



Escuela de
**Ingeniería
Química**

**TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

**PREDICCIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE
COLÁGENO DE SALMÓN MEDIANTE EL USO DE
HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS**

**Candidato(s): CAMILA BEATRIZ BARRERA MENESES
IGNACIO SANTIAGO DEL RÍO PARRA**

**Profesor guía: Dra. Suleivys Nuñez
Profesor co-guía: Dra. Constanza Cárdenas**

Valparaíso, diciembre 2024

Agradecimientos

Con este trabajo de título quisiera agradecer a la única persona que me ha apoyado toda mi vida, mi madre, Gloria Parra, la persona que me ha enseñado todo lo que se en esta vida y de la que nunca podre estar en deuda por todo lo que me ha dado, muchas gracias.

- Ignacio del Rio Parra

Agradezco y dedico este trabajo a mi padre, Marco, por ser el pilar de mi vida y siempre darme la tranquilidad para seguir mis estudios. Pero por sobre todo agradezco a mi madre y abuela, Carmen y Beatriz, porque hasta su último aliento me dieron la confianza y la fuerza para seguir mis sueños.

- Camila Barrera Meneses

Por otra parte, nos gustaría agradecer a todas las personas que nos ayudaron a llevar a cabo este trabajo, las profesoras Suleivys Nuñez, Constanza Cárdenas y Fanny Guzmán, a los académicos Tanya Roman y Yannick Pombett, muchísimas gracias por su buena voluntad, paciencia y todos los consejos que nos proporcionaron a lo largo de la creación de este trabajo, sin su apoyo no podríamos haber seguido adelante.

RESUMEN

Este estudio aborda la identificación y caracterización de péptidos antioxidantes derivados del colágeno de salmón mediante el uso de herramientas bioinformáticas y experimentales, buscando responder a la problemática de la oxidación que afecta tanto a la salud humana como a la calidad de los alimentos, dando una alternativa al uso de fuentes de péptidos como lo pueden ser los subproductos de la industria salmonera. En una primera fase, se realizó un análisis exhaustivo de literatura para determinar propiedades estructurales clave, como baja hidrofobicidad y alta polaridad, relacionadas con el potencial antioxidante. Estas propiedades guiaron la selección de secuencias candidatas, optimizando la identificación de péptidos con actividad antioxidante prometedora mediante predicciones computacionales.

Posteriormente, en la fase experimental, se sintetizaron y evaluaron los péptidos seleccionados en ensayos antioxidantes. La vitamina C, empleada como control positivo, validó la eficacia de las condiciones experimentales. Entre los péptidos evaluados, la secuencia PGDIG mostró una actividad antioxidante significativa del 40% en los ensayos de Actividad Antioxidante Celular (CAA) a una concentración de 0,4 mM, mientras que la secuencia DGCERCF destacó en los ensayos de DPPH, alcanzando una actividad antioxidante comparable a la de la vitamina C a 0,2 mM. Asimismo, en los ensayos de ABTS, la secuencia DGCERCF mantuvo una alta actividad antioxidante en ambas concentraciones probadas.

Los resultados subrayan que las secuencias DGCERCF y PGDIG presentan un potencial antioxidante relevante bajo ciertas condiciones, aunque la eficacia de otros péptidos varía según el tipo de radical y la concentración utilizada. Este trabajo pone de manifiesto el valor de combinar herramientas bioinformáticas con ensayos experimentales para obtener nuevos péptidos antioxidantes eficaces y adaptar su aplicación a situaciones específicas de estrés oxidativo, contribuyendo tanto a la innovación en salud y alimentación como al aprovechamiento sostenible de recursos marinos.

Palabras clave: Péptidos antioxidantes, Herramientas bioinformáticas, Estrés oxidativo, Síntesis de péptidos.

ABSTRACT

This study addresses the identification and characterization of antioxidant peptides derived from salmon collagen through the use of bioinformatic and experimental tools, aiming to tackle oxidation issues that affect both human health and food quality, while also utilizing by-products from the salmon industry. In the first phase, an extensive literature review was conducted to determine key structural properties, such as low hydrophobicity and high polarity, associated with antioxidant potential. These properties guided the selection of candidate sequences, optimizing the identification of peptides with promising antioxidant activity through computational predictions.

In the subsequent experimental phase, selected peptides were synthesized and evaluated in antioxidant assays. Vitamin C, used as a positive control, validated the effectiveness of the experimental conditions. Among the peptides evaluated, the sequence PGDIG showed significant antioxidant activity of 40% in Cellular Antioxidant Activity (CAA) assays at a concentration of 0.4 mM, while the sequence DGCERCF excelled in DPPH assays, achieving antioxidant activity comparable to that of vitamin C at 0.2 mM. Additionally, in ABTS assays, the sequence DGCERCF maintained high antioxidant activity at both tested concentrations.

The results highlight that sequences DGCERCF and PGDIG present relevant antioxidant potential under certain conditions, though the efficacy of other peptides varies according to the type of radical and concentration used. This study underscores the value of combining bioinformatic tools with experimental assays to obtain new antioxidant peptides and to tailor their application to specific oxidative stress conditions, contributing both to innovation in health and nutrition and to the sustainable use of marine resources.

Keywords: Antioxidant peptides, Bioinformatics tools, Oxidative stress, Peptide synthesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.	1
1.2. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....	2
1.3. HIPÓTESIS	3
1.4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. MARCO REFERENCIAL	4
2.1. COLÁGENO Y SUS APLICACIONES.....	4
2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y SU IMPACTO EN LA SALUD	4
2.3. FACTORES EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	7
2.4. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	7
2.5. USO DE HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS	8
3. METODOLOGÍA	10
3.1. RECOPIACIÓN DE INFORMACION BIBLIOGRÁFICA	10
3.2. OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROTEICAS DE COLÁGENO DE SALMÓN	11
3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS <i>IN SILICO</i>	12
3.4. PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS.....	13
3.5. SELECCIÓN DE PÉPTIDOS CANDIDATOS PARA SÍNTESIS QUÍMICA	15
3.6. SINTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS	15
3.7. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	22
3.8. ANÁLISIS ESTADISTICO.....	26
3.9. PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS.....	26
3.10. VALIDACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS.....	27
3.11. ANÁLISIS DE COSTOS DE PRODUCCIÓN	28
4. RESULTADOS	29
4.1. RECOPIACION DE INFORMACIÓN BIBLIOGRAFICA	29

4.2.	OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROTEICAS DE COLÁGENO DE SALMÓN	30
4.3.	PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	31
4.4.	SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS	33
4.5.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	34
4.6.	PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD	41
4.7.	VALIDACIÓN DE CITOTOXICIDAD	42
4.8.	ANÁLISIS DE COSTOS DE PRODUCCIÓN	43
5.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1.	PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	47
5.2.	ENSAYO CAA	47
5.3.	ENSAYO DPPH	49
5.4.	ENSAYO ABTS.....	50
6.	CONCLUSIONES.....	52
7.	RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS	54
	BIBLIOGRAFÍA	56
	APÉNDICES.....	I
	ANEXOS	- 1 -
	ANEXO 1: RESULTADOS HIDROLISIS <i>IN SILICO</i>	- 1 -
	ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA.....	- 16 -
	ANEXO 3: RESULTADOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS	- 38 -
	ANEXO 4: RESULTADOS PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD	- 46 -

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA SOBRE LA OBTENCIÓN DE SECUENCIAS DE COLÁGENO DE SALMÓN. ELABORACIÓN PROPIA.	12
FIGURA 2. HERRAMIENTA BIOPEP EN DONDE SE REALIZA LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS <i>IN SILICO</i>	13
FIGURA 3. ESQUEMA SOBRE LA PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS. ELABORACIÓN PROPIA.	15
FIGURA 4. ESQUEMA SOBRE LA SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA. ELABORACIÓN PROPIA.	16
FIGURA 5. EJEMPLO DE DOCUMENTO CREADO EN ACQUAPEPTIDE. SE MUESTRA EL NÚMERO DE ACOPLA, LOS AMINOÁCIDOS QUE SE DEBEN AGREGAR EN CADA BOLSA Y LOS PASOS DE LA DESPROTECCIÓN.....	17
FIGURA 6. RESUMEN DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (GUZMÁN ET AL., 2023).....	20
FIGURA 7. ESQUEMA SOBRE LOS ENSAYOS PARA MEDIR Y VALIDAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. ELABORACIÓN PROPIA.....	23

FIGURA 8: RESULTADOS DE CLUSTERING EN R STUDIO. ELABORACIÓN PROPIA.	33
FIGURA 9: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CELULAR DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS A 0,2 MM Y 0,4 MM. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO PROMEDIO DE 3 RÉPLICAS ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LAS LETRAS DIFERENTES INDICAN UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE SÍ ($P \leq 0,05$). ELABORACIÓN PROPIA.	36
FIGURA 10: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE DPPH DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS A 0,2 MM Y 0,4 MM. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO PROMEDIO DE 3 RÉPLICAS ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LAS LETRAS DIFERENTES INDICAN UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE SÍ ($P \leq 0,05$). ELABORACIÓN PROPIA.	38
FIGURA 11: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE ABTS DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS A 0,2 MM Y 0,4 MM. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO PROMEDIO DE 3 RÉPLICAS ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LAS LETRAS DIFERENTES INDICAN UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE SÍ ($P \leq 0,05$). ELABORACIÓN PROPIA.	40
FIGURA 12: CITOTOXICIDAD CELULAR DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS A 0,4 MM Y 0,8 MM. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO PROMEDIO DE 3 RÉPLICAS ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LAS LETRAS DIFERENTES INDICAN UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE SÍ ($P \leq 0,05$). ELABORACIÓN PROPIA.	43
FIGURA 13: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5390 A 0%DE ACETONITRILO.	38 -
FIGURA 14: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5390 CON10%DE ACETONITRILO.	38 -
FIGURA 15: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5390 CON15%DE ACETONITRILO.	39 -
FIGURA 16: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5390 CON17,5%DE ACETONITRILO.	39 -
FIGURA 17: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5391.	40 -
FIGURA 18: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5393.	40 -
FIGURA 19: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5395 CON 0% DE ACETONITRILO.	41 -
FIGURA 20: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5395 CON10% DE ACETONITRILO.	41 -
FIGURA 21: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5395 CON15% DE ACETONITRILO.	42 -
FIGURA 22: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5396.	42 -
FIGURA 23: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5398.	43 -
FIGURA 24: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5399.	43 -
FIGURA 25: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5340 CON 0% DE ACETONITRILO.	44 -
FIGURA 26: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5340 CON 10% DE ACETONITRILO.	44 -
FIGURA 27: ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA PÉPTIDO 5340 A 15%.	45 -
FIGURA 28: ESPECTROMETRÍA DE MASA PARA PÉPTIDO 5340 CON17,5% DE ACETONITRILO.	45 -
FIGURA 29: ESPECTROMETRÍA DE MASA PARA PÉPTIDO 5340 CON60% DE ACETONITRILO.	46 -
FIGURA 30: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 4426.	46 -
FIGURA 31: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5390.	46 -
FIGURA 32: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5391.	47 -
FIGURA 33: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5392.	47 -
FIGURA 34: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5393.	47 -

FIGURA 35: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5394.	- 47 -
FIGURA 36: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5395.	- 48 -
FIGURA 37: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5396.	- 48 -
FIGURA 38: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5397.	- 48 -
FIGURA 39: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5398.	- 48 -
FIGURA 40: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5399.	- 49 -
FIGURA 41: RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD PARA EL PÉPTIDO 5400.	- 49 -

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: SECUENCIAS REPORTADAS EN BIBLIOGRAFÍA Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. ELABORACIÓN PROPIA.....	29
TABLA 2: SECUENCIAS DE COLÁGENO DE SALMÓN, JUNTO A SU TIPO, LARGO Y CÓDIGO DE BÚSQUEDA, OBTENIDAS DESDE NCBI. ELABORACIÓN PROPIA.....	31
TABLA 3: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS. ELABORACIÓN PROPIA.....	32
TABLA 4: SECUENCIAS SELECCIONADAS Y SU NÚMERO CORRESPONDIENTE. ELABORACIÓN PROPIA.	34
TABLA 5: DATOS OBTENIDOS SOBRE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS. ELABORACIÓN PROPIA.	42
TABLA 6: NOMBRE, CANTIDAD Y PRECIO DE LOS REACTIVOS OCUPADOS.....	44
TABLA 7: NOMBRE, CANTIDAD Y PRECIO DE LOS AMINOÁCIDOS OCUPADOS.....	44
TABLA 8: NOMBRE, CANTIDAD Y PRECIO DE LOS SOLVENTES OCUPADOS	45
TABLA 9: FRAGMENTOS PEPTÍDICOS OBTENIDOS DE LA HIDROLISIS <i>IN SILICO</i>	- 1 -
TABLA 10: VALORES DE CARGA, HIDROFOBICIDAD, MASA MOLECULAR Y GRUPO, OBTENIDOS DE LA PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA. .	-

16-

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
g	Gramo
mL	Mililitro
mg	Miligramo
µL	Microlitro

mM Milimolar

mg/L Miligramos por litro

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.

La oxidación es un proceso biológico esencial que, bajo condiciones de desequilibrio, puede causar daño celular e inactivar enzimas, lo que provoca estrés oxidativo, el cual está asociado a enfermedades crónicas, envejecimiento celular y deterioro de la salud. Este fenómeno no solo tiene un impacto en los organismos vivos, sino que también en la calidad y seguridad de los alimentos, comprometiendo la estabilidad de lípidos y proteínas, y reduciendo la vida útil de los alimentos (Carvajal, 2019).

El colágeno de salmón se presenta como una fuente prometedora de péptidos bioactivos, particularmente aquellos con propiedades antioxidantes, característica crucial para combatir el estrés oxidativo (Espinoza et al., 2022). Sin embargo, obtener y caracterizar estos péptidos es un desafío tanto en lo técnico como científico. Los métodos convencionales son largo y costosos, y dependen en gran medida de procesos experimentales que requieren tiempo y recursos, lo que reduce la eficiencia y la viabilidad comercial de su producción (Agyei & Danquah, 2011).

La mayor dificultad radica en la falta de un método que combine herramientas bioinformáticas sofisticadas con técnicas experimentales para predecir y validar de manera efectiva la actividad antioxidante de los péptidos derivados del colágeno de salmón. Es difícil encontrar rápidamente péptidos con alto potencial bioactivo sin este enfoque integrado, lo que retrasa la producción a gran escala y puede hacer que el proceso sea económicamente inviable. Además, la selección ineficaz de los péptidos puede resultar en un uso innecesario de materias primas, tiempo y recursos (López-Pedrouso et al., 2023).

Así, el uso de herramientas bioinformáticas se vuelve en un factor clave pues podrían permitir la predicción de péptidos con propiedades bioactivas y fisicoquímicas específicas antes de la síntesis, logrando reducir el número de experimentos necesarios, mejorar la calidad del producto y la optimización de las condiciones de producción, lo que conlleva una reducción de costos y un aumento en la competitividad del producto final (Agyei & Danquah, 2011). Por lo tanto, para garantizar la viabilidad y el éxito de la industria en este campo, es fundamental desarrollar métodos más precisos y rápidos para predecir y seleccionar péptidos antioxidantes.

1.2. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La investigación y desarrollo de péptidos antioxidantes han cobrado relevancia en los últimos años debido a su potencial aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Los péptidos obtenidos de proteínas naturales, como el colágeno, han mostrado un notable potencial antioxidante, lo que ha llevado a la búsqueda de fuentes sostenibles y eficientes para su obtención. En este contexto, la industria ha dirigido su atención al colágeno de origen marino, en particular el colágeno de salmón, debido a su alta disponibilidad y a sus propiedades bioactivas (Lim et al., 2019).

Chile, debido a su destacada industria pesquera, ha surgido como un referente clave en la investigación sobre el uso de subproductos marinos para la producción de péptidos con propiedades funcionales. Este enfoque ha sido respaldado por políticas gubernamentales que fomentan la valorización de residuos y subproductos de la industria acuícola, buscando promover una economía circular y sostenible (Melo et al., 2021). Sin embargo, a pesar de estos avances, la identificación y producción de péptidos antioxidantes a partir del colágeno de salmón sigue siendo un proceso complejo y desafiante.

Los métodos tradicionales para obtener y caracterizar péptidos antioxidantes son costosos y requieren de mucho tiempo, lo que limita su escalabilidad y viabilidad comercial. La ausencia de técnicas predictivas confiables que permitan identificar con precisión las secuencias peptídicas más prometedoras ha sido un obstáculo importante en el desarrollo de productos derivados del colágeno de salmón (Lauritano et al., 2023). Además, se ha observado que las propiedades antioxidantes de los péptidos pueden variar significativamente según su estructura y el método de extracción utilizado, lo que complica aún más el proceso (Rajabimashhadi et al., 2023).

En este contexto, proyectos recientes han explorado el uso de herramientas bioinformáticas para predecir las propiedades antioxidantes de los péptidos derivados del colágeno de salmón. Estos estudios han evidenciado el potencial de las tecnologías de simulación computacional para acelerar el descubrimiento y optimización de péptidos con actividad antioxidante (Hou et al., 2023). Sin embargo, a pesar de estos avances, persiste la necesidad de integrar de manera más efectiva los enfoques experimentales y computacionales para mejorar la precisión y eficiencia en la predicción de péptidos antioxidantes.

1.3. HIPÓTESIS

Secuencias peptídicas predichas a partir del colágeno del salmón del Atlántico, sintetizadas químicamente, muestran una destacada actividad antioxidante, lo que los convierte en agentes biológicos eficaces para neutralizar especies reactivas de oxígeno.

1.4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar un enfoque integral utilizando herramientas bioinformáticas para predecir y diseñar péptidos antioxidantes derivados del colágeno de salmón, con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre las propiedades antioxidantes de este recurso y desarrollar compuestos bioactivos con potencial en diversas industrias.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Recopilar información bibliográfica de las propiedades generales y secuencias de péptidos antioxidante a partir de otras fuentes para usarla como base en la predicción bioinformática.
2. Predecir con herramientas bioinformática secuencias peptídicas a partir de colágenos de salmón con potencial antioxidante para ser sintetizadas y probadas.
3. Sintetizar químicamente las secuencias peptídicas obtenidas mediante el análisis bioinformático para realizar las pruebas antioxidantes correspondientes.
4. Evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos sintetizados mediante ensayos *in vitro* con la finalidad de determinar su potencial para neutralizar especies reactivas de oxígeno.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. COLÁGENO Y SUS APLICACIONES

Hasta la fecha, el colágeno es una proteína ampliamente empleada en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, biomédico y nutraceuticos (Zamorano-Apodaca et al., 2020), el cual es obtenido a nivel industrial a partir de la piel, tendones, ligamentos y huesos de diversos organismos multicelulares, siendo un componente vital para el organismo, pues posee funciones estructurales y de soporte (Gu et al., 2019), lo que es esencial a la hora de desarrollar nuevas formas estructurales de carácter nutricional y biomédico. Este componente es principalmente extraído de mamíferos terrestres, como el cerdo y bovino, lo que en los últimos años ha significado una serie de problemas asociado.

Dentro de las principales dificultades se encuentran los brotes de enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina, fiebre aftosa y fiebre porcina, así como por aspectos socioculturales de algunos grupos religiosos y restricciones en su comercialización en algunos países (Lim et al., 2019), generando una disminución del consumo de colágeno procedente de estas fuentes. Lo anterior ha provocado la necesidad de aprovechar fuentes alternativas más seguras y saludables, representadas principalmente por especies marinas o por subproductos obtenidos de su industrialización (Hong et al., 2019).

El colágeno marino ha demostrado una serie de propiedades beneficiosas debido a la disposición de sus moléculas, lo que le permite adoptar otras formas e interacciones, permitiendo diversas capacidades como la retención de agua, solubilidad, gelificación, formación de coloides, emulsiones y espumas estables (Zamorano-Apodaca et al., 2020), entre otras. Estas propiedades han permitido que este componente este siendo estudiado ampliamente para la generación de péptidos con actividad biológica o bioactivos, los cuales han sido obtenidos principalmente por hidrólisis enzimática del músculo de especies marinas (Utomo, 2020).

2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y SU IMPACTO EN LA SALUD

Actualmente las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector alimentario y farmacéutico, pues son secuencias de aminoácidos con la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos. La literatura científica evidencia que los péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos

vía circulación (Díaz-Ramírez, 2018), pudiendo ejercer efectos tanto a nivel local como a nivel sistémico.

A su vez, otros estudios han demostrado que cualquier proteína, independientemente de sus funciones y calidad nutrimental, puede ser empleada para generar péptidos con actividad biológica, potenciando así el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas, como los residuos de pesquerías. De esta manera, han demostrado que las proteínas y los péptidos derivados de dichas fuentes, exhiben una serie de actividades biológicas con efecto directo sobre procesos fisiológicos del organismo, principalmente antihipertensiva y antioxidantes (Ruiz Ruiz et al., 2013).

De esta manera, se ha mostrado que la actividad antioxidante de péptidos obtenidos de colágeno de fuentes marinas se encuentra estrechamente relacionada con su composición, estructura y masa molecular. Así, por ejemplo, se observó que para péptidos obtenidos de colágeno de piel de salmón se logró identificar que actuaba como agente reductor y agente quelante, a la vez que mostraba una alta capacidad de neutralizar y/o captar radicales libres (Espinoza & Castillo, 2022).

Otro rasgo se obtuvo mediante la observación de dipéptidos, como el Met-Tir, específicamente el obtenido de músculo de sardina, con el cual se obtuvieron resultados concluyentes a la prevención del estrés oxidativo mediante la estimulación de la enzima gemo-oxigenasa-1 y ferritina en células endoteliales (Daidj & Lamri-Senhadji, 2021).

Por otro lado, se ha identificado que este tipo de compuesto, como los péptidos de colágeno de la piel del bacalao del Pacífico que pueden reparar el daño cutáneo inducido por la radiación UV inhibiendo el agotamiento de la actividad de las enzimas antioxidantes (T. Chen & Hou, 2016).

De la misma manera, se obtuvo que los péptidos de colágeno obtenidos de escamas de pargo carmesí 11 y de jalea real (Qiu et al., 2020) podrían disminuir el contenido de productos de peróxido como el malondialdehído (MDA) y la carbonilación de proteínas (PCO), a la vez que mejoran la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa total (T-SOD) y la catalasa (CAT), las cuales se ha mostrado que ayudan a mejorar el ambiente celular ante la presencia de patógenos cancerígenos, así como regulando al alza de expresión de genes relacionados con los antioxidantes.

También, se encontró que estos ejercen efectos beneficiosos sobre la estructura de la piel fotoenvejecida (Liu et al., 2019), a través de la inhibición de tirosinasa y elastasa, enzimas involucradas en los procesos de melanización y envejecimiento.

El desarrollo de mecanismos, como los mencionados previamente, en la secuencia de aminoácidos es de alta importancia, pues en organismos aeróbicos se producen especies reactivas de oxígeno como resultado de las reacciones metabólicas, las cuales en exceso pueden provocar que los radicales libres dañen a las proteínas, lípidos, ADN, enzimas y membranas celulares (Carvajal, 2019). Este efecto ha sido relacionado con el desarrollo de diversas patologías, como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedad cerebral vascular, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y con el proceso de envejecimiento (Sharifi-Rad et al., 2020). Análogamente, el daño oxidativo también tiene una gran importancia en los alimentos, pues trae como consecuencia habitualmente la rancidez, aparición de sabores inaceptables para el consumidor y disminución de la vida comercial del producto (Othón-Díaz et al., 2023).

Este resultado se produce por efecto de los radicales libres, figuras químicas las cuales tienen electrones no apareados y que promueven la generación de reacciones en cadena. Dicho resultado no solo sucede debido a la acción del metabolismo humano, sino que puede ser activado por efectos externos como lo son la contaminación ambiental de los suelos, diversas radiaciones que pueden llegar a los cuerpos, exposición a fertilizantes y pesticidas, consumo de alcohol, tabaco y otras drogas, así como el estrés físico o psicológico (Sharifi-Rad et al., 2020).

Asimismo, se identifica que una manera de contrarrestar esto es mediante la ayuda antioxidante. En concreto, se ha encontrado que las enfermedades cardiovasculares son a causa del deterioro de las lipoproteínas de baja densidad LDL, las cuales al oxidarse presentan la entrada al desarrollo de la aterosclerosis, cuya solución se ha dado a través de antioxidantes de acción vasodilatadora y vaso protectora que producen una disminución en los procesos oxidativos (Coronado H et al., 2015). Además, se han estudiado los efectos del cáncer y la acción antioxidante, donde se establece que los pacientes que necesitan un tratamiento mediante quimioterapia y consumen antioxidantes no solo encuentran una disminución en los malestares producidos por los efectos secundarios de la terapia y encuentran una mayor eficacia de esta,

sino que también presentan la reducción de reacciones adversas para la salud como la generación de neurotoxinas (Ferdous & Yusof, 2021).

2.3. FACTORES EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Diversos autores señalan que los aminoácidos aromáticos, como la tirosina, la histidina, el triptófano y la fenilalanina, y los aminoácidos hidrófobos, como la valina, la leucina, la metionina, la glicina y la alanina, son esenciales para la función antioxidante del péptido (Akbarian et al., 2022). En otros casos, se reporta que el poder antioxidante de los péptidos es mayor cuando son cadenas más pequeñas, lo cual se atribuyó al fácil acceso de los radicales libres y a una eliminación más eficaz de estos. Sin embargo, se ha demostrado repetidamente que cuanto mayor es el grado de hidrólisis, menor es la actividad antioxidante de los péptidos, debido a la posterior descomposición de los péptidos en aminoácidos libres que tienen poca o ninguna actividad antioxidante (Akbarian et al., 2022).

Además de la secuencia peptídica, el peso molecular de los péptidos puede afectar a su actividad antioxidante. Las investigaciones han demostrado que la actividad antioxidante de la proteína hidrolizada está relacionada con su concentración y peso molecular, mostrando que los péptidos de bajo peso molecular obtenidos a partir de la hidrólisis del colágeno de pescado suelen presentar mayor biodisponibilidad y variedad de bioactividades (Hong et al., 2019), específicamente para aquellos que presentan valores entre 500 y 1500 daltons, teniendo mejor respuesta bioactiva que los péptidos con un peso molecular superior a 1500 daltons o inferior a 500 daltons (Akbarian et al., 2022).

2.4. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

La síntesis química de péptidos es ampliamente ocupada para la investigación biomédica y en el desarrollo de nuevos fármacos, pudiendo realizarse mediante dos técnicas: la síntesis enzimática y la química.

En el primer tipo de método se utiliza enzimas para formar enlaces peptídicos, imitando los procesos naturales de formación de péptidos en los organismos vivos, siendo una condición ideal para evitar productos secundarios no deseados y obtener péptidos con estructuras más específicas. Sin embargo, su uso es limitado por el alto costo de las enzimas y la dificultad para aplicarla en secuencias cortas (S. Xu et al., 2018).

Por otro lado, la síntesis química, que fue el método empleado en este proyecto, utiliza químicos controlados para unir secuencialmente los aminoácidos que forman los péptidos, lo cual permite más versatilidad y la construcción de secuencias de péptidos más largas y variadas (Xinyue & Kang, 2023). Dentro de esta destaca la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), debido a su eficiencia y control.

La síntesis en sí consiste en ciclos repetidos de desprotección y acoplamiento. Durante la desprotección, se elimina el grupo protector del aminoácido previamente unido, dejándolo listo para reaccionar con el siguiente aminoácido. En la etapa de acoplamiento, se añade el aminoácido siguiente, protegido, cuyo grupo carboxilo reacciona con el grupo amino libre, formando un enlace peptídico. Este ciclo se repite hasta que todos los aminoácidos necesarios para el péptido han sido acoplados en la secuencia deseada. Al finalizar, se procede a liberarlo de la resina mediante una reacción que rompe el enlace entre el primer aminoácido y la resina, liberando el péptido en solución (Guzmán et al., 2021).

2.5. USO DE HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

La mayoría de los estudios usan métodos clásicos de obtención para poder clasificar propiedades y características de las secuencias peptídicas, lo que implica bajos rendimientos y limitación en el número de muestras que se estudian a la vez. De esta manera, y ante el alto aporte que significa la síntesis de las proteínas, surge la necesidad de implementar métodos con mayor eficiencia.

Lo anterior se puede lograr mediante técnicas de predicción de la actividad peptídica mediante sistemas informáticos, que proporcionan información biológica y quimiométrica sobre la secuencia peptídica deseada a través de diferentes bases de datos con propiedades estructurales y físicas de los péptidos (Usmani et al., 2018).

Los pasos clave de este método se basan en examinar las bases de datos de proteínas para seleccionar las deseadas a partir de secuencias de aminoácidos conocidas. A continuación, las proteínas se digieren *in silico* utilizando enzimas adecuadas para la operación. Luego, se examinan las propiedades estructurales y las posibles actividades biológicas de los péptidos producidos. Recientemente se ha creado una lista práctica y útil de las diferentes bases de datos de propiedades estructurales y físicas de los péptidos (Usmani et al., 2018).

En este ámbito, se ha logrado caracterizar y predecir péptidos bioactivos de la microalga *Chlorella*, donde las herramientas bioinformáticas permitieron generar combinaciones de diferentes enzimas en la hidrólisis, dispensando un mayor número de péptidos bioactivos de las proteínas en comparación con las formas usuales de obtención (Tejano et al., 2019). La bioinformática también se ha utilizado para analizar péptidos derivados de huevos de atún, facilitando la predicción de la composición aminoacídica de los hidrolizados, los patrones del perfil peptídico, así como la actividad antioxidante, la solubilidad y las propiedades espumantes (Phetchthumrongchai et al., 2022).

A pesar de los avances en la caracterización de péptidos, hasta ahora solo se han estudiado las propiedades del colágeno tipo I proveniente de cinco fuentes diferentes, bovino, porcino, pollo, trucha y salmón, así como de sus hidrolizados mediante herramientas bioinformáticas (Nuñez et al., 2020). Por tanto, se identifica una falta significativa de investigaciones centradas en los subproductos del salmón y en la actividad biológica potencial de los péptidos de colágeno derivados de este pescado.

Esta brecha es problemática considerando el impacto ambiental de la industria pesquera y la generación de residuos, pues la gestión adecuada de estos subproductos no solo reduciría el desperdicio, sino que también mitigaría los efectos negativos en el medio ambiente. Por lo tanto, se vuelve crucial encontrar alternativas para aprovechar al máximo estos recursos. En este contexto, esta investigación propone evaluar las propiedades antioxidantes de los péptidos obtenidos a partir de secuencias de colágeno de salmón utilizando herramientas bioinformáticas.

3. METODOLOGÍA

En esta sección se detalla el procedimiento bioinformático y experimental llevado a cabo en esta investigación, cuyo objetivo es la predicción de nuevos péptidos antioxidantes a partir de colágeno de salmón mediante el uso de herramientas bioinformáticas. El proceso se divide en varias etapas clave, que son:

1. **Recopilación de información bibliográfica.**
2. **Obtención de secuencias proteicas de colágeno de salmón.**
3. **Hidrólisis enzimática de proteínas *in silico*.**
4. **Predicción de la actividad antioxidante de los péptidos generados.**
5. **Selección de péptidos candidatos para síntesis química.**
6. **Síntesis química de péptidos.**
7. **Validación experimental de la actividad antioxidante.**
8. **Análisis estadístico.**
9. **Predicción de citotoxicidad de los péptidos generados.**
10. **Análisis de costos de producción.**

Cabe destacar que la hidrólisis enzimática *in silico* es un proceso simulado computacionalmente que permite predecir la generación de péptidos a partir de proteínas, en este caso, del colágeno de salmón. Esta técnica, junto con el análisis bioinformático, reduce significativamente el tiempo y los recursos necesarios para la identificación de péptidos con potencial bioactivo (Hou et al., 2023).

