

---

---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Aislamiento de biopéptidos con actividad inhibitoria  
de la enzima convertidora de angiotensina-I a partir  
de hidrolizados de *P. lunatus***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**M. en C. MARIO ALBERTO DE JESÚS  
DOMÍNGUEZ MAGAÑA**

**DIRECTORES:**

**Dra. Gloria Dávila Ortiz**

**Dr. Luis Chel Guerrero**



**México, D.F., Diciembre de 2009**

## AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, **Dra. Gloria Dávila Ortíz** por todas sus valiosas enseñanzas científicas y también las de carácter humano, por todo su apoyo incondicional y paciencia brindada para lograr la culminación de este proyecto de investigación.

A mi Director de Tesis, **Dr. Luis Antonio Chel Guerrero**, por toda la orientación técnica, científica, apoyo, confianza y amistad otorgada para realizar este trabajo de investigación durante los años del Doctorado.

Al **Dr. David Betancur Ancona**, por proporcionar en todo momento su valiosa ayuda, amistad y consejo profesional en la parte experimental de la tesis doctoral

A mi Comité Revisor de Tesis, **Dr. Humberto Hernández Sánchez, Dra. Rosalva Mora Escobedo, Dra. Georgina Calderón Domínguez y Dra. Alma Leticia Martínez Ayala**, por su contribución al enriquecimiento de esta Tesis.

De mi consideración muy distinguida a la **Dra. Alma Leticia Martínez Ayala** por facilitar el acceso a los laboratorios del **CEPROBI-IPN** y porque siempre estuvo al pendiente en todo momento de las necesidades requeridas durante los años del posgrado. Gracias

Mención especial al **Dr. Javier Vioque Peña** por facilitar el acceso a los laboratorios del Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto de la Grasa, C.S.I.C. para efectuar parte del trabajo experimental y también a su equipo de trabajo: Dr. Francisco Millán, Manuel Alaiz, Justo Pedroche, María del Mar Yust, Julio Girón, Cristina Megías, Cristina Torres, Lola. Muchísimas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por brindarme el apoyo económico como becario con número de registro 47193 y así poder concluir satisfactoriamente los estudios de Doctorado. De igual forma por el financiamiento para el proyecto de **Ciencia Básica** con clave **25796**. Asimismo al apoyo económico de la **SIP-IPN** con la clave del proyecto: 20082532 y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (**PIFI**) por el otorgamiento de becas para la realización de este trabajo.

Finalmente a mis compañeros y amigos que me acompañaron en todo momento y me alentaron en los momentos difíciles en los años de este posgrado y en ocasiones me ayudaron en las diferentes metodologías en laboratorio. A los amigos de la Facultad de Ingeniería Química: Jessé, Gustavo, Mayra, Jorge, Yasser, Teresita, Katy, Nely, Melissa, Mayday, Maestra Rubí Zumárraga, Felipe Pérez, David Dzib, entre otros. A los amigos del Ceprobi: Paul Mauricio, Jacqueline Capataz, Fernando Osorio, Galia, Dante, Salvador, Margarita, Pamela, Jorge Isaac, Ariana, Rita, María Luisa, entre otros. A los amigos de la ENCB-IPN: Cristian Jiménez, Lety Peña, Adriana Tapia, Juan Torruco, Ivonne Pérez, Alaide Jiménez, Rocío Martínez, Brenda Camacho, Carolina Gumeta, María Ximena Quintanilla, Herry Permady, Luz, Ulises, entre otros. Muchísimas gracias a todos ustedes.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
II.1. Hipertensión arterial	3
II.1.2. Sistemas Renina-Angiotensina y su papel en la presión arterial	4
II.1.2.1. La Enzima convertidora de angiotensina-I	5
II.2.2. Tratamiento de la Hipertensión a través de fármacos	7
II.2.2.1. Desventajas de los tratamientos con fármacos	9
II.3. Péptidos bioactivos	10
II.3.1. Fuentes	10
II.3.2. Actividad antihipertensiva en biopéptidos	14
II.3.3. Alternativas tecnológicas para su obtención	14
II.3.4. Aislamiento, purificación y caracterización de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva	16
II.4. Generalidades del frijol lima <i>Phaseolus lunatus</i>	17
II.4.1. Producción de <i>Phaseolus lunatus</i>	18
II.4.2. Composición química y fracciones proteicas de la semilla de <i>Phaseolus lunatus</i>	18
II.5. Germinación	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	22
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	23
V.1. Objetivos específicos	23
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	24
VI.1. Estrategia experimental	24
VI.2. Obtención de la materia prima	25
VI.3. Germinación de granos de frijol lima	26
VI.4. Preparación de harinas de frijol lima	26
VI.5. Obtención de concentrados proteicos de frijol lima	26
VI.6. Composición proximal	27
VI.7. Análisis de aminoácidos en concentrados proteicos y fracciones peptídicas con mayor actividad IECA-I	29
VI.8. Rendimiento en la obtención de concentrados proteicos.	29
VI.9. Hidrólisis enzimática.	29
VI.9.1. Diseño experimental con alcalasa	29
VI.9.2. Diseño experimental con pepsina-pancreatina	30
VI.10. Determinación del Grado de hidrólisis	30

	<b>Página</b>
VI.11. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA-I <i>in vitro</i>	31
VI.12. Obtención de fracciones peptídicas por intervalos de tamaño molecular, a partir de hidrolizados con mayor poder antihipertensivo	31
VI.13. Purificación de fracciones peptídicas con mayor poder inhibitorio de la ECA-I por HPLC	32
VI.14. Diseño experimental	33
VI.14a.- Experimento Uno: digestión con alcalasa 2.4 L	33
VI.14b.- Experimento Dos: sistema secuencial pepsina - pancreatina	34
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
VII.1. Análisis proximal de las harinas y de los concentrados proteicos de <i>P. lunatus</i> y perfil de aminoácidos	35
VII.1.1. Análisis proximal	35
VII.1.2. Perfil de aminoácidos en harinas y concentrados proteínicos	40
VII.2. Rendimiento del proceso para la obtención de concentrados proteicos	43
VII.3. Hidrólisis enzimática a partir de concentrados proteínicos	44
VII.3.1. Sistema con Alcalasa 2.4 L.	44
VII.3.2. Sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina	51
VII.4. Purificación de péptidos inhibidores de ECA-I por cromatografía de filtración en gel a partir de hidrolizados más promisorios	62
VII.4.1. Fraccionamiento de hidrolizados promisorios con alcalasa	62
VII.4.2. Fraccionamiento de hidrolizados promisorios con pepsina – pancreatina	68
VII.5. Purificación de fracciones peptídicas más promisorias por HPLC	79
VII.5.1. Purificación de fracciones más promisorias obtenidas con alcalasa a partir de cromatografía de filtración en gel	79
VII.5.2. Purificación de fracciones más promisorias obtenidas con pepsina-pancreatina a partir de cromatografía de filtración en gel	85
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Sistema Renina.angiotensina y Kalikreína-kikina en la presión arterial	5
2	Estructura y conformación de la ECA-I, encontrada en plasma, en células somáticas y testicular, mostrando los sitios activos catalíticos, dependencia del zinc y las regiones N y C	7
3	Planta y semillas del frijol lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> )	18
4	Diagrama de flujo de la investigación	25
5	Diagrama de flujo para la obtención de concentrados proteicos	28
6	Grados de hidrólisis obtenidos con el sistema Alcalasa 2.4 L sobre concentrados de frijol lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> ) a partir de grano sin germinar CP <sub>1</sub> y germinado CP <sub>2</sub>	45
7	Efecto de factores significativos en hidrólisis con alcalasa 2.4L de concentrados proteínicos a partir de granos sin germinar (CP <sub>1</sub> ) y germinados (CP <sub>2</sub> ) de P. lunatus en a) grado de hidrólisis GH y b) inhibición de ECA-I (IC50): Factor A: fuente de concentrado proteínico (CP <sub>1</sub> y CP <sub>2</sub> ); Factor B: relación E/S; Factor C: tiempo de hidrólisis.	47
8	Grados de hidrólisis obtenidos con el sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina sobre concentrados de frijol lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> ) a partir de grano sin germinar CP <sub>1</sub> y germinado CP <sub>2</sub>	53
9	Efecto de factores significativos en hidrólisis pepsina-pancreatina de concentrados proteínicos a partir de granos sin germinar (CP <sub>1</sub> ) y germinados (CP <sub>2</sub> ) de P. lunatus en a) grado de hidrólisis GH y b) inhibición de ECA-I (IC50): Factor A, fuente de concentrado proteínico; Factor B: relación E/S; Factor C: tiempo de hidrólisis.	54
10	Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H4 obtenido con Alcalasa por cromatografía de filtración en gel	63
11	Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H7 obtenido con Alcalasa, por cromatografía de filtración en gel	66
12	Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H12 obtenido con pepsina-pancreatina, empleando cromatografía de filtración en gel	69
13	Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento 15 obtenido con Pepsina-Pancreatina, empleando cromatografía de filtración en gel	72
14	Perfil de elución del hidrolizado proteico de girasol obtenido tras la acción secuencial de pepsina y pancreatina en una columna de filtración en gel Sephadex G-	75
15	Cromatografía semipreparativa RP-HPLC C <sub>18</sub> de las fracciones más promisorias (F4-4, F4-5, F7-3, F7-4), obtenidas con alcalasa.	80
16	Cromatograma de la muestra F7-4 separada por HPLC en columna semipreparativa	82

## Continuación Índice de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>17</b>	Cromatograma de la muestra F7-B con mayor actividad antihipertensiva, obtenida por RP-HPLC en columna analítica y valores de inhibición de ECA-I en los picos recolectados	82
<b>18</b>	18 Cromatografía semipreparativa RP-HPLC-C <sub>18</sub> de las fracciones más promisorias (F12-2, F12-4, F15-2, F15-5), obtenidas con pepsina-pancreatina.	86
<b>19</b>	Cromatograma de la muestra 12-4 separada por RP-HPLC en columna semipreparativa y valores de inhibición de ECA-I en las fracciones recolectadas.	88
<b>20</b>	Cromatograma de la muestra 12-C con mayor actividad antihipertensiva, obtenida por HPLC en columna analítica y valores de inhibición en los seis regiones recolectadas	89
<b>21</b>	Dendograma de las 6 fracciones más promisorias	94

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18	3
2	Péptidos bioactivos con poder de inhibición de la ECA-I, derivadas de la caseína de la leche de vaca: casokininas	11
3	Péptidos bioactivos con poder de inhibición de la ECA-I, derivadas de las proteínas del suero de la leche de vaca: lactokininas	12
4	Algunos péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, derivadas de fuentes diferentes a las proteínas de la leche de vaca	13
5	Composición proximal del frijol lima según varios autores.	19
6	Proporción de las fracciones proteicas de la harina de <i>P. lunatus</i> .	20
7	Tratamientos efectuados para el procedimiento enzimático I con la alcalasa 2.4L.	33
8	Tratamientos efectuados para el procedimiento enzimático II sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina.	34
9	Análisis proximales al grano de <i>P. lunatus</i> germinado y sin germinar	36
10	Análisis proximales al concentrado proteico de <i>P. lunatus</i>	38
11	Composición de aminoácidos en harinas y concentrados proteínicos a partir de frijol lima ( <i>P. lunatus</i> )	42
12	Composición de aminoácidos en harinas y aislados proteínicos a partir de lupino ( <i>L. mutabilis</i> ) y a partir de semillas de girasol ( <i>Helianthus annuus</i> );	43
13	Grados de hidrólisis (GHs) e inhibición de ECA-I (IC <sub>50</sub> ) en los hidrolizados con alcalasa 2.4L, a partir de concentrados proteínicos de a) grano sin germinar (PC <sub>1</sub> ) y b) germinado (PC <sub>2</sub> ) de <i>P. lunatus</i>	45
14	Composición de aminoácidos en los hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H4 y H7), obtenidos con alcalasa 2.4L. Comparativo con CP <sub>1</sub> y CP <sub>2</sub>	50
15	Grados de hidrólisis obtenidos en los hidrolizados a partir de los concentrados de frijol lima, empleando el sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina	53
16	Composición de aminoácidos en los hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H12 y H15), obtenidos con pepsina-pancreatina. Comparativo con CP <sub>1</sub> y CP <sub>2</sub>	57
17	Composición de aminoácidos en los cuatro hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H7 y H12 a partir de CP <sub>1</sub> ; H4 y H15 a partir de CP <sub>2</sub> ).	59
18	Tratamientos con los mejores valores de actividad antihipertensiva, en comparación con otros hidrolizados de diferentes investigadores	61
19	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F4-4 y F4-5), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H4 preparado a partir de CP <sub>2</sub> con alcalasa	64

## Continuación Índice de Cuadros

Cuadro	Descripción	Página
20	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F7-3 y F7-4) obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H7 preparado a partir de CP <sub>1</sub> y con Alcalasa 2.4L	67
21	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F12-2 y F12-4), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H12 preparado a partir de CP <sub>1</sub> y con pepsina-pancreatina	71
22	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F15-2 y F15-5), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H15 preparado a partir de CP <sub>2</sub> y con pepsina-pancreatina	74
23	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I, obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir de CP <sub>1</sub> y de CP <sub>2</sub>	76
24	Comparativo en la composición de aminoácidos en los picos que eluyeron en primer término y con pesos moleculares mayores a 1.4 kDa	78
25	Fracciones obtenidas por Cromatografía de filtración en gel con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I	79
26	Composición de aminoácidos en las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de ECA-I (7B-6, 7B-7 y 7B-8), obtenidas por HPLC a partir de la muestra F7-4 obtenida con Alcalasa 2.4L	84
27	Composición de aminoácidos en las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de ECA-I (12C-3, 12C-4 y 12C-5), obtenidas por HPLC a partir de la muestra F12-4 obtenida con pepsina-pancreatina	91
28	Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I, obtenidas por RP-HPLC a partir de la fracción F7-4 y de la fracción F12-4 obtenidas por cromatografía de filtración en gel.	92

## RESUMEN

En la actualidad, existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta, denominados péptidos bioactivos, que poseen actividad biológica benéfica al organismo (antihipertensivos, antioxidantes, anticancerígenos, anticolesterolémicos, antitrombóticos, etc), además de regular procesos fisiológicos y de su valor nutricional. Desde mediados de los años 80's ha existido una demanda de fuentes proteínicas vegetales para la elaboración de formulaciones alimentarias, sustituyendo a los hidrolizados de origen animal. En el presente trabajo de investigación se efectuaron hidrolizados a partir de concentrados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) empleando dos sistemas enzimáticos, el primero con alcalasa 2.4L y el segundo con pepsina-pancreatina a través de un diseño experimental 2<sup>3</sup> donde se evaluó el efecto de tres factores (fuente de concentrado proteínico CP: de semilla sin germinar CP<sub>1</sub> y de semilla germinada CP<sub>2</sub>, relación enzima/sustrato E/S: 1/50 y 1/10 y tiempo de hidrólisis: 0.5 y 2 h para alcalasa; 1 y 3 h para pepsina-pancreatina) sobre el grado de hidrólisis GH y sobre la actividad inhibitoria de ECA-I. Los hidrolizados preparados con alcalasa tuvieron GH entre 24.12 y 58.94% y una actividad de inhibición (IC<sub>50</sub>: cantidad de proteína requerida para inhibir el 50% de la actividad de ECA-I) entre 0.56 y 2.4 mg/ml. En los hidrolizados obtenidos con pepsina-pancreatina, los GH fueron menores (15.35-37.07%), pero se obtuvieron mejores resultados de inhibición (IC<sub>50</sub>: 0.25-0.69 mg/ml). En la cromatografía por filtración en gel de los hidrolizados H4, H7, H12 y H15 con mayor actividad antihipertensiva se recolectaron catorce fracciones peptídicas con valores de inhibición de ECA-I entre 8.65-45.9% y con pesos moleculares entre 1 y 0.75kDa. En la purificación por HPLC de las dos fracciones más promisorias F7-4 y F12-4 ambos a partir de CP<sub>1</sub>, se recolectaron fracciones peptídicas con mayor poder de inhibitorio de ECA-I. En F7-4 se recolectaron tres fracciones promisorias (F7B-6, F7B-7 y F7B-8) con IC<sub>50</sub> entre 1.7 y 3.8 µg/ml; a partir de F12-4, las fracciones promisoras fueron F12C-3, F12C-4 y F12C-5 con IC<sub>50</sub> entre 0.9 y 3.4 µg/ml. En el perfil de aminoácidos de estas seis fracciones obtenidas fue evidente el incremento de prolina, triptófano, metionina y fenilalanina, así como también en el contenido de aminoácidos hidrofóbicos.

## ABSTRACT

Currently, is a major interest for specific fragments of dietary proteins, called bioactive peptides, which possess biological activity improving human health (antihypertensive, antioxidant, anticancer, anticholesterolemic, antithrombotic, etc), additionally these peptides regulate physiological processes besides their nutritional value. Since middle 80's there's been a massive demand for the elaboration of food formulas from vegetal protein sources. In the present investigation, hydrolysates were prepared from protein concentrates of Lima bean (*Phaseolus lunatus*) using two enzymatic systems, Alcalase 2.4L and Pepsin-Pancreatin respectively, through a experimental design  $2^3$ , where the effect of three factors was evaluated (protein concentrate source: of ungerminated grain CP1 and germinated grain CP2, enzyme/substrate relation E/S: 1/50 and 1/10, hydrolysis time: 0.5 and 2 h for Alcalase; 1 and 3 h for Pepsin-Pancreatin) in respect to hydrolysis grade and inhibitory activity of the ACE-I. The hydrolysates prepared with Alcalase showed GH between 24.12% and 58.94% and an inhibitory activity ( $IC_{50}$ : amount of protein required to inhibit the 50% of the ACE-I activity) amid 0.56-2.4 mg/mL. On the other hand, in the hydrolysates obtained with Pepsin-Pancreatin, the GH's were minor (15.35-37.07%), but better results in regard to inhibitory activity ( $IC_{50}$ : 0.25-0.69 mg/mL). In the Size Exclusion Chromatography of the hydrolysates H4, H7, H12 and H15 with higher antihypertensive activity were collected fourteen peptidic fractions with inhibitory values of the ACE-I ranging from 8.65-45.9 % and molecular weights between 1-0.75 kDa. In the purification step by HPLC of the two most promising fractions F7-4 and F12-4 both from the CP<sub>1</sub>, peptidic fractions were collected with superior inhibition activity of the ACE-I. In F7-4 three notable fractions were collected (F7B-6, F7B-7 and F7B-8) with  $IC_{50}$  values varying between 1.7-3.8  $\mu$ g/mL; from F12-4, the superb fractions were F12C-3, F12C-4 and F12C-5 with  $IC_{50}$  in the range of 0.9-3.4  $\mu$ g/mL. In the Aminoacid Profile of these six new fractions the increase of Pro, Trp, Met and Phe was evident, as well in the content of hydrophobic aminoacids.



## I. INTRODUCCIÓN

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales. En los últimos años se ha iniciado el desarrollo de este tipo de alimentos, así como también los medios de comunicación han propiciado que la mayoría de los países poco a poco vayan entendiendo que este es el camino correcto, sobre todo para mejorar los costos de manutención de las instituciones de salud para tratar los diferentes trastornos ligados a una inadecuada nutrición como son: obesidad, hipertensión, problemas digestivos, colesterol alto y triglicéridos, entre otros, que son el resultado de esta vida agitada que se vive en la actualidad. Por otra parte, la hipertensión arterial constituye una de las principales preocupaciones de todas las instituciones de salud que se localizan en todo el mundo. Esto ha surgido debido a la gran cifra de individuos que la padecen así como también las estadísticas de decesos por esta mortal enfermedad. México no es la excepción y se sabe que hay 30% en promedio de prevalencia de esta enfermedad en todos los estados de la República. Las encuestas en materia de salud indican que hay un gran número de personas que desconocen que padece de hipertensión arterial y que como no se cuenta con la cultura de medicarse periódicamente a través de pastillas, muy poca gente está recibiendo un control adecuado. A pesar de lo anterior, el auge en la ciencia y tecnología de los alimentos ha mostrado que dentro de las proteínas se pueden obtener sustancias capaces de disminuir y controlar la hipertensión arterial. Estas sustancias, en forma de péptidos bioactivos, constituyen una alternativa para combatir esta enfermedad y ya hay países del primer mundo que están utilizando el consumo de alimentos funcionales conteniendo estos péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas. Uno de los primeros productos en ser comercializados fue el Evolus™ en Finlandia en el año 2000, actualmente se produce LH™ (Islandia), Kaiku Vita™ Danaten™ (España) y Emmi Evolus™

(Portugal), que básicamente son leches fermentadas por diferentes especies de lactobacilos sobre caseína. En Japón se produce el Calpis™ que también resulta de la hidrólisis de caseína por proteasas de *Aspergillus niger*. En todos los casos la acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por Val-Pro-Pro (VPP) y Ile-Pro-Pro (IPP), los cuales purificados o como componentes de los productos hidrolizados han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto.

La mayor investigación de estas sustancias con actividad antihipertensiva se ha dado principalmente en proteínas de origen animal como son la carne de pescado, el huevo y la leche y derivados lácteos; sin embargo se sabe que estas proteínas son de un alto costo. Existen otras fuentes económicas de proteínas como son de leguminosas y algunos cereales. Es bien sabido que las leguminosas tienen un lugar importante en la dieta humana, ya que contienen de dos a tres veces más proteína que los cereales. Tanto para las personas de bajos recursos como para los vegetarianos, son la principal fuente de este compuesto. En la actualidad los científicos y tecnólogos en alimentos ya están explorando estas fuentes de proteína de bajo costo como la soya, el garbanzo, el girasol, el cacahuate para la obtención de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva; porque se ha demostrado además, que las proteínas de estas fuentes vegetales, tienen mayor poder antihipertensivo que las obtenidas a partir de la leche y derivados lácteos.

