línea]. 1a ed., México: Terracota, 2017. Capítulo 1, Carotenoides: estructura, propiedades y funciones, p. 12-32 [Consulta 26 dic. 2021]. < <https://www.cytod.org/es/biblioteca/carotenoides-en-agroalimentaci%C3%B3n-y-salud> > ISBN: 978-84-15413-35-6.

MILLER, D.J. y MACFARLANE, N.G. Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *Journal of human hypertension* [en línea]. 1995, vol. 9, n. 6, p. 465-473 [consulta 12 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7473529/> >. ISSN: 1476-5527.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA y PESCA. *Seguridad Alimentaria “Tendencias de Consumo”* [en línea]. [Consulta 26 dic. 2021]. < http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/tendencias_consumo.php >.

MITTAL, Manish, SIDDIQUI, Mohammad R, TRAN, Khiem, REDDY, Sekhar P. y MALIK, Asrar B. *Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury*. Antioxidants and redox signaling [en línea]. 2014, vol. 11, n. 7, p. 1126-1167 [consulta 21 jun. 2021]. <<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ars.2012.5149> >. ISSN: 1557-7716.

MOLINA, Esther. El papel de los antioxidantes como desaceleradores del envejecimiento. *Revista Especializada de Nutrición (ReNut)* [en línea]. 2012, vol. 6, n.3, p. 1109-1119 [consulta 12 may. 2021]. < [https://www.iidenut.org/pdf_revista_tec_libre/Renut%2021/Renut_21_\(2012\)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_del_envejecimiento.pdf](https://www.iidenut.org/pdf_revista_tec_libre/Renut%2021/Renut_21_(2012)_7_El_papel_de_los_antioxidantes_como_desaceleradores_del_envejecimiento.pdf) >. ISSN: 1996-9583.

MULLER, Lars, THEILE, Kathleen, BOHM, Volker. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular Nutrition and Food Research* [en línea]. 2010, vol. 54, n. 5, p. 731-742 [consulta 28 jun. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20333724/> >. ISSN: 1613-4133.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Office of Dietary Supplements* [en línea]. 2019 [Consulta 23 dic. 2021]. <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-DatosEnEspanol/>>.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *Office of Dietary Supplements* [en línea]. 2020 [Consulta 26 dic. 2021]. < <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-DatosEnEspanol/> >.

NEILL, Steven, DESIKAN, Radhika, HANCOCK, John. Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology* [en línea]. 2002, vol. 5, n. 5, p. 388-395 [consulta 21 jun. 2021]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369526602002820> >. ISSN: 1879-0356 NGUYEN, Nguyen H., TRAN, Gia-Buu y NGUYEN, Cuong T. Antioxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *Journal of Molecular Medicine* [en línea]. 2019, vol. 98, n. 1, p. 59-69 [consulta 20 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31724066/> >. ISSN: 1432-1440.

NIETO, Javier F., IRIBARREN, Carlos, GROSS, Myron, COMSTOCK, George W., CUTLER, Richard G. Uric acid, and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* [en línea]. 2000, vol. 148, p.131-139 [consulta 29 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021915099002142> >. ISSN: 0021-9150.

NISHIDA, Motohiro, SAWA, Tomohiro, KITAJIMA, Naoyuki, ONO, Katsuhiko, INOUE, Hirofumi, IHARA, Hideshi, MOTOHASHI, Hozumi, YAMAMOTO, Masayuki. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chemical Biology* [en línea]. 2012, vol. 8, n. 8, p. 714-724 [consulta 21 jun. 2022]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22772154/> >. ISSN: 1552-4469.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [en línea]. © FAO 2002. [consulta 26 sep. 2023]. < <https://www.fao.org/3/w0073s/w0073s00.htm#Contents> >.

PABLOS, M. I., AGAPITO, M.T., GUTIERREZ, R., RECIO, J.M., REITER, R.J., BARLOW-WALDEN, L., MENENDEZ-PELAEZ, A. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *Journal of Pineal Research* [en línea]. 1995, vol. 19, n. 3, p. 111-115 [consulta 15 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8750343/> >. ISSN: 1600-079X.

PAIVA, Sergio A. R. y RUSSELL, Robert M. β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* [en línea]. 1999, vol. 18, n. 5, p.

426-433 [consulta 17 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10511324/> >. ISSN: 1541-1087.