Adicionalmente, se realizaron ensayos de citotoxicidad para evaluar la seguridad y biocompatibilidad de los péptidos seleccionados.

3.1. RECOPIACIÓN DE INFORMACION BIBLIOGRÁFICA

Materiales:

- *Scopus*

- ScienceDirect
- Google Scholar
- Computador

El primer paso consistió en la recopilación de información bibliográfica relacionada con las propiedades antioxidantes de péptidos obtenidos de diversas fuentes y su aplicación en diferentes industrias. Se realizó una búsqueda exhaustiva en distintos portales como Scopus (Elsevier, 2004), ScienceDirect (Elsevier, 2014) y Google Scholar (Google, 2004), seleccionando los artículos más relevantes y priorizando aquellas investigaciones más recientes con la finalidad de poder obtener secuencias reportadas como antioxidantes y conocer sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se usarán posteriormente como control en el análisis bioinformático.

3.2. OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROTEICAS DE COLÁGENO DE SALMÓN

Materiales:

- *National Center for Biotechnology Information (NCBI) (National Library of Medicine, n.d.)*
- Uniprot (The UniProt Consortium & National Institutes of Health, n.d.).
- Computador

Se inicio el proceso extrayendo secuencias de diferentes tipos de colágeno de salmón. Para esto se utilizó la base de datos publica NCBI y se seleccionó la opción Protein, la cual almacena una variedad de secuencias de proteínas específicas. La búsqueda de secuencias se realizó con la palabra Collagen Salmon Salar, lo cual permite identificar y filtrar las proteínas de colágeno derivadas del salmón. El proceso de esta etapa se ve representado en la Figura 1.

Los resultados arrojan secuencias de diversos tipos, desde colágeno tipo I hasta el XXV, pero se seleccionaron sola aquellas que presentan más de mil aminoácidos. Una vez identificadas las secuencias, la base de datos permite descargarlas en formato FASTA, el cual es un formato estándar para la representación de secuencia de aminoácidos y es compatible con las herramientas bioinformáticas que se ocuparan posteriormente.

Las secuencias seleccionadas fueron ingresadas con su archivo FASTA a la herramienta Uniprot. En esta se ocupó la función Align, la cual permite realizar una comparación visual entre varias secuencias y ver cómo se alinean entre sí, representando de manera más clara las diferencias y

similitudes entre ellas. Esto permitió verificar que todas las secuencias fueran distintas entre sí, asegurado la diversidad en los péptidos que se obtendrían posteriormente.

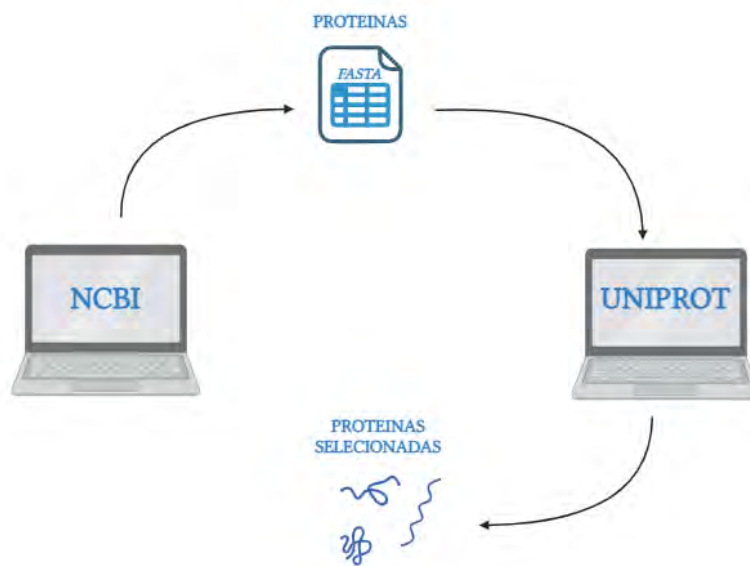


Figura 1. Esquema sobre la obtención de secuencias de colágeno de salmón. Elaboración propia.

3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS *IN SILICO*

Material:

- Programa Biopep
- Computador

Las secuencias de colágeno de salmón salar que fueron obtenidas de NCBI y verificadas mediante UniProt se ingresaron en la herramienta BioPep (Minkiewicz et al., 22 C.E.), el cual es un programa que permite realizar hidrólisis *in silico*. El procedimiento consiste en ingresar a la opción de análisis en la página principal de Biopep y seleccionar la opción de enzyme(s) action para secuencias dadas por el usuario. Al cargar la página, se abrirá un campo de texto disponible donde se pegan las secuencias en formato FASTA, como se presenta en la Figura 2.

BIOPEP-UWM: Enzymes action for your sequence

The screenshot shows the BIOPEP-UWM web interface. At the top, the title is "BIOPEP-UWM: Enzymes action for your sequence". Below the title is a large text input area labeled "Paste the sequence:". Underneath this is a section titled "Select enzymes" containing three rows. Each row has an "Enzyme id:" label, a dropdown menu, and a "View enzyme" button. The first dropdown menu is selected and shows "41 | subtilisin | EC 3.4.21.62". Below the enzyme selection is a blue button labeled "View the report with the results".

Figura 2. Herramienta Biopep en donde se realiza la hidrólisis enzimática de proteínas *in silico*.

Para simular el proceso de hidrólisis enzimática se debe seleccionar una enzima adecuada. En este caso, y basándose en las opciones disponibles en Biopep, se eligió la subtilisina. A pesar de haber otras opciones, se escoge esta debido a su amplia utilidad y menor costo, factor a considerar para la escalabilidad del proceso.

Una vez seleccionada la enzima, se realizó la simulación de hidrólisis *in silico*, obteniendo una lista de fragmentos peptídicos resultantes de la acción enzimática. Posteriormente, se analizaron los péptidos generados y se seleccionaron aquellos que contienen más de cinco aminoácidos, considerando su factibilidad para el posterior proceso de síntesis química.

3.4. PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS

Materiales:

- R studio
- Peptides package
- Herramientas de clustering y análisis de componentes principales (PCA)
- Computador

Los péptidos generados en la etapa anterior, y los péptidos encontrados en la bibliografía, fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas, específicamente el software R

Studio, junto con el paquete Peptides (Torres et al., 2019). Este análisis incluyó la evaluación de diversas propiedades bioquímicas de los péptidos que podrían influir en su capacidad antioxidante. El proceso se ve representado en la Figura 3.

3.4.1. Instalación de paquetes y cálculo de propiedades fisicoquímicas

Antes de comenzar, se configuró el entorno de trabajo en R Studio para garantizar que los archivos y paquetes necesarios estuvieran correctamente instalados. En este caso se cargaron los paquetes Peptides, readxl, seqinr, tidyverse, cluster, factoextra y pheatmap. Luego se importaron los péptidos generados mediante la función `read_excel`.

Se calcularon las propiedades fisicoquímicas relevantes de cada péptido utilizando el paquete Peptides, lo que permitió obtener descriptores como la hidrofobicidad, la carga neta, el peso molecular, entre otras propiedades, mediante los comandos `charge`, `hydrophobicity`, `pl` y `mw`. Luego se renombraron las columnas con los nombres de las respectivas propiedades y se guardaron las propiedades en un archivo CSV.

3.4.2. Normalización y análisis de componentes principales

Para reducir el sesgo entre las diferentes escalas de las propiedades calculadas, los datos fueron normalizados y se prepararon para el análisis de componentes principales (PCA). Para esto se eliminó la columna de secuencias, luego se normalizaron los datos con el comando `scale` y se calculó el PCA sobre los datos normalizados con el comando `prcomp`. Para seleccionar el número óptimo de componentes, se calculó la proporción de varianza explicada por cada componente y su varianza acumulada.

3.4.3. Análisis de clustering

Estos datos se utilizaron para realizar un clustering, mediante la técnica de k-means, con el fin de agrupar los péptidos según sus características estructurales y funcionales. Para esto se determinó el número óptimo de clusters con la función `fviz_nbclust`, la cual ocupa el método Silhouette, que evalúa la calidad del agrupamiento midiendo la cohesión interna de los puntos dentro de un cluster y la separación entre clusters, entregando el número más adecuado para realizar el clustering (C. X. Gao et al., 2023).

Con este valor fijo, se procede a ocupar la función `heatmap` en conjunto con `kmeans_k`, en esta última se indica la cantidad de clusters a realizar. Como resultado se obtiene un mapa de color, donde las filas representan los péptidos generados y las columnas representan los componentes principales. Así, cada casilla representa el valor de la puntuación de un péptido en un componente principal y los colores indican la magnitud de estos valores, lo que facilita la identificación de patrones.



Figura 3. Esquema sobre la predicción de la actividad antioxidante de los péptidos generados.
Elaboración propia.

3.5. SELECCIÓN DE PÉPTIDOS CANDIDATOS PARA SÍNTESIS QUÍMICA

A partir de los análisis previos, se selecciona aquellos péptidos generados en la hidrólisis *in silico* que se agrupan en los mismos clusters que los péptidos reportados en bibliografía, pues se puede inferir que comparten similitudes importantes en sus propiedades fisicoquímicas, y, por tanto, pueden tener una alta probabilidad de presentar actividad antioxidante. Se finaliza la selección eliminando aquellas secuencias que tenían aminoácidos muy parecidos o que son muy complicados de sintetizar.

3.6. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS

Los péptidos seleccionados fueron sintetizados mediante la técnica de síntesis química en fase sólida (SPPS), el cual es un método ampliamente usado para la producción de péptidos. A continuación, en la Figura 4 se presenta un esquema del proceso de síntesis y a continuación los pasos para realizar el proceso.

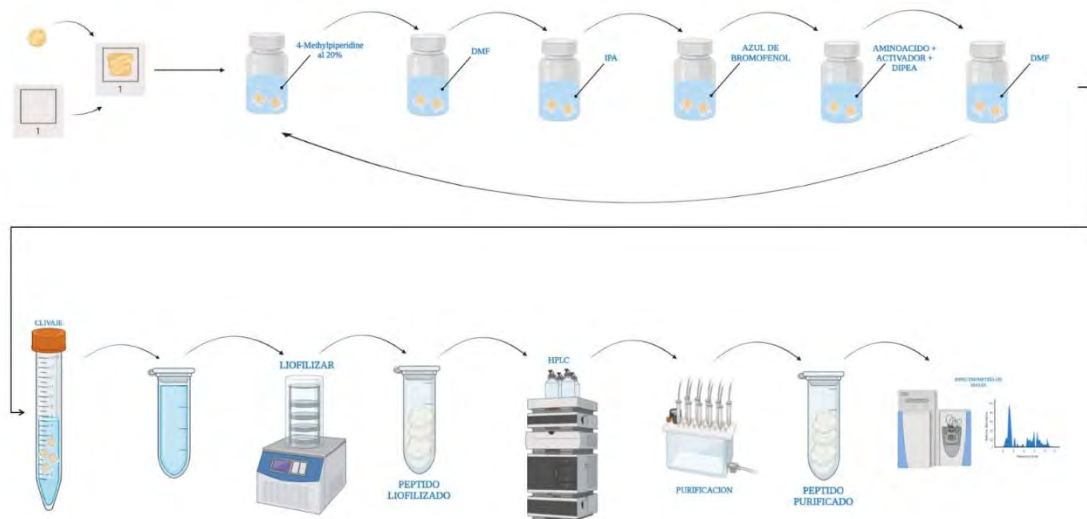


Figura 4. Esquema sobre la síntesis química de péptidos en fase sólida. Elaboración propia.

3.6.1. Optimización de la síntesis química

Materiales:

- Software Acqua peptide
- Computador

El software Acqua peptide (Núcleo Biotecnología Curauma, 2014) es un programa que permite ingresar los péptidos a sintetizar, facilitando la optimización del proceso de síntesis. Así, esta herramienta crea un archivo, como el presentado en la Figura 5, que indica el número de acoples, el orden en el que se debe llevar y los reactivos que se deben agregar para lograr la síntesis deseada.

```

ACOPLE NUMERO 1

PHE:      =2
GLY:      =1
HIS:      =1
LEU:      =3
ARG:      =2
SER:      =2

DESPROTECCION  FECHA ___/___/___      CHEQUEO  HECHO POR      REVISADO POR

4MP 20% TritonX100 1%/DMF(2x10') (C)  |___|___|_____  _____

    Lavado con DMF(3x1') (C)          |___|___|_____  _____

    Lavado con IPA(1x1')              |_____|_____  _____

Lavado con BPB 1%/DMF(1x2')          |_____|_____  _____

    Lavado con DMF (2x1') (C)        |___|___|_____  _____

    Lavado con DCM (1x1')            |_____|_____  _____

Ciclo de Acople      FECHA      HORA      HECHO POR      REVISADO POR
AA+HBTU+OXYMA+DIPEA
Simple (5:5:5:7,5)  |___/___/___|_:_:_:___:___|_____  _____
AA+HCTU+OXYMA+DIPEA
Doble (5:5:5:7,5) (C) |___/___/___|_:_:_:___:___|_____  _____
AA+DIC+OXYMA
Triple (5:5:5) (C)  |___/___/___|_:_:_:___:___|_____  _____

Despues de cada ciclo y antes del test BPB lavar con DMF(2x1') (C)

:ARG
:HIS
:PHE
:SER
:SER
:ARG
:LEU
:LEU
:PHE
:GLY

```

Figura 5. Ejemplo de documento creado en AcquaPeptide. Se muestra el número de acople, los aminoácidos que se deben agregar en cada bolsa y los pasos de la desprotección.

3.6.2. Preparación del soporte sólido

Materiales:

- Bolsas de polipropileno
- Resina Rink
- Diclorometano (DCM)
- Dimetilformamida (DMF)

Una vez preparado el orden de la síntesis, se procedió a la preparación de bolsitas de polipropileno, las cuales se rellenan con una 1 g de resina Rink en estado seco y compacto. Para permitir que los reactivos y aminoácidos accedieran uniformemente a la resina y así formar el péptido, fue necesario hinchar la resina. Este proceso se realizó mediante la inmersión de la resina en solventes orgánicos, específicamente DCM y DMF, durante 30 minutos en cada solvente.

3.6.3. Desprotección inicial

Materiales:

- 4-Methylpiperidine
- N, N-dimetilformamida (DMF)
- Alcohol isopropílico (IPA)
- Bromofenol azul

A continuación, se realizó la desprotección inicial, lo cual permite eliminar al grupo protector Fmoc presente en la resina. Para ello, se adicionó una solución al 20% de 4-Methylpiperidine, asegurando que cubra las bolsas de resina y agitando. Después, la resina se lavó varias veces con disolventes como DMF, IPA y bromofenol azul para eliminar los residuos de reactivos y garantizar la limpieza de la resina antes de proceder con el siguiente paso de acoplamiento de aminoácidos.

3.6.4. Acoplamiento del primer aminoácido

Materiales:

- Aminoácidos
- Hexafluorofosfato de Benzotriazol-Tetrametil Uronio (HBTU)
- Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametilamonio (HCTU)
- Dietil etil amina (DIPEA)
- N, N-dimetilformamida (DMF)
- Bromofenol azul

Para la preparación del primer acoplamiento, se realizó una mezcla que contiene el aminoácido, un activador, como HBTU o HCTU, y DIPEA. Esta solución se añadió a las bolsas de resina en donde el aminoácido se acopla para ir formando la secuencia requerida, dejando actuar por aproximadamente una hora en agitación constante.

Después de completar el tiempo de acoplamiento, las bolsas de resina se lavaron con DMF para eliminar los residuos de reactivos. También se verificó el correcto acople a través de una prueba colorimétrica, pues el bromofenol azul usado anteriormente tiñe la resina de un color azul intenso, el cual se torna en amarillo después de la adición del aminoácido. Una vez lavadas, el ciclo se repitió secuencialmente para cada aminoácido en las secuencias de los péptidos hasta que se completó la síntesis de la cadena peptídica. Este proceso se ve representado en la Figura 6.

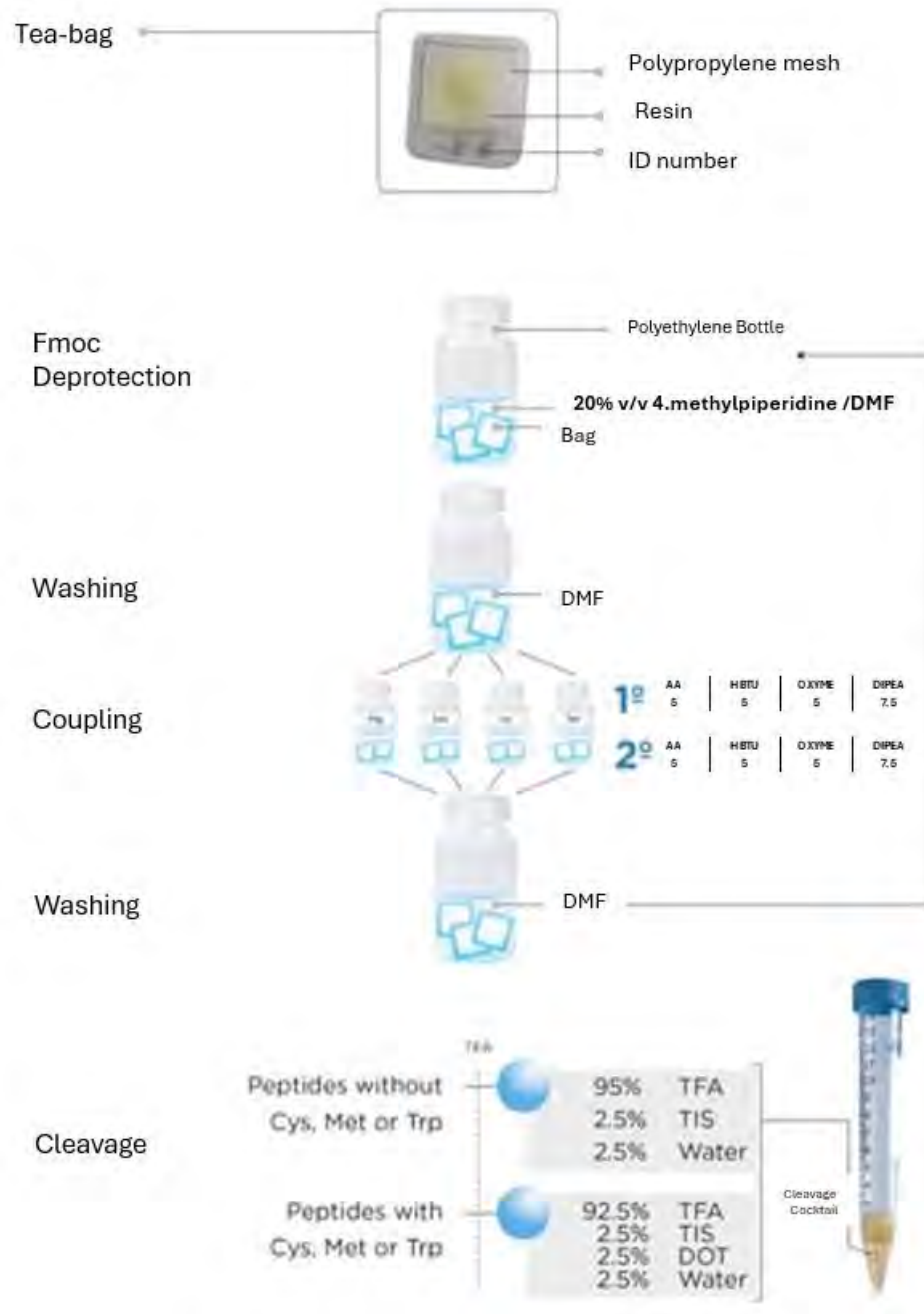


Figura 6. Resumen de la síntesis de péptidos en fase sólida (Guzmán et al., 2023).

3.6.5. Proceso de Clivaje

Materiales:

- Tubo Falcón de 15 mL.
- Ácido trifluoroacético (TFA)

Después de completar la síntesis, la bolsa con resina que contiene el péptido unido se coloca en un tubo falcón de 15 mL al cual se añaden 10 mL del reactivo TFA, el cual rompe los enlaces que mantienen unidos al péptido y la resina. La mezcla se agita suavemente por 1 hora a temperatura ambiente para asegurar que el TFA penetre en la resina y reaccione con el péptido. Después del tiempo de clivaje, la mezcla se filtra para separar la resina del péptido liberado.

3.6.6. Precipitación y lavado del péptido

Materiales:

- Éter dietílico
- Centrífuga

Una vez completado el clivaje, el péptido se precipita añadiendo éter dietílico frío a la solución. Esto ayuda a separar el péptido de los reactivos de clivaje y otros contaminantes. Luego se centrifuga la mezcla para recoger el pellet que contiene el péptido. Este se lava varias veces con éter dietílico para eliminar cualquier impureza o residuo de reactivos y después se deja secar al aire para eliminar el solvente residual.

3.6.7. Purificación

Materiales:

- Columnas de G10 y C18
- Metanol
- Agua destilada
- Acetonitrilo
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Micropipeta y puntas

Tras el proceso de clivaje y liofilización se somete al péptido a un proceso de purificación mediante un análisis con Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Según los resultados obtenidos, se purificó mediante columnas de G10 y C18, las cuales se lavan con metanol y agua destilada para asegurar que estén limpias y listas para adsorber el péptido. Luego, se disuelven 5 mg del péptido en agua destilada y se carga en la columna.

En el caso de las columnas de C18 se van añadiendo soluciones de acetonitrilo en agua en diferentes concentraciones, las cuales pueden variar del 0% al 80%. A medida que se aumenta la concentración de acetonitrilo, el péptido se separa de la columna, se recolecta en tubos eppendorf y se lleva a un concentrador para evaporar el acetonitrilo, dejando un residuo acuoso que contiene el péptido purificado. Por otro lado, para las columnas de G10, se realiza el mismo procedimiento, pero se utiliza agua como solvente para separar el péptido de la columna.

3.6.8. Proceso de liofilización

Materiales:

- Nitrógeno líquido.
- Liofilizador

El residuo acuoso acumulado en los tubos eppendorf se congela utilizando nitrógeno líquido y se lleva al liofilizador, donde se crea un vacío que permite sublimar el hielo. Este proceso dura 2 días y al finalizar se obtienen los péptidos en forma de polvo seco, facilitando su almacenamiento y manipulación.

3.6.9. Espectrometría de masas

Por último, se realizó análisis de caracterización mediante espectrometría de masas con el objetivo de confirmar la secuencia de los péptidos sintetizados. Esta técnica permitió verificar la precisión de la síntesis peptídica, detectando posibles impurezas, errores de acoplamiento o modificaciones en la masa molecular esperada, asegurando así la calidad y pureza del producto final.

3.7. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Finalmente, los péptidos sintetizados fueron sometidos a ensayos experimentales *in vitro* para validar su actividad antioxidante. Para medir la actividad antioxidante se seleccionaron los ensayos de captura de radicales libres como 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y Actividad Antioxidante Celular (CAA), estos métodos se basan en la capacidad de los péptidos para eliminar radicales libres y prevenir la oxidación celular. El proceso de trabajo de los ensayos se ven representados en la Figura 7.

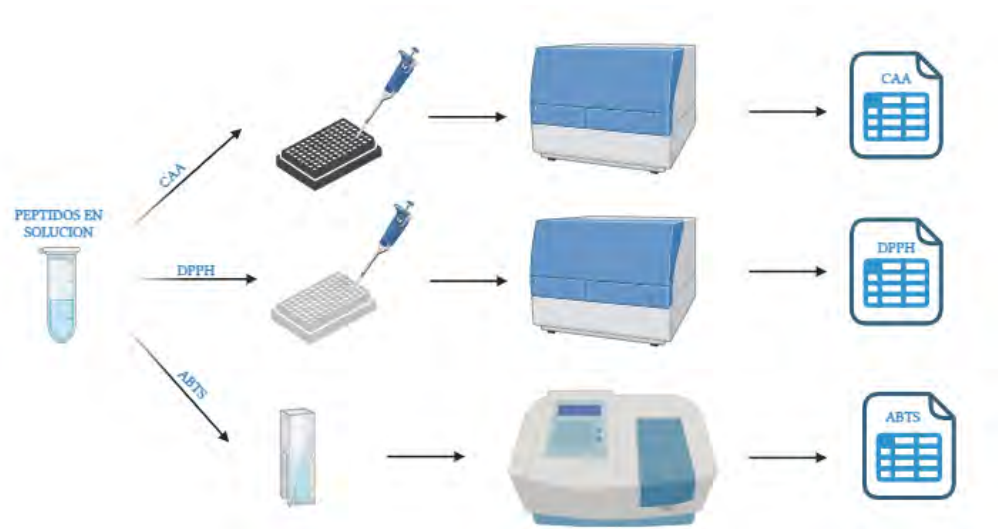


Figura 7. Esquema sobre los ensayos para medir y validar la capacidad antioxidante. Elaboración propia.

3.7.1. Ensayo CAA

Materiales:

- Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)
- Microplaca de 96 pocillos
- 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH).
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Lector de microplacas de fluorescencia con filtro verde
- GraphPad Prism

El ensayo de CAA se llevó a cabo midiendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células mediante los niveles de fluorescencia producida de acuerdo con Yannick Pombett Lopez (n.d.). Para esto, en una microplaca de 96 pocillos se siembra 600.000 células por pocillo. Luego de dos días se remueve el medio de cultivo de todos los pocillos y se añaden 90 μL de DCFH-DA a 33,33 μM y 10 μL de péptido antioxidante, a una concentración de 0,25 y 0,4 mM, y se deja incubar durante 1 hora a 18°C.

Luego, se remueve el medio y se añaden 100 μL de PBS. Además, se estableció que el blanco serían las células, el control negativo serían las células con DCFH-DA y el control positivo serían las células con DCFH-DA y 100 μL de AAPH, el cual actúa como un inductor de ROS.

Rápidamente se mide la fluorescencia a una longitud de onda de 485/535 nm durante 60 minutos cada 1 minuto. Para el procesamiento de datos, se integra el área formada para calcular el área bajo la curva (AUC) con el programa GraphPad Prism. Luego, la actividad antioxidante celular se calcula con la (Ecuación 1).

$$\text{Cellular antioxidant activity (\%)} = \left(\frac{AUC_N - AUC_S}{AUC_N} \right) * 100$$

(Ecuación 1) (López-Barrios et al., 2016)

Donde

- AUC_N es el área bajo la curva de fluorescencia versus tiempo del control negativo con una longitud de onda de 485/515 ex/em.
- AUC_S es el área bajo la curva de fluorescencia versus tiempo de los péptidos sintéticos antioxidantes con una longitud de onda de 485/515 ex/em.

3.7.2. Ensayo DPPH

Materiales:

- 2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Cubetas
- Agua destilada
- Espectrofotómetro

Se prepararon las muestras a concentraciones de 0,2 mM y 0,4 mM para cada péptido. Siguiendo el protocolo establecido por Nuñez et al. (2020), se añadieron 140 μ L de cada muestra en tubos eppendorf de 2 mL. Luego, se agregaron 1,4 mL de la de solución de DPPH a una concentración de 30 mg/L. Para el blanco se considera las mismas proporciones, pero con muestra y agua, mientras que para el control se empleó DPPH y agua. Se deja incubar en oscuridad por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se mide la absorbancia a 520 [nm] en un espectrofotómetro y se cuantifica el porcentaje de captura de radicales a partir de las absorbancias leídas mediante la (Ecuación 2).

$$\%CRL = \frac{[ABS\ control - (ABS\ muestra - ABS\ blanco)]}{ABS\ control} \cdot 100$$

(Ecuación 2) (Nuñez et al., 2023)

Donde

- ABS control: absorbancia del control.
- ABS muestra: absorbancia de la muestra.
- ABS blanco: absorbancia del blanco.

3.7.3. Ensayo ABTS

Materiales:

- Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)
- Persulfato de potasio
- Agua destilada
- Tubos eppendorf de 2 mL.
- Cubetas para espectrofotómetro
- Etanol
- Espectrofotómetro

Primeramente, se prepara una solución combinando ABTS a 7 mM y persulfato de potasio a 2,45 mM en agua destilada, mezcladas en una proporción 1:1. La mezcla se deja reposar durante 12 horas. Después de este tiempo, la solución resultante se diluye en etanol al 99,99%, utilizando un factor de dilución de 50 para obtener una absorbancia aproximada de 0,7.

Por otro lado, se prepararon muestras a concentración de 0,2 mM y 0,4 mM para cada péptido. Se añadieron 15 µL de cada muestra en tubos eppendorf de 2 mL. seguido de 1,5 mL de la solución diluida previamente. Para el blanco, se emplearon las mismas proporciones, reemplazando la muestra de péptido por etanol y la solución diluida. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 6 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación constante.

Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 734 [nm] en un lector de placas y se cuantifico el porcentaje de captura de radicales libres mediante la siguiente ecuación:

$$\%CRL = \frac{(A_o - A_m)}{A_o} \cdot 100$$

(Ecuación 3) (Nakchum & Kim, 2016)

Donde

- Am: absorbancia de la muestra.
- Ao: absorbancia del blanco.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Materiales:

- Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, 2020)
- Computador

Se inicia el programa cargando la base de datos con las variables que deseas analizar, en este caso, los datos obtenidos en los ensayos de antioxidante. Se asegura de que haya una columna para las variables dependientes, que serían los niveles de actividad antioxidantes obtenidos, y otra para las variables independientes, que serían los respectivos péptidos.

El siguiente paso es configurar el modelo, para esto se escoge el apartado de estadísticas, luego comparación de medias y se selecciona la opción Análisis de Varianza (ANOVA). Aparecerá una ventana donde se puede seleccionar cuál de los datos es la variable dependiente y cuáles son las variables independientes. Además, se utiliza un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) utilizando la prueba LSD de Fisher. Luego, se hace clic en ejecutar para realizar el ANOVA, generará un cuadro con los resultados, incluyendo el valor p asociado. Los datos se presentan como medias \pm desviaciones estándar de tres réplicas de las mediciones.

3.9. PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS GENERADOS

Materiales:

- PepSMI (NovoPro, 2013)
- VenomPred (Di Stefano et al., 2024)
- Computador

En esta etapa, se llevó a cabo la predicción de la citotoxicidad de los péptidos seleccionados. Este proceso se realizó utilizando herramientas bioinformáticas con el fin de evaluar la seguridad y viabilidad de los péptidos.

El procedimiento comenzó con la transformación de las secuencias de péptidos generadas en formato FASTA a formato SMILES, utilizando la herramienta en línea PepSMI. Para ello, se ingresaron las secuencias de los péptidos en el convertidor, el cual generó las representaciones correspondientes.

Una vez obtenidas las secuencias en el nuevo formato, se procedió a la predicción de la citotoxicidad utilizando el programa VenomPred. En este paso, se ingresaron las secuencias en la plataforma y se seleccionaron las opciones correspondientes para la predicción de citotoxicidad, como mutagenicidad, hepatotoxicidad, carcinogenicidad y estrogenicidad, las cuales se evalúan basándose en su estructura molecular.