En el presente trabajo se plantea la obtención de péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) a partir de las proteínas del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) conocido en la región de la Península de Yucatán como “ibes”. Con este estudio, se estarían aportando conocimientos fundamentales para el desarrollo de alimentos funcionales con actividad antihipertensiva y se estaría apoyando a las instituciones de salud y demás organismos involucrados en el combate de una de las enfermedades del milenio más preocupantes de la humanidad y de nuestro país como es la hipertensión arterial. También se proporcionaría un mayor valor agregado a una de las leguminosas que son de poco consumo en la región yucateca.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Hipertensión arterial

La morbimortalidad cardiovascular es hoy por hoy la principal preocupación no sólo de los médicos y de los responsables de la salud pública en todos los países del mundo, sino también de la gente común y corriente, en la cual la hipertensión arterial ocupa la mayor atención y esto se debe al gran número de personas afectadas por dicha enfermedad y al pronóstico grave cuando no es controlada adecuadamente.

La hipertensión arterial es la elevación patológica de la presión sanguínea por sobre valores elegidos convencionalmente por asociarse con daño en las arterias y en diversos parénquimas. Entre estos, son especialmente susceptibles el corazón, riñón, cerebro y retina, cuyo daño es proporcional tanto a la magnitud como a la duración de la hipertensión (Loscalzo y col., 1996) En el Cuadro 1 se enlistan los valores de presión arterial tanto normales como elevados.

**Cuadro 1.-** Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18 años

CATEGORÍA	PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (mm Hg)	PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (mm Hg)
Normal	<120	<80
Pre-Hipertensión	120 – 139	80 – 89
Hipertensión (Estado 1)	140-159	90-99
Hipertensión (Estado 2)	≥ 160	≥ 100

Fuente: Chobaniam y col. (2003)

La hipertensión aumenta la tensión sobre el miocardio del ventrículo izquierdo, provocando rigidez e hipertrofia, y acelera el desarrollo de aterosclerosis coronaria. Así, en el paciente hipertenso con aumento de la demanda de oxígeno y una menor disponibilidad, está aumentada la probabilidad de isquemia del miocardio, lo que

ocasiona una alta incidencia de infarto del miocardio, muerte súbita, arritmias e insuficiencia cardíaca congestiva.

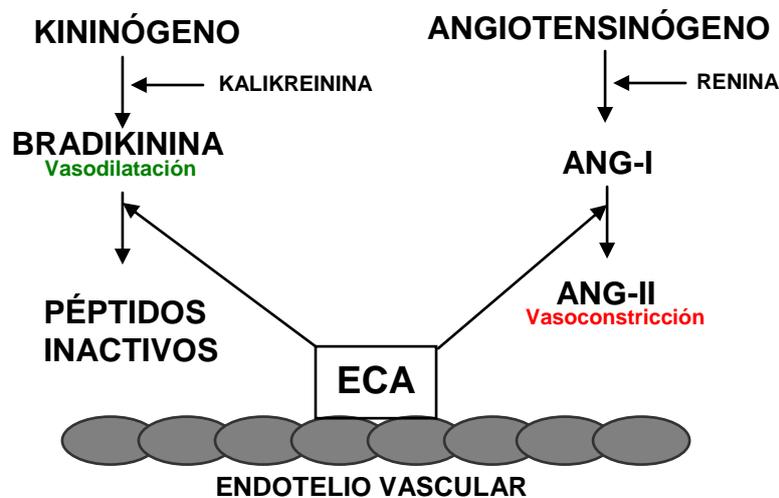
Las cifras relativas al número de hipertensos en el mundo varía de acuerdo al país en donde se haya hecho la encuesta; sin embargo, los resultados indican que la incidencia de la hipertensión arterial oscila entre el 10 y el 20 % de la población total (Izzo y Black ,2003). Alrededor de 17 millones de personas mueren cada año por enfermedad cardiovascular. Se estima que cada 4 segundos ocurre un síndrome coronario agudo y cada 5 segundos un accidente vascular cerebral. (Murray y López, 1997). Se estima que existen en el mundo 600 millones de personas que padecen hipertensión arterial sistémica (HTAS); de éstos, 420 (70%) millones corresponden a países en vías de desarrollo, entre ellos México. Se calcula que aproximadamente el 1.5% de todos los hipertensos mueren cada año por causas directamente relacionadas a HTAS (Collins y col., 1990). La primera encuesta nacional de enfermedades degenerativas, realizada en el año 2002, en México permitió conocer que el 27% de los habitantes entre los 20 y los 60 años padecen de hipertensión arterial. Aunque ya se realizó la segunda encuesta, en el año 2004, los resultados siguen con una tendencia similar. En este estudio se encontró que en nuestro país, aproximadamente 15.2 millones de personas tienen hipertensión arterial sistémica. Uno de cada 2 mexicanos después de los 50 años es portador de HTAS. El 61% de las personas con hipertensión arterial sistémica lo ignoran. Del 49% de personas con diagnóstico previo de HTAS, menos del 50% están bajo tratamiento médico farmacológico. El 14.6% de la población con hipertensión arterial se encuentra en control (<140/90 mmHg). La mayor prevalencia de hipertensión arterial en México ocurre en los estados del Norte de la República (más del 30%). La diabetes tipo 2, la obesidad, la proteinuria y el tabaquismo incrementan la prevalencia de hipertensión arterial (Velásquez y col., 2000).

### **II.1.2 Sistemas Renina-Angiotensina y su papel en la presión arterial**

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) es un sistema complejo de regulación que desempeña un importante papel en el mantenimiento de la presión arterial de la sangre, así como también en el balance de fluidos salinos en los mamíferos. La figura 1 representa el esquema general del SRA, en asociación con el Sistema

Kalicroína-Kinina (SKK), en los cuales se muestra a la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) como el integrante principal generando el péptico con gran poder vasoconstrictor denominado angiotensina-II (Ang-II), a partir de angiotensina-I (Ang-I) y degradando el péptido vasodilatador bradiquinina (Brown y Vaughan (1998).

. De hecho, en la literatura es común observar este diagrama general, sin considerar que ambos sistemas son más complejos y que existen además otras enzimas y péptidos de interés, que también juegan un papel importante en la presión arterial.



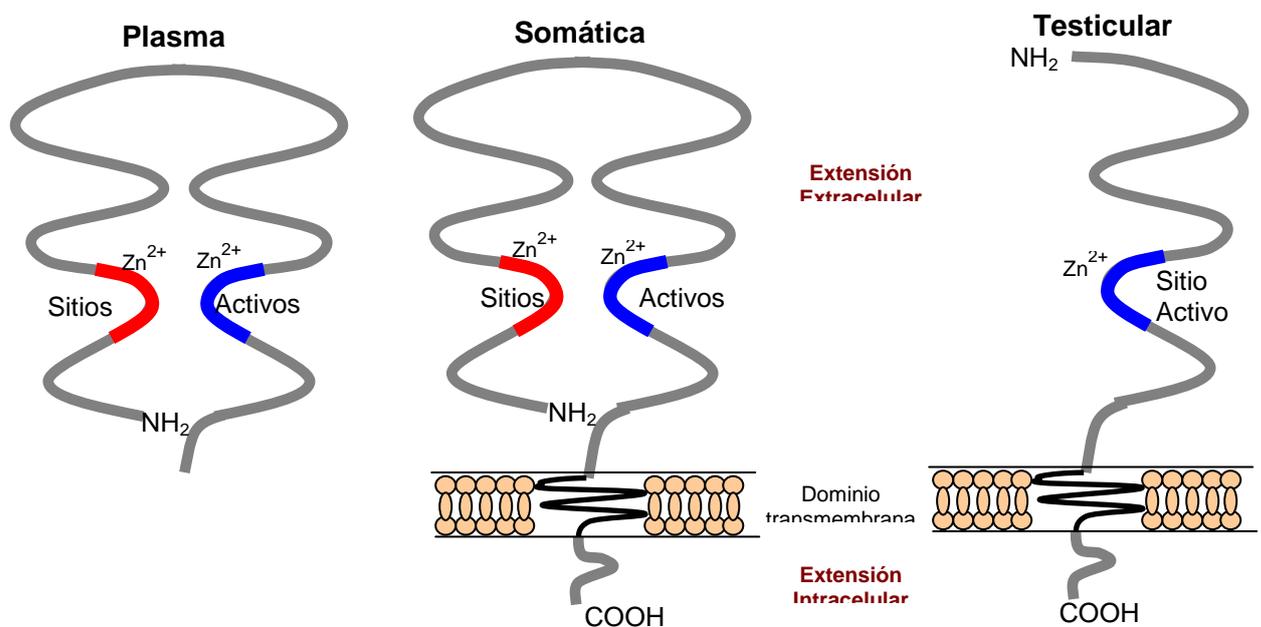
**Figura 1.** Sistemas Renina-angiotensina y Kalikreína-kinina en la presión arterial. Tomado de Brown y Vaughan (1998).

### II.1.2.1. La Enzima convertidora de angiotensina-I

Esta enzima fue descubierta en 1954 y en principio fue llamada enzima convertidora de hipertensina. Su acción vasoconstrictora fue demostrada mediante ensayos en forma artificial empleando un aislado del riñón (Skeggs y col., 1956) y un aislado de arteria aórtica (Helmer, 1957). Su acción de convertir el péptido inactivo (angiotensina I) en el péptido vasoconstrictor angiotensina II, fue realizado en plasma purificado de ganado equino en presencia de ion clorito y de ahí surgió su nombre actual, enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) (Skeggs y col.,1956). En la actualidad se sabe que la ECA-I, que se encuentra en la gran mayoría de los mamíferos, es una proteasa conocida como peptidil dipeptidasa A, también llamada

kininasa II, (E.C. 3.4.15.1) (Corvol y col., 1995; Corvol y Williams, 1996). Es una zinc carboxipeptidasa por contener dentro de su estructura este metal siendo su función principal, la de transformar la Ang-I a Ang-II y de inactivar el péptido vasodilatador bradiquinina (Tzacos y col, 2003). Los primeros hallazgos sobre su inhibición mediante quelantes como el EDTA y su reactivación posterior con metales divalentes hicieron pensar que en su contenido posee el átomo de zinc, el cual juega un papel crucial en la hidrólisis catalítica de esta enzima (Cushman y Cheung, 1971a; Dorer y col., 1970; Yang y col., 1971; Stevens y col., 1972). En todos los artículos científicos que tratan sobre péptidos bioactivos antihipertensivos se menciona esta actividad fundamental, sin considerar que esta enzima también tiene diferentes funciones fisiológicas en el organismo, a saber, tiene otros sustratos participando en metabolismo neuronal, hematopoyesis, digestión, reproducción, metabolismos de la sustancia P en algunas áreas cerebrales. (Levens, 1985; Yoshioka y col., 1987). La ECA-I se encuentra en células epiteliales, células endoteliales sobre todo en el pulmón, neuroepiteliales y mononucleares, en fluidos biológicos como orina, líquido cerebroespinal y líquido amniótico. También se localiza en hígado, en las vellosidades de las membranas del intestino, en placenta y en el plexus cloacal (Soubrier y col., 1993a). Se piensa que esta enzima que se halla en la gran mayoría de mamíferos tiene muchos años de haber evolucionado, debido a que se han encontrado enzimas muy similares a la ECA-I, en algunos insectos, en el cangrejo, en la garrapata, en anélidos y en moluscos (Coates y col., 2000). En el ser humano, la ECA-I se presenta en dos isoformas; la primera ha sido denominada ECA somática (sECA) y tiene un peso molecular entre 150-180 kDa, una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 1277 y se localiza en las regiones antes descritas. La otra isoforma, denominada ECA germinativa o testicular (tECA), es una enzima más pequeña, con un peso entre 90-100 kDa y solamente se localiza en células germinativas en el testículo y su acción está relacionada con la maduración del espermatozoide en varones (Soubrier y col., 1993a). Existe además otra forma, denominada soluble, que se ha aislado mediante la acción de una secretasa y se ha encontrado en suero sanguíneo y otros fluidos corporales; sin embargo, aún no se esclarece su participación fisiológica en el ser humano (Parvathy y col., 1997; Turner y Hooper, 2002). La sECA se caracteriza por tener dos dominios homólogos que se

denominan de acuerdo a su posición en la cadena: N-terminal o *Dominio-N* y C-terminal o *Dominio-C*, conteniendo ambos zinc en el sitio de unión y un centro activo (Deddish y col., 1996). La presencia de estos dos dominios ha sugerido una duplicación genética en el curso de su evolución. La tECA solamente tiene el *Dominio-C*. Ambas isoformas de la ECA se hallan entre la estructura de la membrana plasmática, en la cual la parte del Dominio-C se halla en la extensión intracelular, en tanto que la mayor parte de la cadena de la ECA permanece fuera de la célula; por esta razón se les ha denominado ectoenzimas cuya misión es hidrolizar péptidos circulantes a través de la parte exterior de las células. Una primera representación esquemática de los dominios de las 3 formas de la ECA se muestra en la Figura 2, propuesta en 1992.



**Figura 2.** Estructura y conformación de la ECA-I, encontrada en plasma, en células somáticas y testicular, mostrando los sitios activos catalíticos, dependencia del zinc y las regiones N y C terminal (Johnston, 1992).

## II.2.2 Tratamiento de la Hipertensión a través de fármacos

El tratamiento de la hipertensión arterial esencial está destinado a llevar las cifras tensionales a niveles normales (<140/90 mm Hg), para disminuir los eventos cardiovasculares y la mortalidad por esta causa. En general el tratamiento básico

consiste en disminución del consumo de sal, ejercicio dinámico constante, baja de peso y medidas nutrimentales, así como también control de los otros factores de riesgo cardiovasculares. Dependiendo de diversos criterios clínicos, como la magnitud de la HTAS, otros factores de riesgo, daño a nivel de órganos blancos, edad y otros, se puede plantear el uso de fármacos, que por lo general deben tomarse de forma indefinida y diariamente, en forma única o a veces asociados. Como cualquier medicamento, estos también tienen efectos secundarios los cuales deben considerarse al indicar el tratamiento (Bünning, 1987). Entre los distintos fármacos destacan:

- a) Los  $\beta$ -bloqueadores: actúan bloqueando los receptores cardíacos  $\beta$ -1, impidiendo el aumento de la contractibilidad y frecuencia cardíaca mediada por el sistema autonómico simpático, impidiendo el aumento del débito cardíaco, disminuyendo la presión arterial. Entre estos está el atenolol, metoprolol, Nadolol, Propanolol, Tomolol
- b) Los diuréticos, actúan a nivel renal, aumentando la excreción de sodio y así disminuyendo la volemia y el volumen circulante de este mineral; al disminuir este volumen disminuye la sangre que llega al corazón para cada bombeo disminuyendo el gasto cardíaco y así disminuyendo la presión arterial. Entre los más usados destacan la hidroclorotiazida y los diuréticos de asa larga como furosemida, indapamida, etc.
- c) Los vasodilatadores o bloqueadores de los canales de calcio, como nifedipina, diltiazem, o verapamilo, amlodipino e isradipino actúan bloqueando el mecanismo de contracción arterial, disminuyendo consiguientemente la resistencia sistémica y así disminuyendo la presión arterial.
- d) Los bloqueadores de receptores  $\alpha$  periféricos son otro grupo de vasodilatadores. Incluyen a hidralazina, usualmente usada en embarazadas y doxazocina.
- e) los Bloqueadores del receptor de angiotensina II (losartan o candesartán) evitan que la angiotensina II actúe sobre la musculatura lisa (y no ocurra vasoconstricción) y también sobre la estimulación que produce la liberación de aldosterona en la glándula suprarrenal.

- f) Los inhibidores de la enzima convertidora (IECA) (enalapril, captopril, cilazapril, fosinopril, entre otros), inhiben la conversión de angiotensina I a II, la cual es un potente vasoconstrictor (aumenta la resistencia sistémica). La enzima convertidora también participa en la degradación de la bradiginina el cual es un vasodilatador y al inhibirse su degradación ésta aumenta, lo cual provoca vasodilatación y disminución de la resistencia sistémica, disminuyendo la presión arterial. Es importante destacar que los IECA han demostrado gran eficacia en control de la HTA en pacientes diabéticos, donde se ha demostrado un aumento de la sobrevida, en pacientes con insuficiencia cardiaca y también son útiles en disminuir la progresión del daño renal en nefrópatas (Bünning, 1987).

#### **II.2.2.1. Desventajas de los tratamientos con fármacos**

La principal desventaja que tienen estos fármacos sintéticos para el ser humano, es que son propensos a causar efectos adversos con la administración periódica. Así, se han documentado las siguientes molestias en pacientes: los efectos clásicos son la hipotensión, tos normal, tos irritante, hipercalemia (exceso de nivel de potasio en el torrente sanguíneo), dolores de cabeza desde ligeros a severos, leucopenia (disminución del número de leucocitos totales), ageusia o desgeusia (alteración del sentido del gusto), vasculitis (inflamación de vasos sanguíneos), anticuerpos antinucleares positivos, mialgias y artralgias (dolores de músculos y articulaciones), fallas y disturbios renales, angioedema (alergias y ronchas) y daños fetales en mujeres embarazadas; además, de suma precaución en pacientes con HTA vasculorrenal, dado que puede generar un disturbio renal agudo.. Los efectos secundarios asociados al grupo sulfhidrilo son la proteinuria, erupciones o alergias en la piel y la disminución de la población de células que combaten las infecciones (neutropenia) (Brown y Vaughan, 1998; Vázquez y col., 1998). Esto ha motivado la exploración de sustancias naturales para emplearse en el tratamiento de la hipertensión. Un ejemplo de estas sustancias naturales lo constituyen los péptidos bioactivos con poder de inhibición de la ECA-I que se describen a continuación.

### **II.3. Péptidos bioactivos**

La investigación de componentes funcionales en alimentos se ha convertido en una de las áreas más explorada en los últimos años. Se ha visto que los componentes funcionales provienen de diferentes fuentes naturales. Así, en ciertos glucosinolatos, componentes fenólicos, flavonoides, terpenos y componentes organoazufrados se ha visto que tienen propiedades bioactivas. Otro de los componentes funcionales que se ha visto con propiedades similares son los péptidos bioactivos que pueden presentar actividades antihipertensiva, antitrombótica, anticancerígena, antiobesidad, inmunomoduladora, opioide agonista y antagonista, antioxidante, antimicrobiana y/o hipocolesterolémica (Kitts,1993; Smacchi y Gobbetti ,2000; Clare y Swaisgood, 2000; Fujita, Yokohama y Yoshikawa,2000;Nagaoka y col.,2001; Lovati y col.,2000 ; Arnoldi y col.,2001;Fujita,2000; Miura, 2002; Nakamori,2002; Gálvez, 2000 ). Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen propiedades biológicas al liberarse por procesos de hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo* o por procesos fermentativos.

#### **II.3.1.Fuentes**

Los péptidos bioactivos se encuentran tal cual en los alimentos o bien se obtienen de hidrólisis. Así, hay péptidos bioactivos que se generan durante la manufactura de quesos, yogur u otros productos lácteos. El empleo de las enzimas proteasas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, alcalasa, pancreatina, etc. también producen estos péptidos. Las fuentes más estudiadas en la actualidad para la obtención de péptidos bioactivos son las proteínas de la leche tanto de caseínas como proteínas del suero, las proteínas de la carne principalmente pescado y las proteínas del huevo. En la leche se han obtenido una gran diversidad de péptidos bioactivos, pero sobre todo con actividades antihipertensivas (Kim y col., 1999; Meisel y Bockemann ,1999; FitzGerald y Meisel ,2000; Meisel ,2001;Takano ,1998; Yamamoto y Takano ,1999); en proteínas del huevo (Yoshii y col., 2001); en plasma sanguíneo de ganado vacuno (Hyun y Shin ,2000; Mullally y col.,1997; Tauzin y col.,2002); en proteínas del músculo de sardina y en el pez de bonito también se han identificado estos

péptidos con actividad antihipertensiva (Matsufuji y col. 1994; Neves y col., 2004, Yokokawa y col. 1992; Byun y Kim, 2001); también se han aislado en trigo germinado (Matsui y col., 1999, 2000) (Cuadros 2 y 3).

**Cuadro 2.** Péptidos bioactivos con poder de inhibición de la ECA-I, derivadas de la caseína (CN) de la leche de vaca: casokininas. Los aminoácidos están representados con la nomenclatura de una sola letra por cuestiones de espacio.

