

SUMARIO

1 a 20 - Las proteínas de soja permiten controlar la digestión de lípidos emulsionados como una potencial estrategia para contribuir a la disminución de las enfermedades no transmisibles: utilidad de modelos in vitro

Bellesi, Fernando A^{1,2}, Naso Julieta N^{1,3}, Pizones Ruiz-Henestrosa Víctor M^{1,2}, Pilosof Ana M R^{1,2}

¹ ITAPROQ- Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

Correspondencia: fernandobellesi@gmail.com; julietannaso@gmail.com; vicprh@gmail.com; pilosofana@gmail.com

21 a 40 - El caseinomacropéptido tiene potencial para prevenir la deficiencia de calcio

Loria, Karina Gabriela^{*1,2} y Fariás, María Edith^{*1,3}

¹ Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología. Ruta 5 y Avenida 9 Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina. 10

² Becaria posdoctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas 11 (CONICET).

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 13 Departamento de Industrias. Ciudad Universitaria. Buenos Aires (1428), Argentina.

Correspondencia: Email: efarias@mail.unlu.edu.ar

41 a 60 - Aspectos funcionales y nutricionales de harinas comerciales orgánicas de trigos ancestrales (triticum spelta) y trigo pan (triticum aestivum L.) en argentina

Ormando, P.^{3,4,5}; Mir, L.²; Di Pane, F.¹; Molfese; E.¹

¹ Chacra Experimental Integrada Barrow. Grupo Mejoramiento y Calidad (Convenio MDA-INTA) C.C.50-7500 - Tres Arroyos, Pcia. Buenos Aires, Argentina.

² Estación Experimental A. EEA, Marcos Juárez. Córdoba, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Tecnología de Alimentos. Argentina.

⁴ Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables, UEDD INTA CONICET. Argentina.

⁵ Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Instituto de Tecnología (INTEC). Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: molfese.elenarosa@inta.gob.ar

61 a 79 - Microencapsulación de aceite de chia y desarrollo de alimentos enriquecidos en omega-3

Agustín González^{1,2,3}, María G. Bordón^{1,4}, Pablo D. Ribotta^{1,4*} y Marcela L. Martínez^{1,5}

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA - FCEFYN - UNC). Córdoba, Argentina.

² Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina.

³ Instituto de Investigaciones y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

⁴ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina. 5 Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET - UNC). Córdoba, Argentina.

Correspondencia: pdribotta@unc.edu.ar

La Revista del Foro de la Alimentación, Nutrición y Salud (RFANUS) pretende contribuir a la mejora de la salud pública a través de investigaciones y actualizaciones tendientes a un mejor entendimiento de las ciencias relacionadas con la producción primaria y la industrialización de los alimentos con los sectores relacionados a la salud y nutrición pública.

Esta original iniciativa intenta integrar el estudio de las varias disciplinas relacionadas, contemplando los intereses de dichos sectores para converger en una mejor salud y nutrición de la población.

Dado el reconocimiento de la importancia de la alimentación en la salud y la calidad de vida existe una demanda creciente de la transferencia de conocimientos a profesionales de los sectores de la cadena alimentaria y de la salud y nutrición pública.

El objetivo fundamental de la RFANUS es construir una comunicación efectiva entre todos los sectores involucrados en la cadena alimentaria y el sector de la salud y nutrición humana y animal.

Periodicidad: Tres volúmenes anuales: abril, agosto y noviembre

Lectores: La RFANUS estará dedicada a todos los sectores de la cadena alimentaria, desde el productor de la materia prima, los integrantes de su industrialización y comercialización hasta los sectores directa o indirectamente vinculados con la salud.

Temas a cubrir

1. Efecto de los sistemas de producción en los contenidos de los nutrientes mayores, así como de los microelementos y sustancias bioactivas de interés en la nutrición humana y animal.
2. Efecto de la post cosecha en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
3. Efecto de los procesos industriales en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
4. Acciones desarrolladas para vincular la cadena alimentaria con la calidad nutricional de los alimentos
5. Efecto de la biodisponibilidad de las sustancias bioactivas en la salud humana.
6. Biodisponibilidad de sustancias bioactivas y microelementos y competitividad de los alimentos.
7. Influencia de los cambios en la calidad nutricional de los alimentos en la comercialización en mercado nacional y mundial.

Cuerpo editorial

Director: Economista Ramiro Guillermo Costa Sub Director Ejecutivo de la Bolsa de Cereales y de FANUS

Comité Editorial: Consejo Directivo de FANUS

Comité Editorial externo:

Dr. Claudio Galmarini. EEA La Consulta Mendoza INTA.

Dra. Marta Cuniberti. EEA Marcos Juárez INTA.

Dr. Guillermo Eyherabide. EEA Pergamino INTA.

Dr. Aníbal Pordomingo. EEA Anguil INTA.

Dra. Roxana Beatriz Páez. EEA Rafaela INTA.

Dra. Noemi Zaritzky. CIDCA. CONICET. CIC.

Lda. Estela Kneeteman. Laboratorio Agroalimentos, Toxicología y Nutrición. INTI.

Dr. Gustavo Polenta. Instituto Tecnología Alimentos. INTA Castelar.

Dra. Paola Finocchietto. Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA.

Dra. Laura M. J. Brandani. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Dr. Rubén Daniel Rampa. División Oncología. Hospital Español de Buenos Aires.

Lda. María Inés Somoza. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Información para autores / Proceso editorial de los manuscritos - En <http://fanus.com.ar/rfanus>

**EL CASEINOMACROPÉPTIDO TIENE POTENCIAL PARA PREVENIR LA
DEFICIENCIA DE CALCIO**

**CASEINOMACROPEPTIDE HAS POTENTIAL TO PREVENT CALCIUM
DEFICIENCY**

Loria, Karina Gabriela^{*1,2} y Farías, María Edith^{*1,3}

¹ Universidad Nacional de Luján. Departamento de Tecnología. Ruta 5 y Avenida Constitución - (6700) Luján, Buenos Aires, Argentina.

² Becaria posdoctoral Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Ciudad Universitaria. Buenos Aires (1428), Argentina.

