

OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE MELANOIDINAS DE CORTEZAS DE PAN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD MODULADORA DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS INTESTINALES Y ENDOTELIALES.

VIRGINIA TEMIÑO, MÓNICA CAVIA, GISELA GERARDI, PILAR MUÑIZ,
GONZALO SALAZAR

*¹Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos.
Universidad de Burgos*

Resumen

El consumo de pan tradicionalmente ha sido muy importante en la cultura española, incluso en la actualidad ya que siempre ha estado presente en el acompañamiento de las comidas, por lo tanto, es un alimento básico. En el 2020 la compra de pan se incrementó un 5,7 % con una media de consumo de pan de 32,78 Kg/año según datos publicados por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de 2021. Ello está asociado a un incremento en la generación de residuos de la industria de panificación que llegan a constituir entre un 20 % y un 30% del producto procesado, lo que supone una pérdida de recursos en la producción y un problema de gestión ambiental.

Uno de los compuestos finales formados durante el procesamiento térmico del pan son las melanoidinas. Las melanoidinas se forman durante la reacción de Maillard que es una reacción de pardeamiento no enzimático entre los grupos amino y carbonilo presentes en los alimentos dando lugar a gran cantidad compuestos intermedios los cuales reaccionan entre sí. Las melanoidinas se caracterizan por ser compuestos de alto peso molecular, muy complejos y marrones que contribuyen no solo a mejorar las propiedades organolépticas (color, aroma, sabor) de los alimentos, sino que aportan numerosos beneficios sobre la salud. Entre las numerosas propiedades beneficiosas de las melanoidinas destacan la actividad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, prebiótica, quelante de metales, etc.

Teniendo en cuenta toda esta información el objetivo de este estudio es la obtención de un extracto acuoso de melanoidinas obtenido a partir de residuos de la industria de panificación (cortezas de pan de molde) y evaluar su actividad moduladora del estrés oxidativo en las líneas celulares Caco-2 y HUVEC.

La obtención del extracto de melanoidinas se realizó mediante ultrafiltración en celdas de agitación con membranas de polisulfona de 10 kDa. Para

la obtención de concentrado las melanoidinas se realizaron ultrafiltraciones trabajando a distintas condiciones de presión y modos de operación (continuo y discontinuo). Se observaron diferentes densidades de flujo y selectividad de la membrana para los distintos compuestos. La diafiltración permite un retención de melanoidinas de alto peso molecular, caracterizado por sus propiedades saludables, consiguiendo reducir los compuestos de la reacción de Maillard de bajo peso molecular que son citotóxicos.

Se caracterizó el extracto, presentando un alto contenido de melanoidinas evaluado por el índice de pardeamiento y la absorbancia a 345 nm indicador de la presencia de melanoidinas y con pesos moleculares entre 20 y 82 kDa. El extracto de melanoidinas presentó una alta capacidad antioxidante evaluada por los métodos de ABTS y FRAP y una alta actividad quelante característica de estos compuestos. Su actividad biológica se evaluó en la fracción bioaccesible, obtenida por digestión gastrointestinal, en la línea celular intestinal Caco-2 y en la línea endotelial HUVEC. El extracto bioaccesible presenta bioactividad en ambas líneas celulares modulando el estrés oxidativo como indica la reducción de los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) y el aumento de los niveles de glutatión (GSH/GSSG) observada.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de pan tradicionalmente ha sido muy importante en la cultura española, incluso en la actualidad ya que siempre ha estado presente en el acompañamiento de las comidas, por lo tanto, es un alimento básico. En el 2020 la compra de pan se incrementó un 5,7 % con una media de consumo de pan de 32,78 Kg/año según datos publicados por Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de 2021. Ello está asociado a un incremento en la generación de residuos de la industria de panificación que llegan a constituir entre un 20 % y un 30% del producto procesado, lo que supone una pérdida de recursos en la producción y un problema de gestión ambiental. Por ello resulta muy interesante el posible aprovechamiento de los residuos generados durante la fabricación del pan, pues supondrían una fuente de ingresos para las industrias además de ofrecer beneficios en la salud de los consumidores.