3.10. VALIDACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS

Materiales:

- Kit de Cell Proliferation Reagent WST-1
- Microplaca de 96 pocillos
- Centrifuga
- Lector de microplacas
- PBS

La citotoxicidad de los péptidos se analizó utilizando el método de ensayo de proliferación celular WST-1 (Roche & Sigma Aldrich., 2021). Primero, se prepararon las células lavándolas con una solución salina, en este caso PBS. Luego, cuando las células alcanzaron el crecimiento adecuado, se les agregó tripsina para separarlas del frasco donde crecían. La suspensión de células se colocó en un tubo, se centrifugó y, al final, el grupo de células se mezcló con un medio de cultivo.

Para el ensayo se ajustó la concentración de células a 70.000 por pocillo y se colocaron 100 microlitros de esta mezcla en cada pocillo de una placa con 96 pocillos, para ser incubadas durante 24 horas a 18°C. Después del período de incubación, se añadieron los péptidos a concentración de 0,4 y 0,8 mM, dejando reaccionar por 48 horas.

Pasado el tiempo, se agregó el Reactivo de Proliferación Celular WST-1 a cada pozo y se incubó nuevamente la microplaca durante 4 horas en las mismas condiciones. También se añadió como control positivo el Tritón, una sustancia que mata las células, para comparar los resultados.

Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras en un lector de microplacas. La absorbancia del producto se midió a una longitud de onda de 450 nm y se calculó el porcentaje de viabilidad de las células usando la (Ecuación 4).

$$Cell\ viability\ \% = \frac{Abs\ sample}{Abs\ control} \cdot 100$$

(Ecuación 4)

Donde

- Abs control es la absorbancia del control negativo
- Abs sample es la absorbancia del péptido evaluado.

3.11. ANÁLISIS DE COSTOS DE PRODUCCIÓN

Para estimar los costos asociados a la producción de péptidos puros se identificaron y desglosaron los principales insumos para la síntesis de péptidos, incluyendo solventes, aminoácidos y reactivos.

Luego se recopiló información de proveedores sobre precios actualizados y se sumaron todos los costos de los insumos para obtener el costo total del proyecto.

4. RESULTADOS

4.1. RECOPIACION DE INFORMACIÓN BIBLIOGRAFICA

En primer lugar, el análisis exhaustivo de la información bibliográfica permitió identificar y reunir datos relevantes que sirvieron como base para la predicción bioinformática de nuevos péptidos con potencia antioxidante. La búsqueda reveló múltiples fuentes de péptidos antioxidantes, incluyendo proteínas de origen vegetal, como gluten de trigo y soja, y de origen animal, como proteínas de suero y colágeno de salmón.

A su vez, las secuencias reportadas comparten diversas propiedades destacables, como la capacidad para secuestrar radicales libres, quelar iones metálicos y actuar como donantes de protones (Wang et al., 2021). Además, se observó que la actividad antioxidante estaba influenciada por factores como la secuencia de aminoácidos y la longitud de la cadena peptídica. Para evaluar esta capacidad antioxidante, los estudios realizados, como el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y el ensayo de captura de radicales libres como 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), entre otros (J. Gao et al., 2021). La información recabada se resume en la Tabla 1.

Analizando los resultados de la búsqueda bibliografía, de las secuencias registradas y considerando que se usará el ensayo DPPH para validar la capacidad antioxidante de los péptidos que se iban a sintetizar, se observaron solo los valores presentados para ese ensayo, donde las secuencias VAAGRTDAGVH y TSSSLNMAVRGGLTR mostraron mejores resultados, indicando una mayor capacidad para neutralizar radicales libres y prevenir la oxidación, por lo que fueron escogidas como controles para los pasos posteriores de la investigación.

Tabla 1: Secuencias reportadas en bibliografía y su capacidad antioxidante. Elaboración propia.

Reporte	Fuente	Secuencia de aminoácidos	Capacidad antioxidante	Método de obtención	Referencia
Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham	Jamón seco	SAGNPN	50,00%	DPPH	(Escudero et al., 2013)
Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins	Amaranto	AWEEREQGSR	0,0067 μmol Trolox/ μmol peptide.	ORAC	Orsini Delgado et al., 2016)
		YLAGKPQEH	186 μmol Trolox/ μmol peptide.		
		IYIEQNGITGM	80 μmol Trolox/ μmol peptide.		

		TEVWDSNEQ	39 μ mol Trolox/ μ mol peptide.		
Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins	Semilla de Algodón	YSNQNGRF	49,00%	DPPH	(Wang et al., 2021)
Identification of peptides released from flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity	Semilla de Lino	GFPGRLDHWCASE	3,2 μ mol Trolox/ μ mol peptide.	ORAC	(Silva et al., 2017)
Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) kernel protein hydrolysate	Aceite de Palma	VVGGDGDV	74,37%	DPPH	(Chang et al., 2015)
		VPVTST	74,37%		
		LTTLDSE	74,37%		
Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (<i>Eleusine coracana</i>) protein hydrolysate	Ragi	TSSSLNMAVRGGLTR	80,55%	DPPH	(Agrawal et al., 2019)
		STTVGLGISMRSASVR	75,11%		
Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (<i>Scomber japonicus</i>) muscle protein hydrolysates	Músculo de Caballa	ALSTWTLQLGSTFSASPM	36,34%	DPPH	(Bashir et al., 2020)
		LGTLFIAPI	28,94%		
Identification and molecular docking of antioxidant peptides from hemp seed protein hydrolysates	Semilla de Cañamo	YGRDEISV	73,50%	DPPH	(J. Gao et al., 2021)
		LDLVKPKQ	63,20%		
Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Fermented Fish Sauce (Budu)	Sala de Pescado	LDDPVFIH	0,84 mg/mL IC50	DPPH	(Najafian & Babji, 2019)
		VAAGRTDAGVH	1,45 mg/mL IC50		
Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities	Clara de Huevo	DHTKE	2,00%	DPPH	(J. Liu et al., 2015)
		FFGFN	19,00%		
		MPDAHL	20,00%		
Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (<i>Sesamum indicum</i> L.) protein hydrolysate	Sésamo	SYPTECRMR	0,105 mg/mL IC50	DPPH	(Lu et al., 2019)

4.2. OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROTEICAS DE COLÁGENO DE SALMÓN

Se buscaron secuencias de colágeno de salmón, prefiriendo aquellas de distintos tipos y con más de mil aminoácidos. Utilizando la base de datos de NCBI, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 2. Estas secuencias sirvieron para simular la hidrólisis enzimática, generando péptidos de colágeno que posteriormente fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas.

Tabla 2: Secuencias de colágeno de salmón, junto a su tipo, largo y código de búsqueda, obtenidas desde NCBI. Elaboración propia.

Nombre	Tipo	Código	Largo secuencia
collagen, type I, alpha 1a [Salmo salar]	I	XP_014059932.1	1449 aa
collagen, type II, alpha 1b isoform X1 [Salmo salar]	II	XP_045547905.1	1490 aa
collagen alpha-1(IV) chain isoform X1 [Salmo salar]	IV	XP_045563445.1	1646 aa
collagen, type V, alpha 2a [Salmo salar]	V	XP_014019899.2	1495 aa
collagen alpha-3(VI) chain [Salmo salar]	VI	XP_045563874.1	1074 aa
collagen, type XI, alpha 1a isoform X1 [Salmo salar]	XI	XP_014012750.1	1820 aa
collagen alpha-1(XVI) chain-like isoform X2 [Salmo salar]	XVI	XP_045565559.1	1604 aa
collagen alpha-1(XXIV) chain-like [Salmo salar]	XXIV	XP_014024329.2	1719 aa
collagen, type XXVIII, alpha 1a [Salmo salar]	XXVIII	XP_014033389.2	1173 aa

4.3. PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó una hidrólisis *in silico* en el programa Biopep, en donde se generaron alrededor de 14.000 fragmentos peptídicos derivados de las secuencias de colágeno. Estos fueron analizados en cuanto a su composición de aminoácidos, escogiendo solo aquellos que tenían como mínimo cinco aminoácidos, reduciendo el número a 604 péptidos. Los resultados obtenidos se presentan en el anexo 1.

Los fragmentos seleccionados fueron analizados utilizando el paquete Peptides en RStudio. Se determinaron propiedades fisicoquímicas, como hidrofobicidad, polaridad y peso molecular, como se muestra en el anexo 2.

Así, se observa que las secuencias utilizadas como control tienen valores de hidrofobicidad relativamente bajos, sugiriendo una mejor capacidad para atravesar membranas celulares y llegar a los lugares donde ocurren procesos oxidativos (Zou et al., 2016). Además, presentan mayor polaridad, lo que indica la presencia de grupos funcionales que pueden donar o aceptar electrones con mayor facilidad, neutralizando radicales libres de manera más efectiva (Montero Barrantes, 2021).

Luego, aplicando las técnicas de clustering, se realizó un análisis jerárquico, presentado en la Figura 8, que permitió identificar grupos de péptidos con características similares. Basándose

en las características antioxidantes de las secuencias control, se seleccionaron péptidos del mismo clúster para la síntesis, los cuales se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de los péptidos seleccionados. Elaboración propia.

Sequence	Charge	Hidrophobicity	MW	Grupo
TSSSLNMAVRGGLTR	1,9980	0,2100	1549,7654	Control
VAAGRTDAGVH	0,0893	0,1509	1053,1429	Control
GPQGF	-0,0020	-0,2800	504,5430	Fragmento
AGAPGES	-1,0002	-0,0029	587,5870	Fragmento
GTPGS	-0,0020	-0,0040	417,4190	Fragmento
VEENRDR	-0,9980	1,0429	916,9462	Fragmento
VGEQGL	-1,0002	0,0750	601,6572	Fragmento
VIQPL	-0,0020	-0,3840	568,7140	Fragmento
DGCERCF	-1,1237	0,0229	828,9129	Fragmento
PGDIG	-1,0016	-0,2060	457,4837	Fragmento
GPEGKGL	-0,0005	0,0771	656,7366	Fragmento

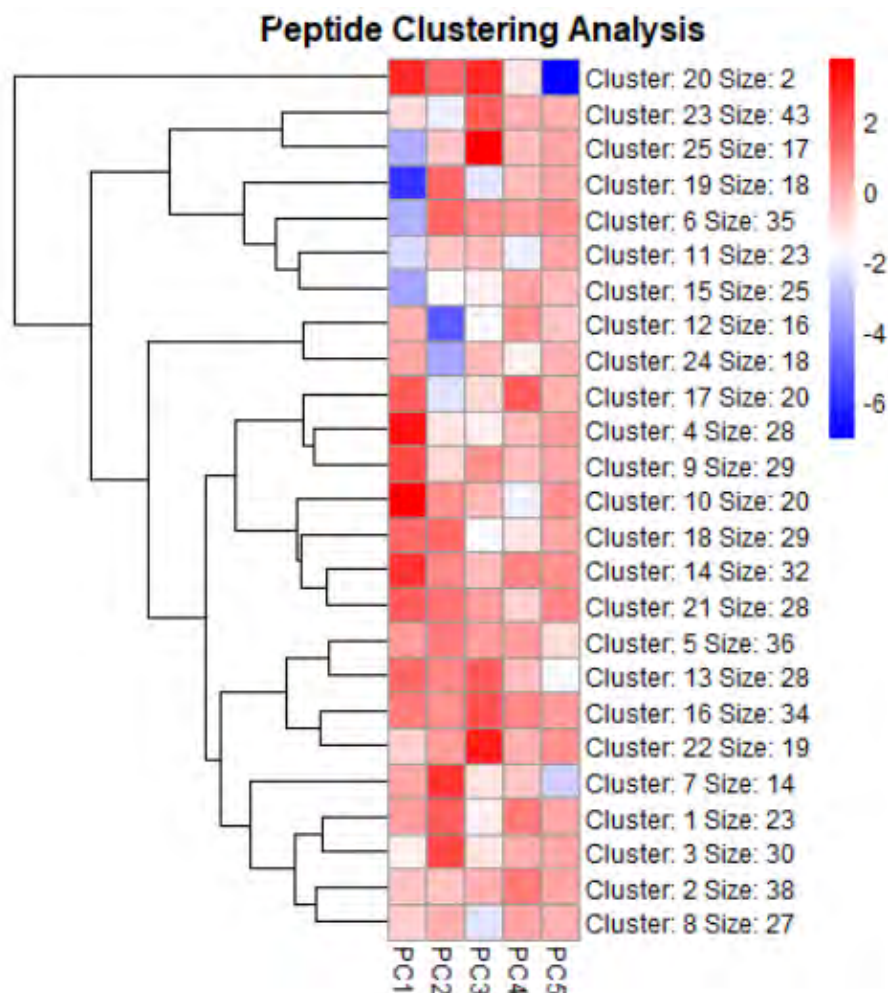


Figura 8: Resultados de clustering en R Studio. Elaboración propia.

4.4. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS

Se procedió a la síntesis química de las secuencias peptídicas obtenidas mediante el análisis bioinformático, utilizando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida. Además, desde el Núcleo Biotecnología Curauma (NBC), fue proporcionada la secuencia VIAPW, que había sido estudiada recientemente y mostraba alta actividad antioxidantes, por lo que se agregó a la síntesis para considerarla como control.

Por otro lado, a cada secuencia sintetizada se le asignó un número para poder diferenciarlas de manera más sencilla, como se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias seleccionadas y su número correspondiente. Elaboración propia.

Secuencia	N° de Péptido	PM	N° de aminoácidos
VIAPW (Control)	4426	584,78	5
TSSSLNMAVRGGLTR (Control)	5400	1549,96	15
VAAGRTDAGVH (Control)	5399	1053,29	11
DGCERCF	5390	829,01	7
GPEGKGL	5391	656,83	7
GPQGF	5392	504,61	5
GTPGS	5393	417,48	5
PGDIG	5394	457,55	5
VGEQGL	5395	601,74	6
AGAPGES	5396	587,67	7
VIQPL	5397	568,78	5
VEENRDR	5398	917,03	7

Posteriormente, se purificaron los péptidos sintetizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el caso de la purificación mediante C18 se realizó ocupando acetonitrilo a distintas concentraciones, pues al cambiar los porcentajes de este solvente orgánico, se afecta la interacción de los compuestos y se optimiza su separación en la mezcla. Esta metodología se aplicó para los péptidos 5390, 5395 y 5400. Para el resto se realizó purificación mediante G10, donde el solvente utilizado es agua. Luego, se confirmó la identidad mediante espectrometría de masas, cuyos resultados se presentan en el anexo 3.

4.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Con los péptidos previamente sintetizados, se llevaron a cabo los ensayos para evaluar su Actividad Antioxidante Celular (CAA), así como los ensayos de DPPH y ABTS, con el objetivo de determinar su capacidad antioxidante *in vitro*. En todos los experimentos, se utilizó la vitamina C como control positivo debido a su reconocida y potente actividad antioxidante, proporcionando una referencia confiable para evaluar y comparar el desempeño de los péptidos sintetizados.

La actividad antioxidante de los péptidos se midió en dos concentraciones diferentes: 0,2 mM, representada por las barras azules y 0,4 mM, representada por las barras rojas. Estas concentraciones permiten observar cómo varía la capacidad antioxidante de los péptidos

dependiendo de la cantidad utilizada, proporcionando información sobre su efectividad en diferentes dosis.

4.5.1. Ensayo de actividad antioxidante celular

En el gráfico presentado en la Figura 9, se muestra la actividad antioxidante de los péptidos sintetizados. En el eje Y se indica el porcentaje de actividad antioxidante calculado mediante la Ecuación 1, mientras que en el eje X se encuentran los números que identifican a cada péptido evaluado.

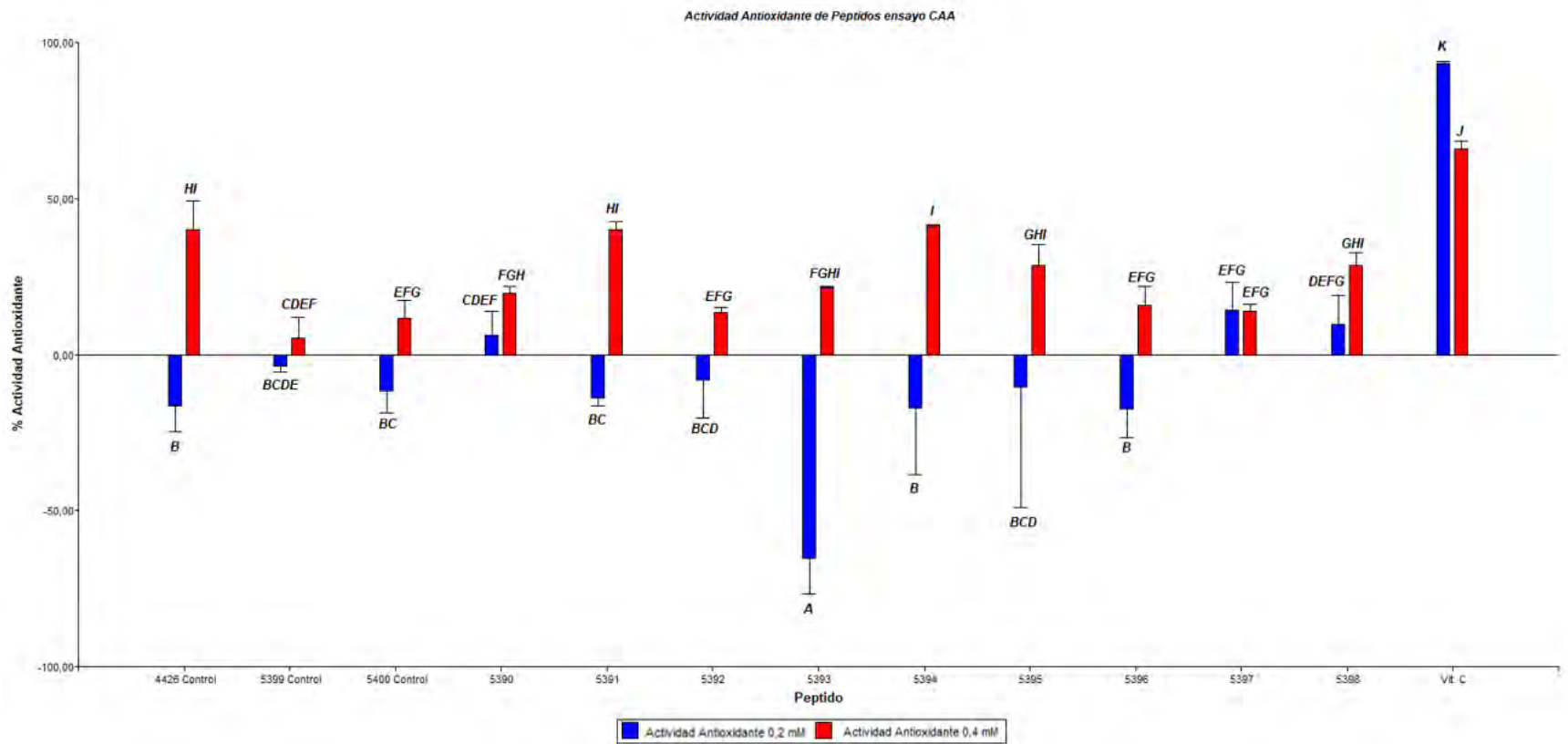


Figura 9: Actividad antioxidante celular de péptidos seleccionados a 0,2 mM y 0,4 mM. Los valores se expresan como promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican una diferencia significativa entre sí ($P \leq 0,05$). Elaboración propia.

Lo primero a destacar es que la vitamina C, utilizado como control positivo, presenta una actividad antioxidante significativa a ambas concentraciones, lo que sugiere que es capaz de proteger eficazmente a las células frente al estrés oxidativo. Estos resultados permiten validar que las condiciones de los ensayos fueron apropiadas. Por otro lado, los péptidos 4426 y 5400 exhiben una actividad moderada a la concentración más alta; sin embargo, la actividad se vuelve negativa a concentraciones menores.

A partir de esta comparación, se observa que los péptidos 5397 y 5398 exhiben una actividad antioxidante moderada en ambas concentraciones, aunque no alcanzan los niveles observados en los controles positivos. Este comportamiento indica que, si bien tienen un potencial antioxidante, su eficacia es inferior en comparación con los controles.

El comportamiento del resto de los péptidos fue más variable. A una concentración de 0,4 mM, algunos péptidos mostraron una actividad antioxidante positiva. Sin embargo, al reducir la concentración a 0,2 mM, varios de ellos presentaron una actividad negativa, lo que sugiere una posible capacidad prooxidante o una falta de efecto antioxidante a dicha dosis (Andrés et al., 2023). El péptido que obtuvo mejores resultados fue el péptido 5394, con una actividad antioxidante celular de 40% a una concentración de 0,4 mM.

4.5.2. Ensayo DPPH

En la Figura 10 se presentan los resultados del ensayo de actividad antioxidante utilizando el radical libre DPPH. En el eje Y se indica el porcentaje de actividad antioxidante calculado mediante la (Ecuación 2, mientras que en el eje X se encuentran los números que identifican a cada péptido evaluado.

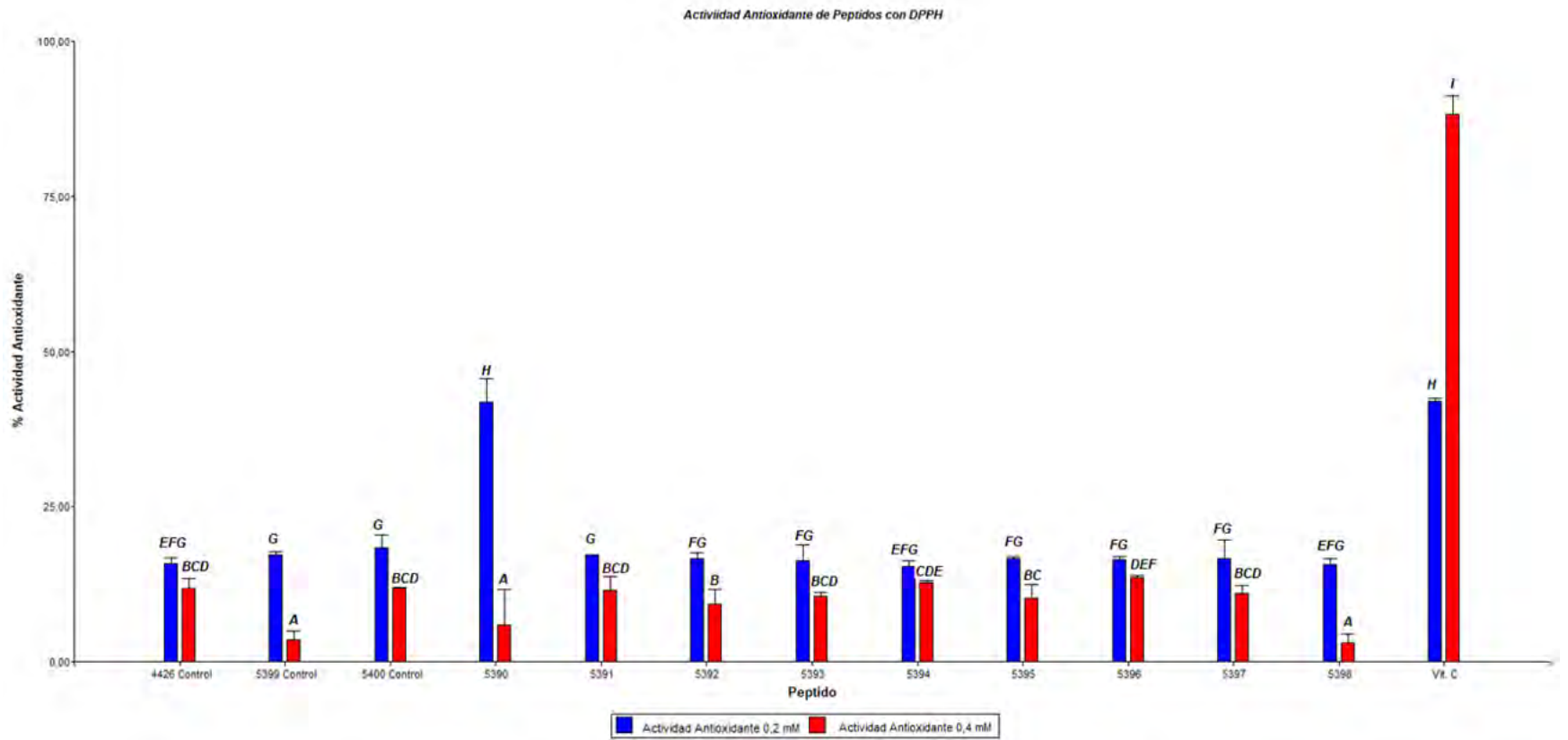


Figura 10: Actividad antioxidante mediante DPPH de péptidos seleccionados a 0,2 mM y 0,4 mM. Los valores se expresan como promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican una diferencia significativa entre sí ($P \leq 0,05$). Elaboración propia.

En primer lugar, se analizaron los controles antioxidantes. Los péptidos 4426 y 5400 muestran una actividad antioxidante moderada en ambas concentraciones, alcanzando un porcentaje cercano al 20%. Esto sugiere que, aunque estos péptidos tienen una actividad antioxidante reportada, no son tan efectivos como la vitamina C.

Por otro lado, el péptido 5390 destaca por su alta actividad antioxidante, especialmente a la concentración más baja, donde se registra un valor cercano al 50%. Sin embargo, a la concentración más alta, su actividad disminuye notablemente, lo que podría indicar una saturación del sistema o una inhibición del efecto antioxidante a concentraciones elevadas (Zhu et al., 2022).

En cuanto a la vitamina C, utilizada como control positivo, muestra la actividad antioxidante más alta en el ensayo, con un porcentaje superior al 90% en la concentración más alta. Este resultado confirma que las condiciones de los ensayos fueron apropiadas. Además, es importante destacar que el péptido 5390, a 0,2 mM obtuvo un valor de actividad antioxidante igual a la vitamina C sin diferencias significativas, lo que indica que tiene muy buena capacidad antioxidante a estas condiciones.

Finalmente, se observó que los demás péptidos evaluados presentaron una actividad antioxidante moderada a la concentración más baja, pero su efectividad disminuyó a concentraciones más altas. Esto sugiere que su capacidad para neutralizar el radical DPPH es limitada o que podría no ser tan eficaces en la protección contra el estrés oxidativo en condiciones de mayor concentración.

4.5.3. Ensayo ABTS

En la Figura 11, se presentan los resultados del ensayo de actividad antioxidante basado en el radical ABTS, el cual se emplea para evaluar la capacidad de los péptidos para neutralizar el radical ABTS^{•+}. En el eje Y se indica el porcentaje de actividad antioxidante calculado mediante la (Ecuación 3, mientras que en el eje X se encuentran los números que identifican a cada péptido evaluado.

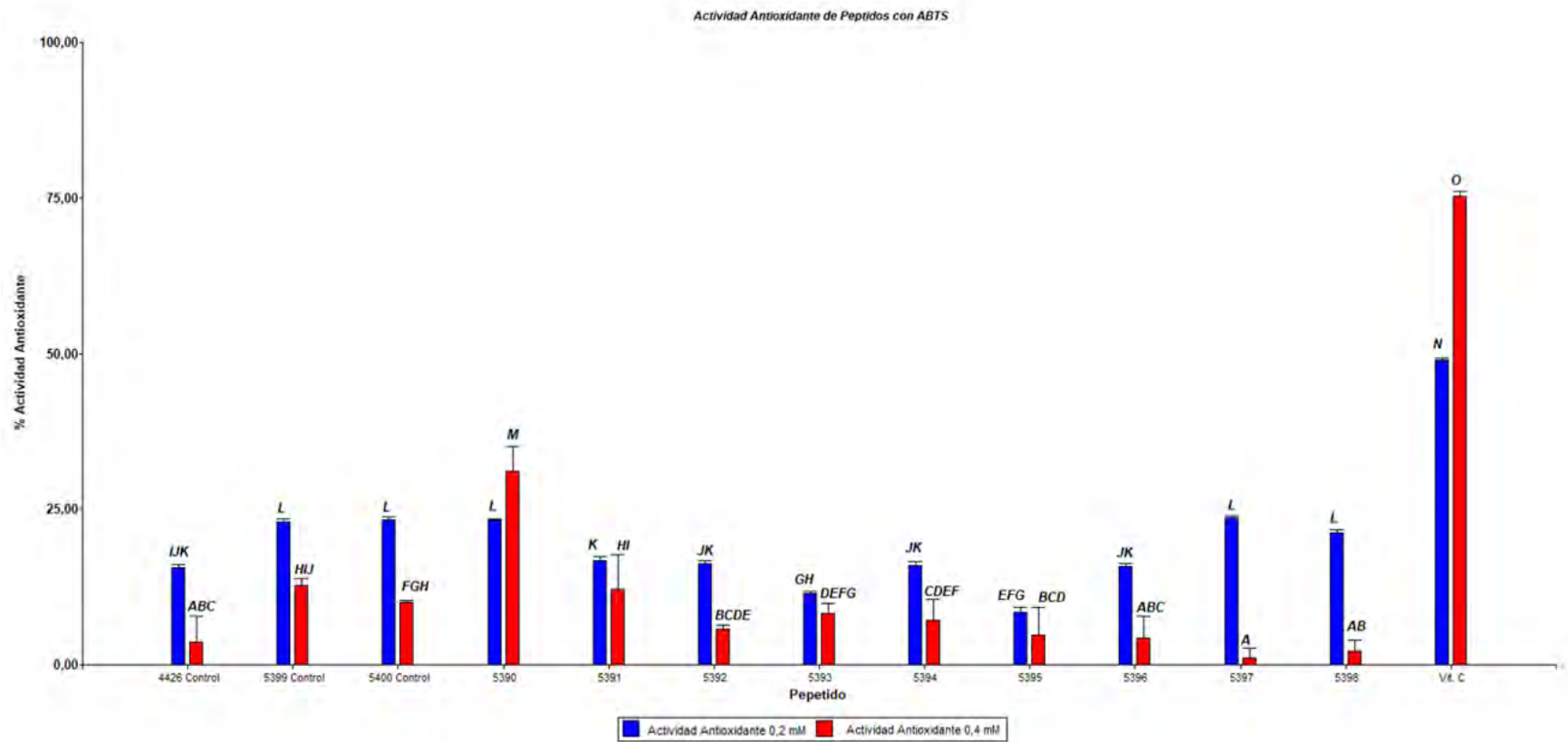


Figura 11: Actividad antioxidante mediante ABTS de péptidos seleccionados a 0,2 mM y 0,4 mM. Los valores se expresan como promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican una diferencia significativa entre sí ($P \leq 0,05$). Elaboración propia.

El péptido 4426 mostró una actividad antioxidante baja en ambas concentraciones, lo que sugiere una capacidad limitada para neutralizar el radical ABTS en comparación con los demás controles analizados.

Por otro lado, el péptido 5390 presenta una notable actividad antioxidante, alcanzando un valor superior al 25% en la concentración más alta y alrededor del 20% en la concentración más baja, superando a los péptidos controles. En contraste, el péptido 5400, usado como control, muestra una actividad antioxidante moderada en la concentración más baja. La vitamina C continúa siendo el control positivo, mostrando la mayor actividad antioxidante en el ensayo.

En cuanto a los péptidos 5391, 5392, 5393, 5394 y 5395, todos muestran una actividad antioxidante baja, con valores reducidos en ambos ensayos. Esto sugiere una capacidad limitada para neutralizar el radical ABTS.

Un aspecto destacable lo constituyen los péptidos 5396, 5397 y 5398, que muestran una actividad antioxidante más pronunciada, alcanzando valores cercanos al 25% en la concentración más baja. Este resultado sugiere que estos péptidos podrían tener un mejor desempeño en sistemas donde el radical ABTS se utiliza como indicador de actividad antioxidante.