<b>Péptido Identificado</b>	<b>Secuencia <i>Síntesis química</i> (aa liberados por proteasa humana)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Disminución de la presión (mm Hg) a una dosis en {mg/kg de peso} en ratas SHR</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha_{s2}$ -CN f(198-202)	TKVIP	400	9 {1}	Maeno y col., (1996)
$\alpha_{s2}$ -CN f(189-192)	AMKPW	580	5 {1}	
$\alpha_{s2}$ -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300	3 {1}	
$\alpha_{s2}$ -CN f(206-207)	YL	122	NR	Mullally y col., (1996)
$\alpha_{s2}$ -CN f(25-32)	NMAINPSK	60	NR	Tauzin y col., (2002)
$\alpha_{s2}$ -CN f(81-91)	(ALNEINQFY)QK	(264) 219	NR	
$\alpha_{s2}$ -CN f(92-98)	FPQYLQY	14	NR	
$\alpha_{s2}$ -CN f(174-181)	(FALPQY)LK	(4) 4	NR	
$\alpha_{s2}$ -CN f(182-184)	TVY	15	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(23-43)	(FFVAP)FPEVFGK	(6) 77	34 {100}	Karaki y col., (1990)
$\alpha_{s1}$ -CN f(24-27)	FVAP	10	NR	Maruyama y col., (1985)
$\alpha_{s1}$ -CN f(25-27)	VAP	2	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(28-34)	FPEVFGK	140	NR	Maruyama y col., (1987b)
$\alpha_{s1}$ -CN f(32-34)	FGK	160	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(194-199)	TTM(PLW)	(16) 36	14 {100}	Karaki y col., (1990)
$\alpha_{s1}$ -CN f(197-199)	LW	50	NR	Maruyama y col., (1987a)
$\alpha_{s1}$ -CN f(143-148)	AYFYPE	106	NR	Yamamoto y col., (1994b)
$\alpha_{s1}$ -CN f(170-199)	QTQYTDAPSFSDIPN PIGSENSGKTTMPLW	346	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(104-109)	YKVPQL	22	13 {1}	Maeno y col., (1996)
$\alpha_{s1}$ -CN f(157-164)	DAYPSGAW	98	NR	Pihlanto y col., (1998)
$\alpha_{s1}$ -CN f(194-199)	TTMPLW	51	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(142-147)	LAYFYP	65	NR	
$\alpha_{s1}$ -CN f(1-9)	RPKHPIKHQ	13	9 {7.5}	Saito y col., (2000)
$\beta$ -CN f(177-183)	AVPYPQR	15-274	10 {100}	Karaki y col., (1990)
$\beta$ -CN f(177-179)	AVP	340	NR	Maruyama y col., (1985)
$\beta$ -CN f(177-181)	AVPYP	80	NR	
$\beta$ -CN f(179-181)	PYP	220	NR	
$\beta$ -CN f(43-68)	DELQDKIHPPFAQTQSI VYFPFGPIPN	4	NR	Yamamoto y col., (1994b)
$\beta$ -CN f(191-202)	LLYQQPVLGPVARGPF PIIV	21	22* {15}	
$\beta$ -CN f(158-175)	PPQSVLSLSQSKVLP VPE	25	22* {15}	
$\beta$ -CN f(168-175)	SKVLPVPE	39	22* {15}	
$\beta$ -CN f(60-66)	YFPFGPI	500	NR	Meisel y Schlimme, (1994)
$\beta$ -CN f(193-202)	YQQPVLGPVR	500	NR	
$\beta$ -CN f(74-76)	IPP	5	24 {0.3}	Nakamura y col., (1995a)
$\kappa$ -CN f(108-110)			NR	Nakamura y col., (1995b)
$\beta$ -CN f(84-86)	VPP	9	29 {0.6}	
$\beta$ -CN f(169-175)	(KVLPPV)Q	(1000) 5	24 {1}; 32 {1}	Maeno y col., (1996)
$\beta$ -CN f(140-143)	LQSW	500	2 {1}	

<sup>o</sup> Disminución máxima de la presión sistólica en ratas SHR, después de la ingestión oral  
NR = Datos no reportados

**Cuadro 2.** Continuación.

<b>Péptido Identificado</b>	<b>Secuencia <i>Síntesis química</i> (aa liberados por proteasa humana)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Disminución de la presión (mm Hg) a una dosis en {mg/kg de peso} en ratas SHR</b>	<b>Referencia</b>
$\beta$ -CN f(59-64)	VYPFPG	221	22 {8}	Abubakar y col., (1998)
$\beta$ -CN f(59-61)	VYP	288	NR	
$\beta$ -CN f(80-90)	TPVVVPPFLQP	749	NR	
$\beta$ -CN f(58-72)	LVYFPFGPIPNLSPQ	18		Smachi y Gobbetti, (1998)
$\beta$ -CN f(108-113)	EMPPFK	423	NR	Philanto y col., (1998)
$\beta$ -CN f(193-198)	YQQPVL	280	NR	
$\beta$ -CN f(60-68)	YFPFGPIPN	15	7 {7.5}	Saito y col., (2000)
$\beta$ -CN f(6-14)	LNVPGEIVE	291	NR	Gobbetti y col., (2000)
$\beta$ -CN f(73-82)	NIPPLTQTPV	180	NR	
$\beta$ -CN f(47-52)	DKIHPF	194	NR	
$\alpha_{S1}$ -CN f(146-147)	YP	720	27 {1}	Yamamoto y col., (1999)
$\alpha_{S1}$ -CN f(159-160)				
$\beta$ -CN f(114-115)				
$\kappa$ -CN f(58-59)				

NR = Datos no reportados

**Cuadro 3.** Péptidos bioactivos con poder de inhibición de la ECA-I, derivadas de las proteínas del suero de la leche de vaca: lactokininas. Los aminoácidos están representados con la nomenclatura de una sola letra por cuestiones de espacio.

<b>Péptido Identificado</b>	<b>Secuencia <i>Síntesis química</i> (aa liberados por proteasa humana)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Disminución de la presión (mm Hg) a una dosis en {mg/kg de peso} en ratas SHR</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha$ -LA f(50-53)	<i>YGLF</i> $\alpha$ -lactofina	733	23 {0.1}	Mullally y col., (1996) Nurminen y col., (2000)
$\alpha$ -LA f(105-110)	LAHKAL	621	NR	Pihlanto y col., (1998)
$\alpha$ -LA f(50-52)	YGL	409	NR	Pihlanto y col., (2000)
$\alpha$ -LA f(99-108)	VGINYWLAHK	327	NR	
$\alpha$ -LA f(104-108)	WLAHK	77	NR	
$\alpha$ -LA f(52-53)	<i>LF</i>	349	NR	Mullally y col., (1997b)
$\beta$ -LG f(102-103)	<i>YL</i>	122	NR	
$\beta$ -LG f(102-105)	<i>YLLF</i> $\beta$ -lactofina	172	NR	
$\beta$ -LG f(146-149)	<i>HIRL</i> $\beta$ -lactotensina	1153	NR	
$\beta$ -LG f(147-148)	<i>IR</i>	696	NR	
$\beta$ -LG f(142-148)	ALPMHIR	43	NR	
$\beta$ -LG f(146-148)	<i>HIR</i>	954	NR	
$\beta$ -LG f(9-14)	GLDIQK	580	NR	Pihlanto y col., (1998)
$\beta$ -LG f(78-80)	IPA	141	31 {8}	Abubakar y col., (1998)
$\beta$ -LG f(81-83)	VFK	1029	NR	Pihlanto y col., (2000)
$\beta$ -LG f(22-25)	LAMA	556	NR	
$\beta$ -LG f(32-40)	LDAQSAPLR	635	NR	
$\beta$ -LG f(106-111)	CMENSA	788	NR	
$\beta$ -LG f(142-146)	ALPMH	521	NR	
$\beta$ -LG f(94-100)	VLDTDYK	946	NR	
BSA f(208-216)	<i>ALKAWSVAR</i>	3	NR	Chiba y Yoshikawa, (1991)
BSA f(221-222)	FP	315	27 {8}	Abubakar y col., (1998)

NR = Datos no reportados

Recientemente se ha iniciado la búsqueda de otras fuentes de biopéptidos como son los cereales, leguminosas y demás vegetales. La ventaja de estas fuentes de péptidos bioactivos radica en el bajo costo de obtención, así como también en su disponibilidad accesible. Por esta razón, recientemente se han obtenido péptidos bioactivos del garbanzo (Yust y col., 2003), de la espinaca (Yang y col., 2003), de las semillas de girasol (Megías y col., 2004), de semilla de soya (Kasai e Hikehara ,2005; Cho y col. 2004) (Cuadro 4)

**Cuadro 4.** Algunos péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, derivadas de fuentes diferentes a las proteínas de la leche de vaca. Los aminoácidos están representados con la nomenclatura de una sola letra por cuestiones de espacio.

Fuente de proteína	Secuencia <i>Síntesis química</i> (aa liberados por proteasas comerciales)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Disminución de la presión (mm Hg) a una dosis en {mg/kg de peso} en ratas SHR	Referencia
Gelatina	GPAGAZ+GPPGAZ	8	NR	Oshima y col., (1979)
a-zeína	LRP	0.3	15 {30} <sup>a</sup>	Miyoshi y col., (1991a)
Músculo porcino	MNP	67	NR	Arihara y col., (2001)
Plasma humana	LIY 2-aceína	0.8	NR	Nakagomi y col., (2000)
Chícharo		0.1	NR	Pedroche y col., (2002)
Wakame	YNKL	21	50 {50}	Suetsuna y Nakano, (2000)
Garlic	FY	4	25 {200}	Suetsuna, (1998)
Trigo	YQY	4	30 {100} <sup>b</sup>	Li y col., (2002)
Gelatina royal	DGL	2	23 {1000}	Matsui y col., (2002c)
Germen de trigo	I (VY)	0.5 (5)	19 {5}; 18 {50}	Matsui y col., (2000)
Bonito en polvo	LKP(NM)	2 (0.3)	14 {15}; 16 {9}	Fujita y Yoshikawa, (1999)
Hemoglobina de Cerdo	FQKWA	6	30 {50}	Mito y col., (1996)
Bonito bowel	IRPVQ	1	19 {100}	Karaki y col., (1993)
Soya	DLP	5	38 {100} <sup>b*</sup>	Wu y Ding, (2001)
				Wu y Ding, (2002)
<i>Limanda aspera</i>	YPFH (frac I)	47.6	NR	Jung y col., (2006)
	YPFH (frac II)	34.5	NR	
	YFPH (frac III)	68.8	NR	
Semilla de girasol	FVNPQAGS	.0069	NR	Megías y col., (2004)
Ovoalbúmina	YAEERYPIL	5.4	31.6 (2)	Miguel y col., (2006)
	RADHPFL	5.3	34.0 (2)	
Análogo del péptido de la Pechuga de pollo	<i>GF-Hyp-GT-Hyp-GL-Hyp-GF</i> <i>Hyp-GL-Hyp-GF</i>	.0046 0.0010	NR NR	Saiga y col. (2006)
Legumina de chícharo	MD	0.021	NR	Yust y col., (2003)
	MDFLI	.011	NR	
	MFDL	.013	NR	
	MDL	.021	NR	
	MDLA	.013	NR	
Espinaca Rubisco	MRWRD	0.0021	14 (30)	Yang y col., (2003)
	MRW	0.0006	22 (30)	
	LRIPVA	0.00038	0	
	IAYKPAG	0.0042	15	

NR = Datos no reportados

### **II.3.2. Actividad antihipertensiva en biopéptidos**

Con la finalidad de encontrar una solución a los grandes estragos que la hipertensión arterial ocasiona en los seres humanos, se han realizado diversas investigaciones con péptidos bioactivos con capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (IECA-I) para tratar de disminuir los niveles de presión arterial alta (Fotherby y Panayiotou, 1999; Mark y Davis, 2000). Se ha encontrado que estos péptidos son los responsables directos de disminuir la presión arterial en animales de laboratorio (Matsufuji y col., 1995) y en individuos hipertensos (Matsui y col. 2000). Adicionalmente, esta clase de péptidos con actividad antihipertensiva han sido empleados en el estudio de fallas crónicas de corazón (Pitt, 1997; Varin y col., 2000) y han sido propuestos también para tratamientos de cáncer (Lever y col. 1998,1999). En la secuencia de aminoácidos constituyentes de los péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva aislados de la leche se ha encontrado a la prolina como uno de los principales constituyentes, lo que hace pensar que juega un rol importante en la disminución de la presión arterial (Meisel ,1997). La actividad antihipertensiva también se encontró en aquellos péptidos ricos en aminoácidos con carácter hidrofóbico, tanto aromáticos como los de cadena ramificada en la región C terminal (Clare y Swaisgood ,2000). Sin embargo, en el garbanzo se encontró actividad antihipertensiva en péptidos ricos en metionina (Yust y col., 2003). Algunos de los biopéptidos con actividad antihipertensiva halladas en la leche son: YP, VPP, IPP, AVPYPGR, YPFPL, TTMLPW.

### **II.3.3. Alternativas tecnológicas para su obtención**

Para la obtención de péptidos a partir de las proteínas se puede emplear la síntesis química, hidrólisis química y enzimática así como también fermentaciones microbianas. La hidrólisis química consiste en tratamiento de las proteínas con álcalis y/o ácidos. Sin embargo en este procedimiento es difícil obtener algún péptido en particular, siendo la hidrólisis enzimática la que mayor se emplea por ser más fácil de controlar y la producción de péptidos puede ser más selectiva. La fermentación microbiana consiste en utilizar cepas microbianas como *Lactobacillus helveticus*, *saccharomices cerevisiae*, que se han probado que liberan biopéptidos

durante la fermentación de sustratos ricos en proteínas como la leche y productos lácteos (Seppo y col., 2002). Las enzimas más empleadas para la obtención de biopéptidos a través de hidrólisis enzimática han sido la Pepsina, la Bromelina, la Peptidasa, la Pancreatina que es una mezcla de proteasas como Tripsina, Quimiotripsina y Elastasa.

La Pepsina es una enzima proteolítica que se genera en el estómago durante la digestión de alimentos; es una endopeptidasa poco específica en su acción hidrolítica, aunque ataca principalmente enlaces peptídicos donde existen aminoácidos aromáticos, metionina o leucina; generalmente produce péptidos y muy pocos aminoácidos libres. En tanto que la Pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimiotripsina y elastasa y se genera en el intestino delgado; tienen actividad de endopeptidasas, contienen una serina como centro activo y presentan mayor especificidad de acción que la Pepsina (Badui-Dergal, 1986) Por lo tanto, la importancia de realizar la hidrólisis con estas dos enzimas propias del sistema digestivo en concentrados proteicos, radica en el hecho de que se genera un pool de péptidos, capaces de atravesar todo el tracto gastrointestinal en forma intacta, sin que sean degradados y poder ejercer los efectos funcionales que se pretenden encontrar en ellos. Por esta razón los investigadores las emplean para la obtención de hidrolizados.

También se ha empleado enzimas comerciales provenientes de cultivos bacterianos como la Alcalasa 2.4L obtenida de *Bacillus licheniformis*, la proteinasa de *L. helveticus*, la Flavourzyme, la Neutrasa, entre las principales. Algunos investigadores utilizan una sola enzima en los hidrolizados, mientras que otros han utilizado mezclas de ellas en sistemas secuenciales de hidrólisis como la Pepsina-Pancreatina, Pepsina-Bromelina, Alcalasa-Flavourzyme, etc. Una de las enzimas que más se ha empleado en hidrólisis enzimáticas es la Alcalasa 2.4 L por su bajo costo; a pesar de que sus hidrolizados proteicos no cuentan con características organolépticas deseables, se ha demostrado que con ella se obtienen una diversidad de péptidos con actividad antihipertensiva. Para el monitoreo de la efectividad de las enzimas empleadas sobre el sustrato, los investigadores se apoyan del grado de

hidrólisis conforme transcurre el tiempo en que la enzima actúa sobre el sustrato. Este grado de hidrólisis revela los grupos aminos de las proteínas que han quedado libres: a mayor número de aminoácidos libres, mayor grado de hidrólisis. Existen dos técnicas muy comunes para la medición de este parámetro: una técnica consiste en hacer reaccionar los grupos aminos libres con ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) de acuerdo a la metodología de Adler-Nissen (1979). En la otra técnica, se establece la relación entre el N<sub>2</sub> soluble en ácido tricloroacético al 20 % p/v entre el N<sub>2</sub> total de la muestra e indica el porcentaje de proteínas solubles (de menor peso molecular) formadas por la acción de estas enzimas proteolíticas (Kim y col., 1990).

#### **II.3.4. Aislamiento, purificación y caracterización de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva.**

Después de la obtención de los hidrolizados proteicos, los investigadores se han valido de técnicas y equipos de química analítica para purificar los péptidos obtenidos. Así, se pueden aislar por rangos de tamaño molecular para lo cual los péptidos pueden separarse por centrifugación o ultrafiltración. También se usa la cromatografía de líquidos rápida para proteína (FPLC); esta técnica fue utilizada por Yust y col. (2003) para separar por tamaños, péptidos obtenidos de la hidrólisis de garbanzo en tanto que Neves y De Mira (2004) usaron la ultrafiltración para separar por tamaños péptidos bioactivos de pescado, para lo cual escogieron las membranas de 30 kDa, 10 kDa y 3 kDa. Es común también la utilización de columnas de filtración en gel en la cual previamente se calibra la columna con ayuda de sustancias estándares de pesos moleculares conocidos. Como ejemplo de este caso Megías y col. (2004) realizaron otra técnica para separar por tamaño péptidos obtenidos mediante la hidrólisis de semillas de girasol. En este caso construyeron la curva estándar con citocromo C (12 384 Da); bacitracina (1400 Da); val-angiotensina (917 Da); los péptidos RKEVY (693 Da) y WG (261 Da), leyendo las diferentes actividades a 280 nm. En lo que respecta a la purificación, la técnica más utilizada es la cromatografía líquida de altas presiones (HPLC) para poder separar las fracciones que se recolecten en una columna de filtración en gel, por centrifugación o ultracentrifugación; esta misma herramienta se usa para conocer la secuencia de

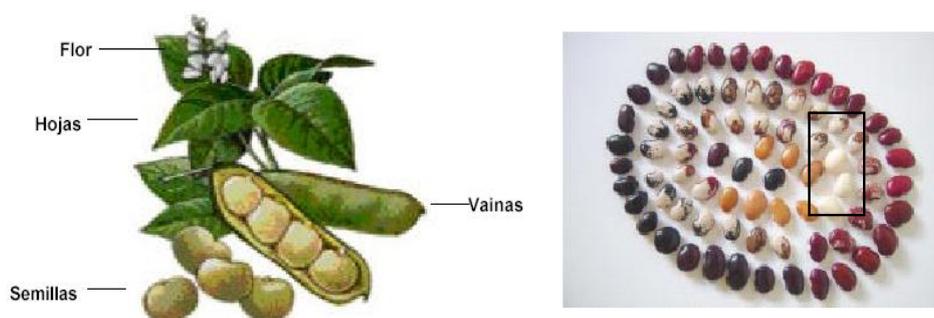
aminoácidos que constituyen a los péptidos y su relación molar. El equipo de investigadores encabezados por Yust y col. (2003) y por Megías y col. (2004) ha efectuado esta técnica empleando diversos gradientes de elusión en la separación de las fracciones, inyectando un volumen de 100  $\mu$ l al equipo. Para analizar la secuencia de aminoácidos ellos disminuyen el volumen de muestra que inyectan al equipo cromatográfico (50  $\mu$ l). También el equipo de investigación de Yang (2003) ha realizado esta técnica para conocer el análisis de aminoácidos constituyentes en péptidos bioactivos obtenidos de la espinaca. Como herramienta para monitorear el grado de hidrólisis de las proteínas a través del tiempo, es común la ayuda de la electroforesis SPS-PAGE.

Para determinar la posible bioactividad antihipertensiva de los péptidos se realizan análisis tanto *in vitro* como *in vivo*. Para los análisis *in vitro* se recurre a una técnica colorimétrica propuesto por Hayakari y col. (1978), la cual es una prueba rápida empleada por la gran mayoría de los investigadores como Pedroche y col. (2002), Yust y col., (2003), Megías y col. (2004, 2009). Para las determinaciones *in vivo* es común el empleo de animales de laboratorio como ratas espontáneamente hipertensas.

#### **II.4. Generalidades del frijol lima *Phaseolus lunatus*.**

El frijol lima (*Phaseolus lunatus*), también llamado guacaro (en Venezuela), poroto de manteca (en Argentina), ib (en Yucatán, México), ixtapacal (en Guatemala) y frijol caballero (en Cuba), se halla en toda América Latina, así como también en los bosques tropicales húmedos de África y Myanmar, donde sólo se pueden cultivar con éxito algunas otras leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus altramuces* y *Lupinus mutabilis* (Redhead, 1990; Sullivan y Davenport, 1993). Se cree que es originario de Guatemala, aunque investigaciones más recientes sugieren que las variedades de semilla pequeña se originaron en las colonias del Pacífico de México y las de semilla grande en el Perú. Ambas se dispersaron de esta zona hacia los trópicos y actualmente se encuentran en Sur y Centroamérica, Estados Unidos y sur de Canadá. Además son de gran importancia en África y en muchos países de Asia

(Kay, 1979). Las formas de semilla silvestre se encuentran desde Sinaloa en México hasta Salta en Argentina, generalmente bajo 1600 m sobre el nivel del mar (msnm) y distribuidas en el Ecuador y en el norte de Perú entre 320 y 2030 msnm (Sullivan y Davenport, 1993). En la figura 3 se muestra el frijol lima como planta así como también los granos de color claro marcados dentro del rectángulo de la figura de la derecha.



**Figura 3.** Planta y semillas del frijol lima (*Phaseolus lunatus*)

#### **II.4.1. Producción de *Phaseolus lunatus*.**

La producción de semillas secas para los cultivos a pequeña escala oscila entre 400 y 1,500 kg/ha, aunque, en la India se conocen producciones medias bajas entre 200 y 300 kg/ha, indicando un alto potencial de cosecha en los trópicos húmedos. En Estados Unidos, estas producciones oscilan entre 3,400 y 4,500 kg/ha, mientras que la producción del *P. lunatus* verde (vaina), cultivado para su industrialización, promedia los 2,580 kg/ha (Kay, 1979). En las formas arbustivas los rendimientos alcanzados son del orden de 200 kg/ha y el de las variedades trepadoras llega a más de 300 kg/ha. En Yucatán el rendimiento alcanzado para la semilla de esta leguminosa es de 850 kg/ha (Sullivan y Davenport, 1993).

#### **II.4.2. Composición química y fracciones proteicas de la semilla de *Phaseolus lunatus*.**

La composición proximal de las semillas de *P. lunatus* (Cuadro 5) revela que tiene un alto contenido de proteína (21 a 26%) y de carbohidratos (55 a 64%). Asimismo tienen un contenido de grasa (1 a 2.27%) y de fibra (3.2 a 6.84%). Además se cita

que poseen alto contenido de minerales como K, Zn, Ca y Fe y bajos niveles de Na y P (Cuadro 2). Se ha señalado a la metionina como el aminoácido limitante de sus proteínas (Oshodi y col., 1993).