PÉREZ CASAR, Laura. Alimentos del futuro: crece la demanda de proteínas alternativas a la carne. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* [en línea]. 2020, vol. 46, n. 2, p. 136-139 [consulta 6 ago. 2021]. < <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/7920> >. ISSN: 1669-2314.

PEREZ, Mariana A. y ARANCIBIA, Selva R. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Archivos de Neurociencia* [en línea]. 2007, vol. 12, n. 1, p. 45-54 [consulta 23 dic. 2021]. < <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=18243> >. ISSN: 0187-4705.

PERÓN RODRÍGUEZ, José M., LÓPEZ MENÉNDEZ, José R., y LÓPEZ TRUJILLO, Yoel. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar* [en línea]. 2001, vol. 30, n.1 [consulta 21 may. 2021]. < http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000100007 > ISSN: 1561-3046.

PHANIENDRA, Alugoju, JESTADI, Dinesh B., PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* [en línea]. 2015, vol. 30, n.1, p. 11-26 [consulta 02 jun. 2021]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310837/> >. ISSN: 0974-0422.

PRAVEEN, Kumar I., VELAYUTHAM, Manikandan, GURU, Ajay, SUDHAKARAN, Gokul, PACHAIAPPAN, Raman, AROCKIARAJ, Jesu. Protective effect of morin by targeting mitochondrial reactive oxygen species induced by hydrogen peroxide demonstrated at a molecular level in MDCK epithelial cells. *Molecular Biology Reports* [en línea]. 2022, vol.49, n. 6, p. 4269-4279 [Consulta 14 jul. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35182324/#:~:text=Conclusion%3A%20These%20findings%20suggest%20that,antioxidant%20genes%20in%20MDCK%20cells.> >. ISSN: 1573-4978.

QUIMYA LIVING FOOD [en línea]. [Consulta 4 ene. 2023]. < <https://quimya.ar/producto/yog-sabor-frutilla-2/> >.

QUIÑONES, M., MIGUEL, M. y ALEIXANDRE, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria* [en línea]. 2012, vol. 27, n. 1, p. 76-89 [consulta 2 jul. 2021]. < https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n1/09_revision_08.pdf >. ISSN: 1699-5198.

RAMÍREZ, Alejandro, REYES, Tatiana, LIBERONA, Leonel, BUSTAMANTE, Andrea, SÁEZ, Claudia, BORZONE, Gisella. Metabolismo del glutatión y desarrollo posnatal del pulmón de la rata. *Revista médica de Chile* [en línea]. 2007, vol. 135, n. 896-903 [consulta 23 jul. 2021]. < <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v135n7/art10.pdf> >. ISSN: 0034-9887.

RAMOS, Sonia. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry* [en línea]. 2007, vol. 18, n. 7, p. 427-442 [consulta 22 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17321735/> >. ISSN: 1873-4847.

RAO, A.V. y AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research* [en línea]. 1999, vol. 19, n. 2, p. 305-323 [consulta 15 ago. 2021]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0271531798001936> >. ISSN: 0271-5317.

REITER, Russel J., ACUÑA-CASTROVIEJO, Dario, TAN, Dun-Xian, BURKHARDT, Susanne. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* [en línea]. 2001, vol. 939, n. 1, p 200-215 [consulta 13 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11462772/> >. ISSN: 1749-6632.

REITER, Russel J., TAN, Dun-Xian, y MALDONADO, Maria D. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *Journal of Pineal Research* [en línea]. 2005, vol 39, n. 2, p. 215-216 [consulta 11 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16098101/> >. ISSN: 1600-079X.

RITER, Stefan W. Bile Pigments in Pulmonary and Vascular Disease. *Frontier in Pharmacology* [en línea]. 2012, vol. 3, n. 39 [consulta 10 jul. 2021]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296960/> >.ISSN: 1663-9812.

RIZZELLO, Carlo G., LORUSSO, Anna, RUSSO, Vito, PINTO, Daniela, MARZANI, Barbara, GOBBETTI, Marco. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [en línea]. 2017, vol. 241, p. 252-261 [consulta 26 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516305815?via%3Dihub> >. ISSN: 0168-1605.

SANZ, Y., COLLADO, M.C., DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española* [en línea]. 2003, vol. 61, n. 9, p. 476-482 [consulta 25 jul. 2021]. < <https://aprenderly.com/doc/2768906/probi%C3%B3ticos--criterios-de-calidad-y-orientaciones-para-el.../> >.