*Autores responsables de correspondencia: Email: efarias@mail.unlu.edu.ar

Resumen

La población mundial presenta una grave deficiencia en calcio por ello es fundamental incrementar su ingesta en la población y simultáneamente su bioaccesibilidad en los alimentos. El calcio es un elemento nutricional fundamental en la salud ósea a lo largo de toda la vida, y su deficiencia conduce a la aparición de trastornos en la salud, entre ellos, la osteoporosis. El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo que se encuentra presente en el suero de queso. Tiene un alto potencial como péptido ligante de calcio por diversos factores: su cadena peptídica es rica en aminoácidos glutámico y aspártico, su alta carga negativa a $\text{pH} > 4,5$, su alto grado de glicosilación abundante en ácido siálico (con capacidad de formar complejos con el calcio a $\text{pH} 7$), y su alta solubilidad en agua aún disuelto en altas concentraciones de CaCl_2 . Se evaluó, el efecto de la incorporación de CaCl_2 en la asociación molecular del CMP mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser. Adicionalmente, se analizaron los espectros infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR), se determinó el calcio dializado y se realizaron las isothermas de calcio unido mediante la técnica del electrodo selectivo. Las modificaciones observadas en los espectros de CMP y CaCl_2 a pH neutro confirmaron que el CMP interacciona con el calcio a través de los grupos carboxílicos que corresponderían a los residuos Asp y Glu. Los cambios en la zona de amidas indicaron cambios en la estructura secundaria del péptido. Por otro lado, los resultados de DLS mostraron la formación de estructuras asociadas por pares de moléculas de CMP (dímeros, tetrámeros, hexámeros) en presencia de CaCl_2 , alcanzando un grado máximo de asociación, el hexámero, para la relación 9 – 10 moles de CaCl_2 por mol de CMP, similares resultados se obtuvieron con todas las técnicas empleadas. Este trabajo demuestra una nueva propiedad del CMP con alto valor agregado.

Palabras clave: caseinomacropéptido, calcio, péptidos ligantes de calcio, FTIR, deficiencia de calcio, electrodo selectivo, DLS, diálisis

Abstract

The world population is seriously deficient in calcium, thus it is essential to increase its intake and simultaneously its bioaccessibility in food. Calcium is a fundamental nutritional element in the bone health throughout life, and its deficiency leads to the appearance of health disorders, including osteoporosis. Caseinomacropéptide (CMP) is a bioactive peptide found in cheese whey. It has a high potential as a calcium-binding peptide due to various factors: its peptide chain is rich in glutamic and aspartic amino acids, its high negative charge at $\text{pH} > 4.5$, its high degree of glycosylation, sialic acid abundance (which has the ability to form complexes with calcium at $\text{pH} 7$), and its high solubility in water even dissolved in high concentrations of CaCl_2 . The effect of the incorporation of CaCl_2 on the molecular association of CMP was evaluated using the dynamic scattering technique. In addition, Fourier transform infrared spectra (FTIR) were analyzed, dialyzed calcium was determined, and bound calcium isotherms were performed using the selective electrode technique. The modifications observed in the CMP and CaCl_2 spectra at neutral pH confirmed that CMP interacts with calcium through the carboxylic groups that would correspond to Asp and Glu residues. Changes in the amide zone indicated the secondary structure of the peptide changes. On the other hand, the DLS results showed the formation of structures associated by pairs of CMP molecules (dimers, tetramers, hexamers) in the presence of CaCl_2 , reaching a maximum degree of association, the hexamer, for the ratio of 9 – 10 mol CaCl_2 for CMP mol, similar results were obtained with all the techniques used. This work demonstrates a new property of the CMP with high added value.

Keywords: caseinomacropéptide, calcium, calcium binding peptides, FTIR, calcium deficiency, selective electrode, DLS, dialysis

Introducción

En la Argentina, se considera que el requerimiento de calcio es 1.000 mg/día para la edad entre los 19 y 50 años (FAO 2001), independiente de la localización geográfica, situación socioeconómica. Según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Argentina realizada en los años 2004-2005 en niños y mujeres entre 10 y 49 años, el calcio es uno de los nutrientes más críticos, el 94,3% de las mujeres presentaron una ingesta menor a la ingesta diaria recomendada (IDR). El 28% de los niños menores de 2 años no cubrieron la ingesta adecuada de este mineral, mientras que en el grupo de 2 a 5 años esta cifra llegó al 45,6%.

En la bibliografía se propusieron a numerosos péptidos de diferente origen como ligantes de calcio para aumentar su bioaccesibilidad. Se pueden citar péptidos obtenidos de espina de pescado (Wu et al. 2017, Chen et al. 2019), trigo, pepino o soja (Bao et al. 2007, Wang et al. 2017, Hou et al. 2018, Wang et al. 2018) o de origen lácteo como los caseinofosfopéptidos o proteínas del suero (Berrocal et al. 1989, Zhao et al. 2014). Sin embargo, en la mayoría de ellos, el uso comercial es muy limitado principalmente por la falta de tecnologías adecuadas para obtenerlos a gran escala (Korhonen et al. 2006). Por otro lado, el caseinomacropéptido (CMP), un péptido bioactivo producido durante la elaboración del queso, se encuentra en abundancia en el suero. Asimismo, está comercialmente disponible en forma de polvos de alta pureza obtenidos por resinas de intercambio iónico. Sus interesantes propiedades funcionales como la gelificación a temperatura ambiente, como espumante y emulsificante (Kreuz et al. 2009, Farías et al. 2010, Martínez et al. 2011, Morales et al. 2019) y valiosas propiedades bioactivas, entre ellas se distinguen su efecto antihipertensivo, antitrombótico, modulador de las hormonas de saciedad y su actividad antimicrobiana (Kawasaki et al. 1993, Dziuba et al. 1996, El-Salam et al. 1996, Brody 2000, Thomä-Worringer et al. 2006) y el manejo de la fenilcetonuria (Ney et al. 2008). Los péptidos con gran afinidad por el calcio típicamente contienen una gran cantidad de Glu y Asp, ya que contribuyen a la unión del calcio posiblemente al generar un ambiente ácido para que los cationes se coordinen (Peng et al. 2017). En la secuencia peptídica del CMP se encuentran 10 de estos aminoácidos ácidos: 8 residuos de Glu y 2 de Asp. Otras investigaciones (Tuan 1987, Choi 2012) muestran que los aminoácidos básicos también tienen afinidad con el calcio principalmente causada por los grupos $-NH_2$ o $-NH$ que pueden participar en la coordinación con el

calcio. Los aminoácidos básicos en el CMP son 3 residuos de Lys. Aproximadamente un 50% del CMP está glicosilado (Thomä-Worringer et al. 2006), y el ácido siálico (reconocido ligante de calcio) se encuentra entre un 5 y 11% en peso del total de CMP, dependiendo de su origen y modo de obtención (Fernando et al. 2010).