**Cuadro 5.** Composición proximal del frijol lima según varios autores.

<b>Parámetro (%)</b>	<b>Augustin y Klein (1989)</b>	<b>Bourges (1987)</b>	<b>Colomé y col. (1993)</b>	<b>Oshodi y Aletor. (1993)</b>
<b>Humedad</b>	10.7	N.R.	6.84	NR
<b>Proteína cruda</b>	21.0	20.0	24.75	26
<b>Grasa cruda</b>	1.0	1.0	2.27	1.3
<b>Fibra cruda</b>	5.3	4.9	6.84	3.2
<b>Cenizas</b>	3.7	NR	4.17	NR
<b>E.L.N.</b>	64.4	61.0	55.03	64.4

E.L.N.: Extracto Libre de Nitrógeno  
Resultados expresados en base seca  
NR = No Reportado

Las proteínas en semillas están constituidas principalmente por tres grandes grupos: proteínas estructurales, proteínas con actividad biológica y proteínas de reserva, siendo éstas las de mayor proporción, las cuales son depositadas en los cuerpos proteínicos durante el desarrollo del endospermo (Fukushima, 1991). Las proteínas de reserva son aquellas que se almacenan en los cuerpos proteínicos durante el desarrollo de la semilla. No exhiben actividad enzimática y son fuente de nitrógeno y carbono durante la germinación. Incluyen principalmente la fracción 2S de albúminas y globulinas en las leguminosas y la fracción de prolaminas y glutelinas en cereales (Utsumi, 1992). Estas proteínas de almacenamiento de las semillas de las plantas son sintetizadas y depositadas en el tejido del endospermo o el cotiledón. En el caso del frijol lima se ha podido conocer las diferentes fracciones de sus proteínas constituyentes. De acuerdo a Chel (2001), se ha podido conocer que la fracción de albúminas constituye el 62.3 %, las globulinas el 34.8 %, las prolaminas el 1.4 % y las glutelinas el 1.5 % (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Proporción de las fracciones proteicas de la harina de *P. lunatus*.

<b>Fracciones</b>	<b>Proteína extraída (mg)</b>	<b>Proteína extraída (%)</b>	<b>% relativo</b>
<b>Albúminas</b>	2746.66	26.41	62.3
<b>Globulinas</b>	1535.24	14.76	34.8
<b>Prolaminas</b>	62.82	0.604	1.4
<b>Glutelinas</b>	66.6	0.64	1.5
<b>TOTAL</b>	4411.32	42.41	100

Fuente: Chel (2001)

La fracción de albúmina tiene 12.2 (g/100 g) de prolina, las globulinas 1.6, las prolaminas 8.7 y las glutelinas 13.70. Por lo tanto, la semilla de frijol lima es una leguminosa con potencial de ser fuente de péptidos bioactivos además de ser un producto alimenticio nutritivo.

#### **II.4.- Germinación**

Una alternativa tecnológica para mejorar la calidad de las proteínas es la germinación que permite mejorar el balance de aminoácidos. Se ha encontrado que con éste se aumenta la concentración de arginina, aminoácido precursor de la síntesis de óxido nítrico, importante vasodilatador endotelial que ejerce un papel crucial en la regulación de la presión arterial. Para mejorar el parámetro de relación de eficiencia proteica (REP) se puede someter a las semillas al proceso de germinación, mediante el cual se logra incrementar el valor de REP de 1.4 a 2.01 (Giami, 2003 a,b). Durante este procedimiento se produce movilización de las proteínas de reserva que están almacenadas en los cuerpos proteínicos de los cotiledones y cambios en la composición de aminoácidos solubles, ya que durante el proceso de germinación se activan enzimas como la amilasa y proteasas, además de hormonas para el desarrollo del embrión en la semilla. (Paredes y Mora, 1989, Dagnia y col, 1992).

Estos cambios fisiológicos dan lugar a la modificación en el patrón de aminoácidos de la proteína, lo que podría influir en la posible formación de péptidos diferentes a la semilla sin germinar. Otra ventaja que pudiera ofrecer la germinación en esta

investigación, además de la formación de nuevas secuencias de aminoácidos, es el hecho de que la extracción de los mismos será más fácil, ya que los carbohidratos y las proteínas que conforman la matriz de la semilla se van degradando enzimáticamente durante el proceso, haciendo más biodisponibles los aminoácidos, lo que facilitaría la hidrólisis enzimática para la búsqueda de biopéptidos inhibidores de la presión arterial alta.

### **III. JUSTIFICACIÓN.**

En años recientes, se ha enfatizado la importancia que tiene el consumo de alimentos en la salud. Estudios epidemiológicos han demostrado por ejemplo, que existe una buena relación entre la dieta de las personas y la baja incidencia de cáncer. Los alimentos pueden contener en forma natural o adicionada diversas sustancias como isoflavonas, saponinas, inhibidores de tripsina, etc., que en el pasado fueron consideradas como factores no nutricionales y que pueden presentar efectos mutagénicos y/o cancerígenos, pero que en la actualidad son investigadas bajo un nuevo enfoque: la prevención de enfermedades específicas, como el caso de la hipertensión arterial que ahora puede ser tratada con la ayuda de biopéptidos obtenidos de origen animal y vegetal; entre los hallazgos científicos de fuentes vegetales de estas sustancias se ha encontrado que cereales como la soya y leguminosas como el chícharo y la semilla de girasol, cuentan con fracciones proteicas ricas en biopéptidos que pueden emplearse para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Una alternativa como fuente de hidrolizados proteicos para la obtención de estos ingredientes bioactivos, mediante tratamiento enzimático es el grano de *P. lunatus*, por su concentración y composición de sus proteínas, ya que es una leguminosa que crece en forma importante en el Estado de Yucatán, así como en otras regiones tropicales.

Los esfuerzos para prevenir y controlar la hipertensión arterial promueven el empleo y consumo de estas sustancias de una manera natural y sana; en otras palabras, a pesar de que existe una gama de medicamentos y drogas eficientes para inhibir la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-1), entre las que se

encuentran el biconcor, captopril, enalapril, cilazapril, fosinopril, las instituciones de salud alertan a la población de los efectos secundarios y/o adversos indeseables que éstos originan, como son náuseas, mareos, dolor de cabeza, jaquecas, surgimiento de alergias de por vida y ciertas dependencias al fármaco.

Las leguminosas han sido utilizadas por años en la alimentación animal y humana; además de que su valor nutricional se ha reconocido en la actualidad, así como el prevenir enfermedades de alta morbilidad en los pueblos occidentales. Se ha visto también que el empleo de hidrolizados proteicos en la alimentación tiene un mayor aprovechamiento y digestibilidad, ya que los péptidos son más biodisponibles que las proteínas enteras, además de que son empleadas en formulaciones y dietas especiales para personas con trastornos digestivos o bien que presenten alguna alergia como a la fenilalanina.

Con base en lo anterior se considera necesario obtener y caracterizar molecularmente péptidos bioactivos a partir de proteínas de leguminosas y probar sus efectos antihipertensivos mediante ensayos *in vitro*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las proteínas de la leguminosa *Phaseolus lunatus* tienen fracciones con valor funcional para el aislamiento y producción de péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I.

## **V. OBJETIVO GENERAL.**

Obtener y caracterizar biopéptidos con poder inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina tipo I a través de la hidrólisis enzimática de concentrados proteicos a partir de granos sin germinar y germinados de *P. lunatus*.

### **V.1. Objetivos específicos.**

V.1.1. Obtener concentrados proteicos a partir de granos sin germinar y germinados de *Phaseolus lunatus*.

V.1.2. Evaluar el efecto de tres factores (fuente de concentrado proteínico, relación enzima/sustrato y tiempo de hidrólisis) sobre el grado de hidrólisis y sobre la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I, en hidrolizados proteicos, empleando Alcalasa y un sistema secuencial enzimático Pepsina-Pancreatina.

V.1.3. Seleccionar las mejores condiciones de hidrólisis para la obtención de péptidos con mayor poder inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina, empleando alcalasa y un sistema secuencial pepsina-pancreatina.

V.1.4. Identificar, purificar y caracterizar los péptidos obtenidos con mayor poder de inhibición de la ECA, mediante hidrólisis con alcalasa y con pepsina-pancreatina, en las condiciones seleccionadas.

## **VI. METODOLOGÍA.**

### **VI.1. Estrategia experimental**

Se realizaron hidrolizados proteicos a partir de granos germinados y sin germinar de frijol lima. Se emplearon las enzimas Alcalasa 2.4 L de Novo, Pepsina y Pancreatina de Sigma, en dos diseños experimentales diferentes. A los hidrolizados obtenidos se les evaluó el grado de hidrólisis GH y, posteriormente, la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I ECA-I, *in vitro*. Se seleccionaron las mejores condiciones para efectuar hidrolizados posteriores, a fin de obtener hidrolizados con mayor poder antihipertensivo. Después se empleó cromatografía de filtración en gel para separar y fraccionar en intervalos de tamaño molecular, aquellos hidrolizados con mayor poder antihipertensivo, evaluando esta misma actividad inhibitoria en las fracciones obtenidas. La siguiente etapa será la purificación de los péptidos en las fracciones con mayor poder antihipertensivo, para lo cual se realizarán subsecuentes separaciones en nuevas fracciones, con ayuda de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a fin de aislar e identificar aquellos péptidos con mayor poder antihipertensivo. En todas estas separaciones se realizarán, de nuevo, mediciones (*in vitro*) de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I, seleccionando aquellas fracciones que contengan los péptidos con mayor poder antihipertensivo para su posterior purificación; dicha actividad se reportará en términos de  $IC_{50}$ , definiéndose este valor como la cantidad de péptidos necesaria para reducir o inhibir la actividad de la ECA-I en un 50 %. La última etapa de esta investigación será la identificación de aminoácidos constituyentes de los péptidos con mayor poder de inhibición de la ECA-I, con ayuda de un equipo microsecuenciador. Así mismo, se empleará la electroforesis para monitorear el grado de hidrólisis enzimática en todos los tratamientos enzimáticos y los tamaños de péptidos que se generen durante la hidrólisis. En la figura 4 se muestra la metodología general de esta investigación.

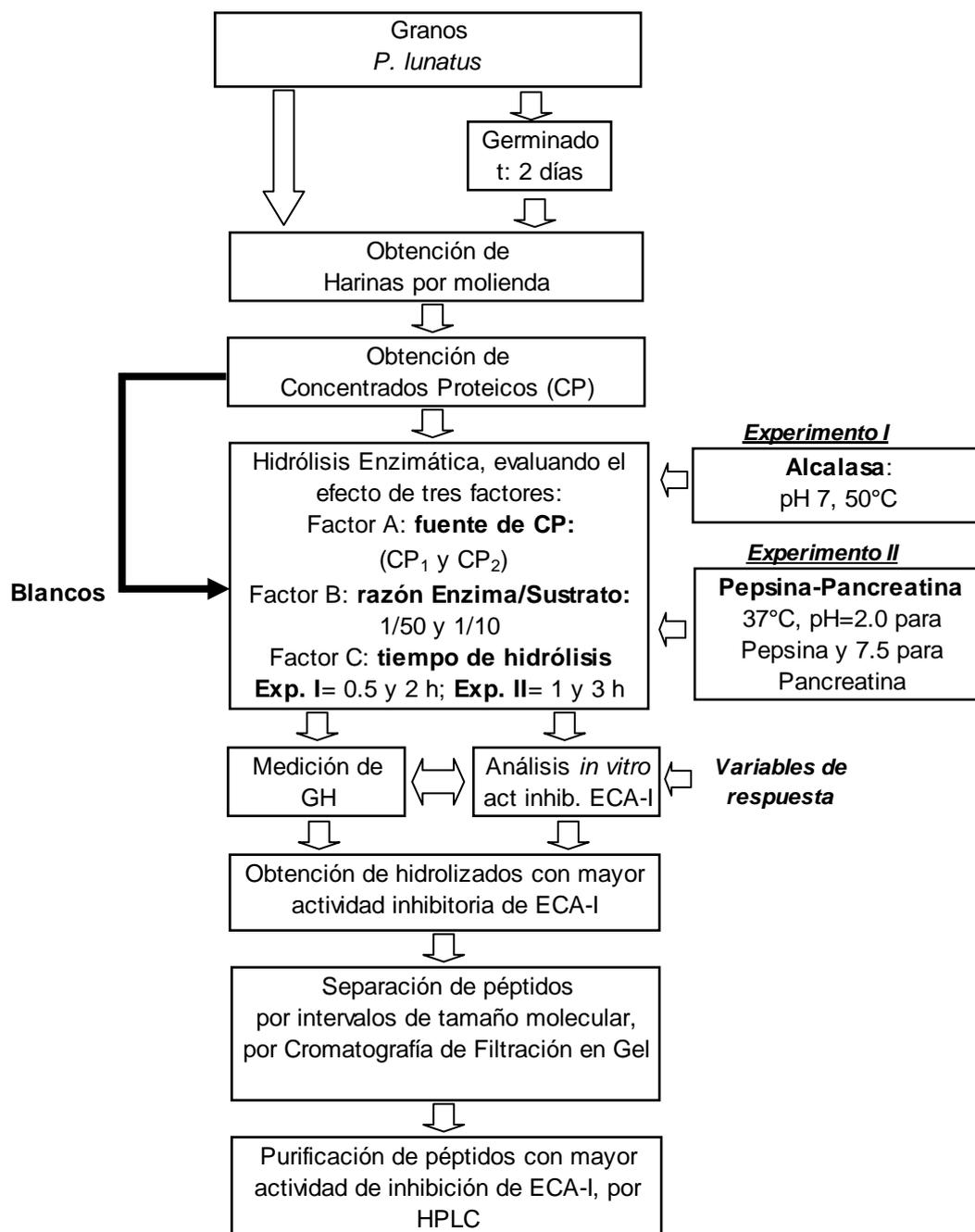


Figura 4. Diagrama de flujo de la investigación

## VI.2. Obtención de la materia prima

Las semillas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) se obtuvieron del mercado local de la ciudad de Mérida Yucatán, México; la cosecha de los granos se realizó en comunidades campesinas del vecino estado de Campeche, México.

### **VI.3 Germinación de granos de frijol lima**

La germinación se efectuó con los parámetros establecidos por la Asociación Internacional de Prueba de Semilla (Anon, 1999). Las semillas fueron lavadas previamente con 20 ml de una solución de hipoclorito de sodio (0.2 g Cl/l); después se enjuagó con agua destilada (25 ml, 3 veces) antes de la germinación para evitar la proliferación de hongos y mejorar la germinación de la semilla. El método de germinación se hizo de la manera siguiente: se colocaron 80 semillas en papel filtro humedecido a saturación (Albet 1516, 42 x 52 cm) y cubiertas con otra capa del mismo papel. Se colocaron en una cámara de germinación, controlando la humedad y a una temperatura de 30° C. Los germinados obtenidos fueron sometidos a extracción de las fracciones proteicas y posterior hidrólisis enzimática.

### **VI.4. Preparación de harinas de frijol lima**

Los granos de frijol lima germinados y sin germinar, se limpiaron manualmente seleccionando aquellos con tamaño uniforme, eliminando impurezas y granos dañados; después fueron triturados en un molino Cemotec (Tecator Sweden) hasta obtener una harina capaz de pasar a través de una malla 20, posteriormente se efectuó una molienda más fina con un molino Cyclotec 1093 (Tecator Sweden), para disponer de una harina con menor tamaño de partícula (malla 50). Este mismo procedimiento se aplicó para los granos germinados.

### **VI.5. Obtención de los concentrados proteínicos de frijol lima**

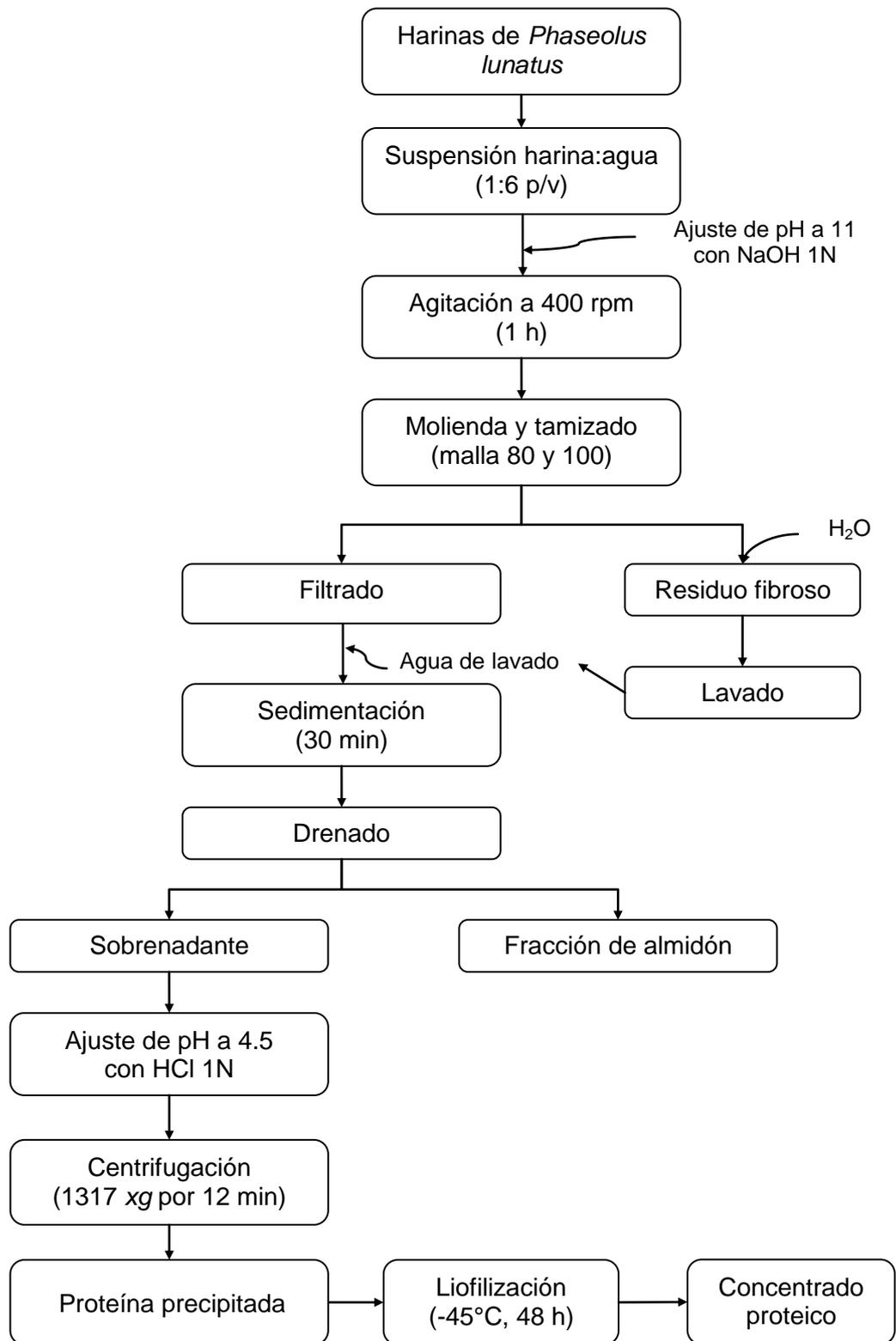
En la obtención de concentrados proteicos CP, se utilizó una modificación del método reportado por Hoover y col. (1991), adaptado por Betancur y col. (1998). Se procesaron dos lotes de 1 kg de harina tanto de grano germinado como sin germinar (Figura 5) y se suspendieron en agua destilada en una relación 1:6 (harina: agua), el pH se ajustó a 11 con una solución de NaOH 1N y se agitó por 1 h con ayuda de un agitador mecánico (Caframo RZ-1) a 400 rpm. Posteriormente la suspensión se pasó a través de un molino de discos Kitchen-Aid y luego a través de dos tamices (malla 80 y 100) secuencialmente para separar el bagazo (rico en fibra) de la mezcla de

almidón y proteína el cual fue lavado en cinco ocasiones con 200 ml de agua cada vez y el filtrado se recibió en un recipiente de plástico para que repose durante 30 min a temperatura ambiente. El residuo (bagazo) fue sometido a secado en charolas de aluminio a 60 °C en una estufa de convección (Lab-Line). Transcurrido el tiempo de reposo (30 min) de la suspensión lechosa se decantó el sobrenadante, para separar el sedimento rico en almidón. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1N, para posteriormente ser sometido a centrifugación (centrífuga Mistral 3000i) a 1,317 xg por 12 min para recuperar el precipitado, el cual se secó a -47 °C y  $13 \times 10^{-3}$  mbar en un equipo liofilizador Labconco.

#### **VI.6. Composición proximal.**

Los componentes proximales a la harina de *Phaseolus lunatus*, obtenida de grano germinado y sin germinar, así como también a los concentrados proteicos fueron determinados por los métodos de la AOAC (1995):

- ✚ Humedad (Método 925.09) por secado en estufa a 105°C hasta peso constante (4 h).
- ✚ Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550° C hasta la pérdida total de la materia orgánica durante 2 h.
- ✚ Grasa cruda o extracto etéreo (Método 920.39; Hart y Fisher, 1991), lípidos libres (grasas neutras o ácidos grasos libres) extraídos con hexano en un sistema Soxhlet.
- ✚ Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, por una digestión ácida (ácido sulfúrico) de la muestra y luego una destilación alcalina (hidróxido de sodio), usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.
- ✚ Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y luego alcalina.
- ✚ Extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) Se calculó por diferencia.



**Figura 5.** Diagrama de flujo para la obtención de concentrados proteicos

## **VI.7. Análisis de aminoácidos en concentrados proteicos y fracciones peptídicas con mayor actividad IECA-I**

Se llevó a cabo mediante el método de Alaiz y col, (1992). Las muestras (2-4 mg de proteína) se hidrolizaron con 4 mL de HCl 6 N a 110° C durante 24 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en el rotavapor y se redisolviéron en tampón borato sódico 1 M, pH 9.0, llevándolas a un volumen final de 25 mL. La derivatización de los aminoácidos se hizo a 50° C, durante 50 min, con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo. La separación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub> 4 µm de fase reversa (Waters) de 300 x 3.9 mm, usándose un sistema de gradiente binario con acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes. El flujo fue de 0.9 mL/min y el gradiente de elución usado: tiempo 0-3 min, gradiente lineal desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3-13 min, elución con A:B (86:14); tiempo 13-30 min, gradiente lineal desde A:B (86:14) hasta A:B (69:31); tiempo 30-35 min elución con A:B (69:31).