Uno de los compuestos finales formados durante el procesamiento térmico del pan son las melanoidinas. Las melanoidinas se forman durante la reacción de Maillard que es una reacción de pardeamiento no enzimático entre los grupos amino y carbonilo presentes en los alimentos dando lugar a gran cantidad de compuestos intermedios los cuales reaccionan entre sí [1] [2]. Las melanoidinas se caracterizan por ser compuestos de alto peso molecular, muy complejos y marrones que contribuyen no solo a mejorar las propiedades organolépticas (color, aroma, sabor) de los alimentos, sino que aportan numerosos beneficios sobre la salud [2]. Los productos de reacción de Maillard (MRPs) presentan gran complejidad química y su extracción, aislamiento, purificación e identificación resulta ser aún incierta y complicada. En la actualidad se está investigando nuevas técnicas para el óptimo aprovechamiento de los MRPs,

una técnica utilizada para aislar y purificar adecuadamente los MRPs es mediante ultrafiltración/diafiltración utilizando membranas permeables de poro definido [3]. Tras el aislamiento de los MRPs resulta imprescindible identificarlos, uno de los métodos para determinar el contenido en melanoidinas es espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 345 nm y 420 nm, correspondiente al índice de compuestos de Maillard intermedios y al índice de pardeamiento respectivamente.

Además de las características organolépticas que aportan las melanoidinas a los alimentos también son conocidas sus numerosas propiedades beneficiosas, entre las que destacan la actividad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, prebiótica, quelante de metales, etc. [4]. La actividad antioxidante de las melanoidinas viene dada por su capacidad de transferir electrones entre sus grupos hidroxilo y pirrol [5] o por su capacidad de quelar metales del medio formando complejos estables con estos [6]. Por ello, las melanoidinas son capaces de estabilizar las especies reactivas del oxígeno (ROS) formados durante el estrés oxidativo celular y de mejorar y equilibrar el estado redox celular (GSH/GSSG) [7].

Por todo lo expuesto resulta muy interesante el estudio de las melanoidinas debido a su alto potencial como potencial ingrediente funcional en los alimentos. Asimismo, la obtención de extractos de melanoidinas a partir de subproductos de las industrias alimentarias como la de panificación le da un valor añadido al producto.

2. OBJETIVO

El objetivo de este estudio es la obtención de un extracto de melanoidinas obtenido a partir de residuos de la industria de panificación (cortezas de pan de molde y pan común) y evaluar la actividad moduladora de sus fracciones bioaccesibles sobre el estrés oxidativo en las líneas celulares Caco-2 y HUVEC.

3. METODOLOGÍA

3.1. Obtención y aislamiento de melanoidinas

Las melanoidinas obtenidas en este ensayo proceden de la corteza de pan común y pan de molde. Para ello se siguió el procedimiento según Roncero-Ramos., et al 2013 en el que primeramente se realiza un raspado de la corteza, un tamizado obteniendo partículas de 1 mm aproximadamente y una digestión enzimática con la enzima pronase E (400U/ml) durante 48 horas. Posteriormente el extracto acuoso resultante se precipita con ácido tricloroacético 20 % y se centrifuga para obtener los compuestos solubles de reacción de Maillard (MRPs). La separación y concentración de melanoidinas se realiza mediante ultrafiltración, utilizando un sistema "dead-end" con membranas planas de polietersulfona de 10 KDa. El ensayo se realizó en condiciones de flujos continuos y discontinuos aplicando distintas presiones (1, 2 y 3 bar) con el fin de observar las mejores condiciones de obtención de melanoidinas.