La existente necesidad de conversión del suero de queso en productos de mayor valor agregado para el aprovechamiento de sus nutrientes y al aporte al desarrollo regional y nacional y, la disminución del impacto ambiental por ser el suero un residuo altamente contaminante, además de la problemática nutricional, urge la necesidad de caracterizar al CMP como ligante de calcio. Para ello se evaluó el efecto de la incorporación de CaCl_2 en la asociación molecular del CMP mediante la técnica de dispersión dinámica de luz láser (DLS), se analizaron los espectros infrarrojos con transformadas de Fourier (FTIR), se determinó el calcio dializado y se realizaron las isotermas de calcio unido mediante la técnica del electrodo selectivo.

Materiales y Métodos

Materiales: Se utilizó caseinomacropéptido BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Según el proveedor, su pureza fue (en base seca): $90,0 \pm 3,0\%$ (p/p) de CMP (N x 7,07). Su contenido mineral (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 682 mg de Ca determinados mediante espectrometría de absorción atómica Analyst 200 Perkin Elmer (USA). Se utilizó CaCl_2 anhidro (Merck, Alemania) de calidad analítica. El agua utilizada para preparar las soluciones fue ultrapura (Thermo Scientific Barnstead, modelo Easypure RF) y su conductividad fue $1,8 \pm 0,1 \mu\text{S/cm}$. Se consideró un peso molecular para el CMP de 7500 Da.

Preparación de las soluciones: Se utilizaron concentraciones de CMP del 10 y 50 g/L. Las soluciones de CMP se prepararon como en Loria et al. (2018) hasta alcanzar la concentración de sal deseada (entre 0 y 250 mM) de CaCl_2 . El CMP es muy soluble en agua y no se formó ningún precipitado después de añadir las soluciones salinas. El pH se ajustó entre 7,0 y 9,0 con NaOH (c).

Dispersión Dinámica de Luz Láser (DLS): Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de DLS Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital, modelo ZEN3600 según la técnica descrita en Farías et al. (2010). Las mediciones fueron realizadas a un ángulo fijo de dispersión de 173° . El rango de medición del equipo fue 0,6–6000 nm. Los ensayos fueron realizados por triplicado y a 25°C . Las soluciones de pH 7,0 fueron previamente filtradas a través de microfiltros Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra) de 0,45, 0,22 y 0,02 μm .

Fracción de calcio no dializable: Se transfirieron 5 ml de la solución de 10 mg/L CMP y 2 mmol/L CaCl_2 a la bolsa de diálisis que se sumergió en 250 mL de agua ultrapura con agitación durante 24 h a 20°C para remover el calcio libre. Los cambios de agua se realizaron cada 8 h. Antes de realizar los experimentos, los materiales utilizados fueron lavados previamente con EDTA 0,01 eq/L y enjuagados 5 veces con

agua ultrapura y la membrana de diálisis (Celulosa Ester de Biotech, MWCO: 100-500 Da, Spectrum Laboratories, Inc., USA) fue cortada en tiras de 20 cm y lavadas con agua ultrapura. La concentración de calcio libre se determinó por espectroscopía de absorción atómica con un espectrofotómetro AAnalyst 200 Perkin Elmer (USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. El blanco consistió en dializar 5 mL de CMP 10 g/L. El pH se ajustó a 7,0. Los ensayos se realizaron por duplicado y simultáneamente.

Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR): Se utilizó 1 mg de cada una de las soluciones CaCl₂-CMP (en las proporciones 0; 0,3; 1,2 y 2,0 mmol/g y pH 7,0) previamente liofilizadas, pulverizadas con 100 mg de KBr en un mortero de ágata y luego presionadas a 2000 kPa para obtener una pastilla. Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu® (modelo IR Prestige-21, Japón) y el análisis de los espectros y los picos se realizó con el software OriginPro® 8 SR0, V8.0724, USA.

Determinación de calcio libre: El calcio unido (Ca_U) se determinó por el método de Berrocal et al. (1989) que consistió en la titulación de 50 mL de una solución de 2 g/L CMP con 200 mmol/L de CaCl₂. La medición de la diferencia de potencial se midió con electrodo de ión selectivo modelo HI4104 conectado a un pHmetro modelo HI98191 (Hanna Instruments, USA) luego de la adición sucesiva de 50 mL de la solución de CaCl₂. La fuerza iónica se ajustó con 0,705 mL de una solución 3,5 moles/L de KCl. La curva de calibración se realizó simultáneamente con los ensayos para verificar la respuesta lineal del electrodo. El pH se ajustó a 7,0; 8,0 y 9,0. El calcio unido (Ca_U) se obtuvo por diferencia entre el calcio total presente en la solución y el calcio libre determinado (Ca_L). Se graficaron los valores de la inversa de Ca_U en función de la inversa del Ca_L (Gráfico de Klotz) según la Ecuación (1):

$$\frac{1}{Ca_U} = \frac{1}{n_i K_{ap} Ca_L} + \frac{1}{n_i} \quad (1)$$

Análisis estadístico: Se utilizó el software GraphPad Prims v7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico (ANOVA). Las diferencias fueron determinadas por la prueba de Tukey para P < 0,05.

Resultados y Discusión

Asociación molecular

En ausencia de CaCl_2 , las distribuciones por intensidades del tamaño de partícula por DLS fueron bimodales para 10 g/L y trimodales para 50 g/L (datos no mostrados). Sin embargo, la concentración de CMP no influyó en la posición del primer pico (2,3-2,5 nm) que fue el predominante. El software del equipo Zetasizer Nano-Zs permitió estimar el grado de asociación molecular por análisis de la posición del pico predominante, considerando que la forma monomérica del CMP (aproximadamente 7,5 kDa) (Farías et al. 2010). La **Figura 1** muestra el valor máximo del $d(H)$ del pico predominante y los correspondientes estados de asociación obtenidos en presencia de distintas cantidades de CaCl_2 para las dos soluciones de CMP (10 y 50 g/L). Se observó para ambas concentraciones, que el $d(H)$ se desplazó hacia tamaños mayores hasta alcanzar un valor máximo (5,6 nm). Es decir, el péptido en presencia de CaCl_2 se autoensambló principalmente siguiendo un mecanismo de dos en dos: desde monómeros a dímeros, tetrámeros y finalmente hexámeros dependiendo de la concentración de CaCl_2 presente en el medio. Esta asociación dependió de la relación $\text{CaCl}_2/\text{g CMP}$ y no de la concentración de sal en la solución. Basados en nuestros hallazgos, se puede afirmar que el CMP se asocia en presencia de CaCl_2 desde los monómeros hasta los dímeros (0,3 - 0,4 mmoles CaCl_2/g de CMP), luego a tetrámeros (0,7 - 0,8 mmoles CaCl_2/g de CMP), y finalmente hexámeros (1-1,2 mmoles CaCl_2/g de CMP que equivale a una relación de 7,5-9 mol CaCl_2 por mol CMP), donde alcanzó su estado de asociación máximo indicando que esta relación es su máxima capacidad ligante.