## **VI.8. Rendimiento en la obtención de concentrados proteicos.**

Para el cálculo del rendimiento del método de obtención de los aislados proteicos a partir de granos germinados y sin germinar de *Phaseolus lunatus* se tomó como referencia el contenido de proteína total, de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{Proteína (g) en el concentrado})}{\text{Proteína en la harina (g)}} \times 100$$

## **VI.9. Hidrólisis enzimática.**

**VI.9.1. Diseño experimental con Alcalasa:** En este experimento, se prepararon suspensiones de los concentrados proteicos (a partir de grano sin germinar y germinado) en agua con una concentración de proteína de 4 % p/v, similar al reportado por Li y col. (2005). Las fracciones de proteína fueron hidrolizadas con esta enzima en una concentración de 0.30 AU/g, a pH 7 y una temperatura de 50°C, de acuerdo a Yust y col. (2003). La alcalasa 2.4L (2.4 AU/g) empleada fue

proporcionada por Novo Nordisk, Dinamarca. Las hidrólisis con alcalasa se detuvieron con la adición de HCl concentrado hasta modificar el pH a 5.0.

**VI.9.2. Diseño experimental mediante Sistema secuencial Pepsina-Pancreatina:** Se prepararon suspensiones similares de los concentrados proteicos en agua con una concentración de proteína de 4 % p/v (Li y col., 2005). Las fracciones de proteína fueron hidrolizadas mediante un tratamiento secuencial enzimático con Pepsina-Pancreatina, empleando el baño provisto de agitación New Brunswick Cientific, modelo R76, de acuerdo a Megías y col. (2004). La primera digestión se realizó con pepsina 1:10,000 (Sigma), a la mitad del tiempo de hidrólisis a una temperatura de 37° C y un pH de 2.0 con una solución enzimática de 4 % p/v, ajustando el pH con HCl 1N. La segunda digestión se realizó durante la segunda mitad del tiempo restante inmediatamente después de finalizar la primera, en la cual a la suspensión proteica se le agregó pancreatina extraída del páncreas porcino (Sigma P32292-100G), a la misma concentración de enzima de 4 % p/v, misma temperatura y tiempo, modificando el valor de pH hasta 7.5 con NaOH 1N. La hidrólisis fue interrumpida con calor (80°C, 20 min).

#### **VI.10. Determinación del Grado de hidrólisis.**

Se evaluó el grado de hidrólisis GH con una modificación de la técnica de OPA (o-ftaldialdeído), propuesta por Nielsen y col. (2001), para lo cual se preparó una curva de calibración, empleando como testigo diferentes volúmenes en  $\mu$ l obtenidos de una dilución 1:10 de la solución madre del aminoácido L-serina, preparada con 30.6 mg en 30 ml de agua, y 1.5 ml del reactivo de OPA, el cual fue preparado con 150 ml de agua, 7.62 g de tetraborato de sodio y 200 mg de docedil sulfato de sodio (SDS). En forma aparte, se disolvieron 160 mg de OPA en 4 ml de etanol QP. Se mezclaron las soluciones anteriores, se agregó 352 mg de mercaptoetanol y se aforó a 200 ml con agua destilada. El reactivo de OPA y el testigo fueron agitados en vortex durante 5 seg y las absorbancias fueron leídas a 340 nm, después de 2 min, en un espectrofotómetro Genesys 10 UV de Termo Espectronic. Una vez obtenida la curva

se procedió a evaluar el GH, agregando 1.5 ml del reactivo de OPA y 200 µl del hidrolizado diluido. Esta solución se agitó durante 5 seg. Se aplicó la fórmula para hallar el porcentaje del grado de hidrólisis:

$$\% \text{ GH} = \frac{\text{(aminos libres en el hidrolizado)}}{\text{(aminos totales en el concentrado proteico)}} \times 100$$

Los aminos totales en la muestra se obtuvieron mediante hidrólisis ácida, empleando HCl 6N a 110°C y un tiempo de 24 h en una estufa. La determinación de aminos totales se efectuó con la misma metodología de Nielsen y col., (2001).

#### **VI.11. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA-I *in vitro*.**

Se efectuó de acuerdo a la metodología de Hayakari y col., (1978), en la cual la ECA-I hidroliza el sustrato sintético Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL) hasta formar ácido hipúrico y His-Leu. Este método consiste en una reacción colorimétrica de ácido hipúrico con tricoloro-s-triazina (TT), desarrollado en 0.50 ml de una mezcla de incubación conteniendo 40 µmol de búfer de fosfato de potasio (pH 8.3), 300 µmol de cloruro de sodio, 1.5 µmol de HHL, 20 µl de ECA-I (100 mU) y los diferentes hidrolizados obtenidos. La incubación se realizó durante 45 min a 37 °C. Dicha reacción se detuvo por la adición de 1.5 ml de 3 % de TT en dioxano, seguido de 3 ml de búfer de fosfato 0.2 M (pH 8.3). Después de la reacción, las diferentes mezclas se centrifugaron a 10,000xg en un tiempo de 10 min, en la cual la actividad enzimática se determinó en el sobrenadante a 382 nm de absorbancia. El valor de IC<sub>50</sub> se define, como se ha descrito con anterioridad, como la concentración del hidrolizado en cuestión requerido para producir el 50 % de inhibición de la ECA-I y se determina mediante regresión lineal de la inhibición de la ECA-I (%) vs. concentración de proteína en los hidrolizados.

#### **VI.12. Obtención de fracciones peptídicas por intervalos de tamaño molecular, a partir de los hidrolizados con mayor poder antihipertensivo**

La separación de las diferentes fracciones peptídicas a partir de los hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva se realizó con el empleo de cromatografía de

filtración en gel, de acuerdo a Yust y col. (2003) y a Megías y col. (2004). Se empleó una columna de vidrio (2 cm x 55 cm), la cual fue empacada con Sephadex G-50. Se inyectó 1 ml de los hidrolizados con una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se usó una solución reguladora de bicarbonato de amonio 50 mM y pH=9.1 como eluyente. El flujo de elución fue 10 ml/h. La columna empacada fue previamente calibrada con cinco estándares de pesos moleculares conocidos: citocromo C (12 384 Da), bacitracina A (1 422.69 Da), Val-angiotensina (1031 Da), los péptidos RKEVY (693.8 Da) y TQ (247.8 Da). Todas las fracciones peptídicas fueron monitoreadas a 280 nm.

### **VI.13. Purificación de fracciones peptídicas con mayor poder de inhibición de la ECA-I por HPLC**

La purificación de los péptidos con mayor poder inhibitorio se realizó con el empleo de cromatografía HPLC de acuerdo a Yust y col. (2003) y a Megías y col. (2004). Las fracciones colectadas por cromatografía de filtración en gel se redisolviéron en agua desionizada e inyectadas en una columna semipreparativa C<sub>18</sub> Hi-Pore RP-318, 250 mm x 10 mm BIO-RAD. El volumen a inyectar fue de 100 µl y la concentración de los péptidos fue 20 mg/ml en una solución de 0.10 % de ácido trifluoroacético a una velocidad de flujo de 4 ml/min y a una temperatura de 30 °C. Mediante un gradiente entre 0-30 % de acetonitrilo en agua durante 50 min se recolectaron nuevas fracciones peptídicas; esta separación se monitoreó a 215 y a 280 nm. Las nuevas fracciones colectadas, se les determinó la inhibición de ECA-I, seleccionando las de mayor actividad para continuar purificándolas mediante columna analítica C<sub>18</sub> Hi-Pore RP-318, 250 mm x 4.6 mm BIO-RAD). En esta purificación, el volumen de inyección fue de 50 µl con una concentración proteínica de 2 mg/ml en la misma solución de ácido trifluoroacético al 0.10 % y la misma mezcla de elución durante 50 min. La velocidad de flujo fue 1 ml/min y a una temperatura de operación de 30 °C y se monitoreó a las mismas longitudes de onda.

## VI.14. Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial con tres factores y dos bloques, como se detalla a continuación.

### VI.14a.- Experimento Uno: digestión con alcalasa 2.4 L

Se estudiaron 3 factores de dos niveles cada uno (diseño 2<sup>3</sup>) con un punto central, en donde el primer factor (A) consistió en la fuente de CP en los niveles: a partir de grano sin germinar y germinado; el factor B se estableció como la relación enzima/sustrato a usar con los niveles (E/S) de 1/50 y 1/10; el factor C se definió como el tiempo de hidrólisis en los niveles: 0.5 y 2 h. El punto central fue definido por las condiciones: (A) mezcla al 50 % de grano sin germinar y germinado; (B) relación (E/S) de 1/30 y (C) un tiempo de 1.25 h. Las variables de respuesta fueron dos: grado de hidrólisis enzimática y medición *in vitro* de la actividad inhibitoria de la ECA-I, siendo la más importante para este estudio la segunda variable (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Tratamientos efectuados para el procedimiento enzimático I con la Alcalasa 2.4L.

Tratamiento		Factores			Nivel	Nivel	Nivel
		A	B	C	Factor A	Factor B	Factor C
1	(1)	-	-	-	Sin germinar	1/10	0.5 h
2	A	+	-	-	Germinado	1/10	0.5 h
3	B	-	+	-	Sin germinar	1/50	0.5 h
4	Ab	+	+	-	Germinado	1/50	0.5 h
5	C	-	-	+	Sin germinar	1/10	2 h
6	Ac	+	-	+	Germinado	1/10	2 h
7	Bc	-	+	+	Sin germinar	1/50	2 h
8	Abc	+	+	+	Germinado	1/50	2 h
9	(0)	0	0	0	50%/50%	1/30	1.25 h

### VI.14b.- Experimento Dos: sistema secuencial enzimático Pepsina-Pancreatina.

La diferencia de este experimento con el anterior fue el tiempo empleado en la hidrólisis. Se estudiaron los mismos factores, también de dos niveles cada uno

(diseño 2<sup>3</sup>) con un punto central, en donde el primer factor (A) consistió en la fuente de CP en los niveles: a partir de grano sin germinar y germinado; el factor B se estableció como la relación de enzima/sustrato a usar con los niveles (E/S) de 1/50 y 1/10; el factor C se definió como el tiempo de hidrólisis en los niveles: 1 y 3 h. El punto central fue definido por las condiciones: (A) mezcla al 50 % de grano sin germinar y germinado; (B) relación (E/S) de 1/30 y (C) un tiempo de 2 h. Las variables de respuesta fueron las mismas: grado de hidrólisis enzimática y medición (*in vitro*) de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (Cuadro 8).

En la resolución de ambos diseños experimentales se empleó el software (paquete estadístico) Statgraphics, versión 5.1 así como también comparativo de medias. Para definir las mejores condiciones del hidrolizado proteico para la obtención de biopépticos con actividad antihipertensiva se empleó el mismo programa, analizando las intersección dobles y el contorno de la superficie de respuesta (Montgomery, 1998). Para el análisis del dendograma se efectuó la metodología del vecino más cercano (Montgomery, 1998).

**Cuadro 8.** Tratamientos efectuados para el procedimiento enzimático II, sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina.

Tratamiento		Factores			Nivel	Nivel	Nivel
		A	B	C	Factor A	Factor B	Factor C
10	(1)	-	-	-	Sin germinar	1/10	1.0 h
11	A	+	-	-	Germinado	1/10	1.0 h
12	B	-	+	-	Sin germinar	1/50	1.0 h
13	Ab	+	+	-	Germinado	1/50	1.0 h
14	C	-	-	+	Sin germinar	1/10	3.0 h
15	Ac	+	-	+	Germinado	1/10	3.0 h
16	Bc	-	+	+	Sin germinar	1/50	3.0 h
17	Abc	+	+	+	Germinado	1/50	3.0 h
18	(0)	0	0	0	50%/50%	1/30	2.0 h

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 Análisis proximal de las harinas y de los concentrados proteicos de *P. lunatus* y perfil de aminoácidos

#### VII.1.1. Análisis proximal

En las harinas de ambos granos obtenidos de *Phaseolus lunatus*, se pudo observar diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) por tipo de grano, es decir, que la germinación mostró efectos significativos en los componentes (Cuadro 9), lo cual indicó que un tiempo de germinación de 2 días, generó importantes cambios en la composición química. El frijol germinado tuvo el mayor contenido de proteína (33.65%). En el grano sin germinar, con excepción del contenido de proteína y cenizas, los demás componentes mostraron disminución después de la germinación; así, el contenido de grasa disminuyó en un 16.5%, la fibra en un 15.6% y los elementos libres de nitrógeno (ELN) en un 4.19%. En tanto que la proteína y las cenizas se incrementaron en un 11.5% y en un 3.86%, respectivamente.

Este incremento en proteína y cenizas también fue obtenido por Dibifori y col. (1994), con 2.4% (18.8-21.2%) y 0.94% (3.12-4.06%) respectivamente, después de germinar *P. lunatus* de Nigeria, una variedad conocida como Ikpakpa, durante 48 h en ausencia de luz, en tanto que Rodríguez y col. (2008) han reportado un incremento de proteína (0.5%) después de germinar *P. vulgaris*, variedad la Granja durante 48 h también; Bau y col. (1997) han reportado incrementos en notables en el contenido de proteína cruda, como señalaron Sangronis y col. (2006), quienes reportaron que durante un tiempo de germinación de 5 días en granos de *Phaseolus vulgaris*, tanto de color negro (variedad Tacarigua) como de color blanco (variedad Matterhorn),

**Cuadro 9.** Análisis proximales al grano de *P. lunatus* germinado y sin germinar. Datos en base seca

<b>Materia Prima</b>	<b>Proteína Cruda</b>	<b>Grasa Cruda</b>	<b>Fibra Cruda</b>	<b>Humedad</b>	<b>Cenizas</b>	<b>E.L.N.</b>
F. Lima sin germinar	30.18 <sup>a</sup>	1.76 <sup>b</sup>	5.64 <sup>b</sup>	(9.58) <sup>b</sup>	3.89 <sup>a</sup>	58.53 <sup>b</sup>
F. Lima germinado	33.65 <sup>b</sup>	1.47 <sup>a</sup>	4.76 <sup>a</sup>	(9.32) <sup>a</sup>	4.04 <sup>b</sup>	56.08 <sup>a</sup>
F. Lima sin germinar <sup>1</sup>	23.31	1.10	5.3	NR	4.11	71.48
F. Lima sin germinar <sup>2</sup>	28.71	2.62	6.84	NR	4.84	63.83
Garbanzo sin germinar <sup>3</sup>	22.70	1.40	2.40	NR	3.40	72.50
Lupino sin germinar <sup>4</sup>	55.30	0.20	5.80	NR	3.80	34.90
Desengrasado	52.40	0.50	3.8	NR	5.40	37.90

<sup>a-b</sup> Comparativo por tipo de grano. Letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

E.L.N. Extracto libre de nitrógeno  
Proteína cruda (factor 6.25)

<sup>1</sup> Augustin y Klein (1989)

<sup>2</sup> Colomé y col. (1993)

<sup>3</sup> Vioque y col. (2001)

<sup>4</sup> Rodríguez-Ambrosio y col. (2005)

el contenido de proteína cruda se incrementó de 24.2 a 28.3 % para el grano negro y de 21.6 a 24.5 % para el grano blanco, similares a los datos hallados con el frijol lima. Este incremento en el contenido de proteínas, posiblemente se deba a la síntesis de enzimas necesarias para el desarrollo del cotiledón hasta la plántula (Bau y col., 1997) y a la degradación de los nutrientes de reserva (lípidos y carbohidratos) que proveen la energía requerida para la síntesis de dichas enzimas durante el proceso de germinación (Kornberg y Beevers, 1957).

Los datos obtenidos de proteína cruda en el grano germinado y sin germinar, concuerdan con los reportados en la literatura. Así, el contenido de proteína hallada en el frijol lima fue superior al valor reportado por Augustin y Klein (1989) para la misma leguminosa (23.31%). Así mismo, Chel-Guerrero y col. (2002) y Martínez (2003), registraron valores de proteína en el frijol lima de 24.1 y 23.7%,

respectivamente; en tanto que Oshodi y Aletor (1993), así como también Colomé y col. (1993), registraron valores inferiores de proteína cruda (28.71 y 26.0%, respectivamente, para el mismo frijol lima). Vioque y col. (2001), reportaron un contenido de proteína inferior (22.7%), en el garbanzo. El contenido de grasa, en el grano de frijol lima sin germinar, fue de 1.76 %; en tanto que, en el grano germinado, este parámetro fue de 1.47 %; estos valores también fueron muy similares al valor de grasa cruda reportado por Augustin y Klein (1989) y por Oshodi y col. (1993), con valores de grasa de 1.10 y 1.30 % respectivamente; mientras que, en el mismo grano (*Phaseolus lunatus*) reportado por Colomé y col. (1993), el nivel de grasa fue mayor (2.62 %). Vioque y col. (2001) reportaron un contenido de grasa cruda de 1.4 % en la harina desengrasada de garbanzo, en tanto que para soya desengrasada sin germinar, se reportan menores niveles de grasa, 0.50 % (Rodríguez-Ambris y col., 2005). El contenido de fibra cruda fue de 5.64% para grano germinado y de 4.76% para grano sin germinar. Tanto Augustin y Klein (1989) como Colomé y col. (1993), reportaron mayores valores de cenizas en *P. lunatus*, con valores de 4.11 y 4.84 % respectivamente; Martínez (2003) reportó un contenido de cenizas muy similar para este mismo de grano (3.38 %). Asimismo, el contenido de cenizas fue muy similar al reportado por Vioque y col. (2001) para el garbanzo, con un valor de 3.4 %. En conclusión, el contenido de cenizas fue muy similar al reportado en la literatura para varios granos de frijol, de 3.3 a 3.7 % (Ortega-Nieblas, 1996) y para variedades de garbanzo y chícharo (Otto y col., 1997). En cuanto al ELN, este valor osciló entre 56.08 y 58.53%. Augustin y Klein (1989) reportaron valores superiores (71.48 %), en tanto que Oshodi y Aletor (1993), Colomé y col. (1993) y Martínez (2003), registraron valores más altos de ELN (63.83, 64.4 y 63.4 %, respectivamente) para el frijol lima sin germinar. Vioque y col. (2001) reportaron un contenido superior de ELN en el garbanzo, con un valor de 72.5 %. Los valores de ELN fueron ligeramente inferiores a los valores reportados en la literatura para varias variedades de frijol, incluyendo granos negros, blancos y rojos (entre 66.8 y 67.1 %), de acuerdo a Dzudie y Hardy (1996).

Con relación a los análisis proximales efectuados a los concentrados proteicos (CP) a partir de las harinas de *Phaseolus lunatus* (Cuadro 10), tanto de grano germinado

(CP<sub>1</sub>) como sin germinar (CP<sub>2</sub>), se puede mencionar que, al igual que con la harina, la germinación influyó notablemente en la composición química de los concentrados, con diferencia estadística significativa por componente ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 10.** Análisis proximales al concentrado proteico de *P. lunatus*. Datos en base seca

<b>Materia Prima</b>	<b>Proteína Cruda</b>	<b>Grasa Cruda</b>	<b>Fibra cruda</b>	<b>Humedad</b>	<b>Cenizas</b>	<b>E.L.N.</b>
F. Lima sin germinar	56.40 <sup>a</sup>	3.12 <sup>a</sup>	1.83 <sup>b</sup>	(4.45) <sup>a</sup>	3.32 <sup>a</sup>	35.33 <sup>b</sup>
F. Lima germinado	69.14 <sup>b</sup>	4.16 <sup>b</sup>	0.96 <sup>a</sup>	(5.40) <sup>b</sup>	3.68 <sup>b</sup>	22.06 <sup>a</sup>
F. Lima sin germinar <sup>1</sup>	71.13	0.67	1.82	NR	2.82	25.12
<i>Canavalia ensiformis</i> sin germinar <sup>2</sup>	73.75	5.12	0.40	NR	4.1	25.12
Garbanzo sin germinar <sup>3</sup>	78.00	3.50	0.60	NR	2.90	11.80
Lupino sin germinar <sup>4</sup>						
Desengrasado	93.20	ND	0.50	NR	2.40	3.90
Soya sin germinar <sup>4</sup>						
Desengrasada	92.30	ND	0.20	NR	4.50	3.0

<sup>a-b</sup> Comparativo por tipo de grano. Letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

E.L.N. Extracto libre de nitrógeno

Proteína cruda (factor 6.25)

<sup>1</sup> Betancur-Ancona y col. (2004)

<sup>2</sup> Pérez (1999)

<sup>3</sup> Sánchez-Vioque y col. (1999)

<sup>4</sup> Rodríguez-Ambris y col. (2005)

Así, los contenidos de proteína, grasa, humedad y cenizas mostraron incrementos en su composición. Se pudieron obtener niveles de proteína entre 56.40 y 69.14% en todos los concentrados proteicos de los diferentes materiales; fue evidente el incremento en los niveles de grasa en ambos concentrados proteínicos (3.12 y 4.16% en CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub> respectivamente); ambos incrementos se pudieron haber originado al exponer los materiales a pH 11 durante el proceso de obtención de ambos CP, ya que a este valor de pH, es posible la saponificación de la mayoría de grasas de carácter polar, precipitando posteriormente con los CP a pH 4.5; este mismo comportamiento se ha presentado en CP de *Cicer arietinum* L (Sánchez-Vioque y col., 1999) y en *Canavalia ensiformis* (Chel-Guerrero y col., 2002). Los resultados de proteína en los CPs a partir del frijol lima fueron inferiores al obtenido por Betancur-Ancona y col. (2004) en la leguminosa de la misma variedad (sin

germinar), con un valor de 71.13 % en tanto que Martínez (2003) obtuvo un valor similar (69.9 %) para concentrado proteico obtenido de grano sin germinar de esta misma leguminosa. En comparación con concentrados proteicos de otras leguminosas sin germinar, Pérez (1999) ha registrado un mayor valor de proteína cruda (73.75 %) en el concentrado proteico de *Canavalia ensiformis*; en tanto que Sánchez-Vioque y col. (1999) registraron un mayor valor de proteína cruda en el concentrado del garbanzo (*Cicer arietinum*), con un valor de 78.0 %. Así mismo, Chau y col. (1997) han reportado mayores cantidades de proteína cruda en concentrados proteicos de varias leguminosas (79.36 % en *Phaseolus angularis*, 78.0 % en *Phaseolus calcaratus*, 85.0 % en *Dilichos lablab* y 78.7 % en *Glycine max*). De igual forma, existe una mayor cantidad de proteína cruda en concentrados proteicos de soya, entre 87.9 y 94.1 % (Henn y Netto, 1998), así como también en concentrados proteicos a partir de garbanzo (83.4 %) y de semillas de girasol (97.0 %) (Vioque y col., 2001). Con relación al contenido de grasa, Betancur-Ancona y col. (2004) reportó un valor muy inferior (0.67%) a los obtenidos en los CPs de este estudio; Pérez (1999) reportó un valor ligeramente superior de grasa cruda en el concentrado de *Canavalia ensiformis* (5.12 %), mientras que Sánchez-Vioque y col. (1999) registró un valor similar de grasa cruda de 3.5 % en el CP de *Cicer arietinum*. Los niveles de fibra cruda oscilaron entre 0.96 y 1.83 %. El valor de fibra obtenido con los frijoles lima fueron similares al valor reportado por Betancur-Ancona y col. (2004) en el concentrado de frijol lima sin germinar (1.82%). El nivel de cenizas se incrementó en un 10.84% después de la germinación. Estos valores de cenizas obtenidos fueron superiores al reportado por Betancur-Ancona y col. (2004), con un valor de 2.82 % en el concentrado proteico del grano sin germinar de *Phaseolus lunatus*; también muy similar al reportado por Sánchez-Vioque y col. (1999) en el concentrado proteico de *Cicer arietinum*, con 2.9 %. Pérez (1999) registró un valor similar de cenizas (4.16 %) en el concentrado proteico de *Canavalia ensiformis*. Con relación a los ELN (22.06 y 35.33%), los valores fueron similares a los reportados por Betancur-Ancona y col. (2004), con 25.12 %. Pérez (1999) registró un valor inferior de ELN en el concentrado proteico de *Canavalia ensiformis* (17.36 %), en tanto que Sánchez-Vioque y col. (1999), obtuvieron un menor valor de ELN (11.8 %) en el concentrado proteico de *Cicer arietinum*. El contenido de ELN para concentrados de

lupino desengrasado y soya desengrasada registrados en la literatura es de 3.90 y 3.0% respectivamente (Rodríguez-Ambris y col., 2005).