3.2. Obtención de la fracción bioaccesible de melanoidinas

Tras el aislamiento del extracto de melanoidinas de alto peso molecular se procedió a la obtención de la fracción bioaccesible. Se realizó una digestión enzimática simulando el proceso de digestión gastrointestinal, el protocolo seguido fue por Minekus et al., 2014, en el que hay una fase oral utilizando α -amilasa de páncreas de porcino 75 U/mL; una fase de digestión gástrica utilizando una solución enzimática de pepsina 500 U/mL; y una fase digestión intestinal en la que se utilizó una solución enzimática de pancreatina 100 U/mL + una solución de sales biliares 10 mM. [8] Después se centrifugaron y liofilizaron las muestras, de esta forma se obtuvo la fracción gastrointestinal (GI) de melanoidinas de pan común (MP) y pan de molde (MPM).

3.3. Bioactividad de la fracción bioaccesible de melanoidinas en las líneas celulares Caco-2 y HUVEC

Se cultivaron células Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano en medio MEM suplementado con 20 % de suero fetal bobino, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio y 1% de penicilina/estreptomicina, se incubaron durante 24 h a 37°C con 90 % HR y 5 % de CO₂. Las células endoteliales HUVEC se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina se incubaron durante 24 h a 37°C con 90 % HR y 5 % de CO₂. Después se trataron con las fracciones biodisponibles pan común (MP) y pan de molde (MPM) durante 24 h, y finalmente se procedió a realizar los respectivos ensayos de ROS y cuantificación de los niveles de GSH/GSSG.

3.3.1. Método ROS

Este método fue determinado por Wang & Joseph 1999, se basa en la cuantificación de especies reactivas al oxígeno (ROS) por el método del 2',7'-dichlorofluoresceín (DCF) [9]. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (20000 células/ pocillo), y se incubaron con las fracciones bioaccesibles de las melanoidinas a distintas concentraciones (25 y 200 μ g/ml) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se añadió una solución de DCF-DA 20 μ M y fueron oxidadas con ABAP 0,6 mM, para inducir un daño oxidativo. Finalmente se midió la fluorescencia cada 30 min con longitud de onda de 480 nm de excitación y 530 nm de emisión. Los resultados fueron expresados como % de fluorescencia de las muestras respecto al control (% T/C)

3.3.2. Cuantificación de los niveles de GSH y GSSG

El glutatión es un tripéptido con efecto protector frente a las especies reactivas del oxígeno pasando a su forma oxidada, el glutatión oxidado (GSSG). Por ello una forma de evaluar el estrés oxidativo es determinar la relación entre GSH/GSSG. La cuantificación de los niveles GSH y de GSSG se realizó por el método de Griffith (1980) con algunas modificaciones (Del Pino-García et al., 2015). Es un método enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en

presencia de glutatión reductasa. La formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) se mide espectrofotométricamente a 412 nm [10]. Para la realización de este ensayo, a 10 μL de la suspensión celular neutralizada con TEAM 4 M, se añadió 190 μL /pocillo de la mezcla de reacción (tampón fosfato 0,1 M EDTA, 1 mM DTNB, 6 mM NADPH y 0,3 mM glutatión reductasa). Se realizó una cinética a 410 nm cada 2,5 minutos durante 20 minutos. El GSSG fue determinado mediante el mismo método derivatizando las muestras previamente con 2- vinilpiridina. Los resultados se expresaron con la relación GSH/GSSG.

3.3.3. Análisis estadístico

Los resultados se representaron con la media \pm desviación estándar, para el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII-X64, realizándose un análisis de la varianza con OneWay (ANOVA) considerando diferencias significativas $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ultrafiltración y diafiltración del extracto enzimático de melanoidinas

La técnica de ultrafiltración con membranas permeables permite la separación de distintos compuestos presentes según su tamaño sin modificar sus propiedades. Además, aplicando el modo de operación diafiltración es posible obtener mayor concentración de los componentes solubles, melanoidinas, en la fracción retenida [11].