4.6. PREDICCIÓN DE CITOTOXICIDAD

En el anexo 4, se presenta los resultados de la predicción de citotoxicidad. A la izquierda de cada resultado se muestra la estructura química del péptido, permitiendo visualizar la disposición de los átomos y su conectividad. A la derecha, se incluye una tabla acompañada de indicadores visuales que representan distintos niveles de riesgo relacionados a la toxicidad, junto con la probabilidad estimada para cada uno. Además, en la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos, donde el color verde indica baja toxicidad, el amarillo una toxicidad moderada, el naranja una toxicidad alta, y el rojo representa una toxicidad severa.

Tabla 5: Datos obtenidos sobre la citotoxicidad de los péptidos sintetizados. Elaboración propia.

Nºpeptido	% de Probabilidad de Toxicidad							
	Mutagenicity	Carcinogenicity	Hepatotoxicity	Estrogenicity	Androgenicity	Acute Oral toxicity	Skin irritation	Eye irritation
4426	12	21	56	13	19	30	8	6
5390	19	12	57	15	6	19	8	16
5391	23	38	59	9	8	22	15	9
5392	15	13	61	5	9	26	10	6
5393	21	42	60	11	14	24	11	24
5394	22	46	56	18	5	20	13	45
5395	28	41	56	9	3	20	13	18
5396	28	42	61	8	6	21	9	16
5397	20	44	56	6	10	28	14	21
5398	27	41	56	15	4	23	13	21
5399	15	24	60	25	7	21	10	18
5400	21	38	62	23	6	40	10	26

En general, se observa que todos los péptidos presentan altos niveles de hepatotoxicidad y bajos niveles de irritación cutánea, mutagenicidad, estrogenicidad y androgenicidad. Por otro lado, los péptidos 4426 y 5392 muestran bajo niveles de carcinogenicidad, niveles medios de toxicidad oral y bajos niveles de irritación ocular. En contraste, los péptidos 5390 y 5399 presentan bajos niveles en los tres factores. De manera similar, los péptidos 5391, 5393, 5395, 5396 y 5398 exhiben niveles medios de carcinogenicidad, junto con bajos niveles de toxicidad oral y de irritación ocular. Finalmente, los péptidos 5394 y 5397 muestran niveles medios de carcinogenicidad e irritación ocular, así como bajos niveles de toxicidad oral. Además, es importante resaltar que ningún péptido mostró severos niveles en ningún tipo de citotoxicidad.

4.7. VALIDACIÓN DE CITOTOXICIDAD

Con los péptidos sintetizados se seleccionaron algunos que presentaron un alto potencial antioxidante para realizar pruebas que pudieran validar su citotoxicidad más allá de una predicción, los péptidos seleccionados fueron el 5390 y el 5394, para esta prueba se utilizaron concentraciones de 0,4 mM y 0,8 mM para cada péptido, los valores obtenidos de estos péptidos fueron comparados con el control negativo en el cual solamente se encuentran células.

Por otra parte, a modo de comparación, también se agregó un control positivo el cual fue el Triton, con esto se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 12, donde en el eje X se presenta la especie que se está analizando y en el eje Y se muestra el porcentaje de supervivencia celular de cada especie.

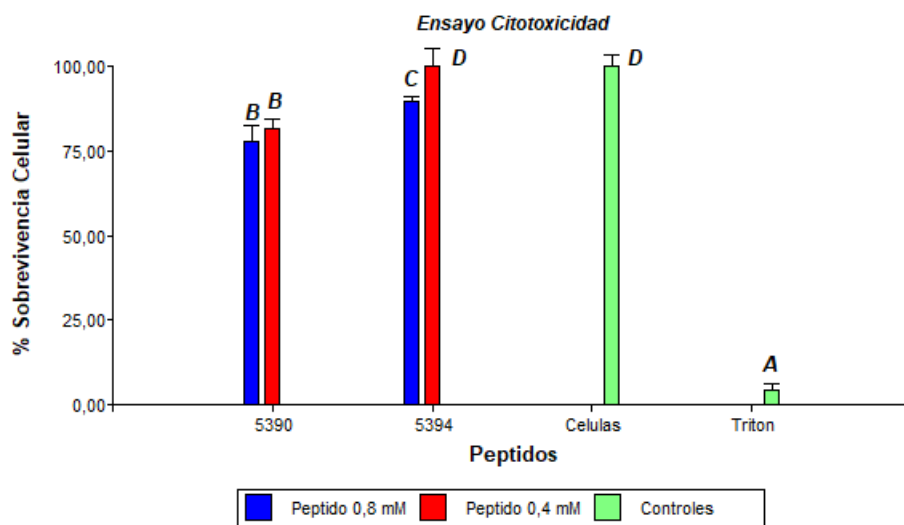


Figura 12: Citotoxicidad celular de péptidos seleccionados a 0,4 mM y 0,8 mM. Los valores se expresan como promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican una diferencia significativa entre sí ($P \leq 0,05$). Elaboración propia.

En cuanto a los péptidos analizados, se observa que los 2 presentaron un porcentaje de supervivencia celular alto, por lo que se deduce que los péptidos analizados en la Figura 12 no son citotóxicos pese al cambio de concentraciones.

4.8. ANÁLISIS DE COSTOS DE PRODUCCIÓN

El mercado global de péptidos sintéticos está en constante crecimiento, proyectando un crecimiento dentro del 7-9% durante la próxima década. En 2021, se estimó que el mercado estaba valorado en más de USD 4 mil millones, con proyecciones que podrían alcanzar o superar los USD 8 mil millones para el año 2023 (Grand View Research, 2023) (Spherical Insights & Consulting, 2022).

Uno de los factores clave que ha impulsado esta demanda es su aplicación en el tratamiento de enfermedades crónicas y en productos de antienvjecimiento. En el primer caso los péptidos

utilizados en tratamientos para enfermedades crónicas, como el cáncer o la diabetes, se administran en dosis que pueden oscilar entre 1 mg y 10 mg por dosis (Jimmidi, 2023), mientras que en cosméticos es común encontrar que los productos contengan entre 1 mg y 5 mg de péptidos bioactivos por gramo de crema (Ferreira et al., 2020).

Con esta información, y considerando solo las secuencias PGDIG y DGCERCF, que fueron las que presentaron mejores resultados de capacidad antioxidante, se realizaron los cálculos considerando una producción de 5 mg de cada uno. Por otro lado, se asume que este tipo de industrias, cuentan con los equipos necesarios para la producción, por lo que el análisis de costos se enfocará a en los activos. En la Tabla 6 se presentan los costos asociados a los reactivos, los que representan un valor total de 112.800 pesos chilenos.

Tabla 6: Nombre, cantidad y precio de los reactivos ocupados.

Nombre Producto	Cantidad [kg]	Precio (CLP\$)	Cantidad ocupada [g]	Precio total (CLP\$)
OxymaPure	1	\$ 350.000	94	\$ 32.900
HCTU	1	\$ 400.000	94	\$ 37.600
HBTU	1	\$ 450.000	94	\$ 42.300
Costo total				\$ 112.800

Por otro lado, en la Tabla 7 se presentan los costos asociados a los aminoácidos. Es importante destacar que este valor puede variar dependiendo de la secuencia y de la cantidad y tipos de aminoácidos que está presente. En este caso, para las secuencias seleccionadas, PGDIG y DGCERCF, el valor total de los aminoácidos ocupados en la síntesis es de pesos chilenos.

Tabla 7: Nombre, cantidad y precio de los aminoácidos ocupados.

Nombre Producto	Cantidad [g]	Precio (CLP\$)	Cantidad Ocupada [g]	Precio total (CLP\$)
Fmoc-Gly-OH	1000	\$ 190.000	26,186	\$ 4.975

Fmoc-Ile-OH	1000	\$ 190.000	12,003	\$2.281
Fmoc-Asp(tBu)-OH	1000	\$ 800.000	34,248	\$27.399
Fmoc-L-Pro-OH*H2O	1000	\$ 190.000	10,536	\$2.002
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	25	\$ 150.000	28,883	\$173.296
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	100	\$ 125.000	40,177	\$50.221
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH*H2O	100	\$ 125.000	24,394	\$30.493
Fmoc-L-Phe-OH	100	\$ 40.000	27,389	\$10.956
Costo total				\$ 36.656

Por último, en la Tabla 8, se presentan los costos asociados a los solventes, los que representan un valor total de 58.142 pesos chilenos.

Tabla 8: Nombre, cantidad y precio de los solventes ocupados

Nombre Producto	Cantidad	Precio unidad (CLP\$)	Cantidad Ocupada [mL]	Precio total (CLP\$)
Diclorometano para análisis EMSURE® - Envase 2.5 L	1	\$ 31.290	320	\$ 4.005
2-Propanol para análisis EMSURE® - Envase 2.5 L	1	\$ 25.217	50	\$ 504
Éter dietílico para análisis EMSURE® - Envase 1 L	1	\$ 15.500	320	\$ 4.960
N,N-Dimetilformamida P.A. EMSURE® - Envase 1 L	1	\$ 17.568	500	\$ 8.784
Piperidina P.A EMSURE- Envase 500 mL	1	\$ 98.400	200	\$ 39.360
Acetonitrilo gradient grade-Envase 4L	1	\$ 28.000	50	\$ 350
Metanol EMSURE-Envase 5 L	1	\$ 17.900	50	\$ 179
Costo total				\$ 58.142

Así, se estima que el costo total de producir 5 mg de cada péptido tiene un valor aproximado de 207.598 pesos chilenos.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1. Predicción de la actividad antioxidante

La predicción bioinformática realizada con el paquete Peptides en RStudio permitió analizar propiedades fisicoquímicas clave, como la hidrofobicidad, polaridad, carga y peso molecular de los péptidos. Estos parámetros son esenciales para evaluar su potencial antioxidante, ya que influyen en su capacidad para interactuar con radicales libres y atravesar barreras celulares, lo cual es crucial para alcanzar las áreas con mayores niveles de estrés oxidativo (Senadheera et al., 2022).

En particular, las secuencias evaluadas mostraron valores de hidrofobicidad relativamente bajos, lo que sugiere una mejor interacción en ambientes acuosos. Este comportamiento se debe a la presencia de aminoácidos como alanina (A), glicina (G), histidina (H) y cisteína (C), que contienen grupos polares capaces de formar enlaces de hidrógeno, aumentando la afinidad de los péptidos por entornos acuosos y mejorando su solubilidad. Esto facilita su acción antioxidante en medios intracelulares, donde suelen generarse especies reactivas de oxígeno (Guo et al., 2024).

Además, las secuencias presentan elevados niveles de polaridad, lo que respalda la presencia de grupos funcionales con capacidad para donar electrones y neutralizar especies reactivas. Este efecto puede atribuirse a aminoácidos como treonina (T), serina (S) y asparagina (N), que contienen grupos hidroxilo (-OH) y amina (-NH₂). Estos grupos favorecen la formación de enlaces de hidrógeno, mejorando la solubilidad y movilidad de los péptidos en medios acuosos, lo cual facilita su acceso a las zonas donde se requiere su acción antioxidante (Tonolo et al., 2023).

Por último, el peso molecular moderado de estas secuencias contribuye a una difusión más eficiente a través de las membranas celulares, lo que les permite acercarse más eficientemente a los radicales libres y, por lo tanto, interactuar con ellos de manera más efectiva con las áreas donde se produce el daño oxidativo (Guo et al., 2024).

5.2. Ensayo CAA

Un aspecto importante que destacar es que los controles positivo y negativo funcionaron correctamente, lo cual valida las condiciones experimentales. En el caso del control positivo, la vitamina C, se observó una actividad antioxidante por sobre el 60 y 90% a 0,4 mM y 0,2 mM, respectivamente. Si bien este resultado es coherente con lo esperado, ya que la vitamina C es

un antioxidante reconocido, es llamativo que a menor concentración se presente mayor capacidad antioxidante, pues significa que un incremento en la dosis no necesariamente mejora su efecto protector.

Este fenómeno podría deberse a una combinación de factores. En primer lugar, se tiene que las células cuentan con mecanismos de defensa antioxidante que se activan frente a niveles bajos de estrés oxidativo, donde a una concentración, se puede emplear el antioxidante de manera eficiente sin afectar la homeostasis celular. Sin embargo, a una concentración más alta se podría sobrecargar los sistemas antioxidantes de las células o podría comenzar a interactuar con otros componentes del entorno celular, generando productos de oxidación que incrementen el nivel de ROS, disminuyendo su propio efecto antioxidante y alterando el equilibrio redox en la célula. (Każmierczak-Barańska et al., 2020).

Además, la vitamina C ingresa a las células a través de transportadores específicos, como los transportadores de ascorbato-sodio. A una concentración de 0,2 mM, estos transportadores podrían estar funcionando de manera óptima, permitiendo una adecuada entrada del antioxidante en las células. Sin embargo, a una concentración más alta, es posible que los transportadores se saturen, limitando la cantidad que realmente ingresa en la célula y, por lo tanto, disminuyendo su eficacia antioxidante (Ferrada et al., 2021).

Por otro lado, es posible observar que algunos péptidos muestran porcentajes negativos de capacidad antioxidante, lo que indica un efecto prooxidante. Estos porcentajes pueden explicarse por varios factores como que, a altas concentraciones, ciertos antioxidantes pueden comportarse como prooxidantes, es decir, las moléculas se oxidan y generan radicales libres, promoviendo la oxidación de otras moléculas en lugar de inhibirla, contribuyendo a la generación de ROS y aumentando el daño oxidativo (Andrés et al., 2023).

También es importante el tipo de ensayo realizado, pues se tratan de células vivas, las cuales tienen interacciones más complejas con antioxidantes, ya que algunos compuestos pueden interferir con vías metabólicas específicas, lo que, bajo ciertas condiciones, podría conducir a la generación de ROS adicionales o incluso al daño celular.

Finalmente, al comparar los porcentajes de actividad antioxidante de los péptidos con el control positivo, observamos que la mayoría de los péptidos presentan menores porcentajes de actividad antioxidante en comparación con la vitamina C, lo que indica una menor capacidad

antioxidante. Sin embargo, el péptido 5394 mostro porcentajes de actividad antioxidante buenos, particularmente en la concentración de 0.4 mM, sugiriendo que tiene una mayor capacidad para neutralizar los ROS, destacándose, así como el más prometedor en términos de actividad antioxidante celular.

Es relevante señalar que este corresponde a la secuencia GTPGS, la cual contiene aminoácidos como glicina (G) y serina (S), que son relativamente pequeños y favorecen la flexibilidad de la estructura del péptido, facilitando su interacción con la membrana celular, permitiendo que el péptido pueda actuar con mayor efectividad. Además, cuenta con Treonina (T), que contiene un grupo hidroxilo, que puede desempeñar un papel en la donación de electrones y, por lo tanto, neutralizar ROS mediante la estabilización de radicales libres (Tonolo et al., 2023).

5.3. Ensayo DPPH

Primero, es importante destacar que los controles positivo y negativo funcionaron correctamente en el ensayo de DPPH, lo que valida las condiciones experimentales utilizadas. Para el control positivo, que consistió en vitamina C, se observó una actividad antioxidante de aproximadamente el 90% a una concentración de 0,4 mM y alrededor del 45% a 0,2 mM. Estos resultados confirman que las condiciones del ensayo fueron adecuadas para evaluar y comparar la capacidad antioxidante de los diferentes péptidos.

Los péptidos 4426 y 5400, por su parte, mostraron una actividad antioxidante moderada en ambas concentraciones, con porcentajes inferiores al 20%. Esto sugiere que, si bien poseen cierto potencial antioxidante, su efectividad es limitada, posiblemente debido a la ausencia de aminoácidos con grupos funcionales altamente reactivos, o bien requieren concentraciones más altas para manifestar un efecto antioxidante significativo.

Entre los péptidos evaluados, el péptido 5390, correspondiente a la secuencia DGCERCF, destacó por su alta actividad antioxidante, especialmente a la concentración de 0,2 mM, donde alcanzó un porcentaje cercano al 45%. Este resultado es relevante, ya que sugiere una capacidad antioxidante comparable a la de la vitamina C en condiciones similares, sin diferencias significativas. Esto indica que el péptido 5390 podría ser eficaz en concentraciones bajas para neutralizar el radical DPPH.

Este comportamiento favorable se podría atribuir a la composición de la secuencia, que incluye aminoácidos clave como la cisteína (C). Este aminoácido posee grupos tiol (-SH), conocidos por

su capacidad de donar electrones y neutralizar radicales libres. Además, la cisteína facilita la formación de enlaces disulfuro, que pueden mejorar la estabilidad y efectividad del péptido en interacciones redox, potenciando su rol como antioxidante eficiente (Chen et al., 2024).

Sin embargo, a concentraciones más altas se observó una disminución en la actividad antioxidante, lo que podría indicar una posible saturación del sistema, es decir, que, aunque haya más péptido, este no puede ingresar a la célula y ejercer su efecto, limitando la eficacia total del antioxidante, o, por una inhibición del efecto antioxidante en dosis elevadas, generando interferencias con otras moléculas antioxidantes y alterando el balance redox de la célula (Zhang et al., 2024). Esto sugiere que el péptido 5390 podría ser más adecuado para aplicaciones que requieran antioxidantes en bajas concentraciones, evitando así efectos adversos o de saturación.

5.4. Ensayo ABTS

En el análisis inicial de los controles, se observa que la vitamina C presentó una actividad antioxidante superior al 50% en ambas concentraciones probadas, lo cual valida su eficacia en la neutralización del radical ABTS y confirma las condiciones experimentales del ensayo.

Por otro lado, el péptido 4426, junto con los péptidos de control 5391 a 5395, exhibieron una actividad antioxidante baja, lo que sugiere una capacidad limitada para neutralizar el radical ABTS. Esta baja actividad puede atribuirse a la posible ausencia de aminoácidos con propiedades antioxidantes potentes en sus secuencias o a una estructura que limita su interacción con el radical ABTS. Sin embargo, es importante señalar que una actividad antioxidante baja en este ensayo específico no implica necesariamente la ausencia de propiedades antioxidantes, ya que estos péptidos podrían actuar mediante otros mecanismos, como la quelación de metales o la activación de rutas antioxidantes celulares, que no se evalúan en este tipo de ensayo (Superti & Russo, 2024).

En contraste, el péptido 5390, con la secuencia DGCERCF, demostró un gran potencial antioxidante, alcanzando cerca del 30% de actividad en la concentración más alta y superando el 20% en la concentración baja. Esta actividad podría deberse a la presencia de cisteína (C), que posee un grupo tiol (-SH) capaz de donar electrones o hidrógenos para neutralizar el radical ABTS⁺, estabilizándolo y reduciendo así su capacidad oxidante (B. Xu et al., 2024). Además, la presencia de ácido glutámico (E) y arginina (R) podría mejorar la solubilidad del péptido en

medios acuosos, permitiendo que su estructura sea más accesible y flexible, lo cual facilita una interacción eficaz con el radical ABTS (Shukla & Trout, 2011).

Por otro lado, los péptidos 5396, 5397 y 5398, correspondientes a las secuencias AGAPGES, VIQPL y VEENRDR, respectivamente, mostraron una actividad antioxidante moderada, alcanzando valores cercanos al 20% en la concentración más baja. Esto podría estar relacionado con la presencia de aminoácidos que, aunque no sean tan reactivos como la cisteína o la tirosina, poseen características que permiten interacciones antioxidantes de grado intermedio. En los péptidos 5396 y 5398, la presencia de ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) aporta grupos carboxilo que pueden actuar neutralizando radicales a un ritmo moderado, contribuyendo así a una actividad antioxidante limitada en el ensayo ABTS (Cano et al., 2023).

En el caso de la secuencia 5397, que contiene serina (S) y glicina (G), se observa que la serina, con su grupo hidroxilo (-OH), puede participar en la donación de electrones, aunque de manera más moderada que un grupo fenólico (Omar et al., 2021), mientras que la glicina, aunque no es reactiva, aporta flexibilidad estructural, lo que podría facilitar la accesibilidad de la serina para interactuar con el radical ABTS y contribuir así a la actividad antioxidante observada (Cano et al., 2023).

6. CONCLUSIONES

Este estudio, logró a través de la recopilación de información bibliográfica, proporcionar una base sólida que facilitó el entendimiento sobre las propiedades estructurales y químicas que influyen en la capacidad antioxidante de los péptidos. Esta información permitió identificar características clave, como baja hidrofobicidad, alta polaridad y peso molecular moderado, que suelen asociarse con un alto potencial antioxidante. Al disponer de esta base teórica, fue posible guiar de manera efectiva las etapas subsecuentes de predicción y selección de secuencias, asegurando que los péptidos elegidos mostraran propiedades que favorecieran la neutralización de radicales libres.

Por otro lado, la predicción bioinformática de secuencias peptídicas a partir de colágeno de salmón permitió identificar péptidos con propiedades antioxidantes, seleccionando secuencias que combinan baja hidrofobicidad y alta polaridad, características deseables para obtener un alto potencial antioxidante. Este proceso no solo optimizó la selección de secuencias prometedoras para el trabajo posterior, sino que también demostró que a través de herramientas computacionales se puede lograr una caracterización integral y detallada que sirve para predecir la funcionalidad biológica de los péptidos.

En los ensayos de Actividad Antioxidante Celular (CAA), el control positivo de vitamina C demostró una actividad antioxidante significativa en ambas concentraciones, validando las condiciones experimentales para evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos. De los péptidos evaluados, el péptido 5394 destacó por alcanzar una actividad antioxidante celular del 40% a 0,4 mM, señalando un potencial antioxidante relevante. Sin embargo, otros péptidos mostraron resultados variables; algunos exhibieron actividad antioxidante a concentraciones altas, pero esta disminuyó a medida que la concentración se redujo, lo que sugiere una posible capacidad prooxidante o una falta de efecto a dosis menores.

En los ensayos DPPH, los controles antioxidantes, representados por los péptidos 4426 y 5400, mostraron una actividad moderada en ambas concentraciones, alcanzando un 20% aproximadamente, lo que confirma cierta actividad, pero con eficacia limitada en comparación con la vitamina C, que superó el 90% en la concentración más alta. El péptido 5390 mostró una actividad antioxidante destacada, cercana al 50% a 0,2 mM, similar a la vitamina C sin diferencias significativas, lo que sugiere una buena capacidad antioxidante a bajas concentraciones. A

concentraciones más altas, la actividad del péptido 5390 disminuyó, posiblemente debido a una saturación o inhibición en el sistema. Este comportamiento sugiere que este péptido puede ser eficaz a concentraciones controladas, mientras que otros péptidos evaluados tuvieron una disminución en su efectividad al aumentar la concentración, indicando una capacidad antioxidante limitada en condiciones de mayor estrés oxidativo.

En los ensayos ABTS, el péptido 5390 nuevamente sobresalió al mostrar una notable actividad antioxidante, alcanzando un valor superior al 25% en la concentración más alta y alrededor del 20% en la más baja, superando a los péptidos controles. En contraste, el péptido 4426 mostró actividad baja en ambas concentraciones, lo que sugiere una capacidad limitada para neutralizar el radical ABTS. Otros péptidos, como el 5396, 5397 y 5398, exhibieron actividad antioxidante más pronunciada, con valores cercanos al 25% a la concentración más baja, lo que indica un desempeño relativamente mejor en condiciones donde el radical ABTS se emplea como indicador.

En conclusión, los resultados obtenidos en los ensayos CAA, DPPH y ABTS destacan que la vitamina C es el antioxidante más eficaz en todos los casos, confirmando la idoneidad de los ensayos. Sin embargo, los péptidos 5390 y 5394 demostraron ser candidatos prometedores con alta capacidad antioxidante en condiciones específicas. La variabilidad en la actividad antioxidante de otros péptidos y su menor eficacia en concentraciones altas o en distintos ensayos sugiere que su actividad antioxidante depende del tipo de radical y de la concentración empleada. Esto enfatiza la necesidad de un enfoque combinado de herramientas bioinformáticas y técnicas experimentales para optimizar el descubrimiento y desarrollo de péptidos antioxidantes de colágeno de salmón y maximizar su aplicabilidad en condiciones específicas de estrés oxidativo.

7. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS

Con base en la investigación realizada sobre la predicción de péptidos antioxidantes derivados de colágeno de salmón, se recomienda considerar el escalamiento de la producción de péptidos antioxidantes, desde el laboratorio hasta un nivel industrial. Esto representa un desafío crucial que requiere una serie de ajustes tanto en el diseño del proceso como en la gestión de los parámetros operativos. Este paso es esencial para lograr un proceso eficiente, controlado y económicamente viable en la industria.

Para lograr esto, el escalado debe abordar varias áreas clave. En primer lugar, se recomienda un análisis para un diseño del reactor, este juega un papel fundamental en el control de las condiciones óptimas de hidrólisis y en la eficiencia general del proceso. A diferencia del procedimiento realizado en el laboratorio, un reactor industrial puede manejar grandes volúmenes de sustrato, pero requiere un diseño que permita mantener una temperatura y pH homogéneos, así como una mezcla eficiente de la resina y los aminoácidos.

En este contexto, los reactores de tanque agitado y los reactores de flujo continuo son alternativas comunes. Los reactores de flujo continuo, en particular, pueden ofrecer ventajas en términos de productividad y control de calidad, al permitir un suministro constante de sustrato y una separación eficiente de los productos. También es importante la selección de resinas de síntesis que tengan una alta capacidad de carga para permitir la producción de mayores cantidades de péptidos en un solo lote. Esto reduce la necesidad de múltiples ciclos de síntesis y purificación, lo que ahorra tiempo y costos.

El escalamiento también debe considerar la eficiencia de la purificación y separación de los péptidos obtenidos. En el laboratorio, se pueden emplear técnicas de purificación específicas y detalladas, pero a nivel industrial es necesario optar por métodos más rápidos y eficientes. La cromatografía en columna de gran volumen, la ultrafiltración y la precipitación selectiva son métodos que pueden escalarse para manejar grandes cantidades de péptidos, aunque es importante optimizar estos procesos para minimizar costos y tiempos de operación.

Otra recomendación relevante por realizar es mejorar la actividad antioxidante de péptidos mediante modificaciones específicas en la secuencia de aminoácidos, ya que ciertos residuos pueden incrementar la capacidad antioxidante. Un método útil es realizar un screening de residuos específicos como la lisina (K) en posiciones clave de la secuencia peptídica, para

aumentar su capacidad de eliminación de radicales libres y su estabilidad. Este proceso conlleva un análisis de la secuencia del péptido para identificar posiciones donde la inserción o sustitución de lisina pueda ser favorable, influyendo en las propiedades fisicoquímicas y la estructura del péptido (Haque et al., 2021).

BIBLIOGRAFÍA

- Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Andrés, C. M. C., Pérez de la Lastra, J. M., Juan, C. A., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2023). Polyphenols as Antioxidant/Pro-Oxidant Compounds and Donors of Reducing Species: Relationship with Human Antioxidant Metabolism. In *Processes* (Vol. 11, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/pr11092771>
- Cano, A., Maestre, A. B., Hernández-Ruiz, J., & Arnao, M. B. (2023). ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. In *Processes* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/pr11010185>
- Carvajal, C. C. (2019). ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: FORMACIÓN, FUNCION Y ESTRÉS OXIDATIVO REACTIVE OXYGEN SPECIES: TRAINING, FUNCTION AND OXIDATIVE STRESS. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).
- Chen, L., Wang, L., Ma, L., Wang, C., Qin, X., Wang, M., Zhang, X., Yang, R., Fang, B., & An, J. (2024). Synergistic Antioxidant Effects of Cysteine Derivative and Sm-Cluster for Food Applications. *Antioxidants*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/antiox13080910>
- Chen, T., & Hou, H. (2016). Protective effect of gelatin polypeptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) against UV irradiation-induced damages by inhibiting inflammation and improving transforming growth factor- β /Smad signaling pathway. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.038>
- Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182015000200014>

- Daidj, N. B. B., & Lamri-Senhadj, M. (2021). Hepatoprotective and anti-obesity properties of sardine by-product oil in rats fed a high-fat diet. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(3). <https://doi.org/10.3746/PNF.2021.26.3.285>
- Di Stefano, M., Galati, S., Piazza, L., Granchi, C., Mancini, S., Fratini, F., Macchia, M., Poli, G., & Tuccinardi, T. (2024). VenomPred 2.0: A Novel In Silico Platform for an Extended and Human Interpretable Toxicological Profiling of Small Molecules. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 64(7). <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00692>
- Díaz-Ramírez, M. (2018). BIFUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS DE LA LECHE, PERSPECTIVAS DE SU USO. *Agro Productividad*, 11(11). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1277>
- Elsevier B.V. (2004). *Scopus*. 2004.
- Elsevier B.V. (2014). *ScienceDirect*. 2014.
- Espinoza, D., & Castillo, A. (2022). Technological advances in obtaining, identifying and producing protein hydrolysates from fish residues by enzymatic action: bioactive and techno-functional properties, application in food, market and regulation. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.012>
- Espinoza, D., Castillo, A., Espinoza, D., & Castillo, A. (2022). Avances tecnológicos en la obtención, identificación y producción de hidrolizados proteicos de residuos de pescado por acción enzimática: propiedades bioactivas y tecnofuncionales, aplicación en alimentos, mercado y regulación. *Scientia Agropecuaria*, 13(2).
- Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Medicinal Prospects of Antioxidants From Algal Sources in Cancer Therapy. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593116>
- Ferrada, L., Magdalena, R., Barahona, M. J., Ramírez, E., Sanzana, C., Gutiérrez, J., & Nualart, F. (2021). Two distinct faces of vitamin c: Aa vs. dha. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antiox10020215>
- Ferreira, M. S., Almeida, I. F., Magalhães, M. C., & Sousa-Lobo, J. M. (2020). Trending anti-aging peptides. *Cosmetics*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040091>

- Gao, C. X., Dwyer, D., Zhu, Y., Smith, C. L., Du, L., Fila, K. M., Bayer, J., Menssink, J. M., Wang, T., Bergmeir, C., Wood, S., & Cotton, S. M. (2023). An overview of clustering methods with guidelines for application in mental health research. In *Psychiatry Research* (Vol. 327). <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2023.115265>
- Gao, J., Li, T., Chen, D., Gu, H., & Mao, X. (2021). Identification and molecular docking of antioxidant peptides from hemp seed protein hydrolysates. *LWT*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111453>
- Google. (2004). *Google Académico*. 2004.
- Grand View Research. (2023). *Peptide Synthesis Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Equipment, Reagents & Consumables), By Application (Therapeutics, Diagnosis), By Technology, By End Use, By Region, And Segment Forecasts, 2024 - 2030*.
- Gu, L., Shan, T., Ma, Y. xuan, Tay, F. R., & Niu, L. (2019). Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>
- Guo, X., Liu, J., Wang, C., Wen, Z., & Zheng, B. (2024). The Antioxidant Mechanism of Peptides Extracted from Tuna Protein Revealed Using a Molecular Docking Simulation. *Antioxidants*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/antiox13020166>
- Guzmán, F., Aróstica, M., Román, T., Beltrán, D., Gauna, A., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2023.01.005>
- Guzmán, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2021). Tea bags for fmoc solid-phase peptide synthesis: An example of circular economy. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26165035>
- Haque, M., Forte, N., & Baker, J. R. (2021). Site-selective lysine conjugation methods and applications towards antibody-drug conjugates. *Chemical Communications*, 57(82). <https://doi.org/10.1039/d1cc03976h>

- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., & Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. In *Food Chemistry* (Vol. 301). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
- Hou, Y., Chitrakar, B., Mao, K., Wang, K., Gu, X., Gao, J., Zhang, Q., Bekhit, A. E. D. A., & Sang, Y. (2023). Bioactivity of collagen peptides derived from commercial animals: In silico investigation. *LWT*, *187*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115381>
- Jimmidi, R. (2023). Synthesis and Applications of Peptides and Peptidomimetics in Drug Discovery. In *European Journal of Organic Chemistry* (Vol. 26, Issue 18). <https://doi.org/10.1002/ejoc.202300028>
- Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszewska, K., Adamus-Grabicka, A., & Karwowski, B. T. (2020). Two faces of vitamin c—antioxidative and pro-oxidative agent. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/nu12051501>
- Lauritano, C., Montuori, E., De Falco, G., & Carrella, S. (2023). In Silico Methodologies to Improve Antioxidants' Characterization from Marine Organisms. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030710>
- Lim, Y. S., Ok, Y. J., Hwang, S. Y., Kwak, J. Y., & Yoon, S. (2019). Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/md17080467>
- Liu, Z., Li, Y., Song, H., He, J., Li, G., Zheng, Y., & Li, B. (2019). Collagen peptides promote photoaging skin cell repair by activating the TGF- β /Smad pathway and depressing collagen degradation. *Food and Function*, *10*(9). <https://doi.org/10.1039/c9fo00610a>
- López-Barríos, L., Antunes-Ricardo, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, *203*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.048>
- López-Pedrouso, M., Zaky, A. A., Lorenzo, J. M., Camiña, M., & Franco, D. (2023). A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological

- activities, applications and limitations. *Meat Science*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109278>
- Melo, O., Quiñones, N. B., & Acuña, D. (2021). Towards Sustainable Agriculture in Chile, Reflections on the Role of Public Policy. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 48(3). <https://doi.org/10.7764/ijanr.v48i3.2359>
- Minkiewicz, P., Darewicz, M., & Iwaniak, A. (22 C.E.). *BIOPEP-UWM Virtual—A Novel Database of Food-Derived Peptides with In Silico-Predicted Biological Activity*. *Applied Sciences*. 10.3390/app12147204.
- Montero Barrantes, M. (2021). Hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera: obtención y funcionalidad. *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.41437>
- Nakchum, L., & Kim, S. M. (2016). Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2). <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.995808>
- National Library of Medicine. (n.d.). *National Center for Biotechnology Information* .
- NovoPro. (2013). *PepSMI: Convert Peptide to SMILES string*.
- Núcleo Biotecnología Curauma. (2014). *Acuapeptide Síntesis*. 2014.
- Núñez, S. M., Cárdenas, C., Valencia, P., Pinto, M., Silva, J., Pino-Cortés, E., & Almonacid, S. (2023). Effect of Adding Bovine Skin Gelatin Hydrolysates on Antioxidant Properties, Texture, and Color in Chicken Meat Processing. *Foods*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/foods12071496>
- Núñez, S. M., Guzmán, F., Valencia, P., Almonacid, S., & Cárdenas, C. (2020). Collagen as a source of bioactive peptides: A bioinformatics approach. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.09.009>
- Omar, A., Gao, Y., Wubulikasimu, A., Arken, A., Aisa, H. A., & Yili, A. (2021). Effects of trypsin-induced limited hydrolysis on the structural, functional, and bioactive properties of sericin. *RSC Advances*, 11(41). <https://doi.org/10.1039/d1ra03772b>

- Othón-Díaz, E. D., Fimbres-García, J. O., Flores-Sauceda, M., Silva-Espinoza, B. A., López-Martínez, L. X., Bernal-Mercado, A. T., & Ayala-Zavala, J. F. (2023). Antioxidants in Oak (*Quercus* sp.): Potential Application to Reduce Oxidative Rancidity in Foods. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antiox12040861>
- Phetchthumrongchai, T., Tachapuripunya, V., Chintong, S., Roytrakul, S., E-kobon, T., & Klaypradit, W. (2022). Properties of Protein Hydrolysates and Bioinformatics Prediction of Peptides Derived from Thermal and Enzymatic Process of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Roe. *Fishes*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/fishes7050255>
- Qiu, W., Chen, X., Tian, Y., Wu, D., Du, M., & Wang, S. (2020). Protection against oxidative stress and anti-aging effect in *Drosophila* of royal jelly-collagen peptide. *Food and Chemical Toxicology*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110881>
- Rajabimashhadi, Z., Gallo, N., Salvatore, L., & Lionetto, F. (2023). Collagen Derived from Fish Industry Waste: Progresses and Challenges. In *Polymers* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/polym15030544>
- Roche, & Sigma Aldrich. (2021). *Cell Proliferation Reagent WST-1*.
- Rodrigo Torres, J. Sebastian Paez, Daniel Osorio, & Paola Rondon-Villarreal. (2019). *Package 'Peptides.'*
- Ruiz Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. In *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. <https://doi.org/10.3926/oms.34>
- Senadheera, T. R. L., Hossain, A., Dave, D., & Shahidi, F. (2022). In Silico Analysis of Bioactive Peptides Produced from Underutilized Sea Cucumber By-Products—A Bioinformatics Approach. *Marine Drugs*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/md20100610>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. El, Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the

- Pathophysiology of Chronic Diseases. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Shukla, D., & Trout, B. L. (2011). Understanding the synergistic effect of arginine and glutamic acid mixtures on protein solubility. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(41).
<https://doi.org/10.1021/jp204462t>
- Spherical Insights & Consulting. (2022, October 2). *Global Peptide Synthesis Market Size To Reach USD 6.2 Bn By 2030*.
- Superti, F., & Russo, R. (2024). Alpha-Lipoic Acid: Biological Mechanisms and Health Benefits. In *Antioxidants* (Vol. 13, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/antiox13101228>
- Tejano, L. A., Peralta, J. P., Yap, E. E. S., Panjaitan, F. C. A., & Chang, Y. W. (2019). Prediction of bioactive peptides from chlorella sorokiniana proteins using proteomic techniques in combination with bioinformatics analyses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071786>
- The UniProt Consortium, & National Institutes of Health. (n.d.). *Uniprot*.
- Tonolo, F., Grinzato, A., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2023). From In Silico to a Cellular Model: Molecular Docking Approach to Evaluate Antioxidant Bioactive Peptides. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030665>
- Universidad Nacional de Córdoba. (2020). *InfoStat*.
- Usmani, S. S., Kumar, R., Bhalla, S., Kumar, V., & Raghava, G. P. S. (2018). In Silico Tools and Databases for Designing Peptide-Based Vaccine and Drugs. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 112).
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.01.006>
- Utomo, H. B. dan A. (2020). STRATEGI GURU DALAM MENGEMBANGKAN KETERAMPILAN BERPIKIR KRITIS (CRITICAL THINKING) PADA PEMBELAJARAN TEMATIK TERPADU KELAS V SEKOLAH DASAR. *Pendidikan Dasar*, 5(2).

- Wang, L., Ma, M., Yu, Z., & Du, S. kui. (2021). Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins. *Food Chemistry*, 352. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129399>
- Xinyue, W., & Kang, J. (2023). Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. In *Progress in Chemistry* (Vol. 35, Issue 4). <https://doi.org/10.7536/PC220930>
- Xu, B., Dong, Q., Yu, C., Chen, H., Zhao, Y., Zhang, B., Yu, P., & Chen, M. (2024). Advances in Research on the Activity Evaluation, Mechanism and Structure-Activity Relationships of Natural Antioxidant Peptides. In *Antioxidants* (Vol. 13, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antiox13040479>
- Xu, S., Zhao, Z., & Zhao, J. (2018). Recent advances in enzyme-mediated peptide ligation. *Chinese Chemical Letters*, 29(7). <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.024>
- Yannick Pombett Lopez. (n.d.). *Protocolo Actividad antioxidante celular (CAA) para cultivos celulares HKL (O. mykiss)*.
- Zamorano-Apodaca, J. C., García-Sifuentes, C. O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S. M., & Lugo-Sánchez, M. E. (2020). Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. *Food Chemistry*, 331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127350>
- Zhang, Y., Li, Y., Quan, Z., Xiao, P., & Duan, J. A. (2024). New Insights into Antioxidant Peptides: An Overview of Efficient Screening, Evaluation Models, Molecular Mechanisms, and Applications. In *Antioxidants* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/antiox13020203>
- Zhu, Y., Lao, F., Pan, X., & Wu, J. (2022). Food Protein-Derived Antioxidant Peptides: Molecular Mechanism, Stability and Bioavailability. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/biom12111622>
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>

APÉNDICES

ANEXOS

ANEXO 1: Resultados hidrolisis *in silico*

Tabla 9: Fragmentos peptídicos obtenidos de la hidrolisis *in silico*.

Secuencia	PM	Número de aminoácidos
GPQGPAGELG	881,9406	10
WGPGPPGDLGAA	1094,1917	12
GSLGPVGDGQVGR	1295,4177	14
GPEGPAGAR	810,8649	9
GETGPAGPAGAAGPAGPR	1490,5955	18
PMRGGGGYHY	1094,2127	10
SGPAGPAGPNGPA	1049,1080	13
GESGPAGPAGPNGPA	1235,2754	15
GLNGPSGPRGPHGS	1289,3730	14
GIAGPAGPRGSPGPA	1261,4030	15
IAGPAGPRGSPGPA	1204,3511	14
GITGPAGPRGPHGPPGKDGRAGGH	2428,6552	27
GARGADGSTGPAGPAGPL	1508,6107	18
DGRAGGHGAIGPVGH	1357,4512	15
GPAGPRGPHGPPG	1378,5130	16
GSVGIAGGPGHQGPG	1247,3327	15
AGGGYDQSGGYD	1146,0916	12
VDIRL	614,7427	5
ARGQGEDDRTAGS	1319,3102	13
KPEPCQIC	917,1059	8
VMCDE	595,6833	5
DCPNP	544,5798	5
VIPHDECCPICPDDGF	1759,9840	16
VEGPQGDRGAKGEPGAGF	1825,9554	19
PGNDGIPGQPGL	1121,2148	12
PGPPGPPGPPGL	1039,1991	12
GGGMS	407,4417	5
MPGPMGPMGPRGPPGPPGS	1774,1037	19
GPQGF	504,5430	5
TGPPGEPGEAGS	1055,0660	12
GPMGPRGAGP PGKNGDDGES	1950,0697	22
GPQGARGF	788,8612	8
PGTPGL	540,6169	6
PGIKGHRGF	968,1263	9
GPAGPKGEAGAS	998,0604	12

PGGPGAKGE	768,8246	9
RGEAGNPGPAGAAGPAGNNGADGNPGTKGAPGS	2801,8854	33
GIAGAPGF	688,7812	8
PGPRGPPGPQGAGGAPGPKGNTGE	2110,2735	24
VGATGAKGEAGAKGES	1389,4850	16
VQGPAGPAGEEGKRGRGEPGS	2050,1752	22
AGARGAPGERGAPGS	1310,3920	15
DGAAGPKGGPGERGGAG	1410,4659	17
VAGAKGNTGEPGRNGEPGMPGS	2040,1949	22
KGMTGS	579,6690	6
PGPDGKTGPS	911,9670	10
GAGGQDGRPGPPGP	1219,2790	14
VGARGQPG	740,8172	8
PGPKGAAGEGGKPGERG	1521,6529	17
VMGP	402,5090	4
VGAPGKDGD	814,8503	9
VGAPGAPGAAGPS	1008,0989	13
GERGEQGAGGPPGF	1315,3646	14
PGPQGAIGETGKPGEQGL	1692,8459	18
PGEGGAPGAAGS	926,9382	12
RGDRGF	706,7592	6
PGERGAPGPS	923,9810	10
GPAGARGS	671,7109	8
QGMPGERGAGGL	1129,2559	12
KGDRGDQG	831,8404	8
VKGADGAGGKDGIRGMTGPIGPNGPAGS	2494,7647	28
PGDKGETG APGPGGPTGARGAPGERGES	2519,6267	29
GAPGPAGF	672,7385	8
PGAAGR	527,5808	6
GNNGPPGPPGPGGKEGQKGNRGETGPS	2500,6265	27
GRPGEL	627,6981	6
PGQRGERGF	1003,0854	9
GEPGKQPGGSPS	1067,1233	12
AGAPGES	587,5870	7
GREGTPGNEGS	1060,0451	11
GRDGAAGPKGERGES	1443,4959	15
GAAGAS	432,4336	6
GAPGPPGAPGP	873,9639	11
VGPAGKS	614,6994	7
GPAGPAGIAGPAGPRGPS	1486,6504	18
GPAGPRGPS	794,8655	9

PGPIGPPGPRGRS	1244,4189	13
GPPGPPGPPGPPGPPGGGF	1592,7740	19
RADDAN	660,6413	6
VMRDRDL	904,0520	7
VDTTL	547,6060	5
QQIENIRS	987,0804	8
KMCHPDW	916,0803	7
IDPDQGCTQDAIK	1403,5266	13
CNMETGETC	987,0823	9
PTEAEIPKKS	1099,2493	10
KNIKEKKH	1024,2314	8
GEAMTDGF	826,8762	8
VNIQL	585,7011	5
MATEAS	608,6642	6
HCKNS	587,6512	5
MDQQS	607,6360	5
HTGAW	570,6053	5
KTTKTS	664,7569	6
PIIDIAPMD	984,1754	9
VGAPNQEF	860,9218	8
VKCQDEDQDPGS	1320,3502	12
CMQDGQS	767,8267	7
KPEPCRIC	945,1627	8
GECCPIC	723,8751	7
VRDGEAPPS	926,9817	9
GAPGAKGQKGEPGDITD	1597,7018	17
VGPRGPGGPL	906,0524	10
AAQMAGGF	751,8553	8
GAPGPQGF	729,7904	8
QGNPGEAGEPGS	1099,0787	12
GPRGPPGPS	820,9034	9
GKPGDDGEAGKPGKGGGERGPS	1953,0555	21
GPQGRGF	818,8875	8
PGTPGL	540,6169	6
PGERGRPGPS	1009,0897	10
GPAGPPGP	648,7165	8
VGAPAGPGF	771,8711	9
GTPGS	417,4190	5
AGAPGIAGAPGF	985,1074	12
GPKGTS	545,5931	6
GDPGIPGF	758,8289	8

KGEAGPKGEL	985,1050	10
GPAGPQGAL	766,8520	9
PGQDGL	585,6144	6
AGPKGAPGERG	996,0909	11
GPKGAGGDPGRPGEPGL	1518,6492	17
TGRPGDTGPQ GK	1170,2473	12
VGPGGAAGEDGRPGPPGPMGARGQPG	2299,5058	26
PGKDGETGAAGPPGPAGPAGERGEQQPGPS	2783,9077	31
VPGECCAAGATGPRGERGF	1742,8686	19
PERGGAGPQGL	1095,1800	12
QGPRGL	626,7133	6
GAQPPGL	695,7732	8
QGMPGERGAS	989,0709	10
GIPGPKGDRGDNGEKGP EGAS	1995,0927	21
GKDGS	462,4599	5
TGPIGPPGPAGPNGEKGES	1718,8405	19
GAAGARGAPGDRGETGPPGPAGF	2023,1520	23
AGPPGS	484,5094	6
DGQPGAKGEQGEQQKGDAGAPGPQGPS	2534,5948	28
GAPGPS	484,5094	6
GPTG	330,3408	4
GPKGARGAQGPPGATGF	1525,6871	17
PGAAGR	527,5808	6
GPAGKDGPKG	882,9718	10
VRGDGGPPGRQGDAGL	1508,6137	16
RGAAGAPGEKGDAGEDGPS	1698,7232	19
GPDGPS	528,5192	6
PGQRGERGF	1003,0854	9
GEPGKQGAPGGS	1041,0854	12
VGPPGL	538,6444	6
TGPAGETGREGNAGS	1360,3597	15
TGIKDRGNTGPAGAPGS	1612,7194	18
PGANGS	501,4965	6
VGPTGKQGDRGEAGAQQGPAGPS	1994,1080	22
PGPPGQS	638,6780	7
GDQGAS	533,4953	6
GPAGPS	484,5094	6
RGPPGP	579,6566	6
GETGPS	546,5345	6
GPPGNS	527,5344	6
QPEKS	587,6304	5

MRADQAS	777,8504	7
RTHDAE	727,7318	6
PKPAS	498,5797	5
VQMTF	624,7528	5
VEIRAEGNS	974,0384	9
QTEAEGCS	823,8297	8
CEGKCDCS	843,9399	8
PGIPGQDGPPGS	1078,1465	12
KGDKGF	650,7324	6
PGPPGPKGEKGDRL	1404,5888	14
EKGDKGQQGF	1093,1612	10
VKGEQPPGPRGKPGKGDNGF	2194,3915	22
HGTPGEKGERGPPANGDGAPGPPGPPGL	2573,7641	28
PGIQGAL	654,7640	7
EKGPPGPPGPPGL	1199,3720	13
KGEPAREGIKGDRL	1582,7799	15
PGPRGQS	697,7488	7
QGDRGL	644,6852	6
QGDPMMPGF	904,9928	9
GKPGIPGPKGEPPGQGL	1488,7066	16
VGPTGIPGQEGHTGPPGAQGIQGDPPGQHGGTGGPPGPPGAGEPGAPGPIGPPGEPGPF	5355,7849	60
PGRPGPAGRDGF	1183,2919	12
QGPPGNMS	786,8577	8
PGPTGEKGES	957,9927	10
PGTPGS	514,5357	6
KGDKGS	590,6340	6
IKGES	532,5943	5
PGGQGPQGP	793,8343	9
PGPPGPDG	692,7263	8
VPTTL	529,6341	5
VCMKRT	736,9459	6
MRKHRML	971,2500	7
DAQEEAQES	1005,9475	9
VGAANF	577,6377	6
VIEGL	529,6340	5
ENKAA	531,5662	5
VKTIQF	734,8937	6
KEANL	573,6468	5
AGDRAL	601,6602	6
VGGMATAEL	847,9818	9
ETIATDKS	863,9200	8

MGDQL	562,6384	5
VTQGTI	617,7000	6
VQNEF	635,6744	5
VGKRDIIF	947,1453	8
TMGATTIN	807,9170	8
KPRPGQ	681,7928	6
VRTNML	732,8962	6
RADKGS	632,6743	6
RIQQG	600,6754	5
VGQAAEAL	757,8417	8
KTADEQEL	932,9829	8
KQIAF	605,7348	5
RNPGMI	686,8271	6
VEITT	561,6329	5
VQTQR	630,7018	5
IGGANL	543,6204	6
VRPDR	641,7281	5
VRIGL	556,7060	5
NTHNTKQD	956,9675	8
RQRQG	643,7035	5
ITGGPS	530,5784	6
VKKIADK	800,9969	7
VEQIMTPL	930,1272	8
VGDTDIS	705,7196	7
VRGERD	730,7788	6
VRADF	606,6793	5
VIEPL	569,6988	5
DIGQDR	702,7219	6
ERPAPNF	829,9108	7
KNKAE	588,6615	5
AGGRNL	586,6485	6
NTGMAL	605,7068	6
MKDTIL	719,8944	6
RAAQN	558,5948	5
VQQRL	642,7561	5
PKEEL	614,6964	5
VHAIS	525,6053	5
VHTDA	541,5614	5
VKRDI	629,7574	5
DGTRS	534,5265	5
VEENRDR	916,9462	7

ADKPEAHF	913,9854	8
HKTKDAIINA	1110,2784	10
KMRHKGGRS	1056,2541	9
NTGAAL	545,5930	6
VPQIL	568,7140	5
VKGPA	470,5693	5
VG DAN	474,4709	5
PTIQPQL	795,9339	7
KDTEES	707,6922	6
VTPGIPDL	810,9456	8
MEMQRW	880,0473	6
KTKRW	717,8692	5
VRAAEP	641,7251	6
VRKTS	589,6927	5
CTNRRAS	806,8949	7
APTKQL	656,7800	6
RPKAGL	640,7836	6
ADGKW	575,6218	5
VEKKT	603,7166	5
VDCKQKITKPL	1272,5688	11
INTNGIT	731,8037	7
QGDIQQL	800,8666	7
PDCETPHGHS	1079,1089	10
TTADDL	634,6408	6
VEGTQTQS	848,8650	8
PIATS	487,5534	5
GPNEA	486,4819	5
QEPTGAPEAGL	1069,1362	11
PNHMDT	713,7631	6
VPAETEEF	920,9715	8
VAGGGEKGEKGEPA	1285,3763	14
VIEPGML	757,9433	7
IEGPPGPAGPAGL	1132,2815	13
QGPPG	454,4831	5
AGADGL	502,5246	6
P G P P G T M L	768,9262	8
GGDGEKGP	715,7177	8
AQEAQAQAIL	1042,1568	10
AMRGPS	617,7209	6
GPMGL	473,5877	5
GDPGPQGPRG	936,9797	10

AGQIGKS	659,7402	7
GKRGRGGADGARGMPGES	1715,8643	18
KGDRGF	678,7458	6
GPPGAPGEDGQRGEDGEIGPRGL	2218,3242	23
GPRGL	498,5826	5
GPRGPPGPTGQPG	1174,2815	13
PGPQGPPIGPPGEKGPQGRS	1813,0029	19
DGPPGHPGKEGPPGEKGAL	1796,9572	19
PGPRG	482,5399	5
VKGADG	545,5931	6
KGGKGEKGEDGF	1208,2932	12
KGDMGL	619,7337	6
KGDRGEL	773,8441	7
GPRGEDGPEGPKGRAGPNGES	2021,0903	21
GPMGAAGEKGL	1115,3128	12
PGRQGPKGS	882,9748	9
PGANGEKGARG	1013,0780	11
GPKGPPGPPGKDGL	1273,4544	14
PGHPGQRGETGF	1239,3127	12
VGPQGPTGETGPIGERGHPGPPGPPGEQGL	2830,0659	30
AGKEGAKGDPGPQGAS	1426,5057	16
GKDGPAGL	713,7885	8
PGERGL	627,6981	6
GPAGL	413,4739	5
KGGEGPQGPS	912,9547	10
PGERGAAGPAGPIGL	1319,4830	15
GRTGPQGPPGPAGEKGGPGEKGPQGPAGRDG	2824,0218	31
PGPAGPQPPGEDGDKGE	1661,7019	18
VGEPGQKGS	857,9187	9
KADKGEQPPGPAGL	1421,5729	15
GQKGDEGS	776,7580	8
PGPPGPIGL	803,9565	9
PGPPGEKGENGD	1153,1704	12
VGPMGPPGPPGPRGPQGPS	1738,9818	19
GADGAQPPGG	882,8850	11
VGEKGENCEAGNPGTPGEPGTGGPKGERGDKGEAGPPGAAGPAGAKGPPGDDGPKGNPGP	5368,6493	60
AGEKGEDGES	977,9371	10
GQPGPPGPS	792,8466	9
GPPGPPGKRPPGTAGAEGRQGEKGAKGES	2785,0286	30
VGPQGPS	640,6939	7
GKPGPEGL	753,8533	8

RGIPGP	595,6993	6
VGEQGL	601,6572	6
GQDGPPGPMGPPGL	1276,4295	14
KGDPGTKGEKGHS	1297,3903	13
IGPPGEQGEKGDRGL	1509,6388	15
PGPQGS	541,5613	6
PGGKGDGGIS	843,8917	10
GPPGPPGL	690,7971	8
PGPGGPKGS	752,8252	9
VIQPL	568,7140	5
GEGMEDIF	896,9672	8
MGTQNNPARTCKDL	1548,7521	14
AHPEF	599,6439	5
IDPNQGCS	832,8833	8
PDRKS	601,6603	5
KRGKL	600,7622	5
VDAAGNTINE	1003,0335	10
VQMTF	624,7528	5
ARQNF	634,6926	5
NCHQS	587,6078	5
HDETTDS	803,7374	7
NDEEL	618,5980	5
VIEINTPKIDQ	1269,4605	11
VPIID	555,6719	5
VRCPS	560,6690	5
PQTARHNITGF	1241,3719	11
GKTAL	488,5845	5
IHPTDQ	709,7568	6
KKKTL	616,8020	5
NGPEATL	700,7464	7
RARGADPL	854,9644	8
VQQGAAS	659,6969	7
EPRGEL	699,7617	6
PTEGHTL	753,8100	7
GIRATDAAP	870,9608	9
VEMDIQQ	861,9653	7
QEACCEIPGARCPPGAL	1714,9899	17
RRAAENDPEQQ	1313,3493	11
GTCKEGRMGQKGEKGES	1781,9764	17
VGHKGDKGQKGDIGL	1508,6974	15
VGPKGQKGTS	958,0824	10

GPEGL	471,5106	5
AGEPGKPGL	824,9321	9
PGIGKPGL	737,8972	8
PGTPGGPPGS	822,8729	10
KGDKGHS	727,7751	7
HGKTGPKGEPG	1064,1661	11
VPGIGDPGL	823,9443	9
VKGEKGDAC	977,1003	10
VCPTL	531,6678	5
EIPAANL	726,8276	7
VAMEQTL	790,9299	7
KGERGKPGL	941,0982	9
GQKGEQGEPEG	986,0060	10
RKEKGNTGGKGADGKTGKAGPRGPS	2340,5410	25
GKDGL	488,5411	5
KGIKGDPIGGL	1151,3712	12
GTPGPKGEKGAS	1085,1820	12
AGETGPPGPAGPAGEGTDGKQG	1907,9682	22
VPGRDGL	712,8038	7
RKEKGDQGEQGDQGL	1573,5960	15
AGTHGTQGL	840,8911	9
PGEPGRDGL	896,9553	9
KGEKGEACES	1037,1095	10
GQQMG	519,5730	5
VGGMQGPKGERGDPGPPGEGKAGKHGKPGL	2853,2083	30
VQGPPIGQKGS	970,0933	10
QGDTG	476,4434	5
VGIPGPQGAEGPRGL	1404,5887	15
VAGPQGIRGL	967,1360	10
VGPAGDMGPKGEEGPPGPQGPMG	2119,3516	23
VTGPPGKDGKGG	1156,2608	13
GIPGADGRDGTGAKGDKGEPGDCNCIS	2662,7991	28
TGTGGPGAPGL	985,0616	12
GGNTW	533,5411	5
QGPPGPPGPPGPPGQGF	1637,8149	18
VPGQPGL	666,7751	7
PGRTHL	679,7769	6
PQDEDPS	786,7502	7
VCEDCS	654,7077	6
VPGMAGTKGEKGDGKTGIGNA S	2161,3715	24
DGCERCF	828,9129	7

RGDGK	531,5692	5
VPGMAGTKGEKGDEGKTGIGNAS	2161,3715	23
EAAQAPTTTTNADGANGGCS	1864,8718	20
GPGTPGHPGTPGTPGS	1373,4447	16
PGIRGETGPQQQRQAG	1665,7859	17
VPGNMGPPGF	972,1266	10
PGPQGS	541,5613	6
TGQQGERGTAGPPG	1312,3615	14
MGPPGL	570,7044	6
KGERGTPGS	887,9480	9
AGTKGES	648,6707	7
QGKAG	459,5026	5
VAGPKGEAGL	898,0268	10
DGPKGDQGS	859,8478	9
QQQPGF	632,6737	6
PGTPGPPGPPGKQREGPPGPKADKGNDAQGPQGS	3345,5924	36
GPPGS	413,4306	5
QGPPGF	601,6597	6
DGKDGPGRGEPGIPGT	1768,9622	18
VGPRGIPGF	899,0604	9
KGKHGH	662,7494	6
PGQKGDAGP	825,8765	9
VGPPGTAGRPGL	1078,2363	12
EGDAGAPGPQGRPPGQL	1757,8801	19
AGAAGPPGPAGPAG	1047,1355	14
VGIKGEKQAADRGL	1498,7023	15
VGPAGPPGHPGMMGEPGS	1631,8415	18
DGAAGKDGS	776,7580	9
KADAPMMGQ	948,1200	9
VGPRGERGTPGS	1169,2626	12
PGPPGIPGNDP	1017,1062	11
DNIKDF	750,8063	6
VIKIF	618,8173	5
RIPQQEES	1083,1661	9
PGRPGPPGKDGNDGTPGAPGQPGQMGREGRHGPL	3612,9473	37
GPQGPRGL	780,8819	8
KGEKGDKG	817,8973	8
VGEMGDS	693,7265	7
GPPGAPG	551,5998	7
GKMGPS	575,6806	6
VGQQGIPG	754,8410	8

GTPGQPGQKGREGRCNPS	1825,9767	18
QPIEW	671,7507	5
GAQRTRS	774,8349	7
PTAITRTL	872,0323	8
DAHIEAPTGS	997,0293	10
RANNAF	691,7445	6
TAEKTS	635,6720	6
VHDGRQHS	934,9669	8
VRPRS	613,7177	5
HADCGA	572,5932	6
VQQREQTL	1001,1074	8
GRMNS	563,6292	5
KAAQF	563,6542	5
KRQCRL	802,9932	6
HTQQTS	700,7061	6
TPAGS	431,4459	5
APTPS	471,5107	5
VRIQTQS	830,9394	7
VTAGHNS	684,7067	7
GITRRS	688,7848	6
PTRRS	615,6902	5
ENDMEERS	1009,0124	8
PRRPQPF	897,0476	7
TTDTPGIKS	918,9994	9
VKQTHL	724,8582	6
KDGQRNS	803,8300	7
QPTDHL	709,7568	6
RPNGTTL	757,8447	7
PGPKGEPGPPGPS	1173,2908	13
GPPGL	439,5118	5
PGPAGKRGARGPTGPHGNPGL	1951,1781	21
PGPKGS	541,6047	6
PGQAPPDKGDRGPQGL	1646,7799	17
PGPDGF	588,6176	6
PGPQQQPGEQGIPGL	1431,5679	15
PGRQGL	626,7133	6
AGPEGNPGPKG	980,0451	11
IGPPGIAGS	767,8801	9
AGQEGERGIPGP	1167,2436	12
VGKTGPKGKQG	1056,2302	11
VGERGPPGPDGDEGP	1435,4698	15

VGGTGMGGF	781,8816	9
RGDPGPEGQRGL	1238,3254	12
VGTMGL	576,7087	6
KGDKGEPGL	899,9993	9
RGEPGKF	789,8894	7
QGDKGAAGL	815,8813	9
PGPPGL	536,6285	6
GKTGPPGKMGDIGPQPPGPPGPEGF	2429,7326	26
PGDIG	457,4837	5
VPGPNGPPGPKGL	1186,3762	13
QGARGPQRPPGPKGIEGDEGPL	2213,4378	22
GPEGL	471,5106	5
KGETGEL	732,7886	7
GKNGPQGPAGL	995,1030	11
VGEAGEKGGRRGPAGPL	1451,6022	16
GPPGEKGS	727,7721	8
PGGPGAF	601,6597	7
GPQQRGTPG	954,0102	10
KGRRGPRGAEGPL	1350,5465	13
GEPGPEGTKGEQEGGKKGEPGF	2229,3446	23
IGKAGGPGERGL	1111,2661	12
PGKPGKAGIPGS	1065,2375	12
TGERGAHGEPGPKGPTGD	1719,7880	18
VGPDGEQGPPEG	1041,0391	11
VPGGEGEPGP	894,9365	10
VGEPGIKGD	870,9578	9
GGEGEQQQGMRS	1320,3561	13
PGPAGEDGPL	908,9633	10
GKDGPKGEPGDRGPMGEAGDRGIEGDPGL	2822,0153	29
PGATGL	514,5790	6
AGKCGF	581,6873	6
PGPEGKQGPL	979,1007	10
GNRGRHGK KGEAGKPGHIGETGDIGDIGQKGGTGL	3412,7295	36
TGHAGKPGS	810,8649	9
PGEDS	503,4661	5
GPAGPL	510,5906	6
QGHIGTS	698,7335	7
GHRGA	496,5264	5
PGTPGEPGEQGPKGEMGTQGL	2024,1895	21
EGKKG	517,5827	5
TGTAG	405,4080	5

VEGAIGL	657,7647	7
AGPDGL	528,5625	6
PGKAGRQQQRGT	1212,3339	12
VGQEGAAGL	800,8667	9
GMIGF	523,6476	5
HGEMGPQGPQGHGPRGL	1808,9920	18
PGAPGL	510,5906	6
GTRENPARG	1047,1386	9
VDIQEPPS	883,9536	8
THTARGQRRRRKGQRDDNQ	2237,3857	19
QNEGKIL	800,9100	7
VEIMF	637,7919	5
EKAKL	587,7171	5
EKQKDF	793,8748	6
MQIQAAAGW	904,0513	8
RETAANS	747,7629	7
VDHPRS	709,7599	6
VTAAS	447,4887	5
EAKNHNIRL	1094,2386	9
PRDMPTNARL	1170,3519	10
CDKGERGPPGS	1102,1870	11
AQPGS	458,4715	5
DGTPGPKGF	874,9487	9
VPGMKGDQGPDPGPPGPRGPRGEQGL	2456,7184	25
GGPGDQGPEGL	983,0023	11
VTGPPGDTGIGF	1117,2236	12
PGPKGNKGNQGRPGTGMGMGDPGL	2474,7948	26
PGPIGPPG	690,7971	8
VQGTQGF	735,7947	7
EGPKGTRGTPGS	1143,2217	12
KGDKGNTGAPGL	1114,2234	12
PGAGIQGEKGDS	1115,1648	12
PGPRGPPGL	846,9846	9
VGPKGDQGF	903,9902	9
VGEPGS	544,5620	6
KGEPGPDGS	842,8607	9
GIPGIPGEDGA	982,0579	11
VGPKGEIGL	869,0286	9
VGPAGAKGEPGS	1026,1142	12
GMMGL	507,6636	5
PGPPGRGL	749,8679	8

VGDPG	443,4569	5
VGIAGL	528,6492	6
VGPPGL	538,6444	6
TGPQGL	571,6309	6
PGQPGL	696,7580	7
GPEGKGL	656,7366	7
PGPKGERGS	883,9596	9
PGPTGPPGIGL	962,1135	11
GIPGEGIQGPKGEPGF	1539,7079	16
EGPKGPRGPPGDGF	1367,4838	14
PGEKGMGIL	1016,1772	10
GDRGKKGDKGEF	1293,4019	12
GEPGS	445,4294	5
IGPMGKS	688,8400	7
EKGDPGL	714,7733	7
VIKIRES	957,1813	8
VKCRS	720,8419	6
VGPNF	661,7123	6
VNREAS	674,7116	6
QNDIKAA	758,8294	7
GEGTF	509,5162	5
VQPEDAAREHTAGIEMF	1972,1597	18
VNKKDPL	812,9645	7
EMIAIAS	733,8779	7
QICEHNDGTL	1129,2095	10
IPNPMPTL	882,0856	8
VPDRGGIPDF	1072,1857	10
RRPGPIF	939,1282	8
RAPES	558,5919	5
PDIMTAAS	804,9134	8
GGQGGKQPP	953,0224	10
VGPQTPQTPTNW	1325,4435	12
IPKTTQL	799,9657	7
DPEANS	631,5968	6
GGCQGNQF	981,0072	10
EAGCRS	621,6659	6

ANEXO 2: Resultados de la predicción bioinformática

Tabla 10: Valores de carga, hidrofobicidad, masa molecular y grupo, obtenidos de la predicción bioinformática.