### **VII.1.2. Perfil de aminoácidos en harinas y concentrados proteínicos**

La composición aminoacídica de las proteínas presentes en harinas y CPs se muestran en el Cuadro 11. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de obtención de concentrados proteínicos a partir de harinas no produjo cambios considerables en la composición aminoacídica, salvo algunas excepciones. Del perfil aminoacídico en las harinas se pudo constatar que la germinación causó disminución considerable (22.2%) en el contenido de metionina (0.81-0.63 mg/100 mg de proteína), ligera disminución (3.5%) en el contenido de lisina (7.10-6.85% mg/100 mg de proteína) y ligero incremento (6.8%) en el contenido de ácido aspártico+asparagina (12.98-13.86 mg/100 mg de proteína). El contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos tuvo en promedio 32%, por lo que ambas harinas constituyen una fuente de partida interesante para la obtención de hidrolizados y péptidos con capacidad inhibitoria de la ECA-I; se ha demostrado que entre los péptidos con estas propiedades, están aquellos que tienen en su secuencia residuos de aminoácidos con carácter hidrofóbico (Megías y col., 2004).

Del perfil de aminoácidos del concentrado proteínico a partir de grano sin germinar CP<sub>1</sub> y de la harina respectiva, se observó disminución considerable en el contenido de fenilalanina (6.22-0.52 mg/100 mg de proteína) y de metionina (0.81-0.35) e incrementos en el contenido de cisteína (0.55-3.87 mg/100 mg de proteína) y de prolina (2.84-7.62); por otra parte, con el perfil de aminoácidos del concentrado proteínico a partir de grano germinado CP<sub>2</sub> y de la harina respectiva, se observó disminución considerable también en el contenido de fenilalanina (6.05-0.65 mg/100 mg de proteína) e incrementos en el contenido de cisteína (0.35-3.90 mg/100 mg de proteína) y de prolina (2.80-7.68). Esto pudo deberse a la interacción de estos residuos de aminoácidos con algún resto lipídico oxidado o bien, por reacción con azúcares solubles (Megías 2008). En procesos de obtención de aislados proteínicos a partir de lupino (Vioque y col., 1991) y de semillas de girasol (Megías 2008) también se observó incremento en el contenido de prolina (3.5-13.4% y 0.90-6.0%,

respectivamente) y disminución en el contenido de metionina (3.0-1.5% y 2.3-0.5%, respectivamente) (Cuadro 12). En relación con los requerimientos de la FAO (2002), los CPs son limitantes en lisina, al igual que las harinas, y en aminoácidos azufrados (Cuadro 11).

Los perfiles del contenido de aminoácido fueron muy similares tanto para CP<sub>1</sub> como para CP<sub>2</sub>. (Cuadro 11). Ambos tuvieron alto contenido de ácido aspártico+asparagina (12.80 y 12.47% para CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub>, respectivamente); ácido glutámico+glutamina (15.30 y 16.10%); leucina (9.19 y 9.01%); prolina (7.62 y 7.68%) y serina (7.39 y 7.26%). Durante la germinación y el posterior proceso de obtención del concentrado proteínico se incrementaron los niveles de ácido glutámico (15.30-16.10%), glicina (4.67-4.84%), alanina (6.08-6.19%), metionina (0.35-0.50%) y fenilalanina (0.52-0.65%), disminuyendo los niveles de ácido aspártico+asparagina (12.80-12.47%), serina (7.39-7.26%), histidina (3.24-3.17%), tirosina (3.54-3.09%), isoleucina (4.30-4.11%), leucina (9.19-9.01%) y triptófano (0.98-0.79%). El resto de los aminoácidos no tuvo cambio significativo alguno.

El perfil de aminoácidos de ambos materiales son muy similares al perfil del concentrado del *P. lunatus* reportado por Betancur-Ancona y col., 2004b y al perfil del aislado proteínico de frijol mungo (*P. radiatus*) reportado por Li. y col., 2005).

**Cuadro 11.** Composición de aminoácidos en harinas y concentrados proteínicos a partir de frijol lima (*P. lunatus*); harina de granos sin germinar (HNA<sub>1</sub>); harina de granos germinados (HNA<sub>2</sub>); concentrado proteínico de granos sin germinar (CP<sub>1</sub>); concentrado proteínico de granos germinados (CP<sub>2</sub>). Se incluyen valores requeridos por FAO.

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				FAO (2002)
	HNA <sub>1</sub>	CP <sub>1</sub>	HNA <sub>2</sub>	CP <sub>2</sub>	
Asx <sup>1</sup>	12.98	12.80	13.86	12.47	
Glx <sup>2</sup>	16.70	15.30	16.63	16.10	
Ser	7.97	7.39	7.93	7.26	
His	3.08	3.24	3.13	3.17	1.9
Gli	4.46	4.67	4.34	4.84	
Tre	4.46	4.40	4.40	4.41	3.4
Arg	6.37	4.96	6.42	5.02	
Ala	4.82	6.08	4.83	6.19	
Pro	2.84	7.62	2.80	7.68	
Tir	3.77	3.54	3.72	3.09	
Val	4.40	4.79	4.41	4.88	3.5
Met	0.81	0.35	0.63	0.50	2.5 <sup>3</sup>
Cis	0.55	3.87	0.53	3.90	
Ile	3.86	4.30	3.92	4.11	2.8
Leu	8.65	9.19	8.49	9.01	6.6
Fen	6.22	0.52	6.05	0.65	6.3 <sup>4</sup>
Lis	7.10	5.99	6.85	5.94	5.8
Trp	0.97	0.98	1.07	0.79	
<b>Distribución de aminoácidos</b>					
Hidrofóbicos	32.57	34.10	32.19	33.34	
Neutros	21.21	20.90	20.92	21.06	
Hidrofílicos	46.22	45.00	46.89	45.60	

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

<sup>3</sup> Met+Cis

<sup>4</sup> Fen+Tir

**Cuadro 12.** Composición de aminoácidos en harinas y aislados proteínicos a partir de lupino (*L. mutabilis*) y a partir de semillas de girasol (*Helianthus annuus*);

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				FAO (2002)
	Lupino <sup>a</sup>		Girasol <sup>b</sup>		
	HNA	Aislado	HNA	Aislado	
Asx <sup>1</sup>	12.2	12.3	9.6	11.8	
Glx <sup>2</sup>	30.7	26.9	21.3	24.7	
Ser	5.4	7.0	5.5	5.1	
His	3.5	3.5	3.0	2.3	1.9
Gly	3.2	3.4	6.4	6.5	
Thr	3.2	3.6	4.8	3.8	3.4
Arg	14.7	13.7	11.2	9	
Ala	4.2	3.4	4.1	4.6	
Pro	3.5	13.4	0.9	6	
Tir	5.1	1.4	3.1	2.1	
Val	3.2	3.4	5.0	3.8	3.5
Met	3.0	1.5	2.3	0.5	2.5 <sup>3</sup>
Cis	2.1	1.8	2.3	1.6	
Ile	4.0	4.1	4.6	2.8	2.8
Leu	5.7	6.3	7.1	7.3	6.6
Phe	3.2	3.7	4.8	5.1	6.3 <sup>4</sup>
Lis	7.3	6.1	4.2	2.9	5.8
Trp	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	

<sup>a</sup> Vioque y col. (1998)

<sup>b</sup> Megías y col. (2004)

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

## VII.2. Rendimiento del proceso para la obtención de concentrados proteicos

Tomando en consideración el contenido de proteína de las harinas y de los concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* a partir de grano germinado y sin germinar, se obtuvieron los rendimientos en la recuperación de la proteína presente

en las harinas, siendo 30.84 % para *P. lunatus* germinado y 34.30% para grano sin germinar. Paredes-López y Ondorica-Falomir (1986), reportaron un rendimiento de 46% en un aislado de semillas de una variedad de girasol (safflower), en tanto que Arntfield y col. (1985) han registrado un rendimiento de 44 % en la obtención de aislados de semillas de haba. Rodríguez-Ambríz y col. (2005) obtuvieron un mejor rendimiento (60%) en la obtención de aislados de lupino (*Lupinus campestris*). A este respecto, está en proceso la realización de un perfil electroforético de las harinas y concentrados, para corroborar que las bandas de proteína sean las mismas, es decir, se pretende descartar posibles pérdidas de alguna fracción de proteína durante la obtención de los concentrados respectivos, ya que sería lamentable la pérdida de fracciones con poder antihipertensivo.

### **VII.3 Hidrólisis enzimática a partir de concentrados proteínicos**

#### **VII.3.1 Sistema con Alcalasa 2.4 L.**

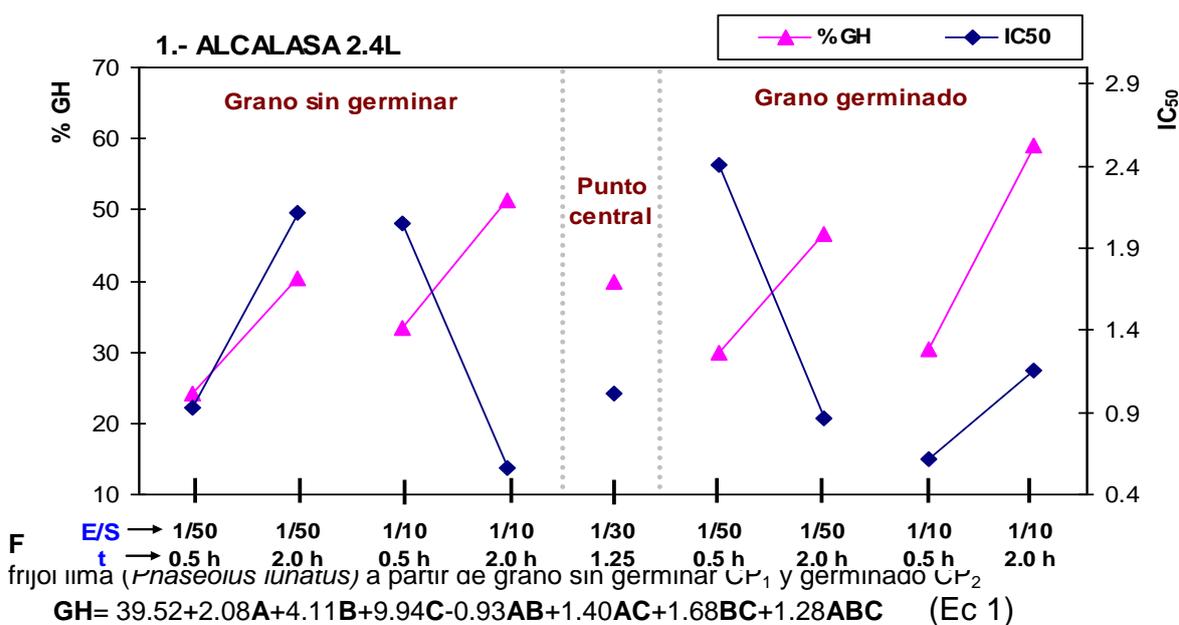
La hidrólisis con la endoproteasa alcalasa tuvo mayores GH tanto para CP<sub>1</sub> como para CP<sub>2</sub>, donde el mayor GH se obtuvo con CP<sub>2</sub> (58.94%) (Cuadro 13, Figura 6). La mayor actividad de esta enzima sobre CP<sub>2</sub> pudo deberse a la eliminación parcial de lípidos y carbohidratos durante la etapa de germinación; otra posibilidad que pudo ocurrir fue que, después de la desnaturalización con ácido-álcali para obtener ambos concentrados proteínicos, CP<sub>2</sub> haya tenido una mejor orientación estereoquímica o molecular facilitando la interacción enzima-sustrato. Por otra parte, como resultado de la germinación, se incrementaron los niveles de algunos residuos de aminoácidos (Ala, Met, Fen) (Cuadro 11), donde la alcalasa tiene una mejor especificidad (Doucet y col., 2003).

El análisis de varianza indicó que todos los factores principales (fuente de CP, relación E/S y tiempo de hidrólisis), así como también las interacciones dobles (fuente de CP-relación E/S, fuente de CP-tiempo de hidrólisis, relación E/S-tiempo de hidrólisis) y la triple interacción (fuente de CP-relación E/S-tiempo de hidrólisis) tuvieron efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el GH (Figura 7, Ecuación Ec 1); el análisis de regresión para esta primera variable dio por resultado una ecuación polinomial de primer orden:

**Cuadro 13.** Grados de hidrólisis (GHs) e inhibición de ECA-I (IC<sub>50</sub>) en los hidrolizados con alcalasa 2.4L, a partir de concentrados proteínicos de a) grano sin germinar (PC<sub>1</sub>) y b) germinado (PC<sub>2</sub>) de *P. lunatus*

Treatment	Factor A Fuente de CP	Factor B Relación E/S	Factor C Tiempo de hidrólisis (h)	GH (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
1	CP <sub>1</sub>	1/50	0.5	24.12 <sup>a</sup>	0.94 <sup>d</sup>
2	CP <sub>2</sub>	1/50	0.5	29.91 <sup>b</sup>	2.40 <sup>i</sup>
3	CP <sub>1</sub>	1/10	0.5	33.40 <sup>d</sup>	2.05 <sup>g</sup>
4	CP <sub>2</sub>	1/10	0.5	30.34 <sup>c</sup>	<b>0.61<sup>b</sup></b>
5	CP <sub>1</sub>	1/50	2.0	40.39 <sup>f</sup>	2.11 <sup>h</sup>
6	CP <sub>2</sub>	1/50	2.0	46.67 <sup>g</sup>	0.87 <sup>c</sup>
7	CP <sub>1</sub>	1/10	2.0	51.28 <sup>h</sup>	<b>0.56<sup>a</sup></b>
8	CP <sub>2</sub>	1/10	2.0	58.94 <sup>i</sup>	1.16 <sup>f</sup>
9A	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	1.25	39.56 <sup>e</sup>	1.00 <sup>e</sup>
9B	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	1.25	40.07 <sup>e</sup>	1.02 <sup>e</sup>
9C	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	1.25	39.76 <sup>e</sup>	1.01 <sup>e</sup>
9D	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	1.25	39.77 <sup>e</sup>	1.02 <sup>e</sup>

<sup>a-i</sup> letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05)



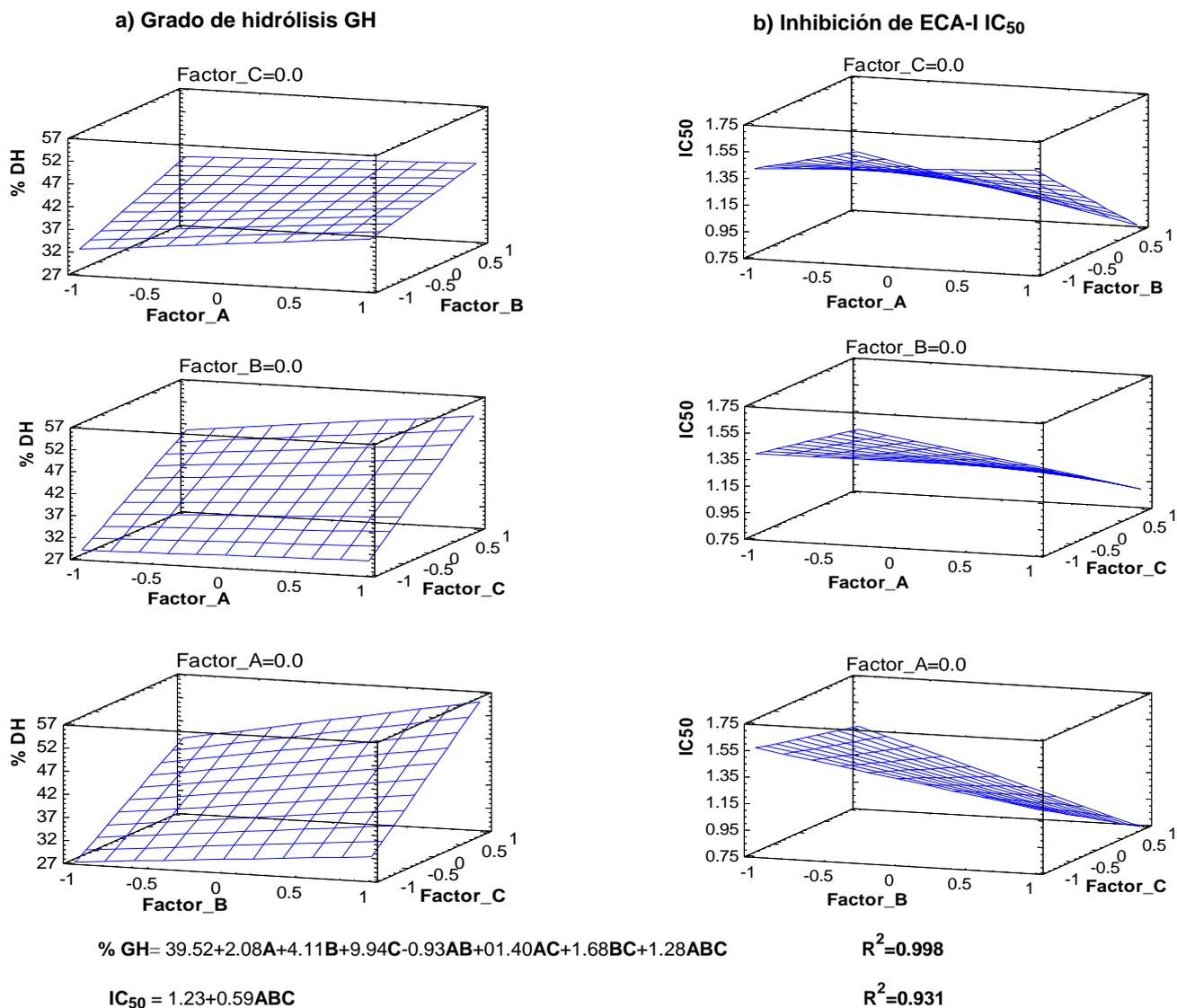
de

donde A es la fuente de CP, B la relación E/S, C el tiempo de hidrólisis, AB es la interacción doble: fuente de CP-relación E/S, AC la interacción doble: fuente de CP-tiempo de hidrólisis, BC la interacción doble relación E/S-tiempo de hidrólisis y ABC es la triple interacción fuente de CP-relación E/S-tiempo de hidrólisis. Así, este modelo matemático permitió establecer el GH en función de los factores principales y de las interacciones, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.998. El modelo reveló que la razón E/S (B) y el tiempo de hidrólisis (C) tuvieron el mayor efecto positivo en el GH ( $p < 0.05$ ) con coeficientes de 4.11 y 9.94 respectivamente.

Los valores de inhibición de ECA-I, en términos de  $IC_{50}$  oscilaron entre 0.56-2.40 mg/ml (Cuadro 13, figura 6), donde el mejor valor de inhibición (0.56 mg/ml) se obtuvo con concentrado proteínico a partir de grano sin germinar con una relación E/S=1/10 y 2 h de hidrólisis. En el análisis de varianza respectivo para esta segunda variable, solamente la triple interacción (fuente de CP-relación E/S-tiempo de hidrólisis) tuvo efecto significativo ( $p < 0.05$ ), por lo que la ecuación o modelo matemático obtenido, de primer orden también y con  $r^2=0.93$ , a partir de esta segunda variable en función de los factores evaluados y las interacciones, estableció la actividad inhibitoria en términos solamente de dicha interacción triple (Ec-2):

$$IC_{50} = 1.23 + 0.59ABC \quad (Ec-2)$$

De acuerdo a esta resolución estadística para la actividad inhibitoria de ECA-I, el primer tratamiento se podría escoger (CP1, E/S=1/50 y 0.5 h de hidrólisis) para la obtención de un hidrolizado con dicha actividad inhibitoria ( $IC_{50}=0.94$  mg/ml) (es el menos costoso), a pesar de no ser el hidrolizado con la mejor actividad inhibitoria ( $IC_{50}=0.56$  mg/ml). A efecto de optimizar la actividad inhibitoria de ECA-I en este estudio, con estos tres factores evaluados no son suficientes, se debería considerar e incluir más factores a evaluar.



**Figura 7.** Efecto de factores significativos en hidrólisis con alcalasa 2.4L de concentrados proteínicos a partir de granos sin germinar (CP<sub>1</sub>) y germinados (CP<sub>2</sub>) de *P. lunatus* en a) grado de hidrólisis GH y b) inhibición de ECA-I (IC<sub>50</sub>): Factor A, fuente de concentrado proteínicos (CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub>); Factor B: relación E/S; Factor C: tiempo de hidrólisis.