Para la realización de este estudio se aplicaron distintas condiciones de operación, con el objetivo de obtener un fraccionamiento óptimo de los compuestos presentes del extracto enzimático de melanoidinas. Se aplicaron distintas condiciones de presión transmembrana (PT) 1, 2 y 3 bares trabajando en forma discontinua; en forma continua solamente se aplicó PT de 3 bar. Después se evaluaron varios parámetros respecto a la densidad de flujo y la selectividad de membrana.

4.1.1. Evaluación de las densidades de flujo

Se estudio la evolución de las densidades de flujo de permeación (J), para determinar la viabilidad del proceso en función del ensuciamiento de la membrana [11].

Los resultados con flujos discontinuos en MPM y en MP se presentan en la **Figura 1**. Los resultados indican el valor de J tiende a alcanzar un estado estacionario en ambos extractos MP y MPM, lo que indica que no se está produciendo ensuciamiento de la membrana. Cabe destacar que los mayores valores de J se presentan a las condiciones de trabajo de 3 bar con valores de 8 L/h \cdot m² frente a los valores obtenidos a 2 bar de 7 L/h \cdot m² o a 1 bar J de 4 L/h \cdot m². Estos resultados nos indican que trabajando a presiones altas se puede obtener en menor tiempo el concentrado de melanoidinas, lo cual puede permitir ahorrar tiempo y dinero.

También se observó que en ninguna de las condiciones de trabajo utilizadas se produce ensuciamiento de la membrana pues la tendencia es lineal. El incremento de valores de J al principio de cada etapa puede ser debido a cambios en la polaridad de la membrana de filtración que le obliga a alcanzar de nuevo el estado estacionario, tardando en volver a alcanzar su estado polarizado. Las diferencias en los valores de J observados para las muestras MPM y MP indica que posiblemente las melanoidinas sean químicamente distintas presentando mayores valores de J la muestra MPM con valores de $8 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ frente a la muestra MP con un valor de $6 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$. Asimismo, se la obtención del concentrado de MPM se consigue en menor tiempo, a los 400 min frente a MP que se obtuvo a los 700 min.

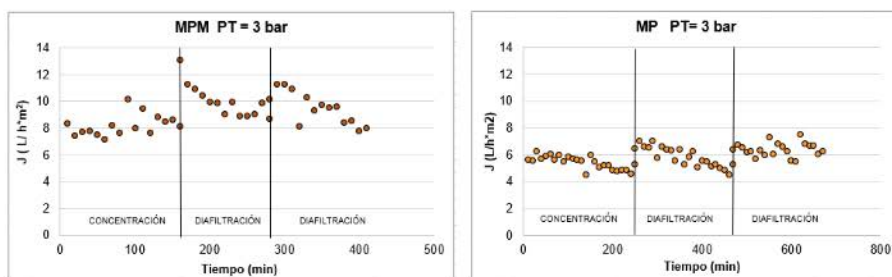


Figura 1. Evaluación de la densidad de flujo de permeación (J) trabajando en forma discontinua con valores de presión transmembrana de (PT) 3 bares, para extracto de corteza de pan de molde (MPM) y de pan común (MP).

Los resultados de la ultrafiltración en continuo se presentan en la **Figura 2**, observándose la misma tendencia que en la forma discontinua. Los valores de J alcanzan el estado estacionario con valores de 8 a $10 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ para el extracto MPM y de valores de 6 a $8 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ para el extracto MP. Los valores de J aumentan a mayor número de diafiltraciones realizadas incluso sin desestabilizar la membrana observándose que el estado estacionario se conserva mejor que en la forma discontinua, además la fracción de melanoidinas de ambos extractos, MPM como en MP se obtienen al mismo tiempo de concentrado a los 300 min.