Secuencia	Charge	Hidrophobicity	MW	Group
TSSSLNMAVRGGLTR	1,9980	0,2100	1549,7654	Control
VAAGRTDAGVH	0,0893	0,1509	1053,1429	Control
VDIRL	-0,0016	0,0820	614,7427	Tipo 1
ARGQGEDDRTAGS	-0,9994	0,5892	1319,3102	Tipo 1
KPEPCQIC	-0,1245	-0,0500	917,1059	Tipo 1
VMCDE	-2,0618	-0,0400	595,6833	Tipo 1
DCPNP	-1,0635	-0,1860	544,5798	Tipo 1
VIPHDECCPICPDDGF	-4,0939	-0,3156	1759,9840	Tipo 1
VEGPQGDRGAKGEPGPAGF	-0,9983	0,1179	1825,9554	Tipo 1
PGNDGIPGQPGL	-1,0016	-0,1700	1121,2148	Tipo 1
PGPPGPPGPPGL	-0,0020	-0,5825	1039,1991	Tipo 1
GGGMS	-0,0020	-0,1580	407,4417	Tipo 1
MPGPMGPMGPRGPPGPPGS	0,9980	-0,3611	1774,1037	Tipo 1
GPQGF	-0,0020	-0,2800	504,5430	Tipo 1
TGPPGEPGEAGS	-1,9985	0,0192	1055,0660	Tipo 1
GPMGPRGPAGP PGKNGDDGES	-0,9996	0,0819	1950,0697	Tipo 1
GPQGARGF	0,9980	0,0050	788,8612	Tipo 1
PGTPGL	-0,0020	-0,3817	540,6169	Tipo 1
PGIKGHRGF	2,0886	0,0467	968,1263	Tipo 1
GPAGPKGEAGAS	-0,0005	0,0283	998,0604	Tipo 1
PGGPGAKGE	-0,0005	0,0511	768,8246	Tipo 1
RGEAGNPGPAGAAGPAGNNGADGNPGTKGAPGS	-0,0001	0,0739	2801,8854	Tipo 1
GIAGAPGF	-0,0020	-0,4963	688,7812	Tipo 1
PGPRGPPGQAGGAPGPKGNTGE	0,9995	0,0021	2110,2735	Tipo 1

VGATGAKGEAGAKGES	0,0009	0,2819	1389,4850	Tipo 1
VQGPAGPAGEEGKRGGRGEPGS	0,0030	0,2727	2050,1752	Tipo 1
AGARGAPGERGAPGS	0,9998	0,1300	1310,3920	Tipo 1
DGAAGPKGGPGERGGAG	-0,0001	0,1153	1410,4659	Tipo 1
VAGAKGNTGEPGRNGEPGMPGS	0,0012	0,1609	2040,1949	Tipo 1
KGMTGS	0,9977	0,2833	579,6690	Tipo 1
PGPDGKTGPS	-0,0019	0,0830	911,9670	Tipo 1
GAGGQDGRPGPPGP	-0,0016	-0,0321	1219,2790	Tipo 1
VGARGQPG	0,9980	0,1338	740,8172	Tipo 1
PGPKGAAGEGKPGERG	1,0009	0,2176	1521,6529	Tipo 1
VMGP	-0,0020	-0,5100	402,5090	Tipo 1
VGAPGKDGD	-1,0014	0,1578	814,8503	Tipo 1
VGAPGAPGAAGPS	-0,0020	-0,3038	1008,0989	Tipo 1
GERGEQGAGGPPGF	-0,9985	0,0821	1315,3646	Tipo 1
PGPQGAIGETGKPGEQGL	-0,9988	0,0844	1692,8459	Tipo 1
PGEGGAPGAAGS	-1,0002	-0,1267	926,9382	Tipo 1
RGDRGF	0,9984	0,4667	706,7592	Tipo 1
PGERGAPGPS	-0,0002	0,0460	923,9810	Tipo 1
GPAGARGS	0,9980	0,0650	671,7109	Tipo 1
QGMPGERGAGGL	-0,0002	0,0408	1129,2559	Tipo 1
KGDRGDQG	-0,0014	0,7263	831,8404	Tipo 1
VKGADGAGGKDGIKRGMTGPIGNPAGS	0,9983	0,0507	2494,7647	Tipo 1
PGDKGETG APGPGGPTGARGAPGERGES	-0,9965	0,1886	2519,6267	Tipo 1
GAPGPAGF	-0,0020	-0,4938	672,7385	Tipo 1
PGAAGR	0,9980	0,0433	527,5808	Tipo 1
GNNGPPGPPGPGGKEGQKGNRGETGPS	1,0009	0,2256	2500,6265	Tipo 1
GRPGEL	-0,0002	0,1450	627,6981	Tipo 1
PGQRGERGF	0,9998	0,3722	1003,0854	Tipo 1

GEPGKQGGGPS	-0,0005	0,1117	1067,1233	Tipo 1
AGAPGES	-1,0002	-0,0029	587,5870	Tipo 1
GREGTPGNEGS	-0,9985	0,4255	1060,0451	Tipo 1
GRDGAAGPKGERGES	0,0017	0,4613	1443,4959	Tipo 1
GAAGAS	-0,0020	-0,1183	432,4336	Tipo 1
GAPGPPGAPGP	-0,0020	-0,4482	873,9639	Tipo 1
VGPAGKS	0,9977	0,0543	614,6994	Tipo 1
GPAGPAGIAGPAGPRGPS	0,9980	-0,2372	1486,6504	Tipo 1
GPAGPRGPS	0,9980	-0,0789	794,8655	Tipo 1
PGPIGPPGPRGRS	1,9980	-0,0769	1244,4189	Tipo 1
GPPGPPGPPGPPGPPGGGF	-0,0020	-0,5374	1592,7740	Tipo 1
RADDAN	-1,0011	0,6267	660,6413	Tipo 1
VMRDRDL	-0,0011	0,4471	904,0520	Tipo 1
VD TTL	-1,0016	0,1140	547,6060	Tipo 1
QQIENIRS	-0,0002	0,6163	987,0804	Tipo 1
KMCHPDW	0,0271	-0,1871	916,0803	Tipo 1
IDPDQGCTQDAIK	-2,0629	0,2454	1403,5266	Tipo 1
CN METGETC	-2,1224	0,1578	987,0823	Tipo 1
PTEAEIPKKS	0,0009	0,4250	1099,2493	Tipo 1
KNIKEKKH	3,0895	1,0363	1024,2314	Tipo 1
GEAMTDGF	-1,9998	-0,0175	826,8762	Tipo 1
VNIQL	-0,0020	-0,0720	585,7011	Tipo 1
MATEAS	-1,0002	0,1583	608,6642	Tipo 1
HCKNS	1,0266	0,4320	587,6512	Tipo 1
MDQQS	-1,0016	0,5400	607,6360	Tipo 1
HTGAW	0,0889	-0,2180	570,6053	Tipo 1
KTTKTS	1,9974	0,9517	664,7569	Tipo 1
PIIDIAPMD	-2,0011	-0,3544	984,1754	Tipo 1

VGAPNQEF	-1,0002	0,0088	860,9218	Tipo 1
VKCQDEDQDPGS	-3,0612	0,4633	1320,3502	Tipo 2
CMQDGQS	-1,0635	0,2129	767,8267	Tipo 2
KPEPCRIC	0,8755	0,0463	945,1627	Tipo 2
GECCPIC	-1,1862	-0,5229	723,8751	Tipo 2
VRDGEAPPS	-0,9998	0,2156	926,9817	Tipo 2
GAPGAKGQKGEPGDITD	-0,9999	0,2535	1597,7018	Tipo 2
VGPRGPGGPL	0,9980	-0,2520	906,0524	Tipo 2
AAQMAGGF	-0,0020	-0,2738	751,8553	Tipo 2
GAPGPQGF	-0,0020	-0,3225	729,7904	Tipo 2
QGNPGEAGEPGS	-1,9985	0,1883	1099,0787	Tipo 2
GPRGPPGPS	0,9980	-0,1322	820,9034	Tipo 2
GKPGDDGEAGKPGKGGERGPS	0,0015	0,3595	1953,0555	Tipo 2
GPQGTRGF	0,9980	0,1175	818,8875	Tipo 2
PGTPGL	-0,0020	-0,3817	540,6169	Tipo 2
PGERGRPGPS	0,9998	0,2600	1009,0897	Tipo 2
GPAGPPGP	-0,0020	-0,4688	648,7165	Tipo 2
VGPAGAPGF	-0,0020	-0,4833	771,8711	Tipo 2
GTPGS	-0,0020	-0,0040	417,4190	Tipo 2
AGAPGIAGAPGF	-0,0020	-0,4517	985,1074	Tipo 2
GPKGTS	0,9977	0,2800	545,5931	Tipo 2
GDPGIPGF	-1,0016	-0,4213	758,8289	Tipo 2
KGEAGPKGEL	0,0009	0,3140	985,1050	Tipo 2
GPAGPQGAL	-0,0020	-0,2800	766,8520	Tipo 2
PGQDGL	-1,0016	-0,0433	585,6144	Tipo 2
AGPKGAPGERG	0,9995	0,1873	996,0909	Tipo 2
GPKGAGGDPGRPGEPGL	-0,0001	0,0035	1518,6492	Tipo 2
TGRPGDTGPQ GK	0,9981	0,3833	1170,2473	Tipo 2

VPGGAAGEDGRPGPPGPMGARGQPG	0,0002	-0,0469	2299,5058	Tipo 2
PGKDGETGAAGPPGAPAGERGEQQPGPS	-1,9965	0,1035	2783,9077	Tipo 2
VPGECCAAGATGPRGERGF	0,0015	0,0763	1742,8686	Tipo 2
PGERGGAGPQGL	-0,0002	0,0392	1095,1800	Tipo 2
QGPRGL	0,9980	0,1333	626,7133	Tipo 2
GAQPPGL	-0,0020	-0,2813	695,7732	Tipo 2
QGMPGERGAS	-0,0002	0,2330	989,0709	Tipo 2
GIPGPKGDRGDNGEKGPEGAS	-0,9982	0,2881	1995,0927	Tipo 2
GKDGS	-0,0019	0,5220	462,4599	Tipo 2
TGPIGPPGAPNGEKGES	-0,9988	0,0079	1718,8405	Tipo 2
GAAGARGAPGDRGETGPPGAPGF	0,0002	-0,0309	2023,1520	Tipo 2
AGPPGS	-0,0020	-0,2783	484,5094	Tipo 2
DGQPGAKGEQEGGQKGDAGAPGPQGPS	-1,9982	0,2418	2534,5948	Tipo 2
GAPGPS	-0,0020	-0,2783	484,5094	Tipo 2
GPTG	-0,0020	-0,1100	330,3408	Tipo 2
GPKGARGAQPPGATGF	1,9977	-0,0088	1525,6871	Tipo 2
PGAAGR	0,9980	0,0433	527,5808	Tipo 2
GPAGKDGPKG	0,9978	0,1800	882,9718	Tipo 2
VRGDGGPPGRQGDAGL	-0,0011	0,1394	1508,6137	Tipo 2
RGAAGAPGEKGDAGEDGPS	-1,9979	0,2321	1698,7232	Tipo 2
GPDGPS	-1,0016	-0,0983	528,5192	Tipo 2
PGQRGERGF	0,9998	0,3722	1003,0854	Tipo 2
GEPGKQGAPGGS	-0,0005	0,1517	1041,0854	Tipo 2
VGPPGL	-0,0020	-0,5533	538,6444	Tipo 2
TGPAGETGREGNAGS	-0,9985	0,3073	1360,3597	Tipo 2
TGIKDRGNTGPAGAPGS	0,9981	0,1722	1612,7194	Tipo 2
PGANGS	-0,0020	-0,0183	501,4965	Tipo 2
VGPTGKQGDRGEAGAQQPAGPS	-0,0001	0,1918	1994,1080	Tipo 2

PGPPGQS	-0,0020	-0,1500	638,6780	Tipo 2
GDQGAS	-1,0016	0,2900	533,4953	Tipo 2
GPAGPS	-0,0020	-0,2783	484,5094	Tipo 2
RGPPGP	0,9980	-0,1167	579,6566	Tipo 2
GETGPS	-1,0002	0,1917	546,5345	Tipo 2
GPPGNS	-0,0020	-0,0983	527,5344	Tipo 2
QPEKS	-0,0005	0,7280	587,6304	Tipo 2
MRADQAS	-0,0016	0,4186	777,8504	Tipo 2
RTHDAE	-0,9089	0,7483	727,7318	Tipo 2
PKPAS	0,9977	0,0700	498,5797	Tipo 2
VQMTF	-0,0020	-0,1660	624,7528	Tipo 2
VEIRAEGNS	-0,9985	0,4267	974,0384	Tipo 2
QTEAEGCS	-2,0604	0,3763	823,8297	Tipo 4
CEGKDCS	-1,1860	0,0988	843,9399	Tipo 4
PGIPQDGPPGS	-1,0016	-0,1733	1078,1465	Tipo 4
KGDKGF	0,9978	0,4100	650,7324	Tipo 4
PGPPGPKGEKGDRL	0,9996	0,1793	1404,5888	Tipo 4
EKGDKGQQGF	-0,0004	0,5670	1093,1612	Tipo 4
VKGEQPPGPRGKPGKGDNGF	0,9998	0,2600	2194,3915	Tipo 4
HGTPGEKGERGPPANGDGAPPPGPPGL	-0,9074	-0,0229	2573,7641	Tipo 4
PGIQGAL	-0,0020	-0,3014	654,7640	Tipo 4
EKGPPGPPGPPGL	-0,0005	-0,2592	1199,3720	Tipo 4
KGEPAREGIKDRGL	1,0014	0,4507	1582,7799	Tipo 4
PGPRGQS	0,9980	0,2243	697,7488	Tipo 4
QGDRGL	-0,0016	0,3933	644,6852	Tipo 4
QGDPMMPGF	-1,0016	-0,2478	904,9928	Tipo 4
GKPGIPGKGEPPGQGL	0,9992	-0,0100	1488,7066	Tipo 4
VGPTGIPQEGHTGPPGAQGIQGDPPGPPQHGGTGGPPGPPGAGEPGAPGPIGPPGEPGPF	-3,8144	-0,1773	5355,7849	Tipo 4

PGRPGPAGRDGF	0,9984	-0,0033	1183,2919	Tipo 4
QGPPGNMS	-0,0020	-0,0275	786,8577	Tipo 4
PGPTGEKGES	-0,9988	0,3110	957,9927	Tipo 4
PGTPGS	-0,0020	-0,1283	514,5357	Tipo 4
KGDKGS	0,9978	0,7183	590,6340	Tipo 4
IKGES	-0,0005	0,4720	532,5943	Tipo 4
PGGQPQGP	-0,0020	-0,0767	793,8343	Tipo 4
PGPPGPDG	-1,0016	-0,3338	692,7263	Tipo 4
VP TTL	-0,0020	-0,1980	529,6341	Tipo 4
VCMKRT	1,9357	0,3367	736,9459	Tipo 4
MRKHRML	3,0886	0,4514	971,2500	Tipo 6
DAQEEAQES	-3,9962	0,7111	1005,9475	Tipo 6
VGAANF	-0,0020	-0,2867	577,6377	Tipo 6
VIEGL	-1,0002	-0,2520	529,6340	Tipo 6
ENKAA	-0,0005	0,6280	531,5662	Tipo 6
VKTIQF	0,9977	0,1383	734,8937	Tipo 6
KEANL	-0,0005	0,4620	573,6468	Tipo 6
AGDRAL	-0,0016	0,1467	601,6602	Tipo 6
VGGMATAEL	-1,0002	-0,1433	847,9818	Tipo 6
ETIATDKS	-1,0001	0,5400	863,9200	Tipo 6
MGDQL	-1,0016	-0,0160	562,6384	Tipo 6
VTQGTI	-0,0020	0,1717	617,7000	Tipo 6
VQNEF	-1,0002	0,2500	635,6744	Tipo 6
VGKRDIIF	0,9981	0,1063	947,1453	Tipo 6
TMGATTIN	-0,0020	0,0963	807,9170	Tipo 6
KPRPGQ	1,9977	0,5017	681,7928	Tipo 6
VRTNML	0,9980	0,1800	732,8962	Tipo 6
RADKGS	0,9981	0,7283	632,6743	Tipo 6

RIQQG	0,9980	0,6280	600,6754	Tipo 6
VGQAAEAL	-1,0002	-0,0250	757,8417	Tipo 6
KTADEQEL	-1,9983	0,6513	932,9829	Tipo 6
KQIAF	0,9977	0,0660	605,7348	Tipo 6
RNPGMI	0,9980	0,0450	686,8271	Tipo 6
VEITT	-1,0002	0,2520	561,6329	Tipo 6
VQTQR	0,9980	0,8600	630,7018	Tipo 6
IGGANL	-0,0020	-0,2750	543,6204	Tipo 6
VRPDR	0,9984	0,6800	641,7281	Tipo 6
VRIGL	0,9980	-0,1120	556,7060	Tipo 6
NTHNTKQD	0,0890	0,8463	956,9675	Tipo 6
RQRQG	1,9980	1,1560	643,7035	Tipo 6
ITGGPS	-0,0020	-0,1317	530,5784	Tipo 6
VKKIADK	1,9975	0,6386	800,9969	Tipo 6
VEQIMTPL	-1,0002	-0,1063	930,1272	Tipo 6
VGDTDIS	-2,0011	0,1914	705,7196	Tipo 6
VRGERD	0,0002	0,8600	730,7788	Tipo 6
VRADF	-0,0016	0,1160	606,6793	Tipo 6
VIEPL	-1,0002	-0,3700	569,6988	Tipo 6
DIGQDR	-1,0011	0,6100	702,7219	Tipo 6
ERPAPNF	-0,0002	0,0929	829,9108	Tipo 6
KNKAE	0,9992	1,0220	588,6615	Tipo 6
AGGRNL	0,9980	0,1650	586,6485	Tipo 6
NTGMAL	-0,0020	-0,1367	605,7068	Tipo 6
MKDTIL	-0,0019	0,0900	719,8944	Tipo 6
RAAQN	0,9980	0,6480	558,5948	Tipo 6
VQQRL	0,9980	0,5140	642,7561	Tipo 6
PKEEL	-0,9988	0,4380	614,6964	Tipo 6

VHAIS	0,0889	-0,1480	525,6053	Tipo 6
VHTDA	-0,9107	0,2100	541,5614	Tipo 6
VKRDI	0,9981	0,6420	629,7574	Tipo 6
DGTRS	-0,0016	0,7140	534,5265	Tipo 6
VEENRDR	-0,9980	1,0429	916,9462	Tipo 6
ADKPEAHF	-0,9092	0,1550	913,9854	Tipo 6
HKTDAIINA	1,0887	0,3850	1110,2784	Tipo 6
KMRHKGGRS	4,0883	0,7544	1056,2541	Tipo 6
NTGAAL	-0,0020	-0,0600	545,5930	Tipo 6
VPQIL	-0,0020	-0,3840	568,7140	Tipo 6
VKGPA	0,9977	0,0240	470,5693	Tipo 6
VG DAN	-1,0016	0,1580	474,4709	Tipo 6
PTIQPQL	-0,0020	-0,0771	795,9339	Tipo 6
KDTEES	-1,9983	0,9833	707,6922	Tipo 6
VTPGIPDL	-1,0016	-0,3113	810,9456	Tipo 6
MEMQRW	-0,0002	0,1850	880,0473	Tipo 11
KTKRW	2,9974	0,8660	717,8692	Tipo 11
VRAAEP	-0,0002	0,2250	641,7251	Tipo 11
VRKTS	1,9977	0,8440	589,6927	Tipo 11
CTNRRAS	1,9360	0,6114	806,8949	Tipo 11
APTKQL	0,9977	0,2183	656,7800	Tipo 11
RPKAGL	1,9977	0,2150	640,7836	Tipo 11
ADGKW	-0,0019	0,1020	575,6218	Tipo 11
VEKKT	0,9992	0,9600	603,7166	Tipo 11
VDCKQKITKPL	1,9356	0,3245	1272,5688	Tipo 11
INTNGIT	-0,0020	0,1686	731,8037	Tipo 11
QGDIQQL	-1,0016	0,2971	800,8666	Tipo 11
PDCETPHGHS	-1,8800	0,0880	1079,1089	Tipo 11

TTADDL	-2,0011	0,2517	634,6408	Tipo 11
VEGTQTQS	-1,0002	0,5613	848,8650	Tipo 11
PIATS	-0,0020	-0,1480	487,5534	Tipo 11
GPNEA	-1,0002	0,1600	486,4819	Tipo 11
QEPTGAPEAGL	-1,9985	0,0555	1069,1362	Tipo 11
PNHMDT	-0,9107	0,1750	713,7631	Tipo 11
VPAETEEF	-2,9967	0,1613	920,9715	Tipo 11
VAGGGEKGEKGPA	-0,9973	0,3157	1285,3763	Tipo 11
VIEPGML	-1,0002	-0,3914	757,9433	Tipo 11
IEGPPGAPAGL	-1,0002	-0,3754	1132,2815	Tipo 11
QGPPG	-0,0020	-0,1440	454,4831	Tipo 11
AGADGL	-1,0016	-0,1917	502,5246	Tipo 11
PGPPGTML	-0,0020	-0,4713	768,9262	Tipo 11
GGDGEKGP	-1,0001	0,2863	715,7177	Tipo 11
AQEAQAQAIL	-1,0002	0,1520	1042,1568	Tipo 11
AMRGPS	0,9980	0,0633	617,7209	Tipo 11
GPMGL	-0,0020	-0,5800	473,5877	Tipo 11
GDPGPQGPRG	-0,0016	0,0890	936,9797	Tipo 11
AGQIGKS	0,9977	0,2657	659,7402	Tipo 11
GKRGRGGADGARGMPGES	1,9999	0,3650	1715,8643	Tipo 11
KGDRGF	0,9981	0,4383	678,7458	Tipo 11
GPPGAPGEDGQRGEDGEIGPRGL	-2,9958	0,1543	2218,3242	Tipo 11
GPRGL	0,9980	-0,0600	498,5826	Tipo 11
GPRGPPGPTGQPG	0,9980	-0,0731	1174,2815	Tipo 11
PGPQGPIGPPGEKGPQGRS	0,9995	0,0595	1813,0029	Tipo 11
DGPPGHPGKEGPPGEKGAL	-0,9077	0,0395	1796,9572	Tipo 11
PGPRG	0,9980	0,0100	482,5399	Tipo 11
VKGADG	-0,0019	0,2533	545,5931	Tipo 11

KGGKGEKGEDGF	0,0011	0,5017	1208,2932	Tipo 11
KGDMGL	-0,0019	0,0600	619,7337	Tipo 11
KGDRGEL	-0,0001	0,5900	773,8441	Tipo 11
GPRGEDGPEGPKGRAGPNGES	-0,9965	0,3143	2021,0903	Tipo 11
GPMGAAGEKGKL	0,9992	0,0675	1115,3128	Tipo 11
PGRQGPKGS	1,9977	0,3456	882,9748	Tipo 11
PGANGEKGARG	0,9995	0,3291	1013,0780	Tipo 11
GPKGPPGPPGKDGL	0,9978	-0,1029	1273,4544	Tipo 11
PGHPGQRGETGF	0,0907	0,1233	1239,3127	Tipo 11
VGPQGPTGETGPIGERGHPGPPGPPGEQGL	-1,9058	-0,0250	2830,0659	Tipo 11
AGKEGAKGDPPGQAS	-0,0004	0,2369	1426,5057	Tipo 11
GKDGPAGL	-0,0019	-0,0113	713,7885	Tipo 11
PGERGL	-0,0002	0,1450	627,6981	Tipo 11
GPAGL	-0,0020	-0,4880	413,4739	Tipo 11
KGGEGPQGPS	-0,0005	0,2250	912,9547	Tipo 11
PGERGAAGPAGPIGL	-0,0002	-0,1793	1319,4830	Tipo 11
GRTGPQGPPGPAGEKGGPGEKGPQGPAGRDG	1,0014	0,1745	2824,0218	Tipo 11
PGPAGPQGGPPGEDGDKGE	-2,9979	0,0989	1661,7019	Tipo 11
VGEPGQKGS	-0,0005	0,3067	857,9187	Tipo 11
KADKGEQGGPPGAGL	-0,0004	0,1300	1421,5729	Tipo 11
GQKGDEGS	-1,0001	0,5900	776,7580	Tipo 11
PGPPGPIGL	-0,0020	-0,5944	803,9565	Tipo 11
PGPPGEKGENGD	-1,9983	0,2308	1153,1704	Tipo 11
VGPMGPPGPPGPRGPQGPS	0,9980	-0,2474	1738,9818	Tipo 11
GADGAQGGPPGG	-1,0016	-0,0845	882,8850	Tipo 11
VGEKGENGEAGNPGTGPEPTGGPKGERGDKGEAGPPGAAGPAGAKGPPGDDGPKGNPGP	-2,9915	0,1522	5368,6493	Tipo 11
AGEKGEDGES	-2,9965	0,5690	977,9371	Tipo 11
GQPGPPGPS	-0,0020	-0,2178	792,8466	Tipo 11

GPPGPPGKRPPGTAGAEGRQGEKGAKGES	2,0024	0,2530	2785,0286	Tipo 11
VGPQGPS	-0,0020	-0,1000	640,6939	Tipo 11
GKPGPEGL	-0,0005	-0,0263	753,8533	Tipo 11
RGIPGP	0,9980	-0,1200	595,6993	Tipo 11
VGEQGL	-1,0002	0,0750	601,6572	Tipo 11
GQDGPPGPMGPPGL	-1,0016	-0,3193	1276,4295	Tipo 11
KGDPGTKGEKGHS	1,0902	0,5400	1297,3903	Tipo 11
IGPPGEQGEKGDRGL	-0,9983	0,2433	1509,6388	Tipo 11
PGPQGS	-0,0020	-0,0500	541,5613	Tipo 11
PGGKGDGGIS	-0,0019	0,0610	843,8917	Tipo 11
GPPGPPGL	-0,0020	-0,5725	690,7971	Tipo 11
PGPGGPKGS	0,9977	-0,0856	752,8252	Tipo 11
VIQPL	-0,0020	-0,3840	568,7140	Tipo 11
GEGMEDIF	-2,9980	-0,0125	896,9672	Tipo 11
MGTQNNPARTCKDL	0,9362	0,3071	1548,7521	Tipo 11
AHPEF	-0,9093	-0,2000	599,6439	Tipo 11
IDPNQGCS	-1,0635	0,0513	832,8833	Tipo 11
PDRKS	0,9981	0,8100	601,6603	Tipo 11
KRGKL	2,9974	0,8020	600,7622	Tipo 11
VDAAGNTINE	-1,9998	0,2360	1003,0335	Tipo 11
VQMTF	-0,0020	-0,1660	624,7528	Tipo 11
ARQNF	0,9980	0,4160	634,6926	Tipo 11
NCHQS	0,0269	0,3120	587,6078	Tipo 11
HDETTDS	-2,9084	0,6786	803,7374	Tipo 11
NDEEL	-2,9980	0,5720	618,5980	Tipo 11
VIEINTPKIDQ	-1,0001	0,2509	1269,4605	Tipo 11
VPIID	-1,0016	-0,3760	555,6719	Tipo 11
VRCPS	0,9360	0,0180	560,6690	Tipo 16