Así, en la optimización de la actividad inhibitoria a partir de hidrolizados de arroz con tripsina, He y col. (2005) evaluaron cinco factores (pH, temperatura, relación E/S (B), relación agua/sólido de arroz y tiempo de hidrólisis (C)). Ellos hallaron que el pH y la relación agua/sólidos de arroz fueron los factores con efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la actividad inhibitoria de ECA-I, mientras que los demás factores, incluyendo B y C, no tuvieron efecto significativo alguno ( $p > 0.05$ ).

A 0.5 h de hidrólisis y E/S: 1/50 (Cuadro 13, Figura 6), la actividad de la alcalasa fue más alta con CP<sub>2</sub> (GH=29.91%), en tanto que la mayor actividad inhibitoria de ECA-I se obtuvo con CP<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub>=0.94 mg/ml). Sin embargo, al incrementar E/S hasta 1/10 el resultado fue inverso, ya que la actividad de la alcalasa fue mejor con CP<sub>1</sub> (GH=33.40%) y la mayor actividad inhibitoria se obtuvo con CP<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>=0.61 mg/ml), lo que hace suponer que a 1/50 de relación E/S, la enzima fue limitante en la reacción de hidrólisis en un tiempo de 0.5 h.

Cuando se incrementó el tiempo de hidrólisis hasta 2 h (Cuadro 13, Figura 6), con CP<sub>2</sub> se obtuvo el mayor grado de hidrólisis en ambos niveles de E/S (1/50: GH=46.67%; 1/10: GH=58.94%); en contraste, la actividad inhibitoria de ECA-I fue independiente de la fuente de CP y de la relación E/S, donde los mayores resultados de inhibición se lograron con CP<sub>1</sub> a E/S:1/10 (IC<sub>50</sub>= 0.56 mg/ml) y con CP<sub>2</sub> a E/S=1/60 (IC<sub>50</sub>=0.87 mg/ml); dado que el modelo matemático para esta segunda variable mostró que ésta es función solamente de la triple interacción ABC, es recomendable escoger al tratamiento 7 (CP<sub>1</sub>, E/S:1/10 y 2 h) que tuvo la mejor actividad inhibitoria de ECA-I (IC<sub>50</sub>: 0.56 mg/ml) de todos los tratamientos efectuados.

En este experimento también fue notorio que, en los tratamientos 2 (CP<sub>2</sub>,E/S=1/50) y 3 (CP<sub>1</sub>,E/S=1/10), la actividad antihipertensiva mejoró conforme se incrementó el tiempo de hidrólisis (2.40-0.87 y 2.05-0.56 mg/mL respectivamente), es decir que a mayor tiempo de hidrólisis, se generaron péptidos con mayor poder de inhibición de ECA-I (Cuadro 7, Figura 4); en los tratamientos restantes 1 (CP<sub>1</sub>,E/S=1/50) y 4 (CP<sub>2</sub>, E/S=1/10) la actividad inhibitoria disminuyó al incrementarse el tiempo de hidrólisis (0.94-2.11 y 0.61-1.16 mg/mL, respectivamente). Esto pudo deberse a que algunos péptidos con actividad inhibitoria de ECA-I generados en 0.5 h, fueron hidrolizados posteriormente al incrementarse éste hasta 2 h; este comportamiento se ha reportado en hidrolizados proteicos obtenidos a partir de semillas de girasol (Megías y col., 2004), de garbanzo (Yust y col., 2003) y en proteínas de pescado (Byun y Kim, 2001). En el tratamiento central se obtuvo un DH promedio de 39.81% y una

IC<sub>50</sub> promedio de 1.01 mg/ml, por lo que resulta inconveniente realizar la mezcla PC1-PC2, dado que no se obtuvo un mejor valor de inhibición de ACE-I.

En resumen, los mejores valores de inhibición de ACE-I (IC<sub>50</sub>: 0.56-2.11 mg/mL) fueron obtenidos con CP<sub>1</sub>, no obstante que se obtuvieron mejores GHs con CP<sub>2</sub>. Los valores de GH e inhibición de la ECA-I fueron muy similares a los resultados hallados en la hidrólisis de otras proteínas con alcalasa: a partir de proteína del pez (Alaska pollack) con IC<sub>50</sub>=0.629 mg/mL obtenido a 6 h de hidrólisis (Byun y Kim, 2001), en hidrolizado a partir de aislado proteínico de garbanzo (IC<sub>50</sub>=0.19 mg/mL, GH=18%) obtenido a 0.5 h de hidrólisis (Pedroche y col., 2002), en legumina de garbanzo IC<sub>50</sub>=0.180 mg/mL, GH=27%) al mismo tiempo de hidrólisis (0.5 h) (Yust y col., 2003) y a partir de frijol mungo (IC<sub>50</sub>=0.640 mg/mL, GH=17%) at 2 h of hydrolysis time (Li y col., 2005).

Se efectuó el perfil de aminoácidos en los hidrolizados más promisorios, que fueron el hidrolizado obtenido del tratamiento 4 (H4): CP<sub>2</sub>, E/S:1/10, 0.5 h de hidrólisis y el hidrolizado obtenido del tratamiento 7 (H7): CP<sub>1</sub>, E/S:1/10, 2 h. De estos perfiles (Cuadro 14), se observó incrementos en los residuos de aminácidos hidrofóbicos; así, este incremento fue de 5.97% en H4 (33.34-35.33 mg/100 mg de proteína) y de 7.33% en H7 (34.10-36.60); este incremento fue acorde con la literatura, ya que alcalasa se caracteriza, entre otras particularidades, de generar péptidos con carácter hidrofóbico (Megías y col., 2004). También se observaron notables cambios en las concentraciones de algunos residuos de aminoácidos; así, los residuos de fenilalanina, metionina, arginina, lisina y valina se vieron incrementados en los hidrolizados a partir de los concentrados proteínicos correspondientes; fenilalanina se incrementó 898.5% en H4(0.65-6.49 mg/100 mg de proteína) y 1140.4% en H7(0.52-6.45); metionina, 286% en H4 (0.50-1.93) y 408.6% en H7 (0.35-1.78); arginina, 40.6% en H4 (5.02-7.06) y 19.2% en H7 (4.96-5.91); lisina tuvo un incremento de 30% en H4 (5.94-7.72) y de 34.1% en H7 (5.99-8.03); valina, 11.7% en H4 (4.88-5.45) y 21.1% en H7 (4.79-5.80);

**Cuadro 14.** Composición de aminoácidos en los hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H4 y H7), obtenidos con alcalasa 2.4L. Comparativo con CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub>

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)			
	CP <sub>1</sub>	H7	CP <sub>2</sub>	H4
		(IC <sub>50</sub> : 0.56 mg/ml)		(IC <sub>50</sub> : 0.61 mg/ml)
Asx <sup>1</sup>	<b>12.80</b>	<b>8.63</b>	<b>12.47</b>	<b>9.24</b>
Glx <sup>2</sup>	15.30	14.46	16.10	13.08
Ser	7.39	7.68	7.26	8.15
His	3.24	3.93	3.17	3.95
Gli	4.67	4.98	4.84	4.87
Tre	4.40	4.97	4.41	5.02
Arg	<b>4.96</b>	<b>5.91</b>	<b>5.02</b>	<b>7.06</b>
Ala	6.08	6.14	6.19	5.85
Pro	<b>7.62</b>	<b>1.33</b>	<b>7.68</b>	<b>0.87</b>
Tir	3.54	4.11	3.09	4.76
Val	4.79	5.80	4.88	5.45
Met	<b>0.35</b>	<b>1.78</b>	<b>0.50</b>	<b>1.93</b>
Cis	<b>3.87</b>	<b>0.75</b>	<b>3.90</b>	<b>0.82</b>
Ile	4.30	4.67	4.11	4.52
Leu	9.19	9.76	9.01	9.58
Fen	<b>0.52</b>	<b>6.45</b>	<b>0.65</b>	<b>6.49</b>
Lis	<b>5.99</b>	<b>8.03</b>	<b>5.94</b>	<b>7.72</b>
Trp	0.98	0.65	0.79	0.63
<b>Distribución de aminoácidos</b>				
Hidrofóbicos	<b>34.10</b>	<b>36.60</b>	<b>33.34</b>	<b>35.33</b>
Neutros	20.90	22.50	21.06	23.62
Hidrofílicos	45.00	40.96	45.60	45.61

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

De estos cinco residuos de aminoácidos, fenilalanina, metionina y valina son hidrofóbicos y son comunes su hallazgo o presencia en la secuencia de péptidos con mayor poder de inhibición de ECA-I (Megías y col., 2004); arginina no es un aminoácido hidrofóbico, sin embargo existen evidencias en la literatura donde se le ha asociado su presencia en la disminución de la presión arterial (Fitzgerald y Meisel, 2000). En los residuos de aminoácidos prolina, cisteína y ácido aspártico+asparagina (Asx) se presentaron disminuciones notables; así prolina disminuyó 88.7% en H4 (7.68-0.87 mg/100 mg de proteína) y 82.5% en H7 (7.62-1.33); cisteína se redujo 78.97% en H4 (3.90-0.82) y 80.6% en H7 (3.87-0.75); Asx disminuyó 25.9% en H4 (12.47-9.24) y 32.6% en H7 (12.80-8.63). En el caso de prolina, era de esperarse su incremento por ser un residuo de aminoácido hidrofóbico donde su presencia ha sido documentada en aquellos péptidos con poder de inhibición de ECA-I en hidrolizados a partir de proteínas de la leche (Maeno y col., 1996; Pihlanto y col., 2000; Tauzin y col., 2002). Si se compara el perfil de aminoácidos entre los hidrolizados H4 y H7 se puede notar mayor presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos y de residuos de prolina en H7 (36.6% y 1.33%, respectivamente); sin embargo, H4 tuvo mayor contenido de arginina (7.06%). Entonces, era de esperarse que H7 tuviera mayor poder inhibitorio de ECA-I ( $IC_{50}$ :0.56 mg/ml).

### **VII.3.2. Sistema secuencial enzimático Pepsina-pancreatina**

En los hidrolizados obtenidos con este sistema enzimático, se obtuvieron GH menores que los obtenidos con la enzima alcalasa, ya que los valores oscilaron entre 15.35 y 37.07 % (Cuadro 15, Figura 6), lo que hace suponer una menor interacción de ambas enzimas hacia los dos sustratos evaluados; estas diferencias en los GH obtenidos pudo deberse al método empleado para las hidrólisis (tipo y concentración de enzima: 0.3 AU/ml en alcalasa, 4% p/v en pepsina y pancreatina) (Pedroche y col., 2002), a pesar de que las condiciones de hidrólisis para cada enzima fueron las óptimas (pH y temperatura) para sus actividades hidrolíticas; también pudo deberse a los niveles inferiores en el contenido de residuos de aminoácidos aromáticos y catiónicos en ambos sustratos (5.04 y 10.95% en CP1, respectivamente; 4.53 y

10.96% en CP<sub>2</sub>, respectivamente) donde estas enzimas tienen una mejor especificidad (Cuadro 11). (Oka and Morihara, 1970; Adamson y Reynolds, 1995).

Los resultados de inhibición fueron mejores (IC<sub>50</sub> entre 0.25 y 0.69 mg/mL), siendo notables los valores de inhibición obtenidos a partir de CP<sub>2</sub>, ya que fueron los mejores en casi todos tratamientos obtenidos a partir de este sistema secuencial (0.28-0.53 mg/mL). De nuevo, el GH se incrementó a mayor tiempo de hidrólisis tanto para CP<sub>1</sub> como para CP<sub>2</sub>, mientras que la actividad antihipertensiva fue independiente de dicho tiempo.

En este segundo experimento de hidrólisis, el análisis de varianza mostró que para la primera variable evaluada (GH), la relación E/S, el tiempo de hidrólisis, la interacción doble fuente de CP-relación E/S y la interacción triple (fuente de CP-relación E/S-tiempo de hidrólisis) presentaron efecto significativo  $p < 0.05$ . Así mismo, un análisis de regresión dio por resultado una tercera ecuación polinomial matemática de primer orden, donde se pudo establecer el GH como una función de los factores evaluados y de las interacciones (Ec-3, Figura 9).

$$\% \text{ DH} = 29.48 + 3.88\text{B} + 3.86\text{C} - 2.27\text{AB} + 2.27\text{ABC} \quad \text{R}^2 = 0.98 \quad (\text{Ec-3})$$

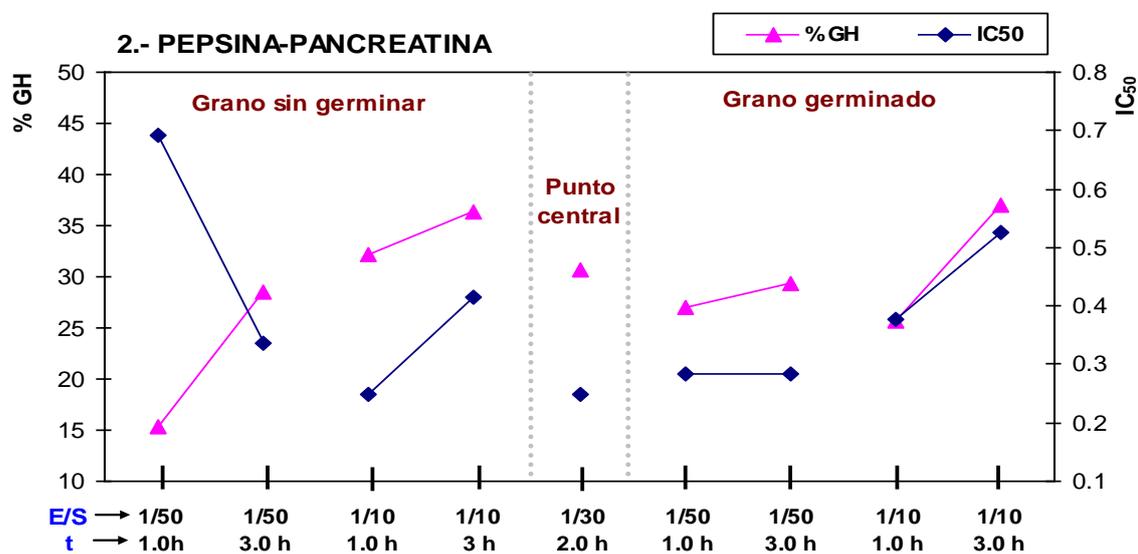
Así, el modelo relaciona y predice el GH como una función de la relación E/S (B), del tiempo de hidrólisis (C), de la interacción doble fuente de CP-relación E/S (AB) y de la interacción triple fuente de CP-relación E/S-tiempo de hidrólisis (ABC), con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.98$ . En este modelo, es claro observar que la relación E/S (B) y el tiempo de hidrólisis (C) son los que tuvieron los mayores efectos significativos ( $p < 0.05$ ) sobre GH (coeficientes 3.88 y 3.86, respectivamente).

En relación a la actividad inhibitoria, ninguno de los factores ni las interacciones tuvieron efecto significativo ( $p > 0.05$ ); en otras palabras, todos los tratamientos con pepsina-pancreatina tuvieron actividad inhibitoria sin diferencia estadística.

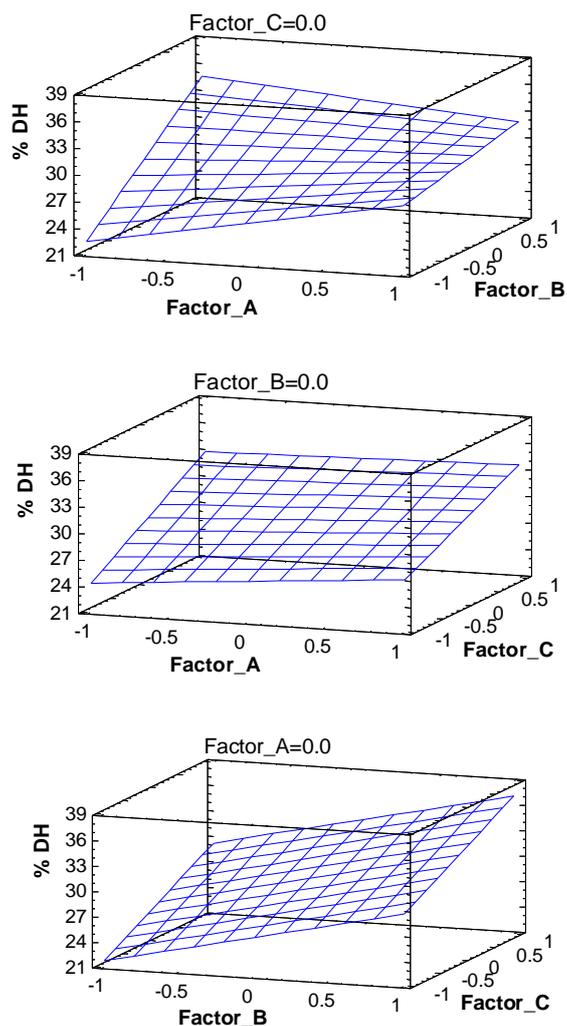
**Cuadro 15.** Grados de hidrólisis e inhibición de ECA-I obtenidos en los hidrolizados a partir de los concentrados de frijol lima, empleando el sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina

Treatment	Factor A Fuente de CP	Factor B Relación E/S	Factor C Tiempo de hidrólisis (h)	GH (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
10	CP <sub>1</sub>	1/50	1.0	15.35 <sup>a</sup>	0.69
11	CP <sub>2</sub>	1/50	1.0	27.04 <sup>c</sup>	0.29
12	CP <sub>1</sub>	1/10	1.0	32.16 <sup>g</sup>	<b>0.25</b>
13	CP <sub>2</sub>	1/10	1.0	25.68 <sup>b</sup>	0.38
14	CP <sub>1</sub>	1/50	3.0	28.49 <sup>d</sup>	0.34
15	CP <sub>2</sub>	1/50	3.0	29.28 <sup>e</sup>	<b>0.28</b>
16	CP <sub>1</sub>	1/10	3.0	36.28 <sup>h</sup>	0.42
17	CP <sub>2</sub>	1/10	3.0	37.07 <sup>i</sup>	0.53
18A	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	2.0	29.89 <sup>f</sup>	0.25
18B	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	2.0	30.84 <sup>f</sup>	0.26
18C	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	2.0	31.04 <sup>f</sup>	0.25
18D	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub> (50/50 p/p)	1/30	2.0	30.59 <sup>f</sup>	0.26

<sup>a-i</sup> letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05)



**Figura 8.** Grados de hidrólisis obtenidos con el sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina sobre concentrados de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) a partir de grano sin germinar CP<sub>1</sub> y germinado CP<sub>2</sub>



$$\% \text{ GH} = 29.48 + 3.88\text{B} + 3.86\text{C} - 2.27\text{AB} + 2.27\text{ABC}$$

$$R^2 = 0.98$$

**Figura 9.** Efecto de factores significativos en hidrólisis pepsina-pancreática de concentrados proteínicos a partir de granos sin germinar (CP<sub>1</sub>) y germinados (CP<sub>2</sub>) de *P. lunatus* en a) grado de hidrólisis GH y b) inhibición de ECA-I (IC<sub>50</sub>): Factor A, fuente de concentrado proteínico; Factor B: relación E/S; Factor C: tiempo de hidrólisis.

Para el primer tiempo de hidrólisis evaluado (1 h), con E/S=1/50 la especificidad del sistema pepsina-pancreática fue más notoria con CP<sub>2</sub> (GH=27.04%), así como también la inhibición de ECA-I (IC<sub>50</sub>=0.29 mg/m) (Figura 6). Sin embargo, al incrementar la concentración de ambas enzimas en la hidrólisis (E/S=1/10), se mejora la interacción E-S (GH=32.16 %) y la inhibición de ECA-I con CP<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub>=0.25 mg/mL), lo cual indica que ambas enzimas son limitantes con el CP<sub>1</sub> a E/S=1/50. Fue

notorio también que, a mayor concentración de las enzimas ( $E/S=1/10$ ) el sustrato fue limitante para  $CP_2$ , ya que disminuyó tanto el GH (27.04-25.68) como la actividad inhibitoria de ECA-I (0.29-0.38).

Al incrementar el tiempo de hidrólisis (3 h), a una concentración de  $E/S=1/10$ , nuevamente la interacción E-S y la actividad inhibitoria de ECA-I fueron mayores con  $CP_2$  ( $DH=29.28\%$ ,  $IC_{50}=0.28$  mg/ml) y a una mayor concentración enzimática ( $E/S=1/10$ ), la mayor interacción E-S continuó con  $CP_2$  ( $DH=37.1\%$ ), pero la actividad inhibitoria fue más notable con el concentrado  $CP_1$  ( $IC_{50}=0.42$ ); no obstante, el mejor valor de inhibición de este segundo experimento se logró con el menor tiempo de hidrólisis (1 h) y con  $CP_1$  ( $IC_{50}=0.25$  mg/ml); por lo tanto, de acuerdo al modelo matemático para la inhibición de ECA-I obtenido por regresión lineal se debería escoger las condiciones del tratamiento 12 para obtener el mejor valor de inhibición de ECA-I ( $PC_1$  a  $1/10$  y 1 h de hidrólisis). En este experimento también fue notorio además, que solamente en el tratamientos con  $CP_1$  a  $E/S=1/50$ , la actividad inhibitoria de ECA-I mejoró conforme se incrementó el tiempo de hidrólisis (0.69-0.25 mg/ml), lo cual indica que se generaron péptidos con mayor poder de inhibición de ECA-I (Figura 6); en los demás tratamientos, con excepción de  $CP_2$  a  $E/S=150$  con actividad inhibitoria sin cambios (0.29-0.28 mg/ml), dicha actividad disminuyó al incrementarse el tiempo de hidrólisis, posiblemente porque algunos péptidos con actividad inhibitoria de la ACE-I generados en un tiempo de 0.5 h, fueron hidrolizados posteriormente.