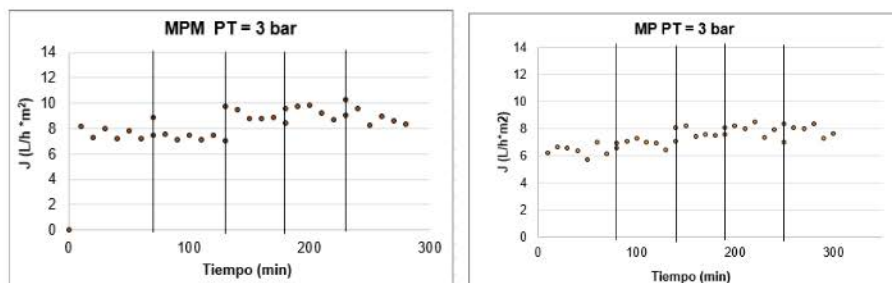


Figura 2. Evaluación de la densidad de flujo de permeación (J) trabajando en forma continua con valores de presión transmembrana de (PT) 3 bares, para extracto de corteza de pan de molde (MPM) y de pan común (MP).

Tras analizar estos resultados las mejores condiciones de operación este caso es trabajando a flujos altos y en condiciones continuas ya que obtenemos menores tiempo de concentración además de menores variaciones en los flujos de permeación J.

4.1.2. Selectividad de membrana

Con las condiciones de trabajo seleccionadas se evaluó la capacidad de selección membrana frente a los distintos compuestos presentes, el objetivo es obtener una mayor concentración de melanoidinas de alto peso molecular. Se determinaron el contenido de MRPs medidos a distintas longitudes de onda, los compuestos medidos a 280 nm corresponden con compuestos de bajo peso molecular, a 345 nm corresponden con los compuestos de peso molecular intermedio y a 420 nm corresponden con los compuestos de alto peso molecular, observándose mayor porcentaje de rechazo de los compuestos de peso molecular intermedio y menor porcentaje de rechazo de los compuestos de bajo peso molecular. Respecto a los MRPs de alto peso molecular medidos a 420 nm cabe destacar que su porcentaje de rechazo fue inferior al de los compuestos intermedios medidos a 345 nm lo cual nos indica que los compuestos evaluados a ambas longitudes de onda tienen distintas características polares. La selectividad de la membrana no solo actúa a favoreciendo la retención de los compuestos de alto – intermedio peso molecular, melanoidinas, sino que también se ve influenciada por las características polares de los compuestos.

4.2. Caracterización y estudio de las fracciones bioaccesibles de melanoidinas

El estrés oxidativo se debe al desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, dando lugar a una desregulación de la homeostasis celular implicadas en el inicio y evolución de enfermedades como la hipertensión, diabetes, envejecimiento... [12].

El tripéptido glutatión (GSH) es el tiol más abundante presenten en las células, modulando el estrés oxidativo proporcionando protección a las células. Además, es capaz de contrarrestar los radicales libres como el radical hidroxilo, superóxido, y actuar eliminando las especies reactivas al oxígeno (ROS) y sus subproductos tóxicos. [7]

En este estudio se evaluó la relación de GSH/GSSG como indicador del estado redox celular. El GSH en presencia de ROS pasa a GSSG, generando cambios en el balance redox celular cambiando la homeostasis celular. El estudio del efecto de las melanoidinas sobre la relación GSH/GSSG se evaluó en células endoteliales pertenecientes a la línea HUVEC y en células epiteliales intestinales pertenecientes a la línea Caco-2, los resultados aparecen representados en la **Figura 3**. Respecto a la línea celular HUVEC el tratamiento con la fracción bioaccesible MP no muestra diferencias significativas con respecto a las células no tratadas, sin embargo, se observa una reducción en las células tratadas con la fracción de MPM. El tratamiento de las células con t-BOOH

reducen los niveles de GSH/GSSG y se observa un efecto protector en presencia de las muestras MP y MPM, indicando su capacidad moduladora del estrés oxidativo.

Por otro lado, en la línea Caco-2 como se puede observar en la **Figura 3** el ratio GSH/GSSG los valores son inferiores a los observados en la línea endotelial. El tratamiento de las células Caco con la fracción bioaccesible de las melanoidinas MP y MPM no presentan diferencias significativas con respecto a la célula no tratada (NT), indicando que no alteran el estado redox. El tratamiento con el agente oxidante t-BOOH reduce significativamente la relación GSH/GSSG, y no se observa un efecto modulador en presencia de las fracciones bioaccesibles.