SCHMIDT, Heidi M., KELLEY, Eric E y STRAUB, Adam C. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology* [en línea]. 2019, vol. 21 [consulta 28 jun. 2021]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231718309868#bib12> >. ISSN: 2213-2317.

SEIFRIEDA, Harold E., ANDERSON, Darrell E., FISHERA, Evan I., MILNER, John A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry* [en línea]. 2007, vol. 18, n. 9, p. 567-579 [consulta 21 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360173/> >. ISSN: 1873-4847.

SHEEHAN, David, MEADE, Gerardene, FOLEY, Vivienne M., DOWD, Catriona A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* [en línea]. 2001, vol. 360, p. 1-16 [consulta 7 jul. 2021]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222196/pdf/11695986.pdf> >. ISSN: 1470-8728.

SIES, H. y JONES, D. *Encyclopedia of Stress* [en línea]. 2a. ed. United Kingdom: Academic Press, 2007. p. 45-48 [consulta 16 jun. 2021]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739476002853#!> >. ISBN: 978-0-12-373947-6.

SIES, Helmut, CADENAS, Enrique. Biological Basis of Detoxication of Oxygen Free Radicals. En Biological Basis of Detoxication, CALDWELL, John [en línea]. New York: Academic Press, 1983, p. 182. <[https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=cS2EVemN-tEC&oi=fnd&pg=PA181&dq=SIIES+FL.+y+CADENAS+E.+\(1983\).+Biological+basis+of+detoxication+of+oxygen+free+radicals.+En:+Biological+Basis+of+Detoxication+\(Caldwell+.1.+y+Iakoby+W.B.+Eds.\).+Acad.+Press.+San+Diego.+Pp.+181.&ots=I8d5xndRtz&sig=bvBS8WZL4v300g7YX0QDEEUBKwk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=cS2EVemN-tEC&oi=fnd&pg=PA181&dq=SIIES+FL.+y+CADENAS+E.+(1983).+Biological+basis+of+detoxication+of+oxygen+free+radicals.+En:+Biological+Basis+of+Detoxication+(Caldwell+.1.+y+Iakoby+W.B.+Eds.).+Acad.+Press.+San+Diego.+Pp.+181.&ots=I8d5xndRtz&sig=bvBS8WZL4v300g7YX0QDEEUBKwk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>. ISBN: 0-12-155060-5.

SIES, Helmut, MENCK, Carlos F. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/DNAging* [en línea]. 1992, vol. 275, p. 367-375 [consulta 12 jun. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092187349290039R?via%3Dihub>>. ISSN: 0921-8734.

SILK ARGENTINA [en línea]. [Consulta 5 ene. 2023]. <<https://www.silkargentina.com.ar/alternativas/yogur-topping-granola/>>.

SINGH, Avtar, IDOWU, Anthony T., BENJAKUL, Soottawat, KISHIMURA, Hideki, ALUKO, Rotimi E., KUMAGAI, Yuya. Debittering of salmon (*Salmo salar*) frame protein hydrolysate using 2-butanol in combination with β -cyclodextrin: Impact on some physicochemical characteristics and antioxidant activities. *Food chemistry* [en línea]. 2020, vol. 321, p. 1-9 [consulta 26 sep. 2023]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32247182/>>. ISSN: 1873-7072.

SINGH, Baljinder, KUMAR, Ashwini y MALIK, Ashok K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [en línea]. 2017, vol. 38, n. 6, p. 820-832 [consulta 25 jul. 2021]. <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elps.201600334?casa_token=AGfYGQK3TbgAAAAA%3AqYyq8UwEswrF8YO6W0h42gTpcQhZj8FvgHjOy dHRccVLDi97x5jDOmiJntEF9CGEQWLGRvUpEH-gDw>. ISSN: 1522-2683.

SMITH, Robin A. J., KELSO, Geoffrey F., JAMES, Andrew M., MURPHY, Michael P. Targeting coenzyme Q derivatives to mitochondria. *Methods in enzymology* [en línea]. 2004,

vol. 382, p. 45-67 [consulta 16 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15047095/> >. ISSN: 1557-7988.

SOMERSET, Shawn M. y JOHANNOT, Lidwine. Dietary Flavonoid Sources in Australian Adults. *Nutrition and Cancer* [en línea]. 2008, vol. 60, n.4, p. 442-449 [consulta 20 ago. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18584477/> >. ISSN: 1532-7914.