Espectroscopía FTIR

La mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, típicamente entre 4000 y 500 cm^{-1} . La energía absorbida se relaciona con la frecuencia de vibración natural de cada una de las uniones presentes en las moléculas y, por lo tanto, pueden identificarse varios tipos de uniones, así como también grupos funcionales. Los espectros FTIR están conformados por dos zonas: una de grupos funcionales (4000-1300 cm^{-1}) y otra “fingerprint” o “huella digital” que comprende longitudes de onda entre 1300 y 600 cm^{-1} . La región de grupos funcionales se usa para identificar tipo y carga de los grupos, mientras que la región de la “huella

digital” indica las características estructurales propia de la molécula. Los espectros superpuestos con diferentes proporciones de CaCl_2 (0; 0,3; 1,2 y 2,0 mmol) por g de CMP se muestran en la **Figura 2**. El espectro FTIR del CMP (ver concentración de CaCl_2 cero) fue similar al obtenido por Burgardt et al. (2015), quienes utilizaron un producto comercial del mismo proveedor. Se puede observar una banda ancha e intensa entre 3400 y 3300 cm^{-1} relacionada a un solapamiento de bandas correspondientes a la vibración de los estiramientos O–H, libre o unido (Burgardt et al. 2014). Las absorciones de tensión N-H tienen lugar a frecuencias ligeramente más bajas que las absorciones de tensión del O-H. Las bandas de las amidas secundarias A y B se encuentran a 3300 cm^{-1} y 3080 cm^{-1} , respectivamente (Burgardt et al. 2014). La banda de la amida A corresponde al estiramiento del enlace N–H en la formación de la unión puente hidrógeno N–H mientras que la amida B resulta de la resonancia de FERMI de la vibración del estiramiento N-H con el sobretono de la vibración de la amida II (Twardowski et al. 1994). Según Burgardt et al. (2014) estas bandas también están relacionadas con el aminoácido prolina, que es abundante en el CMP. Las bandas observadas en 2970 y 2940 cm^{-1} refieren a vibraciones simétricas y asimétricas del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) (Abraham et al. 2008). La vibración de la amida I, que es causada principalmente por los estiramientos del enlace $\text{C}=\text{O}$, se mide en el rango de 1700 a 1600 cm^{-1} , mientras que, la vibración de la amida II, que se produce por la deformación de los enlaces N-H y por los estiramientos de los enlaces C-N, se mide en el rango de 1600 a 1500 cm^{-1} (Curley 1998). Estos son los modos vibracionales más importantes de las amidas. Las frecuencias exactas a las que estos enlaces absorben dependen de la estructura secundaria de las proteínas o péptidos. En el espectro del CMP estas bandas se observan en 1649 cm^{-1} y 1549 cm^{-1} , y se atribuyen a las vibraciones de amida I y II respectivamente. La banda de amida III a 1240 cm^{-1} representa la combinación entre la vibración del estiramiento C-N, la flexión del enlace N-H de la amida y las vibraciones de los grupos CH_2 del esqueleto de la glicina y de las cadenas laterales de la prolina (Jackson 1995). Una de las bandas especialmente significativas en el CMP es la correspondiente al grupo funcional carboxilato (COO^-). Los carboxilatos producen una vibración a los 1400 cm^{-1} que caracteriza la coordinación de los iones metálicos divalentes (Nara 2008). La banda a 1320 cm^{-1} es atribuida al grupo CO-N (amina) (Burgardt et al. 2014). El CMP está glicosilado, y la señal de absorción en la región de la huella digital se encuentra entre 1200 y 1000 cm^{-1} (Khajehpour et al. 2006). Según Lewis et al. (2013) el ácido siálico

tiene una señal característica a 1024 cm^{-1} , la N-Acetilglucosamina (GlcNAc) a 1025 cm^{-1} y la N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a 1038 cm^{-1} . Los sitios fosforilados del CMP (Ser 149 y 127) dan una escasa señal a 990 cm^{-1} (Carmona et al. 1986). Las bandas presentes a 935 y 900 cm^{-1} estarían relacionadas con la galactosa (Burgardt y col., 2014).

Al comparar los espectros (con y sin CaCl_2) se distinguen diferencias que brindan información acerca de la estructura molecular. Puede apreciarse en la misma **Figura 2** que los principales cambios en los espectros se detectaron cuando la relación de CaCl_2/CMP fue igual o superior a 1,2 mmoles de CaCl_2/g CMP. Se distinguieron diferencias que brindaron información en la estructura molecular, por ejemplo, desplazamientos hacia el rojo o hacia el azul, incremento o reducción de picos. La absorción a alta frecuencia de 3301 cm^{-1} (Amida 2° A) que se atribuye a la vibración de estiramientos N-H cambió a 3283 cm^{-1} y el de la Amida 2° B de 3080 a 3088 cm^{-1} . Este cambio podría deberse a que los grupos N-H se reemplazarían por uniones N-Ca como describieron Peng et al. (2017) y Wang et al. (2017) para otros péptidos. La banda de Amida I a 1649 cm^{-1} para los espectros con CaCl_2/CMP , se debería a que los grupos C-O participarían en la interacción del péptido con el Ca^{2+} (Wu et al. 2019). En la región de la Amida II han desaparecido los picos correspondientes al número de onda 1535 y 1545 cm^{-1} , encontrándose un valle en el espectro del CMP/CaCl_2 .

Fundamentalmente, el cambio más relevante se observa en la banda correspondiente a la vibración de los grupos carboxílicos (COO^-), donde el pico hallado se desplazó desde 1400 cm^{-1} hacia frecuencias mayores (1416 cm^{-1}) en el espectro del CMP/CaCl_2 . Este efecto puede ser atribuido a la extensión de los grupos $-\text{COO}^-$ que se combinan con Ca^{2+} para formar $\text{COO}-\text{Ca}$ (Byler et al. 1989, Wang et al. 2017). Wang et al. (2017) estudiaron a través de espectroscopía FTIR el efecto de la interacción del CaCl_2 y un péptido proveniente de la fermentación con *B. subtilis* de semillas de pepino. Los autores observaron un desplazamiento desde 1402 cm^{-1} en el espectro del péptido libre hacia frecuencias mayores (1420 cm^{-1}) en presencia de calcio y lo atribuyeron al estiramiento del grupo carboxilato $-\text{COO}^-$ por la combinación con Ca^{2+} para formar $-\text{COO}-\text{Ca}$.