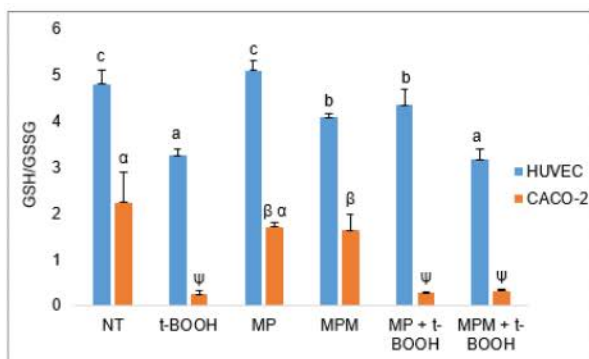


Figura 3. Estudio del estado redox celular GSH/GSSG en la línea celular HUVEC y Caco-2. Células no tratadas (NT), células tratadas con el oxidante t-BOOH (T-BOOH), células tratadas con las melanoidinas de pan común (MP) y pan de molde (MPM), células tratadas con las melanoidinas de pan común y oxidadas con t-BOOH (MP +T-BOOH) y pan de molde y oxidadas con t-BOOH (MPM +TBOOH).

Para evaluar si las melanoidinas modulan el estrés oxidativo se evaluaron el efecto de las mismas sobre los niveles de ROS intracelular [9]. En este caso para completar los resultados obtenidos respecto al estado redox celular en HUVEC y Caco-2 medido por el ratio GSH/GSSG se realizó un ensayo ROS en el que se sometió a las células a una oxidación con ABAP.

En **Figura 4 A** se evaluó el efecto sobre el estrés oxidativo de la fracción bioaccesible de las melanoidinas, se observó que en la línea celular HUVEC las muestras MP 200, MPM 25 y MPM 200 no presentaron diferencias significativas frente a las células control, observándose una disminución significativa en la muestra MP 25. Estos resultados indican que la presencia de la fracción bioaccesible de melanoidinas no induce cambios en los niveles de ROS intracelulares. En la línea Caco-2 se observan una disminución de los niveles de ROS a todas las concentraciones ensayadas.

En la **Figura 4 B** se representa los niveles de ROS en presencia del agente oxidante ABAP, comparando con las muestras tratadas con melanoidinas y oxidadas. En la línea celular HUVEC, se observa que la presencia de la fracción de melanoidinas MPM no presentaron diferencias significativas frente al control oxidado. Sin embargo, la presencia de la fracción bioaccesible de MP en el medio de incubación reduce significativamente los niveles de ROS indicando un importante efecto protector frente al estrés oxidativo. Sin embargo, en las células Caco-2 el tratamiento con las fracciones bioaccesibles de ambos tipos de melanoidinas no reduce los niveles de ROS. Estos resultados establecen una relación entre tipo de melanoidina y capacidad moduladora de estrés oxidativo.

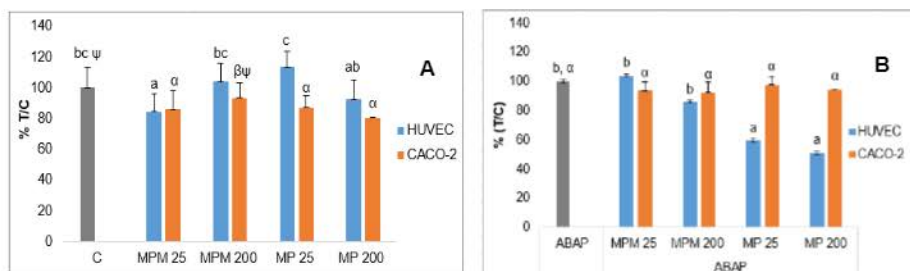


Figura 4. Estudio de la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) en la línea celular HUVEC y Caco-2. Figura A → Células sin tratamiento (NT), células tratadas con las melanoidinas de pan común (MP) y pan de molde (MPM), e incubadas con distintas concentraciones de melanoidinas de 25 µg/ml y con 200 µg/ml. Figura B → Células oxidadas con ABAP (ABAP), células tratadas con las melanoidinas de pan común (MP) y pan de molde (MPM), e incubadas con distintas concentraciones de melanoidinas de 25 µg/ml y con 200 µg/ml, todas ellas oxidadas con ABAP.

5. CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para el fraccionamiento de melanoidinas de MP y MPM mediante ultrafiltración es utilizar flujos continuos con presiones altas de 3 bar, consiguiendo concentrar en un menor tiempo las melanoidinas, y obtener mejores rendimientos. Las fracciones bioaccesibles de las melanoidinas ejercen un efecto beneficioso modulando el estrés oxidativo celular en presencia de agentes oxidantes exógenos. Por todo lo expuesto las melanoidinas procedentes del pan podrían suponer una fuente importante compuestos funcionales para la industria panadera, además de su utilización como posible ingrediente funcional.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de la Junta de Castilla y León a través de proyecto JCyL/FEDER- BU243P18.

REFERENCIAS

- [1] L. V. Bork, P. T. Haase, S. Rohn, y C. Kanzler, «Formation of melanoidins – Aldol reactions of heterocyclic and short-chain Maillard intermediates», *Food Chem.*, vol. 380, p. 131852, jun. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131852.
- [2] N. Diaz-Morales, M. Ortega-Heras, A. M. Diez-Maté, M. L. Gonzalez-SanJose, y P. Muñiz, «Antimicrobial properties and volatile profile of bread and biscuits melanoidins», *Food Chem.*, vol. 373, p. 131648, mar. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131648.
- [3] S. Pastoriza y J. A. Rufián-Henares, «Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet», *Food Chem.*, vol. 164, pp. 438-445, dic. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.118.
- [4] N. Diaz-Morales, M. Ortega-Heras, A. M. Diez-Maté, M. L. Gonzalez-SanJose, y P. Muñiz, «Antimicrobial properties and volatile profile of bread and biscuits melanoidins», *Food Chem.*, vol. 373, p. 131648, mar. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131648.
- [5] M. Nooshkam, M. Varidi, y D. K. Verma, «Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review», *Food Res. Int.*, vol. 131, p. 109003, may 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109003.
- [6] F. J. Morales, C. Fernández-Fraguas, y S. Jiménez-Pérez, «Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems», *Food Chem.*, vol. 90, n.º 4, pp. 821-827, may 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.05.030.
- [7] P. Maher, «The effects of stress and aging on glutathione metabolism», *Ageing Res. Rev.*, vol. 4, n.º 2, pp. 288-314, may 2005, doi: 10.1016/j.arr.2005.02.005.
- [8] M. Minekus *et al.*, «A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus», *Food Funct.*, vol. 5, n.º 6, pp. 1113-1124, jun. 2014, doi: 10.1039/c3fo60702j.
- [9] H. Wang y J. A. Joseph, «Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader»
Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable., *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, n.º 5, pp. 612-616, sep. 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00107-0.
- [10] O. W. Griffith, «Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine», *Anal. Biochem.*, vol. 106, n.º 1, pp. 207-212, jul. 1980, doi: 10.1016/0003-2697(80)90139-6.
- [11] D. Garcia, J. Sepúlveda-Valencia, y H. Ciro-Velásquez, «Evaluación del proceso de Diafiltración para la concentración de la proteína en el

suero dulce de quesería», *DYNA*, vol. 87, pp. 239-247, jul. 2020, doi: 10.15446/dyna.v87n214.82795.

- [12] K. B. F. Barbosa, J. Bressan, M. A. Zulet, y J. A. Martínez, «Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos», *An. Sist. Sanit. Navar.*, vol. 31, n.º 3, pp. 259-280, dic. 2008.