STEFANI, Massimo, RIGACCI, Stefania. Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *Biofactors* [en línea]. 2014, vol. 40, n. 5, p. 482-493 [consulta 25 jul. 2021]. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24890399/>>. ISSN: 1872-8081.

SUNTRES, Zacharias E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* [en línea]. 2002, vol. 180, n. 1, p. 65-77 [Consulta 14 jul. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02003827?via%3Dihub> >. ISSN: 1879-3185.

TAN, Dun-Xian, MANCHESTER, Lucien C., REITER, Russel J., PLUMMER, Benjamin F., HARDIES, Lou J., WEINTRAUB, Susan T., SHEPHERD, Alexander M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [en línea]. 1998, vol. 253, n.3, p. 614-620 [consulta 12 jul. 2021]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9918777/>>. ISSN: 1090-2104.

TURUNEN, Mikael, OLSSON, Jerker y DALLNER, Gustav. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta* [en línea]. 2004, vol. 1660, n. 1-2, p. 171-199. [Consulta 20 mar. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273603003717?via%3Dihub> >. ISSN: 0005-2736.

VANHOUTTE, Paul M., FELETOU, Michel, TEDDEI, Stefano. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology* [en línea]. 2005, vol. 144, n. 4, p. 449-458 [consulta 10 ago. 2021]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1576026/> >. ISSN: 1476-5381.

VAQUERO-RAYA, E. C. y MOLERO-RICHARD, X. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología* [en línea]. 2005, vol. 28, n. 8, p. 473-484 [consulta 25 jul. 2021]. <<https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-especies-reativas-oxigeno-enfermedades-inflamatorias-13078997>>. ISSN: 0210-5705.

VEAL, Elizabeth A., DAY, Alison M., MORGAN, Brian A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell* [en línea]. 2007, vol. 26, n. 1, p. 1-14 [consulta 26 may. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276507001864#bib46>>. ISSN: 1097-2765.

WEISIGER, Richard A. y FRIDOVICH, Irwin. Superoxide Dismutase: ORGANELLE SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry* [en línea]. 1973, vol. 248, n.10, p. 3582-3592 [consulta 20 jul. 2021]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819439690?via%3Dihub>>. ISSN: 1083-351X.

WHITE, Roger C., BROCK, Tommy A., CHANG, Ling-Yi, CRAPOI, James, BRISCOE, Page, KU, David, BRADLEY, William A., GIANTURCO, Sandra H., GORE, Jeri, FREEMAN, Bruce A., TERPEY, Margaret M. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea]. 1994, vol. 91, n. 3, p. 1044-1048 [consulta 6 ago. 2021]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC521450/pdf/pnas01125-0220.pdf>>. ISSN: 1091-6490.

XIAO, Yu, XING, Guangliang, RUI, Xin, LI, Wei, CHEN, Xiaohong, JIANG, Mei, DONG, Mingsheng. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of functional foods* [en línea]. 2014, vol. 10, p. 210-222 [consulta 2 oct. 2023]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001996?via%3Dihub>>. ISSN: 1756-4646.

YANGA, Laurence, MIHB, Nathan, ANANDA, Amitesh, PARKB, Joon Ho, TANA, Justin, YURKOVICHA, James T., MONKA, Jonathan M., LLOYDA, Colton J., SANDBERGA, Troy E. Cellular responses to reactive oxygen species are predicted from molecular mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea]. 2018, vol. 116, n. 28, p. 14368–14373 [consulta 10 sep. 2023]. < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31270234/> >. ISSN: 1091-6490.

ZALBA, G., SAN JOSÈ, G., MORENO, M.U. y DIEZ J. Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades vasculares. *Nefrología* [en línea]. 2002, vol. 22, n. 7 [consulta 26 may. 2021]. < <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-X0211699503029197> >. ISSN: 1989-2284.

ZELKO, Igor N., MARIANI, Thomas J. y FOLZ, Rondney J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* [en línea]. 2002, vol. 33, n. 3 p. 337-349 [consulta 26 sep. 2023]. < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089158490200905X> >. ISSN: 0891-5849.

ZENG, Melody Y., MIRALDA, Irina, ARMSTRONG, Cortney L., URIARTE, Silvina M., BAGAITKAR, Juhi. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Molecular Oral Microbiology* [en línea]. 2019, vol. 34, n. 2, p. 27-38 [consulta 21 jun. 2021]. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6935359/> >. ISSN: 2041-1014.