Determinación de la fracción no dializable de calcio

La capacidad ligante de calcio del CMP también se evaluó por la metodología clásica de cuantificar la fracción no dializable de calcio. Esta fracción es aquella que se

encuentra ligada al CMP y por ello no puede atravesar la membrana de diálisis. Durante las primeras horas del ensayo, la concentración de calcio dentro de la bolsa de diálisis decreció rápidamente, hasta alcanzar el equilibrio (24 h). El rápido decrecimiento de la fracción de calcio en los primeros momentos se debe a la fácil difusión de los iones a través de la membrana semipermeable, que no puede ser atravesada por el CMP. Los iones calcio difunden debido a la diferencia de potencial químico entre la solución del interior de la bolsa y el agua del exterior. Dado el impacto de la fuerza iónica en el estado de asociación del CMP, se eligió dializar la muestra contra agua ultrapura a pH 7 y no contra una solución buffer Tris-HCl como se usa en la bibliografía (Bennick 1976, Bao et al. 2007). La fracción de calcio que no atravesó la membrana de diálisis (calcio retenido en la bolsa de diálisis junto al CMP) fue del $64,4 \pm 3,3 \%$ y representó el calcio unido al CMP (a pH neutro y temperatura ambiente) que se estimó que $1,3 \pm 0,1$ milimoles de CaCl_2 por gramo de CMP, equivalente a aprox. 9-10 moles de Ca^{2+} por mol de CMP.

Calcio unido y constantes de asociación.

La constante de asociación aparente (K_{ap}), el máximo calcio unido por mg de CMP (n_i) y el número de sitios de unión se determinaron a través de un ajuste de los datos experimentales al modelo teórico de Berrocal et al. (1989). En una situación ideal se consigue una recta a partir de la cual se puede calcular la constante de asociación aparente y la cantidad máxima de moles de calcio unidos (Berrocal et al. 1989, Jung et al. 2006, Zong et al. 2012). La **Figura 3** muestra los gráficos de Klotz obtenidos al representar la inversa del calcio unido (Ca_U) vs la inversa del calcio libre (Ca_L) según la **Ecuación 1**, para las tres condiciones de pH evaluadas (7,0; 8,0 y 9,0). Se pueden distinguir el ajuste matemático para dos a tres rectas, todas de $R^2 > 0,917$, demostrando que son varios los sitios en la molécula de CMP que pueden unir Ca^{2+} . Zhang et al. (2016) reconocieron dos rectas en los diagramas de Klotz y las adjudicaron a dos maneras diferentes en las que la molécula fosfovitina se une al calcio, interaccionando con sitios de baja y alta afinidad. También Lee et al. (1977) reconocieron dos rectas para una fosfoproteína de la dentina. Cuando la concentración de calcio libre es baja, las interacciones entre el calcio y un péptido se dan en sitios de alta afinidad, y al contrario, si la concentración de calcio libre es lo suficientemente alta, podrán interaccionar los sitios más débiles, de baja afinidad.

Los moles de máximo Ca^{2+} unido expresados por mol de CMP (n_i) y los valores de K_{ap} obtenidos del ajuste matemático de los datos en la condición de bajo calcio libre (sitio de alta afinidad) se muestran en la **Tabla 1**. Para los cálculos se consideró una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da (Mollé et al. 2005). Los resultados mostraron que la cantidad obtenida de calcio unido fue independiente del pH, siendo este valor cercano a 1 mol de Ca^{2+} por mol de CMP, que correspondería a un sitio de alta afinidad con el calcio, quizá relacionado con el contenido de fósforo de la molécula según lo descrito por Berrocal et al. (1989) para fosfopéptidos. Para el caso del CMP, el residuo de Ser en posición 44 se encuentra siempre fosforilado (Mercier et al. 1993). La **Tabla 1** revela que los valores de K_{ap} de aproximadamente $2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ no dependieron del pH reforzando la hipótesis de que el sitio de alta afinidad está fuertemente ionizado en los tres pH estudiados. Zhang et al. (2016) determinaron una K_{ap} para el sitio de alta afinidad de la fosfovítina de aprox. 10^4 L mol^{-1} independiente del pH entre 7 y 8 usando la misma técnica. Lee et al. (1977) también encontraron una K_{ap} más alta ($3,6 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) para el sitio de alta afinidad de una fosfoproteína obtenida de la dentina bovina.

En la **Tabla 2**, se muestran los valores de n_i y K_{ap} en condiciones de alto calcio libre. Se encontró que la cantidad máxima de calcio unido aumentó con el crecimiento del pH desde 7 a 9. Así, un mol de CMP unió entre 8 y 14 moles de calcio. Esto sugiere que los grupos carboxilatos (residuos de glutamato y aspártico) estarían también involucrados en la unión con el calcio del CMP más allá algún residuo de Ser fosforilado. Entre los aminoácidos, el aspártico y el glutámico son fuertes ligantes de calcio, aunque débiles en comparación a otros aniones. No obstante, el efecto sinérgico es evidente tal como describieron Vavrusova et al. (2014) para otros polipéptidos. Por otro lado, si bien el número de moles de Ca^{2+} que incorporó el CMP aumentó con el pH, la K_{ap} tuvo el efecto opuesto al esperado disminuyeron desde 132 L mol^{-1} (pH 7) a 33 L mol^{-1} (pH 9). También Lee et al. (1977) hallaron una K_{ap} para los sitios de baja afinidad que fue dos órdenes de magnitud inferior que en los sitios de alta afinidad de una fosfoproteína de la dentina bovina.

No solamente la Ser fosforilada y los grupos carboxilatos podrían interactuar con el calcio. Considerando una masa molecular de ácido siálico de 309 g/mol, se puede estimar que un mol de CMP proporcionaría entre 1,2 y 2,7 moles de ácido siálico. Como el complejo formado por la unión entre el siálico y calcio es 1:1 (Jaques et al. 1977), cada mol de CMP puede unir entre 1 y 3 moles de calcio solamente por la

presencia de siálico. Por ello, el grado de glicosilación del CMP no es un dato menor si se desea analizar su capacidad ligante de calcio. En resumen, considerando todos los posibles sitios de interacción el CMP puede llegar a unir hipotéticamente entre 11 y 14 moles de calcio por mol, un dato similar al obtenido en este ensayo (**Tabla 1** y **Tabla 2**).