PQTARHNITGF	1,0889	0,1764	1241,3719	Tipo 16
GKTAL	0,9977	0,1600	488,5845	Tipo 16
IHPTDQ	-0,9107	0,2167	709,7568	Tipo 16
KKKTL	2,9971	0,9260	616,8020	Tipo 16
NGPEATL	-1,0002	0,0471	700,7464	Tipo 16
RARGADPL	0,9984	0,2500	854,9644	Tipo 16
VQQAAS	-0,0020	0,2171	659,6969	Tipo 16
EPRGEL	-0,9985	0,3667	699,7617	Tipo 16
PTEGHTL	-0,9093	0,1000	753,8100	Tipo 16
GIRATDAAP	-0,0016	0,0911	870,9608	Tipo 16
VENDIQQ	-1,9998	0,3257	861,9653	Tipo 16
QEACCEIPGARCPPGAL	-1,1844	-0,1818	1714,9899	Tipo 16
RRAAENDPEQQ	-0,9980	0,7827	1313,3493	Tipo 16
GTCKEGRMGQKGEKGES	0,9404	0,5912	1781,9764	Tipo 16
VGHKGDQKQKGDIGL	1,0889	0,3353	1508,6974	Tipo 16
VGPKGQKGTGS	1,9974	0,3920	958,0824	Tipo 16
GPEGL	-1,0002	-0,2000	471,5106	Tipo 16
AGEPGKPGL	-0,0005	-0,0533	824,9321	Tipo 16
PGIGKPGL	0,9977	-0,2688	737,8972	Tipo 16
PGTPGGPPGS	-0,0020	-0,2590	822,8729	Tipo 16
KGDKGHS	1,0887	0,6557	727,7751	Tipo 16
HGKTGPKGEPG	1,0901	0,3036	1064,1661	Tipo 16
VPGIGDPGL	-1,0016	-0,3822	823,9443	Tipo 16
VKGEKGDACA	-0,0624	0,3070	977,1003	Tipo 16
VCPTL	-0,0640	-0,5340	531,6678	Tipo 16
EIPAANL	-1,0002	-0,1686	726,8276	Tipo 16
VAMEQTL	-1,0002	0,0571	790,9299	Tipo 16
KGERGKPGL	1,9992	0,4567	941,0982	Tipo 16

GQKGEQGEPE	-0,9988	0,4850	986,0060	Tipo 16
RGEKGNTGGKGADGKTGKAGPRGPS	3,9990	0,4612	2340,5410	Tipo 16
GKDGL	-0,0019	0,2180	488,5411	Tipo 16
KGIKGDPIGIPGL	0,9978	-0,0475	1151,3712	Tipo 16
GTPGPKGEKGAS	0,9992	0,2675	1085,1820	Tipo 16
AGETGPPGPAGPAGEGTDGKQG	-1,9983	0,0964	1907,9682	Tipo 16
VPGRDGL	-0,0016	0,0157	712,8038	Tipo 16
RGEKGDQGEQGDQGL	-1,9979	0,5953	1573,5960	Tipo 16
AGTHGTQGL	0,0889	0,0878	840,8911	Tipo 16
PGEPGRDGL	-0,9998	0,0856	896,9553	Tipo 16
KGEKGEACES	-1,0593	0,5690	1037,1095	Tipo 16
GQQMG	-0,0020	0,2300	519,5730	Tipo 16
VGGMQGPKGERGDPGPPGEGKAGKHGKPL	2,0917	0,1730	2853,2083	Tipo 16
VQPIGQKGS	0,9977	0,1920	970,0933	Tipo 16
QGDTG	-1,0016	0,4440	476,4434	Tipo 16
VGIPGPQGAEGPRGL	-0,0002	-0,0967	1404,5887	Tipo 16
VAGPQGIRGL	0,9980	-0,0800	967,1360	Tipo 16
VGPAGDMGPKGEEGPPGPQGPMG	-1,9983	-0,0852	2119,3516	Tipo 16
VTGPPGKDGKGGSS	0,9978	0,1969	1156,2608	Tipo 16
GIPGADGRDGTGAKGDKGEPGDCNCIS	-3,1226	0,1925	2662,7991	Tipo 16
TGTGGPGAPGTL	-0,0020	-0,1483	985,0616	Tipo 16
GGNTW	-0,0020	-0,0900	533,5411	Tipo 16
QGPPGPPGPPGPPGPQGF	-0,0020	-0,3856	1637,8149	Tipo 16
VPGQPGL	-0,0020	-0,3171	666,7751	Tipo 16
PGRTHL	1,0889	0,1283	679,7769	Tipo 16
PQDEDPS	-2,9993	0,4014	786,7502	Tipo 16
VCEDCS	-2,1237	-0,0167	654,7077	Tipo 16
VPGMAGTKGEKGDEGKTGIGNA S	0,0011	0,2796	2161,3715	Tipo 16

DGCERCF	-1,1237	0,0229	828,9129	Tipo 16
RGDGK	0,9981	0,8120	531,5692	Tipo 16
VPGMAGTKGEKGDEGKTGIGNAS	0,0011	0,2796	2161,3715	Tipo 16
EEAAQAPTTTADGANGGCS	-3,0600	0,2275	1864,8718	Tipo 16
GPGTPGHPGTPGTPGS	0,0889	-0,1325	1373,4447	Tipo 16
PGIRGETGPQQQRQAG	0,9998	0,3141	1665,7859	Tipo 16
VPGNMGPPGF	-0,0020	-0,4480	972,1266	Tipo 16
PGPQGS	-0,0020	-0,0500	541,5613	Tipo 16
TGQQGERGTAGPPG	-0,0002	0,2807	1312,3615	Tipo 16
MGPPGL	-0,0020	-0,6083	570,7044	Tipo 16
KGERGTPGS	0,9995	0,5067	887,9480	Tipo 16
AGTKGES	-0,0005	0,4757	648,6707	Tipo 16
QGKAG	0,9977	0,4420	459,5026	Tipo 16
VAGPKGEAGL	-0,0005	-0,0400	898,0268	Tipo 16
DGPKGDQGS	-1,0014	0,4011	859,8478	Tipo 16
QGQPGF	-0,0020	-0,0500	632,6737	Tipo 16
PGTPGPPGPPGKQREGPPGPKADKGNDAQGPQGS	0,9998	0,1422	3345,5924	Tipo 16
GPPGS	-0,0020	-0,2800	413,4306	Tipo 16
QGPPGF	-0,0020	-0,3583	601,6597	Tipo 16
DGKDGKPMRGEPIPGT	0,0001	0,2211	1768,9622	Tipo 16
VGPRGIPGF	0,9980	-0,3011	899,0604	Tipo 16
KGKHGH	2,1792	0,6067	662,7494	Tipo 16
PGQKGDAGP	-0,0019	0,1511	825,8765	Tipo 16
VGPPGTAGRPGL	0,9980	-0,1800	1078,2363	Tipo 16
EGDAGAPGPQGRPPGQQL	-0,9998	-0,0158	1757,8801	Tipo 16
AGAAGPPGPAGPAG	-0,0020	-0,3679	1047,1355	Tipo 16
VGIKGEKQAADRGL	0,9996	0,3267	1498,7023	Tipo 16
VGPAGPPGHPGMMGEPGS	-0,9093	-0,2761	1631,8415	Tipo 16

DGAAGKDGS	-1,0014	0,3022	776,7580	Tipo 16
KADAPMMGQ	-0,0019	0,0778	948,1200	Tipo 16
VGPRGERGTPGS	0,9998	0,2850	1169,2626	Tipo 16
PGPPGIPGNDP	-1,0016	-0,3073	1017,1062	Tipo 16
DNIKDF	-1,0014	0,3217	750,8063	Tipo 16
VIKIF	0,9977	-0,3340	618,8173	Tipo 16
RIPQQEES	-0,9985	0,5067	1083,1661	Tipo 16
PGRPGPPGKDGNGRDGTPGAPGQPGQMGREGRHGPL	2,0913	0,1384	3612,9473	Tipo 16
GPQGPRGL	0,9980	-0,0138	780,8819	Tipo 16
KGEKGDKG	0,9993	0,8250	817,8973	Tipo 16
VGEMGDS	-1,9998	0,1357	693,7265	Tipo 16
GPPGAPG	-0,0020	-0,4286	551,5998	Tipo 16
GKMGPS	0,9977	0,0533	575,6806	Tipo 16
VGQQGIPG	-0,0020	-0,0250	754,8410	Tipo 16
GTPGQPGQKGREGRCNPS	1,9375	0,3650	1825,9767	Tipo 16
QPIEW	-1,0002	-0,1640	671,7507	Tipo 16
GAQRTRS	1,9980	0,7800	774,8349	Tipo 24
PTAITRTL	0,9980	0,1088	872,0323	Tipo 24
DAHIEAPTGS	-1,9089	0,1090	997,0293	Tipo 24
RANNAF	0,9980	0,2533	691,7445	Tipo 24
TAEKTS	-0,0005	0,7133	635,6720	Tipo 24
VHDGRQHS	0,1802	0,5250	934,9669	Tipo 24
VRPRS	1,9980	0,6020	613,7177	Tipo 24
HADCGA	-0,9726	-0,1100	572,5932	Tipo 24
VQQREQTL	-0,0002	0,6838	1001,1074	Tipo 24
GRMNS	0,9980	0,4420	563,6292	Tipo 24
KAQF	0,9977	0,1660	563,6542	Tipo 24
KRQCRL	2,9357	0,7317	802,9932	Tipo 24

HTQQTS	0,0889	0,6933	700,7061	Tipo 24
TPAGS	-0,0020	-0,0260	431,4459	Tipo 24
APTPS	-0,0020	-0,1440	471,5107	Tipo 24
VRIQTQS	0,9980	0,5643	830,9394	Tipo 24
VTAGHNS	0,0889	0,1871	684,7067	Tipo 24
GITRRS	1,9980	0,6433	688,7848	Tipo 24
PTRRS	1,9980	0,8080	615,6902	Tipo 24
ENDMEERS	-2,9962	0,8363	1009,0124	Tipo 24
PRRPQPF	1,9980	0,1657	897,0476	Tipo 24
TTDTPGIKS	-0,0019	0,3489	918,9994	Tipo 24
VKQTHL	1,0886	0,3683	724,8582	Tipo 24
KDGQRNS	0,9981	0,9357	803,8300	Tipo 24
QPTDHL	-0,9107	0,1617	709,7568	Tipo 24
RPNGTTL	0,9980	0,2757	757,8447	Tipo 24
PGPKGEPGPPGPS	-0,0005	-0,1423	1173,2908	Tipo 24
GPPGL	-0,0020	-0,5840	439,5118	Tipo 24
PGPAGKRGARGPTGPHGNPGL	3,0886	0,0310	1951,1781	Tipo 24
PGPKGS	0,9977	0,0500	541,6047	Tipo 24
PGQAPPGDKGDRGPQGL	-0,0014	0,1306	1646,7799	Tipo 24
PGPDGF	-1,0016	-0,4067	588,6176	Tipo 24
PGPQQQPGEQGIPGL	-1,0002	-0,0800	1431,5679	Tipo 24
PGRQGL	0,9980	0,1333	626,7133	Tipo 24
AGPEGNPGPKG	-0,0005	0,0473	980,0451	Tipo 24
IGPPGIAGS	-0,0020	-0,3744	767,8801	Tipo 24
AGQEGERGIPGP	-0,9985	0,1775	1167,2436	Tipo 24
VGKTGPKGKQG	2,9971	0,4582	1056,2302	Tipo 24
VGERGPPGPDGDEGP	-2,9976	0,1087	1435,4698	Tipo 24
VGGTGMGGF	-0,0020	-0,3033	781,8816	Tipo 24

RGDPGPEGQRGL	0,0002	0,2983	1238,3254	Tipo 24
VGTMGL	-0,0020	-0,3200	576,7087	Tipo 24
KGDKGEPGL	-0,0004	0,3389	899,9993	Tipo 24
RGEPGKF	0,9995	0,3200	789,8894	Tipo 24
QGDKGAAGL	-0,0019	0,1656	815,8813	Tipo 24
PGPPGL	-0,0020	-0,6117	536,6285	Tipo 24
GKTGPPGKMGDIGPQPPGPPGPEGF	-0,0004	-0,1254	2429,7326	Tipo 24
PGDIG	-1,0016	-0,2060	457,4837	Tipo 24
VPGPNGPPGPKGL	0,9977	-0,2600	1186,3762	Tipo 24
QGARGPQRPPGPKGIEGDEGPL	0,0017	0,1791	2213,4378	Tipo 24
GPEGL	-1,0002	-0,2000	471,5106	Tipo 24
KGETGEL	-0,9988	0,4643	732,7886	Tipo 24
GKNGPQGPAGL	0,9977	0,0091	995,1030	Tipo 24
VGEAGEKGGRRGPAGPL	0,0012	0,0881	1451,6022	Tipo 24
GPPGEKGS	-0,0005	0,1638	727,7721	Tipo 24
PGGPGAF	-0,0020	-0,5257	601,6597	Tipo 24
GPQGQRGTPG	0,9980	0,2560	954,0102	Tipo 24
KRRRPRGAEGPL	2,9995	0,3823	1350,5465	Tipo 24
GEPGPEGTKGEQEGGKKGEPGF	-1,9940	0,3287	2229,3446	Tipo 24
IGKAGGPPERGL	0,9995	0,0875	1111,2661	Tipo 24
PGKPGKAGIPGS	1,9974	-0,0092	1065,2375	Tipo 24
TGERGAHGEPGPKGPTGD	-0,9074	0,2656	1719,7880	Tipo 24
VGPDGEQGPEG	-2,9980	0,1555	1041,0391	Tipo 24
VPGGEGEPGP	-1,9985	-0,0950	894,9365	Tipo 24
VGEPGIKGD	-1,0001	0,1422	870,9578	Tipo 24
GGEGEQQQGMRS	-0,9985	0,4923	1320,3561	Tipo 24
PGPAGEDGPL	-1,9998	-0,2120	908,9633	Tipo 24
GKDGPKGEPGDRGPMGEAGDRGIEGDPGL	-2,9955	0,2214	2822,0153	Tipo 24

PGATGL	-0,0020	-0,3017	514,5790	Tipo 24
AGKCGF	0,9357	-0,2283	581,6873	Tipo 24
PGPEGKQGPL	-0,0005	0,0140	979,1007	Tipo 24
GNRGRHGK KGEAGKPGHIGETGDIGDIGQKGGTGL	2,1831	0,3349	3412,7295	Tipo 24
TGHAGKPGS	1,0886	0,1700	810,8649	Tipo 24
PGEDS	-1,9998	0,2980	503,4661	Tipo 24
GPAGPL	-0,0020	-0,5317	510,5906	Tipo 24
QGHIGTS	0,0889	0,1914	698,7335	Tipo 24
GHRGA	1,0889	0,3120	496,5264	Tipo 24
PGTPGEPGEQGPKGEMGTQGL	-1,9970	0,1295	2024,1895	Tipo 24
EGKKG	0,9992	0,8500	517,5827	Tipo 24
TGTAG	-0,0020	0,1340	405,4080	Tipo 24
VEGAIGL	-1,0002	-0,2414	657,7647	Tipo 24
AGPDGL	-1,0016	-0,2717	528,5625	Tipo 24
PGKAGRQQRGT	2,9977	0,5508	1212,3339	Tipo 24
VGQEGAAGL	-1,0002	-0,0278	800,8667	Tipo 24
GMIGF	-0,0020	-0,6500	523,6476	Tipo 24
HGEMGPQGPQGHPPRGL	0,1816	0,0006	1808,9920	Tipo 24
PGAPGL	-0,0020	-0,5317	510,5906	Tipo 24
GTREPARF	0,9998	0,4156	1047,1386	Tipo 24
VDIQEPPS	-1,9998	0,1038	883,9536	Tipo 24
THTARGQRRRKGQRDDNQ	4,0895	0,9247	2237,3857	Tipo 28
QNEGKIL	-0,0005	0,3929	800,9100	Tipo 28
VEIMF	-1,0002	-0,4320	637,7919	Tipo 28
EKAKL	0,9992	0,6400	587,7171	Tipo 28
EKQKDF	-0,0004	0,8417	793,8748	Tipo 28
MQIQAAGW	-0,0020	-0,1963	904,0513	Tipo 28
RETAANS	-0,0002	0,6229	747,7629	Tipo 28

VDHPRS	0,0893	0,3717	709,7599	Tipo 28
VTAAS	-0,0020	0,0220	447,4887	Tipo 28
EAKNHNIRL	1,0904	0,5000	1094,2386	Tipo 28
PRDMPTNARL	0,9984	0,2390	1170,3519	Tipo 28
CDKGERGPPGS	-0,0621	0,2673	1102,1870	Tipo 28
AQPGS	-0,0020	0,0680	458,4715	Tipo 28
DGTPGPKGF	-0,0019	-0,0300	874,9487	Tipo 28
VPGMKGDQPDGPPGPRGRGEQGL	0,0004	0,0968	2456,7184	Tipo 28
GGPGDQPEGL	-1,9998	-0,0291	983,0023	Tipo 28
VTGPPGDTGIGF	-1,0016	-0,2225	1117,2236	Tipo 28
PGPKGNKGNQGRPGPTGPMGMGDPGL	1,9978	0,0358	2474,7948	Tipo 28
PGPIGPPG	-0,0020	-0,5313	690,7971	Tipo 28
VQGTQGF	-0,0020	0,0971	735,7947	Tipo 28
EGPKGTRGTPGS	0,9995	0,3567	1143,2217	Tipo 28
KGDKGNTGAPGL	0,9978	0,2408	1114,2234	Tipo 28
PGAGIQGEKGDS	-1,0001	0,2308	1115,1648	Tipo 28
PGPRGPPGL	0,9980	-0,3011	846,9846	Tipo 28
VGPKGDQGF	-0,0019	0,0611	903,9902	Tipo 28
VGEPGS	-1,0002	0,0200	544,5620	Tipo 28
KGEPGPDGS	-1,0001	0,2356	842,8607	Tipo 28
GIPGIPGEDGA	-1,9998	-0,1791	982,0579	Tipo 28
VGPKGEIGL	-0,0005	-0,0700	869,0286	Tipo 28
VGPAKAGEPGS	-0,0005	0,0175	1026,1142	Tipo 28
GMMGL	-0,0020	-0,5760	507,6636	Tipo 28
PGPPGRGL	0,9980	-0,2450	749,8679	Tipo 28
VGDPG	-1,0016	-0,1320	443,4569	Tipo 28
VGIAGL	-0,0020	-0,4767	528,6492	Tipo 28
VGPPGL	-0,0020	-0,5533	538,6444	Tipo 28

TGPQGL	-0,0020	-0,0733	571,6309	Tipo 28
PGQPGE	-1,0002	-0,0929	696,7580	Tipo 28
GPEGKGL	-0,0005	0,0771	656,7366	Tipo 28
PGPKGERGS	0,9995	0,3533	883,9596	Tipo 28
PGPTGPPGIGL	-0,0020	-0,4436	962,1135	Tipo 28
GIPGEGIQPKGEPGF	-0,9988	-0,0650	1539,7079	Tipo 28
EGPKGPRGPPGDGF	-0,0001	0,0229	1367,4838	Tipo 28
PGEKDMGIL	-1,0001	-0,0150	1016,1772	Tipo 28
GDRGKKGDKGEF	0,9998	0,6408	1293,4019	Tipo 28
GEPGS	-1,0002	0,1040	445,4294	Tipo 28
IGPMGKS	0,9977	-0,0643	688,8400	Tipo 28
EKGDPGL	-1,0001	0,2157	714,7733	Tipo 28
VIKIRES	0,9995	0,3063	957,1813	Tipo 28
VKCRES	0,9375	0,6183	720,8419	Tipo 28
VGPFNF	-1,0002	-0,1267	661,7123	Tipo 28
VNREAS	-0,0002	0,6000	674,7116	Tipo 28
QNDIKAA	-0,0019	0,4443	758,8294	Tipo 28
GEGTF	-1,0002	0,0100	509,5162	Tipo 28
VQPEDAAREHTAGIEMF	-2,9053	0,1600	1972,1597	Tipo 28
VNKKDPL	0,9978	0,3957	812,9645	Tipo 28
EMIAIAS	-1,0002	-0,1743	733,8779	Tipo 28
QICEHNDGTL	-1,9709	0,1720	1129,2095	Tipo 28
IPNPMPTL	-0,0020	-0,4263	882,0856	Tipo 28
VPDRGGIPDF	-1,0011	-0,0930	1072,1857	Tipo 28
RRPGPIF	1,9980	-0,1088	939,1282	Tipo 28
RAPES	-0,0002	0,4880	558,5919	Tipo 28
PDIMTAAS	-1,0016	-0,1163	804,9134	Tipo 28
GGQGGKQPPP	0,9977	0,2860	953,0224	Tipo 28

VGPQTPQTPTNW	-0,0020	0,0433	1325,4435	Tipo 28
IPKTTQL	0,9977	0,2057	799,9657	Tipo 28
DPEANS	-1,9998	0,3650	631,5968	Tipo 28
GGCQGNGNQF	-0,0640	0,0700	981,0072	Tipo 28
EAGCRS	-0,0622	0,3300	621,6659	Tipo 28

ANEXO 3: Resultados de la espectrometría de masas

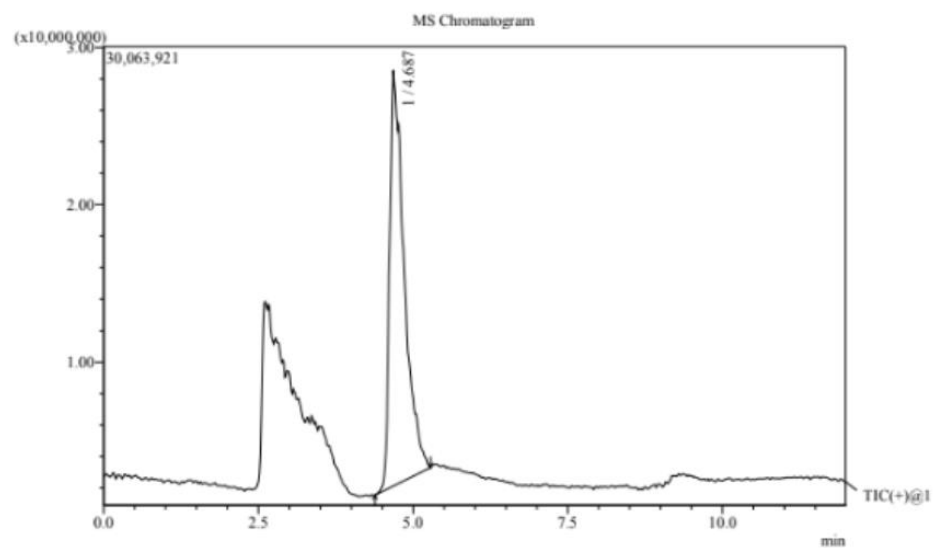


Figura 13: Espectrometría de masas para péptido 5390 a 0%de acetonitrilo.

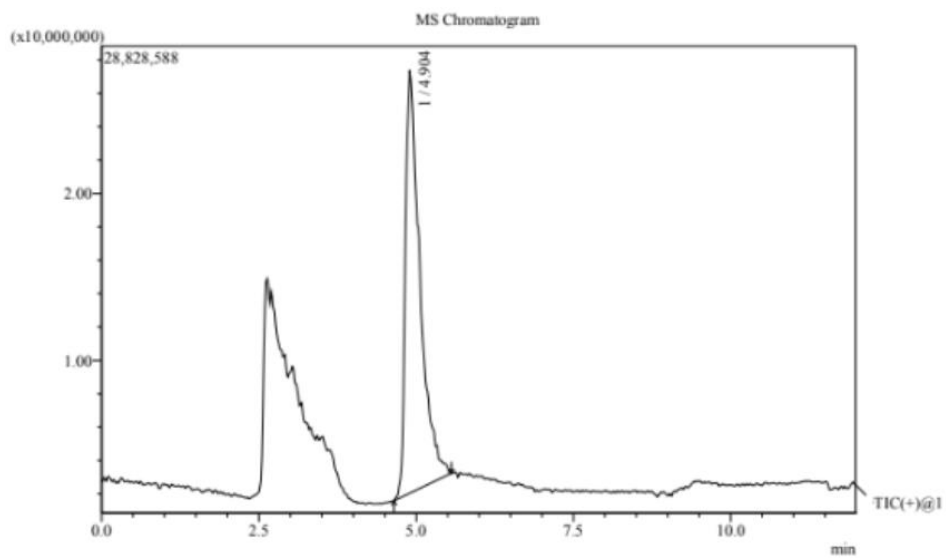


Figura 14: Espectrometría de masas para péptido 5390 con10%de acetonitrilo.

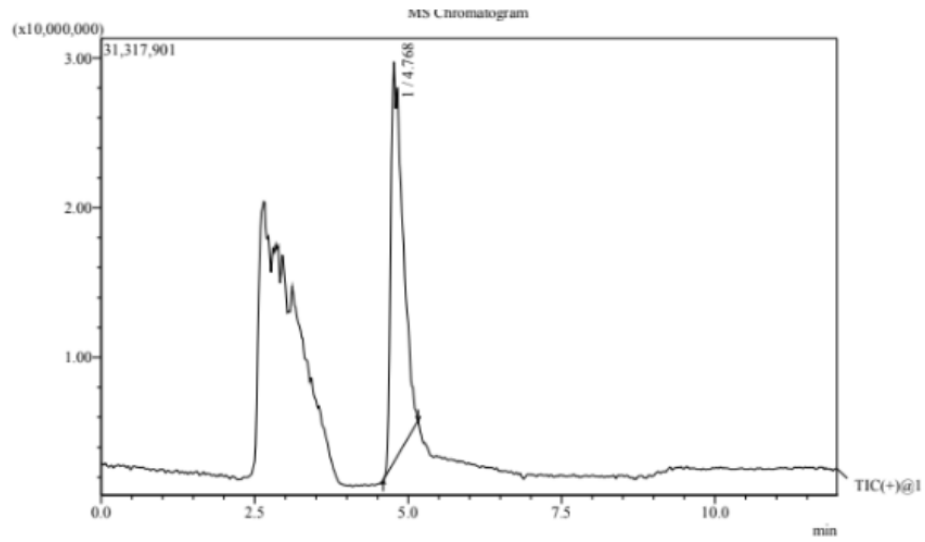


Figura 15: Espectrometría de masas para péptido 5390 con15%de acetonitrilo.

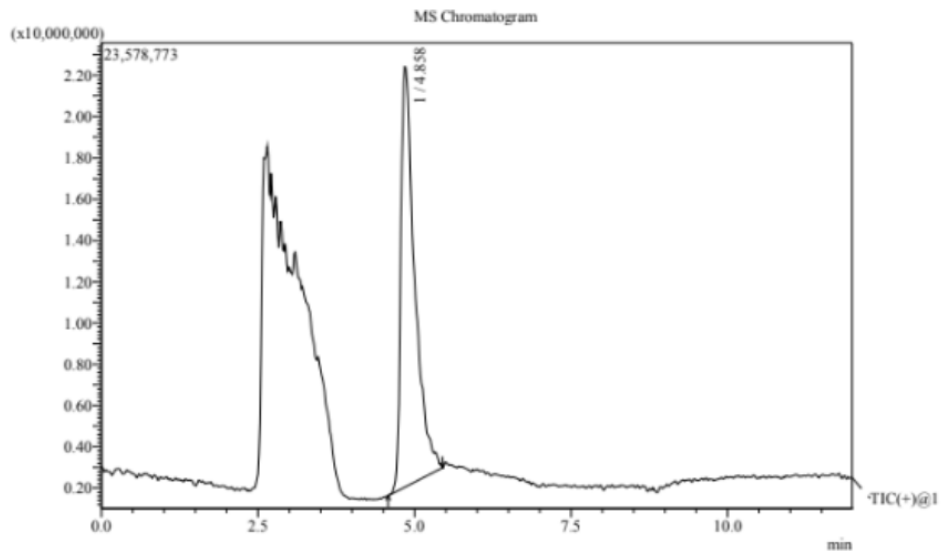


Figura 16: Espectrometría de masas para péptido 5390 con17,5%de acetonitrilo.

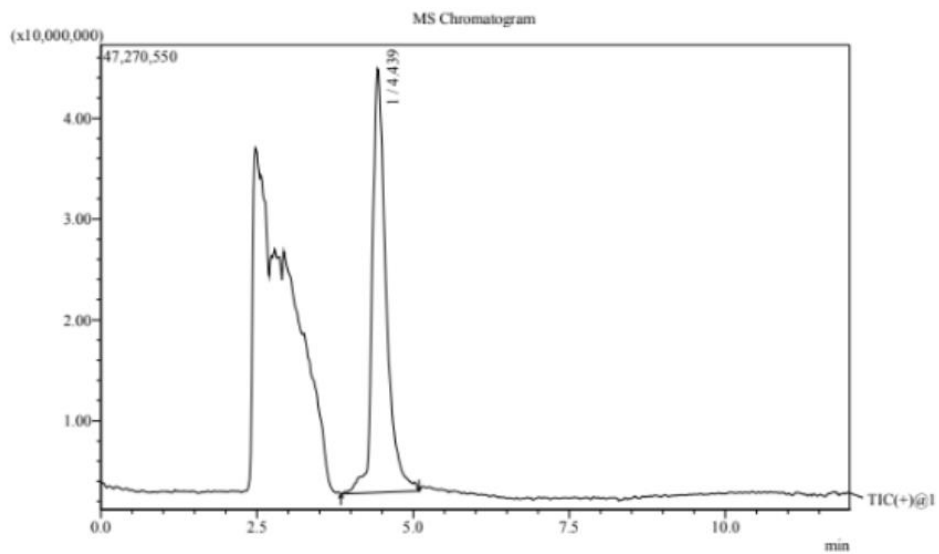


Figura 17: Espectrometría de masas para péptido 5391

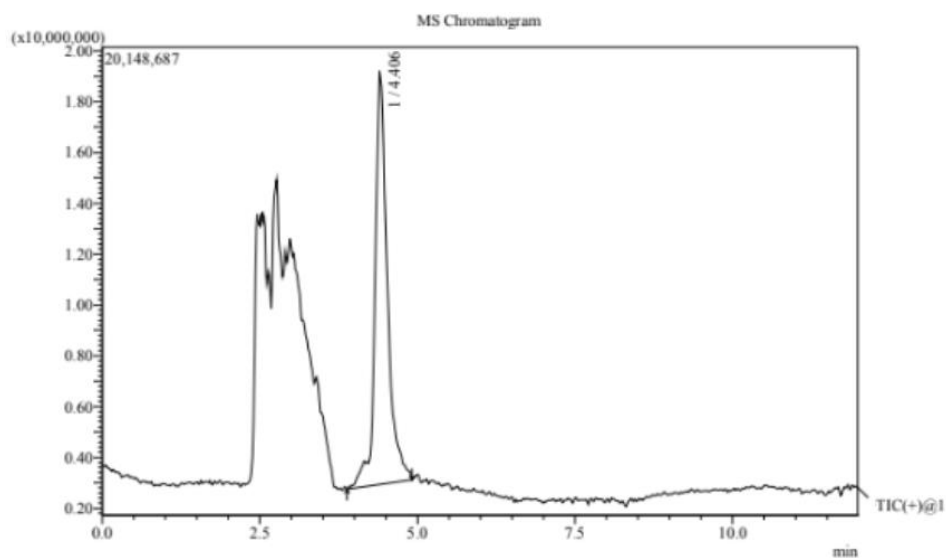


Figura 18: Espectrometría de masas para péptido 5393.