Conclusiones

Se concluye mediante diferentes técnicas que efectivamente el CMP tiene capacidad ligante de calcio a pH neutro. A pH 7,0, el CMP se encuentra formando moléculas individuales (monómeros), pero si se adiciona CaCl_2 , las cargas electroestáticas se apantallan y los residuos hidrofóbicos de la molécula de CMP pueden interaccionar. Los resultados de DLS indicaron que cuando la concentración de cloruro de calcio es superior a una relación 9-10 moles CaCl_2 por mol de CMP, se alcanza el máximo estado de asociación, un hexámero. Este cambio en el tamaño es indicativo de una interacción molecular con el CaCl_2 . En condiciones de bajo calcio libre un mol de CMP une fuertemente 1 mol de calcio, independientemente del pH. En las condiciones de alto calcio libre un mol de CMP une (más débilmente) al calcio, con un valor mínimo de 8 moles a pH 7 y máximo de 14 moles de calcio a pH 9. Los espectros FTIR de CMP/CaCl_2 confirmaron que en presencia de calcio iónico se evidencia principalmente un corrimiento en la posición de los grupos carboxilatos (COO^-) desde 1400 cm^{-1} a 1416 cm^{-1} que indicarían interacción para la misma relación. Este trabajo demuestra una nueva propiedad del CMP con alto valor agregado.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Pilosof y Bioq. Andrés Pighín. Los autores desean agradecer al departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (Proyecto PICT-2014-1402), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Figura 1

Valor máximo del $d(H)$ del primer pico de la distribución (intensidades) de soluciones de CMP en función de concentraciones crecientes de CaCl_2 a pH 7 y 25 °C. Concentración de CMP: **A)** 10 g/L y **B)** 50 g/L. Se indica el estado de asociación predominante estimado mediante el software del equipo Zetasizer Nano-Zs. Las barras representan el desvío estándar.

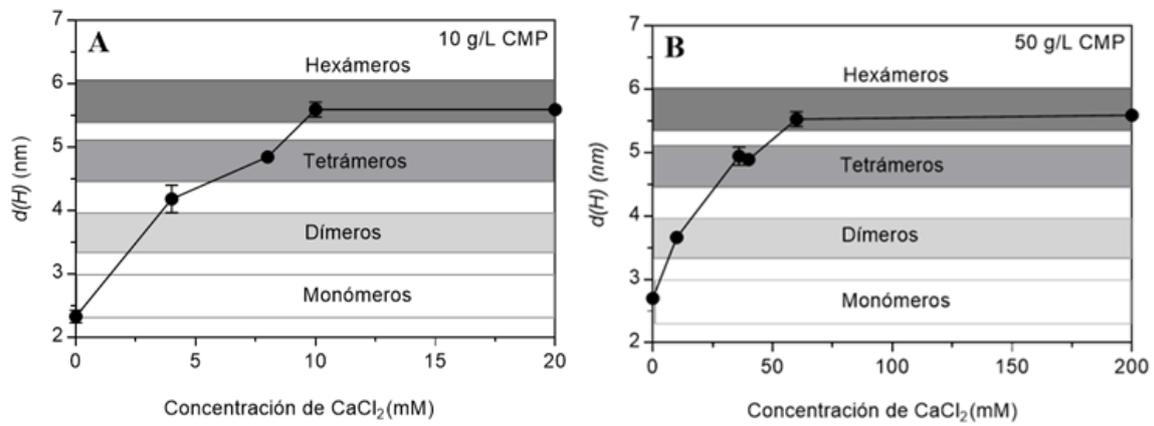


Figura 2. Espectro FTIR del CMP con diferentes relaciones CaCl_2/CMP , desde 4000 a 500 cm^{-1} .

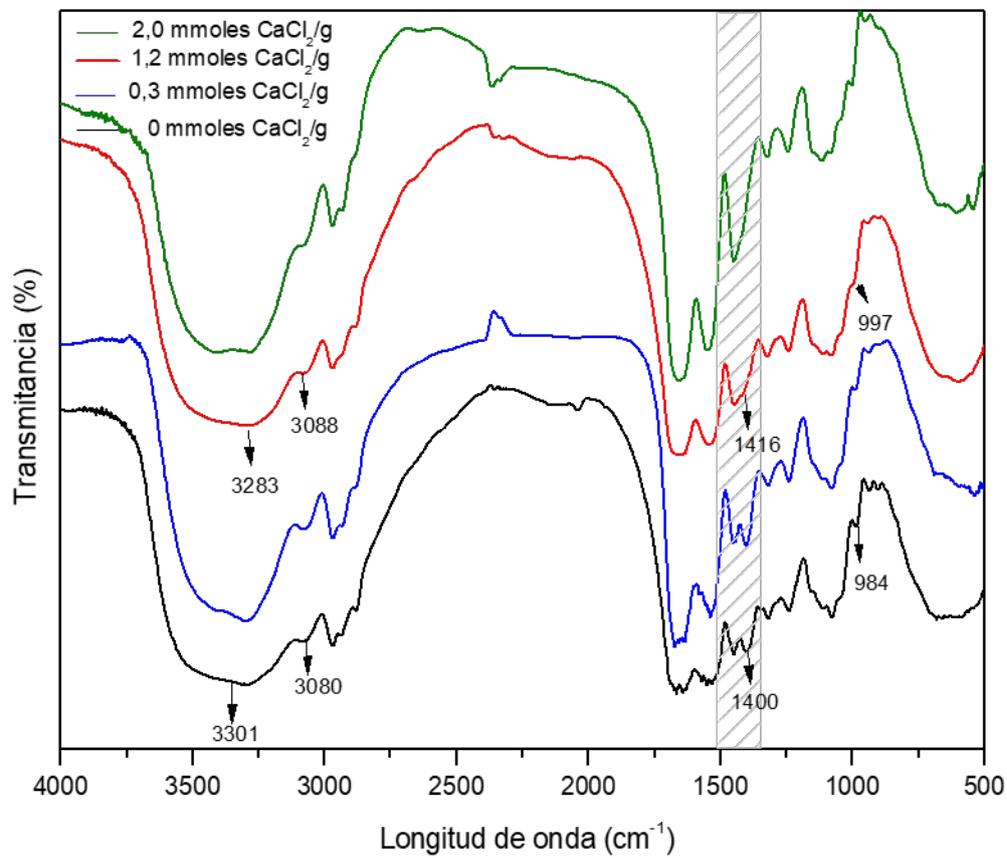


Figura 3. Gráficos de Klotz del sistema Ca/CMP a **A)** pH 7, **B)** pH 8 y **C)** pH 9 con una fuerza iónica de 0,05 M (KCl) y 25°C, asumiendo una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

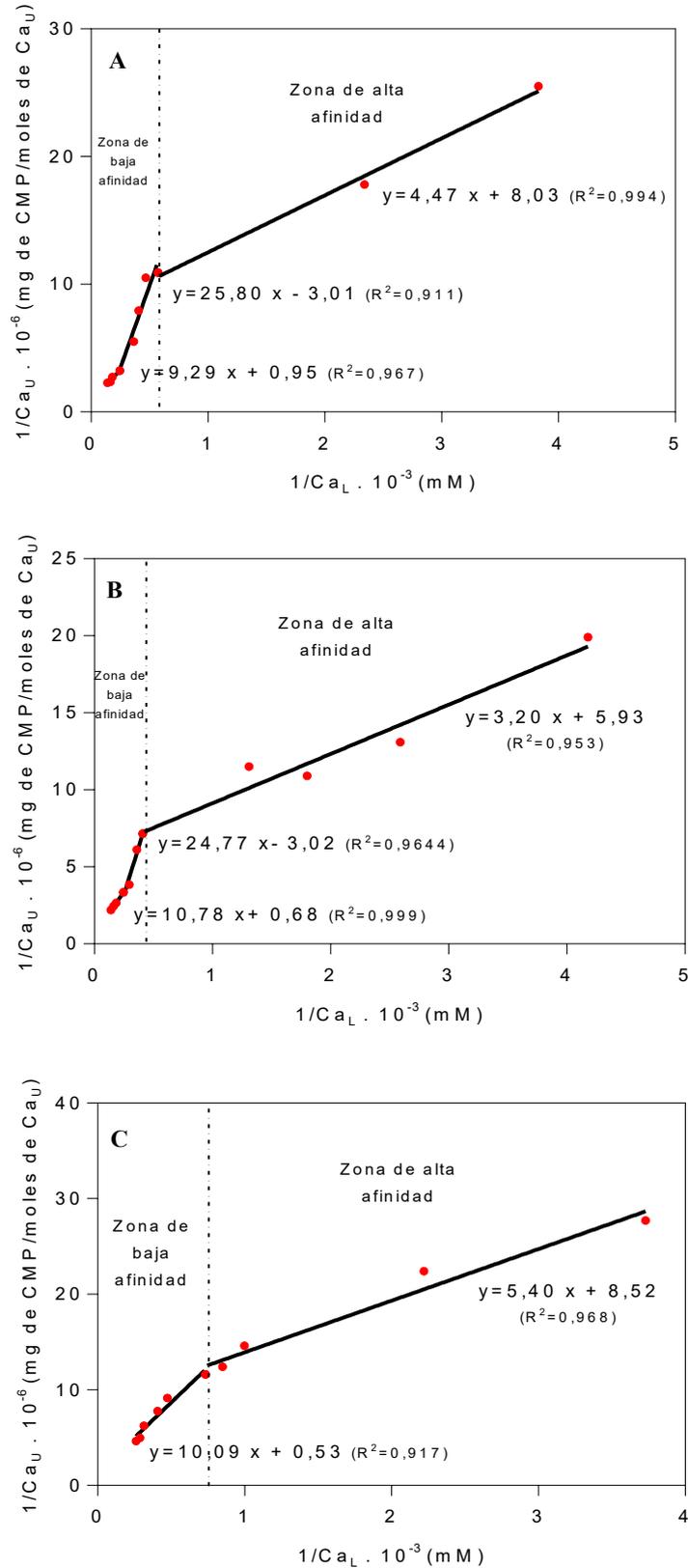


Tabla 1. K_{ap} y n_i en condiciones de bajo calcio libre obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (L mol⁻¹)	1700 ± 300 ^a	2200 ± 300 ^a	1600 ± 50 ^a
n_i (moles de Ca²⁺/mol de CMP)	0,93 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,21 ^a	0,87 ± 0,12 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

Tabla 2. K_{ap} y n_i en condiciones de alto calcio libre obtenidos del gráfico de Klotz. Se asumió una masa molecular promedio para el CMP de 7500 Da.

pH	7	8	9
K_{ap} (L mol⁻¹)	132 ± 30 ^a	63 ± 1 ^{a, b}	33 ± 1 ^b
n_i (moles de Ca²⁺/mol de CMP)	7,9 ± 1,8 ^a	11,0 ± 0,48 ^a	14,0 ± 0,6 ^a

Letras diferentes representan diferencias significativas a $p > 0,05$.

Bibliografía

- Abraham, J. P., D. Sajan, I. H. Joe and V. S. Jayakumar (2008). "Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of p-amino acetanilide." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **71**(2): 355-367.
- Bao, X. L., M. Song, J. Zhang, Y. Chen and S. T. Guo (2007). "Calcium-binding ability of soy protein hydrolysates." Chinese Chemical Letters **18**(9): 1115-1118.
- Bennick, A. (1976). "The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein A, common to human parotid and submandibular secretions." Biochemical Journal **155**(1): 163-169.
- Berrocal, R., S. Chanton, M. A. Juillerat, B. Favillare, J.-C. Scherz and R. Jost (1989). "Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium." Journal of Dairy Research **56**(3): 335-341.
- Berrocal, R., C. Serge, J. M. A., Favillare Blaise, S. Jean-Claude and J. Rolf (1989). "Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium." Journal of Dairy Research **56**(3): 335-341.
- Brody, E. P. (2000). "Biological activities of bovine glycomacropeptide." British Journal of Nutrition **84**(SupplementS1): 39-46.
- Burgardt, V. C. F., D. F. Oliveira, I. G. Evseev, A. R. Coelho, C. W. I. Haminiuk and N. Waszczynskij (2014). "Influence of concentration and pH in caseinomacropeptide and carboxymethylcellulose interaction." Food Hydrocolloids **35**: 170-180.
- Burgardt, V. C. F., L. C. B. Züge, G. de Bonna Sartor, N. Waszczynskij, J. L. M. Silveira and C. W. I. Haminiuk (2015). "The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics." Food Hydrocolloids **49**(0): 11-17.
- Byler, D. M. and H. M. Farrell, Jr. (1989). "Infrared Spectroscopic Evidence for Calcium Ion Interaction with Carboxylate Groups of Casein." Journal of Dairy Science **72**(7): 1719-1723.
- Carmona, P. and M. L. Rodriguez (1986). "Hydrogen bonding between phosphate and amino acid side chains." Journal of Molecular Structure **143**: 365-368.
- Chen, M., H. Ji, Z. Zhang, X. Zeng, W. Su and S. Liu (2019). "A novel calcium-chelating peptide purified from *Auxis thazard* protein hydrolysate and its binding properties with calcium." Journal of Functional Foods **60**: 103447.
- Choi, D. W., Lee, J. H., Chun, H. H., & Song, K. B (2012). "Isolation of a calcium-binding peptide from bovine serum protein hydrolysates." Food Science and Biotechnology **21**(6): 1663-1667.
- Curley, D. K., T.; Unrah, J.; Farrell, H. (1998). "Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: effects of calcium and temperature." J. Dairy Sci. **81**: 3154-3162.
- Dziuba, J. and P. Minkiewicz (1996). "Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's κ -casein." International Dairy Journal **6**(11-12): 1017-1044.
- El-Salam, M. H. A., S. El-Shibiny and W. Buchheim (1996). "Characteristics and potential uses of the casein macropeptide." International Dairy Journal **6**(4): 327-341.
- FAO (2001). " Human Vitamin and Mineral Requirements, Report 07a." Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok, Thailand.
- Farías, M. E., M. J. Martinez and A. M. R. Pilosof (2010). "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation." International Dairy Journal. **20**: 79-88.
- Fernando, S. F. and B. W. Woonton (2010). "Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP)." Journal of Food Composition and Analysis **23**(4): 359-366.
- Hou, H., S. Wang, X. Zhu, Q. Li, Y. Fan, D. Cheng and B. Li (2018). "A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex." Food Chemistry **243**: 389-395.

- Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., & Mantsch, H. H. (1995). "Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues." *Biochimica et Biophysica Acta e Molecular Basis of Disease* **1270**: 1-6.
- Jaques, L. W., E. B. Brown, J. M. Barrett, W. S. Brey and W. Weltner (1977). "Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate." *The Journal of Biological Chemistry* **252**, Nº **13**: 4533-4538.
- Jung, W.-K., R. Karawita, S.-J. Heo, B.-J. Lee, S.-K. Kim and Y.-J. Jeon (2006). "Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis." *Process Biochemistry* **41**(9): 2097-2100.
- Kawasaki, Y., H. Kawakami, M. Tanimoto, S. Dosako, A. Tomizawa, M. Kotake and I. Nakajima (1993). "pH-Dependent molecular weight changes of κ -casein glycomacropéptide and its preparation by ultrafiltration." *Milchwissenschaft* **48**: 191-196.
- Khajehpour, M., J. L. Dashnau and J. M. Vanderkooi (2006). "Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins." *Analytical Biochemistry* **348**(1): 40-48.
- Korhonen, H. and A. Pihlanto (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality." *International Dairy Journal* **16**(9): 945-960.
- Kreuß, M., T. Strixner and U. Kulozik (2009). "The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropéptide." *Food Hydrocolloids* **23**(7): 1818-1826.
- Lee, S. L., A. Veis and T. Glonek (1977). "Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein." *Biochemistry* **16**(13): 2971-2979.
- Lewis, S. P., A. T. Lewis and P. D. Lewis (2013). "Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR." *Vibrational Spectroscopy* **69**: 21-29.
- Loria, K. G., A. M. R. Pilosof and M. E. Fariás (2018). "Influence of calcium and sodium chloride on caseinomacropéptide self-assembly and flow behaviour at neutral pH." *LWT* **98**: 598-605.
- Martinez, M. J., M. E. Fariás and A. M. R. Pilosof (2011). "Casein glycomacropéptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating." *Food Hydrocolloids* **25**(5): 860-867.
- Mercier, J.-C. and J.-L. Vilotte (1993). "Structure and Function of Milk Protein Genes." *Journal of Dairy Science* **76**(10): 3079-3098.
- Mollé, D. and J. Léonil (2005). "Quantitative determination of bovine κ -casein macropéptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS)." *International Dairy Journal* **15**(5): 419-428.
- Morales, R., M. J. Martinez and A. M. R. Pilosof (2019). "pH-induced cold gelation of caseinglycomacropéptide emulsions." *Food Hydrocolloids* **87**: 805-813.
- Nara, M. a. T., Masaru (2008). "Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communication* **369**: 225-239.
- Ney, D. M., A. K. Hull, S. C. van Calcar, X. Liu and M. R. Etzel (2008). "Dietary Glycomacropéptide supports growth and reduces the concentrations of phenylalanine in plasma and brain in a murine model of phenylketonuria." *J. Nutr.* **138**(2): 316-322.
- Peng, Z., H. Hou, K. Zhang and B. Li (2017). "Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats." *Food Chemistry* **221**: 373-378.
- Thomä-Worringer, C., J. Sørensen and R. López-Fandiño (2006). "Health effects and technological features of caseinomacropéptide." *International Dairy Journal* **16**(11): 1324-1333.
- Tuan, R. S., Scott, W. A., & Cohn, Z. A. (1987). "Purification and characterization of calcium-binding protein from chick chorioallantoic membrane." *Journal of Biological Chemistry* **253**(4): 1011-1016.
- Twardowski, J. and P. Anzenbacher (1994). *Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry / J. Twardowski, P. Anzenbacher ; translation editor, Mary Masson*. New York : Warsaw, Ellis Horwood ; Polish Scientific Publishers.
- Vavrusova, M. and L. H. Skibsted (2014). "Calcium nutrition. Bioavailability and fortification." *LWT - Food Science and Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034>.
- Wang, L., Y. Ding, X. Zhang, Y. Li, R. Wang, X. Luo, Y. Li, J. Li and Z. Chen (2018). "Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination." *Food Chemistry* **239**: 416-426.

- Wang, X., A. Gao, Y. Chen, X. Zhang, S. Li and Y. Chen (2017). "Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization." Food Chemistry **229**: 487-494.
- Wu, W., L. He, Y. Liang, L. Yue, W. Peng, G. Jin and M. Ma (2019). "Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis." Food Chemistry **284**: 80-89.
- Wu, W., B. Li, H. Hou, H. Zhang and X. Zhao (2017). "Isolation and identification of calcium-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and their binding properties with calcium." Food & Function **8**(12): 4441-4448.
- Zhang, X., F. Geng, X. Huang and M. Ma (2016). "Calcium binding characteristics and structural changes of phosvitin." Journal of Inorganic Biochemistry **159**: 76-81.
- Zhao, L., S. Huang, X. Cai, J. Hong and S. Wang (2014). "A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate." Journal of Functional Foods **10**: 46-53.
- Zong, H., L. Peng, S. Zhang, Y. Lin and F. Feng (2012). "Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides." European Food Research and Technology **235**(5): 811-816.