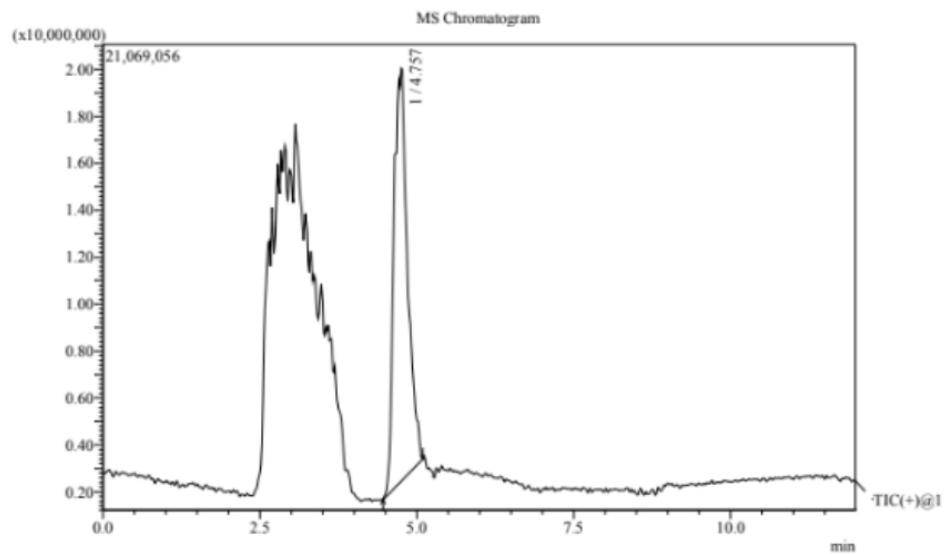


Figura 19: Espectrometría de masas para péptido 5395 con 0% de acetonitrilo.

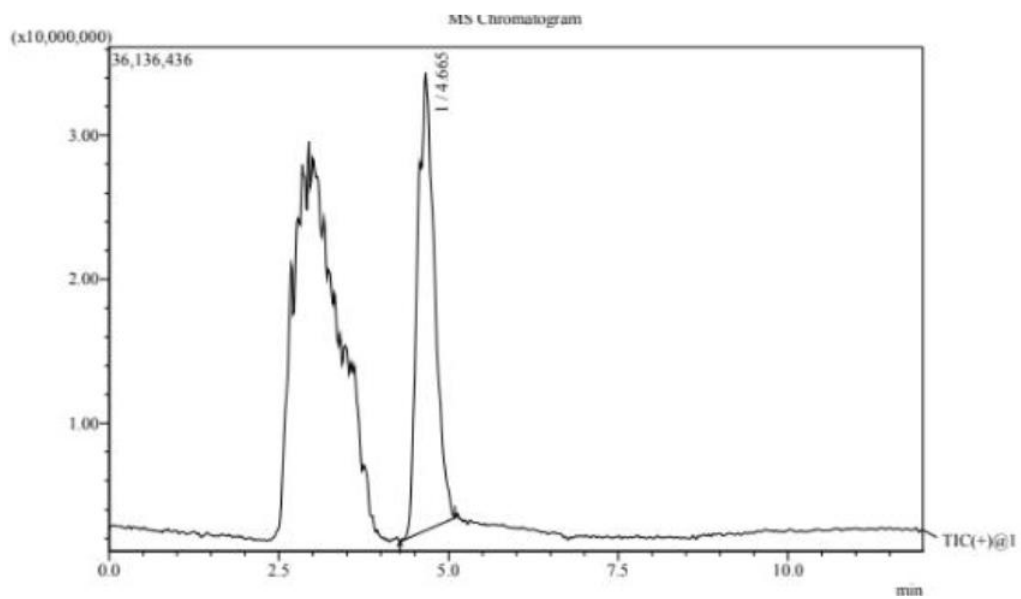


Figura 20: Espectrometría de masas para péptido 5395 con 10% de acetonitrilo.

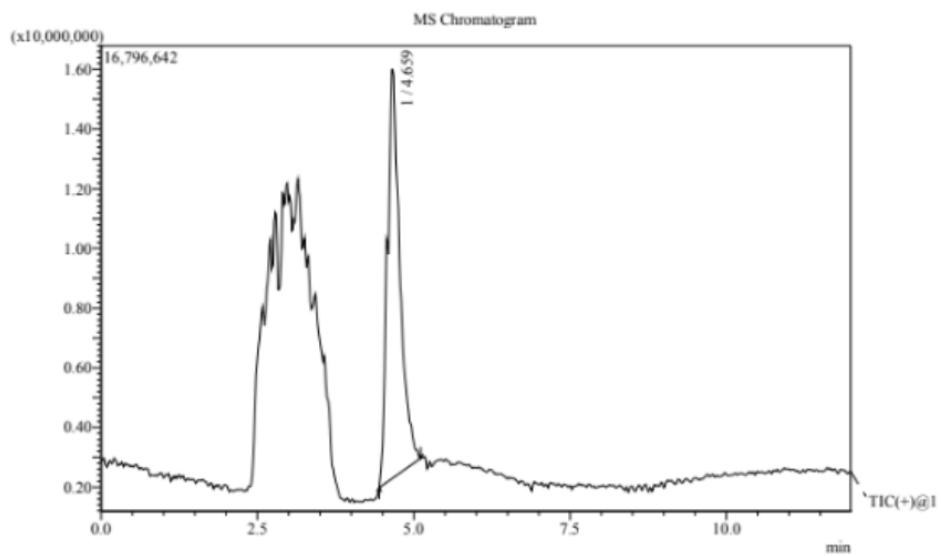


Figura 21: Espectrometría de masas para péptido 5395 con 15% de acetonitrilo.

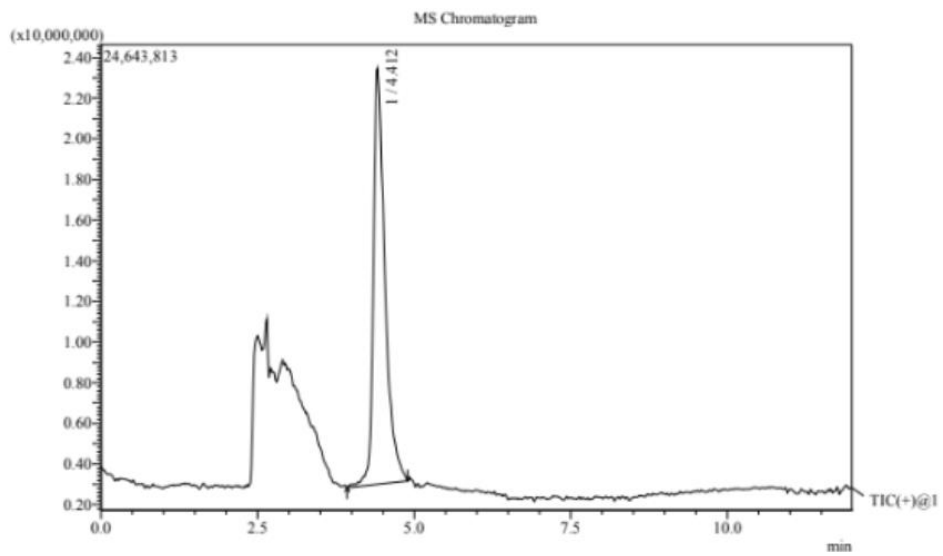


Figura 22: Espectrometría de masas para péptido 5396.

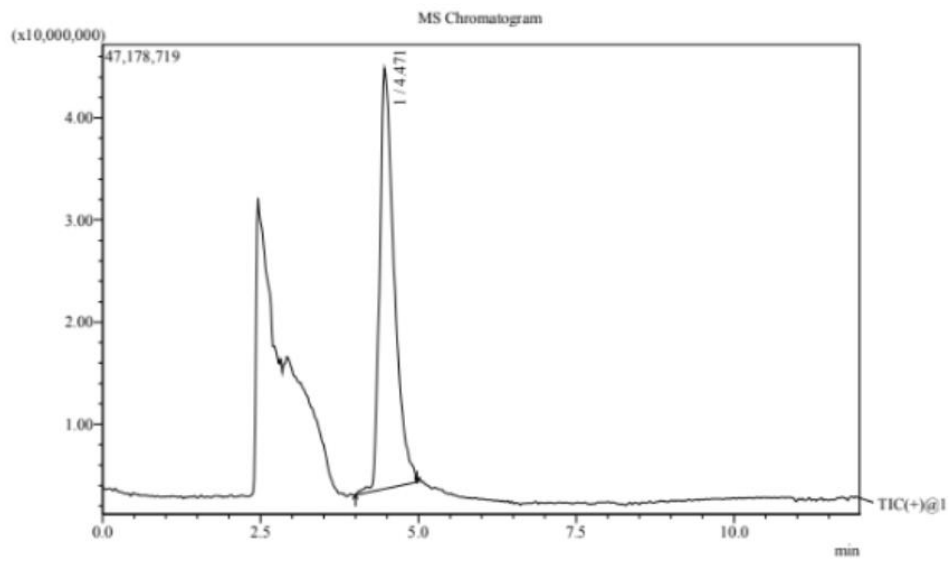


Figura 23: Espectrometría de masas para péptido 5398.

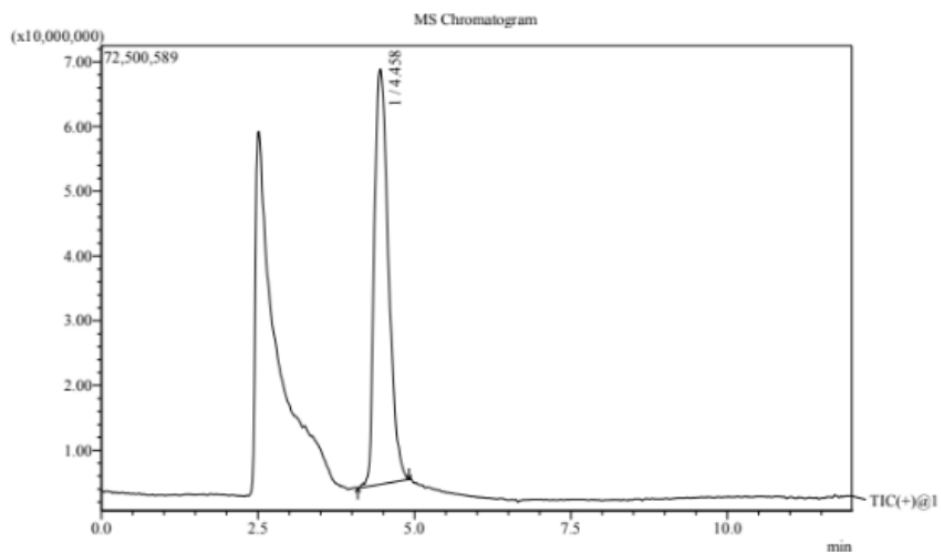


Figura 24: Espectrometría de masas para péptido 5399.

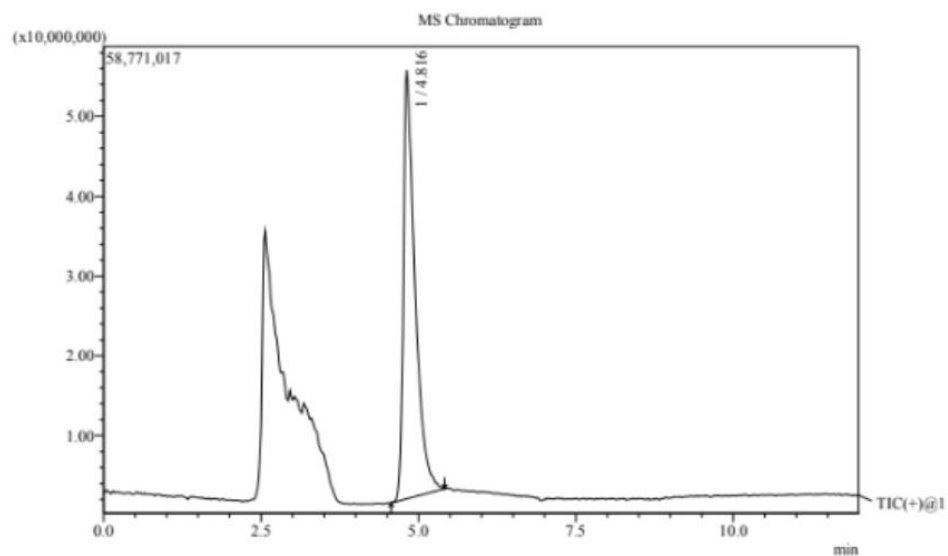


Figura 25: Espectrometría de masas para péptido 5340 con 0% de acetonitrilo.

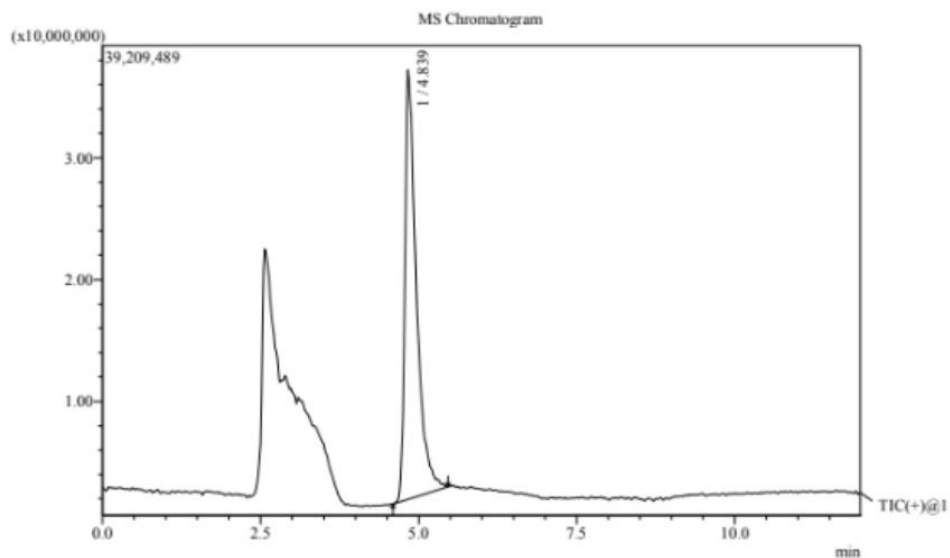


Figura 26: Espectrometría de masas para péptido 5340 con 10% de acetonitrilo.

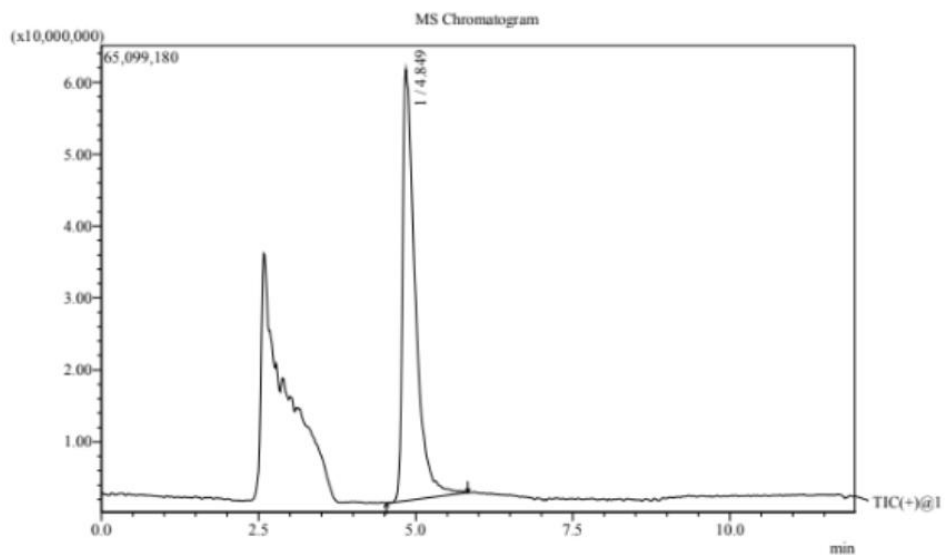


Figura 27: Espectrometría de masas para péptido 5340 a 15%.

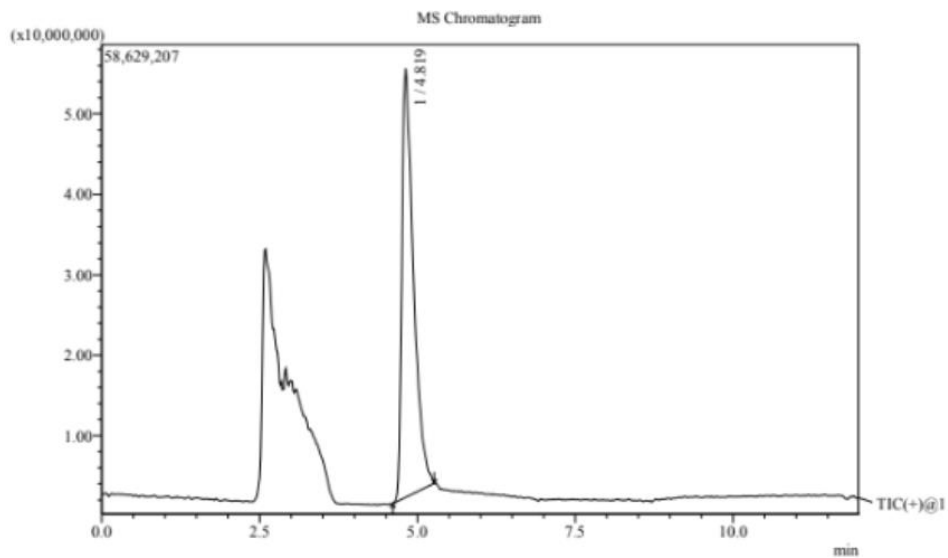


Figura 28: Espectrometría de masa para péptido 5340 con 17,5% de acetonitrilo.

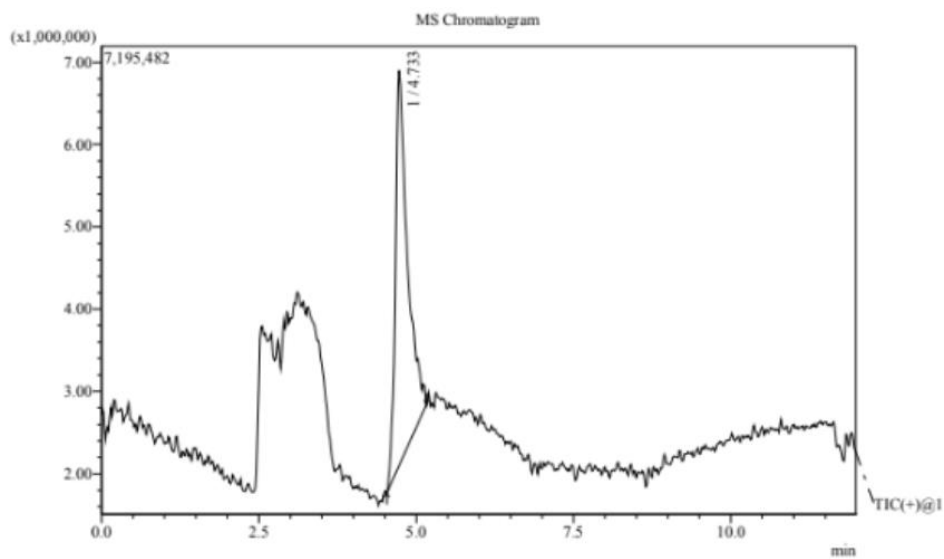


Figura 29: Espectrometría de masa para péptido 5340 con 60% de acetonitrilo.

ANEXO 4: Resultados predicción de citotoxicidad

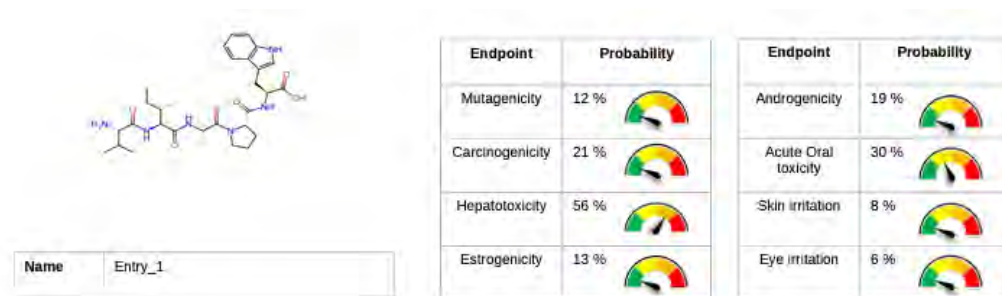


Figura 30: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 4426.

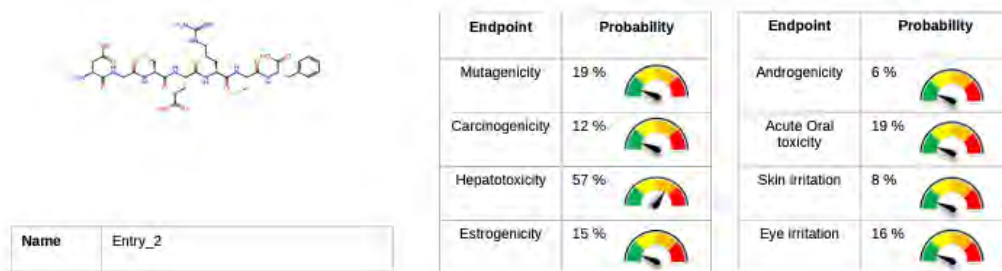


Figura 31: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5390.

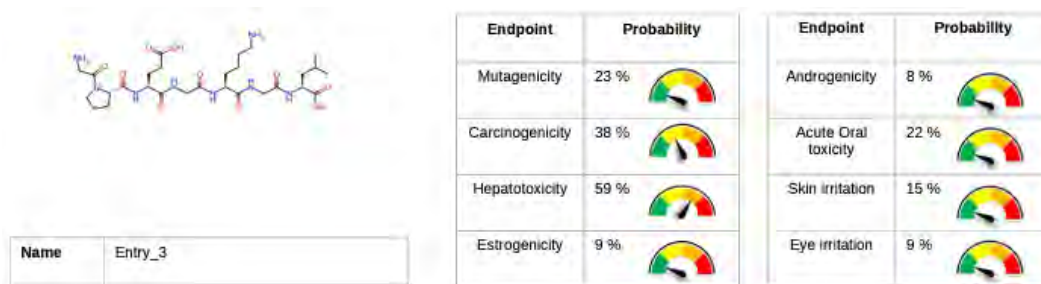


Figura 32: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5391.

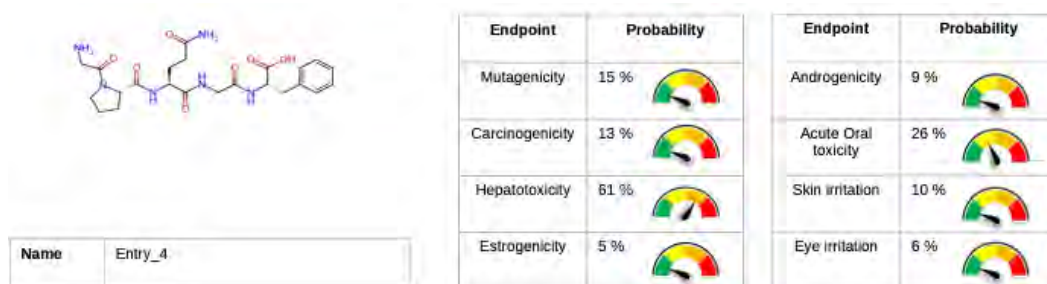


Figura 33: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5392.

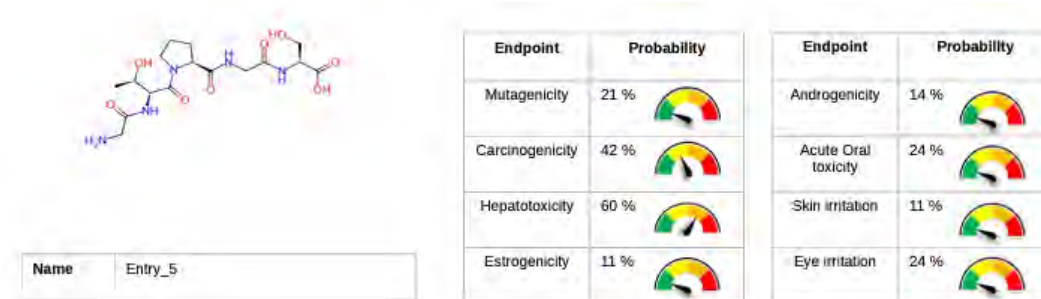


Figura 34: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5393.

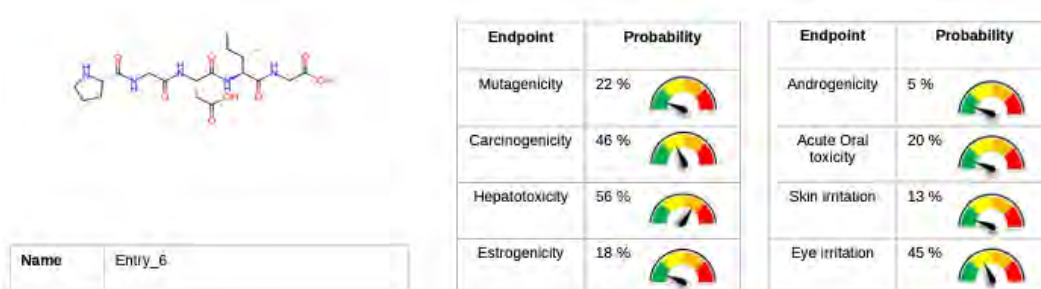


Figura 35: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5394.

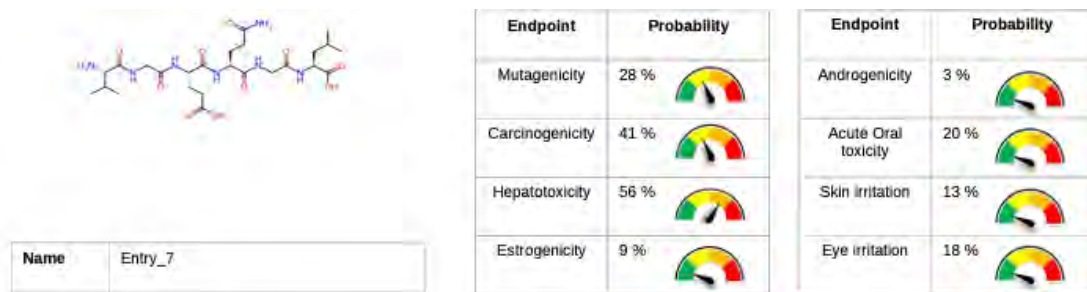


Figura 36: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5395.

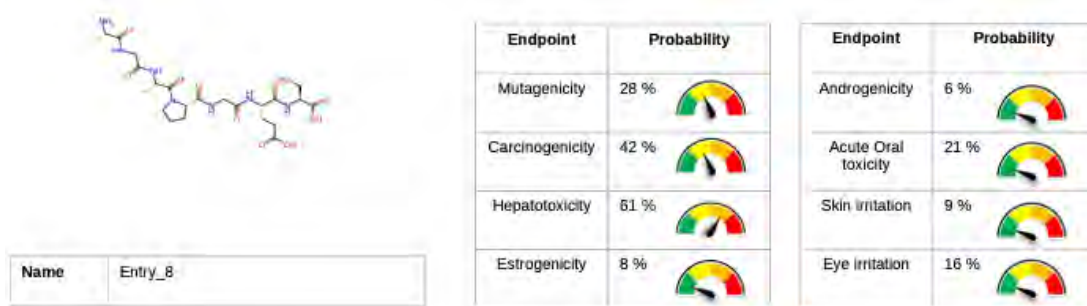


Figura 37: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5396.

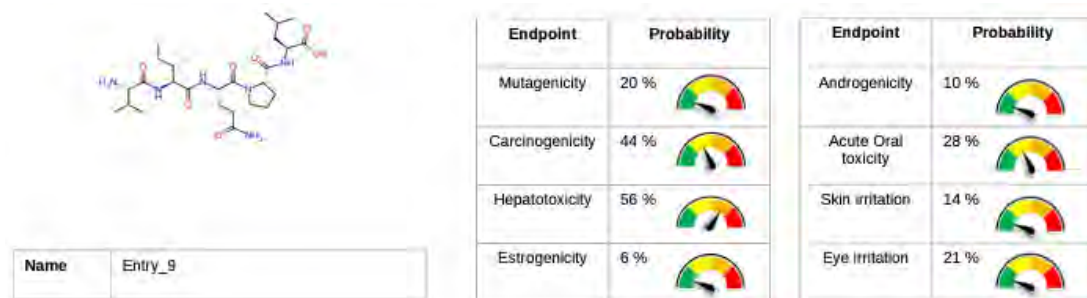


Figura 38: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5397.

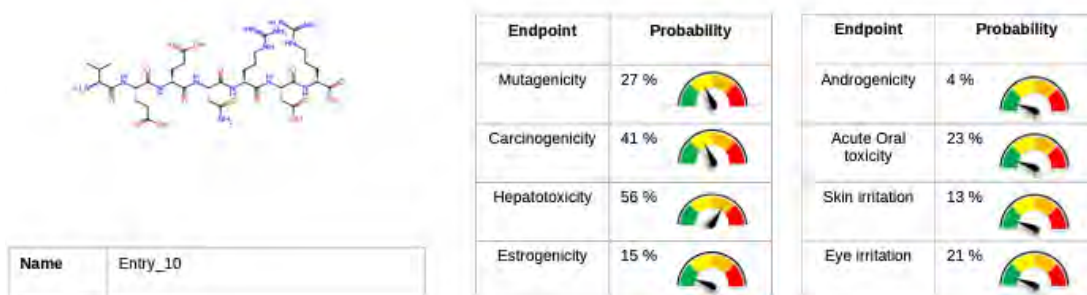


Figura 39: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5398.

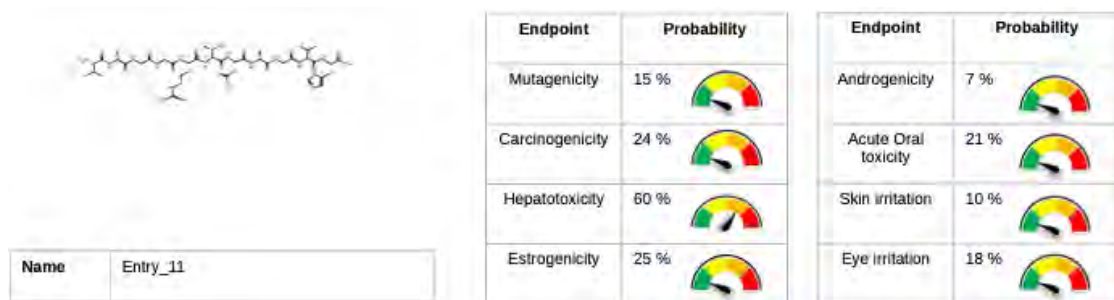


Figura 40: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5399.

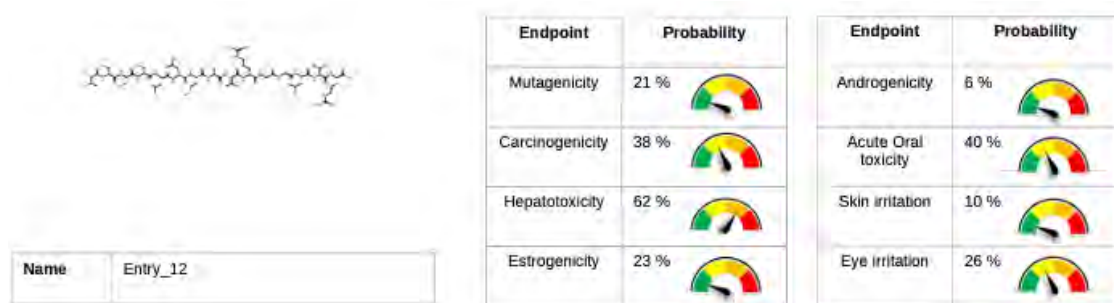


Figura 41: Resultados de la predicción de citotoxicidad para el péptido 5400.