De manera similar con los hidrolizados con alcalasa, todos los hidrolizados incrementaron GH conforme se aumentó el tiempo de hidrólisis, aunque los mayores grados de hidrólisis no correspondieron a los mejores valores de actividad antihipertensiva. Esto concuerda con el trabajo de Mejías y col. (2004), en el cual los mejores porcentajes de inhibición en hidrolizados de girasol con pepsina-pancreatina (entre 45 y 50 %), se obtuvieron a GH entre 10 y 22 %, no obstante que se obtuvieron mejores valores de GH (30-45 %).

En el perfil de aminoácidos en los hidrolizados más promisorios, que fueron el hidrolizado obtenido del tratamiento 12 (H12): CP<sub>2</sub>, E/S: 1/10, 1 h de hidrólisis y el hidrolizado obtenido del tratamiento 15 (H15): CP<sub>1</sub>, E/S: 1/50, 3 h. De estos perfiles (Cuadro 16), el incremento en los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se observó solamente en H15 con 9.10% (33.34-36.36 mg/100 mg de proteína); en H12 se tuvo una ligera disminución (2.7%) en la concentración de estos residuos de aminoácidos (34.10-33.17). A diferencia con la alcalasa, pepsina y pancreatina no se caracterizan de generar péptidos con carácter hidrofóbico.

Se observaron notables cambios en las concentraciones de algunos residuos de aminoácidos; así, los residuos de fenilalanina, metionina, lisina y arginina se vieron incrementados en los hidrolizados a partir de los concentrados proteínicos correspondientes; fenilalanina se incrementó 1057.7% en H12(0.52-6.02 mg/100 mg de proteína) y 936.92% en H15(0.65-6.74); metionina, 200% en H12 (0.35-1.05) y 228% en H15 (0.50-1.64); lisina, 27.21% en H12(5.99-7.62) y 31.31% en H15 (5.94-7.80); arginina, 22.98% en H12 (4.96-6.10) y 28.3% en H15 (5.02-6.44); al igual que con los hidrolizados más promisorios obtenidos con alcalasa (H4 y H7), fenilalanina y metionina, residuos de aminoácidos hidrofóbicos, se vieron incrementados notablemente, contribuyendo a la capacidad de inhibición de ECA-I (Megías y col., 2004;); la presencia aumentada de arginina también contribuyó a dicha capacidad de inhibición. Hubo disminución de niveles en los residuos de aminoácidos prolina, cisteína en ambos hidrolizados y notable disminución de ácido aspártico+asparagina (Asx) solamente en el hidrolizado H15. Así, prolina disminuyó 70.47% en H12 (7.62-2.25 mg/100 mg de proteína) y 86.98% en H15 (7.68-1.00), cisteína en 81.40% en H12 (3.87-0.72) y 77.18% en H15 (3.90-0.89); Asx disminuyó 41.1 % en H15 (12.42-7.32).

A pesar de que H15 tuvo el mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, de fenilalanina, metionina y arginina, la capacidad inhibitoria de ECA-I fue mayor en H12(IC<sub>50</sub>: 0.25 mg/ml); al parecer, la mayor presencia de residuos de prolina en H12 (2.25 mg/100 mg de proteína) contribuyó con este resultado de inhibición (el contenido de prolina en H15 fue 1.00 mg/100 mg de proteína).

**Cuadro16.** Composición de aminoácidos en los hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H12 y H15), obtenidos con pepsina-pancreatina. Comparativo con CP<sub>1</sub> y CP<sub>2</sub>

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)			
	CP <sub>1</sub>	H12 (IC <sub>50</sub> : 0.250 mg/ml)	CP <sub>2</sub>	H15 (IC <sub>50</sub> : 0.280 mg/ml)
Asx <sup>1</sup>	12.80	12.82	<b>12.47</b>	<b>7.32</b>
Glx <sup>2</sup>	15.30	15.41	16.10	14.37
Ser	7.39	7.50	7.26	8.12
His	3.24	3.13	3.17	3.81
Gli	4.67	4.90	4.84	5.13
Tre	4.40	4.59	4.41	5.14
Arg	<b>4.96</b>	<b>6.10</b>	<b>5.02</b>	<b>6.44</b>
Ala	6.08	5.26	6.19	5.94
Pro	<b>7.62</b>	<b>2.25</b>	<b>7.68</b>	<b>1.00</b>
Tir	3.54	4.04	3.09	4.63
Val	4.79	4.93	4.88	5.75
Met	<b>0.35</b>	<b>1.05</b>	<b>0.50</b>	<b>1.64</b>
Cis	<b>3.87</b>	<b>0.72</b>	<b>3.90</b>	<b>0.89</b>
Ile	4.30	4.11	4.11	4.75
Leu	9.19	8.82	9.01	9.91
Fen	<b>0.52</b>	<b>6.02</b>	<b>0.65</b>	<b>6.74</b>
Lis	<b>5.99</b>	<b>7.62</b>	<b>5.94</b>	<b>7.80</b>
Trp	0.98	0.74	0.79	0.64
<b>Distribución de aminoácidos</b>				
Hidrofóbicos	34.10	33.17	33.34	36.36
Neutros	20.90	21.75	21.06	23.91
Hidrofílicos	45.00	45.08	45.60	39.74

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

Residuos de prolina es muy común en la secuencia de aminoácidos en péptidos con poder de inhibición de ECA-I, sobre todo los obtenidos a partir de las proteínas de la leche (Maeno y col., 1996; Pihlanto y col., 2000; Tazuin y col., 2002).

Efectuando una comparación entre los cuatro hidrolizados más promisorios por fuente de CP: H7 y H12 a partir de CP<sub>1</sub>, H4 y H15 a partir de CP<sub>2</sub> (Cuadro 17), se pudo notar que los hidrolizados obtenidos a partir de grano sin germinar (H7 y H12) tuvieron mejores actividades de inhibición de ECA-I (IC<sub>50</sub>: 0.56 y 0.25 mg/ml, respectivamente). En el perfil de aminoácidos fue notorio el mayor contenido de prolina en ambos hidrolizados (1.33 y 2.25 mg/100 mg de proteína, respectivamente), lo que hace suponer que este aminoácido sea el responsable de estos mejores resultados, no obstante que el contenido de metionina fue mayor en los otros dos hidrolizados promisorios (1.93 mg/100 mg de proteína en H4 y 1.64 mg/100 mg de proteína en H15). Los péptidos a partir de las proteínas de la leche con actividad inhibitoria de ECA-I se han caracterizado por tener este residuo de aminoácido de manera repetida en sus secuencias (Maeno y col., 1996; Pihlanto y col., 2000; Tazuin y col., 2002).

En general, todos los hidrolizados obtenidos a partir de los concentrados proteínico y con las tres enzimas estudiadas presentaron actividad inhibitoria de ECA-I (0.25-2.40 mg/ml). Los hidrolizados con mayor actividad de inhibición fueron obtenidos con pepsina-pancreatina. Además, los mejores valores de inhibición se obtuvieron con CP<sub>1</sub>, aunque los valores obtenidos con los granos germinados no dejan de ser menos importantes. En los tratamientos de hidrólisis estudiados, no se halló una correlación directa entre el GH y los valores de IC<sub>50</sub>. En esta investigación se ha visto, por ejemplo, que el mejor valor de IC<sub>50</sub> (0.25 mg/ml) se obtuvo a un GH de 32.16 %, en tanto que el valor de IC<sub>50</sub> para el mayor GH (58.94 %), no fue precisamente el mejor (1.159 mg/ml), lo cual indica que se produjo mayor cantidad de péptidos a 43 % de GH, pero desafortunadamente no se produjeron aquellos que tienen mejor especificidad sobre la ECA-I.

**Cuadro17.** Composición de aminoácidos en los cuatro hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva (H7 y H12 a partir de CP<sub>1</sub>; H4 y H15 a partir de CP<sub>2</sub>).

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)			
	H7 (IC <sub>50</sub> : 0.56 mg/ml)	H12 (IC <sub>50</sub> : 0.250 mg/ml)	H4 (IC <sub>50</sub> : 0.61 mg/ml)	H15 (IC <sub>50</sub> : 0.280 mg/ml)
Asx <sup>1</sup>	<b>8.63</b>	12.82	<b>9.24</b>	7.32
Glx <sup>2</sup>	14.46	15.41	13.08	14.37
Ser	7.68	7.50	8.15	8.12
His	3.93	3.13	3.95	3.81
Gli	4.98	4.90	4.87	5.13
Tre	4.97	4.59	5.02	5.14
Arg	5.91	6.10	7.06	6.44
Ala	6.14	5.26	5.85	5.94
<b>Pro</b>	<b>1.33</b>	<b>2.25</b>	0.87	1.00
Tir	4.11	4.04	4.76	4.63
Val	5.80	4.93	5.45	5.75
Met	<b>1.78</b>	<b>1.05</b>	<b>1.93</b>	<b>1.64</b>
Cis	<b>0.75</b>	0.72	<b>0.82</b>	0.89
Ile	4.67	4.11	4.52	4.75
Leu	9.76	8.82	9.58	9.91
Fen	<b>6.45</b>	<b>6.02</b>	<b>6.49</b>	<b>6.74</b>
Lis	<b>8.03</b>	7.62	<b>7.72</b>	7.80
Trp	0.65	0.74	0.63	0.64
<b>Distribución de aminoácidos</b>				
Hidrofóbicos	36.60	33.17	35.33	36.36
Neutros	22.50	21.75	23.62	23.91
Hidrofílicos	40.96	45.08	45.61	39.74

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

Los valores de inhibición hallados en estos dos experimentos se pueden comparar con otros valores de inhibición hallados en hidrolizados a partir de

proteínas de otras fuentes vegetales (Cuadro 18). Así, Hettiarachchy y Kalapathy (1997), obtuvieron un grado de hidrólisis de 11 % a 1 h de hidrólisis y de 17% a 3 h, en el hidrolizado de concentrado proteico de soya, empleando la enzima pancreatina extraída de páncreas porcino. Megías y col. (2004) obtuvieron un GH de 38 % con este mismo sistema secuencial (pepsina-pancreatina) después de 6 h de hidrólisis total (3 h para la pepsina y 3 h para la pancreatina), empleando proteína extraída de semillas de girasol; emplearon una concentración de proteína de 10 % p/v en la suspensión y una relación enzima/sustrato (E/S) de 1/20 y obtuvieron una IC<sub>50</sub> de 0.0024 mg/ml. Neves y col. (2004), obtuvieron grados de hidrólisis entre 8.1 y 33.3 % al emplear diferentes tratamientos enzimáticos a base de una sola enzima: pepsina, pero extraída de diferentes fuentes (de páncreas porcino, de *Aspergillus oryzae*, de *Streptomyces griseus*) y de sistemas secuenciales de enzimas en donde la primera enzima fue la pepsina con un tiempo de 3 h seguido de otra enzima (Bromelina, Quimiotripsina) con un tiempo de acción de 2 h. El sustrato empleado fue una mezcla de proteínas de productos marinos: María Luisa (*Paralanchurus brasiliensis*), Pierna de Moca (*Cynoscion sp*) y Camarón rosa (*Penaeus brasiliensis* y *Penaeus pauliensis*); la relación (E/S) fue 1/100. El mayor grado de hidrólisis (33.3 %), se obtuvo con la pepsina extraída de *Streptomyces griseus*. En el gluten de maíz, se han obtenido valores de IC<sub>50</sub> entre 0.160 y 250 mg/ml, empleando enzimas por separado (flavourzyme y proteasa A) después de 4 h de hidrólisis (Kim y col., 2004). En tanto que Li col. (2005) obtuvieron una IC<sub>50</sub> de 0.64 mg/ml con un hidrolizado de frijol mungo, leguminosa de gran consumo en China, empleando alcalasa en un tiempo de 2 h; el GH respectivo fue de 18 %; este grupo de investigación también realizó hidrolizados del mismo material con la enzima neutrasa, pero obtuvieron menores grados de hidrólisis y muy poca actividad de inhibición, por lo que se concentraron en los tratamientos con alcalasa para la posterior purificación de péptidos y secuenciación de los mismos.

**Cuadro 18** Tratamientos con los mejores valores de actividad antihipertensiva, en comparación con otros hidrolizados de diferentes investigadores.

Tratamiento	Material como sustrato	Enzima (s) Empleada (s)	Tiempo de Hidrólisis (h)	Grado	Actividad
				De Hidrólisis (%)	Inhibitoria ECA-1 IC <sub>50</sub> (mg/ml)
4	CP <sub>2</sub>	Alcalasa	0.5	24.9 <sup>e</sup>	0.61 <sup>d</sup>
6	CP <sub>2</sub>	Alcalasa	2.0	23.7 <sup>d</sup>	0.887 <sup>e</sup>
7	CP <sub>1</sub>	Alcalasa	2.0	33.5 <sup>f</sup>	0.56 <sup>c</sup>
11	CP <sub>2</sub>	Pep-pancreatina	1.0	15.6 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>
12	CP <sub>1</sub>	Pep-pancreatina	1.0	17.7 <sup>c</sup>	0.25 <sup>a</sup>
15	CP <sub>2</sub>	Pep-pancreatina	3.0	16.9 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>
18	CP <sub>1</sub> -CP <sub>2</sub>	Pep-pancreatina	2.0	17.2 <sup>c</sup>	0.25 <sup>a</sup>
----	Frijol mungo <sup>1</sup>	Alcalasa	2.0	18.0	0.64
----	Chícharo <sup>2</sup>	Alc-flavourzyme	1.0	30.0	0.19
----	Gluten de maíz <sup>3</sup>	Flavourzyme	4.0	NR	0.16
----	Gluten de maíz <sup>3</sup>	Proteasa A	4.0	NR	0.25
----	Alfalfa <sup>4</sup>	Delvolasa	8.0	NR	0.009
----	Girasol <sup>5</sup>	Pep-pancreatina	6.0	30.0	0.0024
----	Legumina chícharo <sup>6</sup>	Alcalasa	0.50	27	0.18
----	Colza <sup>7</sup>	Pep-pancreatina	10		0.70

<sup>a-i</sup> letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05)

<sup>1</sup> Li y col. (2005)

<sup>2</sup> Pedroche y col. (2002)

<sup>3</sup> Yust y col. (2003)

<sup>3</sup> Kim y col. (2004)

<sup>4</sup> Kapel y col. (2006)

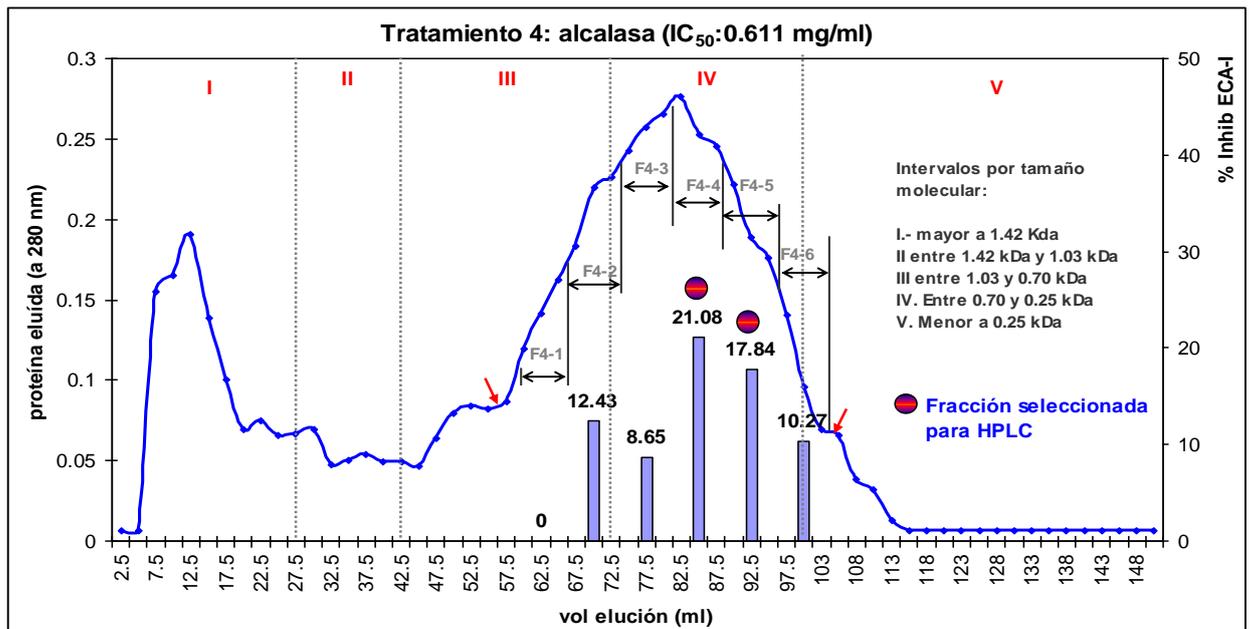
<sup>5</sup> Megías y col. (2004)

<sup>7</sup> Marczak y col. (2003)

## **VII.4. Purificación de péptidos inhibidores de ECA-I por cromatografía de filtración en gel a partir de hidrolizados más promisorios**

### **VII.4.1. Fraccionamiento de hidrolizados promisorios con alcalasa**

Como se ha visto con anterioridad (Cuadro 12) los tratamientos con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I, fueron H4 (CP a partir de grano germinado, E/S=1/10, 0.50 h de hidrólisis, GH=24.9 % e  $IC_{50}$ =0.61 mg/ml) y H7 (CP a partir de grano sin germinar, E/S=1/10, 2h de hidrólisis, GH=33.5 % e  $IC_{50}$ =0.56 mg/ml). Al efectuar la separación por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, se obtuvieron cromatogramas típicos que corresponden a separaciones de hidrolizados proteínicos constituidos por un pull de péptidos, en los cuales primero eluyeron los de mayor tamaño molecular y al final del proceso de separación eluyeron los de menor tamaño. Tomando en consideración que los péptidos inhibidores de la ECA-I que se han reportado en la literatura (Li y col., 2004) están constituidos entre 2 y 7 residuos de aminoácidos, se decidió delimitar estas posiciones en el cromatograma (flechas rojas de cada perfil de elución, Figura 10), correspondiendo a volúmenes de elución entre 57 y 104 ml y con pesos moleculares entre 1.42 y 0.25 kDa. Así, fueron obtenidas 6 fracciones en cada perfil de elución y se les determinó la actividad inhibitoria de la ECA-I, empleando 5  $\mu$ g de proteína en dicho análisis. En el perfil de elución de H4 (Figura 7), se pudieron obtener 5 fracciones con actividad inhibitoria de la ECA-I, con porcentajes de inhibición entre 8.65 y 21.08 %. Fue notoria la presencia de un pico al inicio de la separación P4 y que corresponde a péptidos de tamaño molecular mayor a 1.42 kDa y este pico se halló en todas las separaciones de los hidrolizados con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I. En el tratamiento H4, se seleccionaron las dos fracciones con mayor poder antihipertensivo: F4-4 con 21.08% de inhibición de la actividad de ECA-I y F4-5, con 17.84%, con pesos moleculares comprendidos entre 0.70 y 0.25 kDa (región IV, Figura 7). En la fracción F4-1 no hubo actividad inhibitoria.



**Figura 10.** Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H4 obtenido con Alcalasa. Se empleó cromatografía de filtración en gel, empleando sephadex G50 y la proteína eluída se monitoreó a 280 nm. Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA-I, en las seis fracciones, empleando 5 µg de proteína para dicho análisis.

Las dos fracciones con mayor actividad antihipertensiva (F4-4 y F4-5), fueron seleccionadas para la posterior purificación por HPLC. Efectuando una comparación del contenido de aminoácidos de estas dos fracciones con el hidrolizado de partida H4 (Cuadro 19), se hallaron modificaciones en los niveles de ciertos residuos de aminoácidos; en primer término, el contenido de aminoácidos hidrófilos se incrementó en ambas fracciones: 7.4% en F4-4 (35.33-37.94 mg/100 mg de proteína) y 48.20% en F4-5 (35.33-52.36); en segundo término, se presentaron notables incrementos en los residuos de triptófano, prolina, fenilalanina y arginina y disminución en los niveles de lisina, metionina, isoleucina, valina y treonina. El triptófano se concentró 236.5% en F4-4(0.63-2.12 mg/100 mg de proteína) y en 255.4% en F4-5 (0.63-16.71); prolina se incrementó en 246% en F4-4 (0.87-3.01) en tanto que en F4-5 no se detectó residuos de prolina; el incremento de fenilalanina fue notorio en F4-4 (45.3%: 6.49-9.43 mg/100 mg de proteína) y en F4-5 (85.7%: 6.49-12.05); arginina se incrementó 18.3% en F4-4 (7.06-8.35) y 8.5% en F4-5 (7.06-7.66). La lisina mostró disminución de 33.3% en F4-4 (7.72-5.15 mg/100 mg de proteína) y de 89% en F4-5 (7.75-0.85); metionina se redujo 58.6% en F4-4 (1.93-

0.80) desapareciendo en la fracción F4-5; isoleusina disminuyó 26.3% en F4-4 (4.52-3.33) y 43.4% en F4-5 (4.52-2.56), en tanto que valina disminuyó 24% tanto en F4-4 como en F4-5 (5.45-4.14); treonina se redujo 26.7% en F4-4 (5.02-3.68) y 33.9% en F4-5 (5.02-3.32 mg/100 mg de proteína).

**Cuadro 19.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F4-4 y F4-5), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H4 preparado a partir de CP<sub>2</sub>. Se incluye el perfil del primer pico de elución P4

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				P4
	CP <sub>2</sub>	H4 (IC <sub>50</sub> : 0.61 mg/ml)	F4-4 (IECA: 21.08%)	F4-5 (IECA: 17.84%)	
Asx <sup>1</sup>	12.47	9.24	11.66	15.18	19.14
Glx <sup>2</sup>	16.10	13.08	10.64	13.25	15.40
Ser	7.26	8.15	7.10	2.34	6.04
His	3.17	3.95	3.22	ND	0.98
Gli	4.84	4.87	4.99	4.16	4.07
Tre	4.41	<b>5.02</b>	<b>3.68</b>	<b>3.32</b>	3.66
Arg	5.02	<b>7.06</b>	<b>8.35</b>	<b>7.66</b>	3.17
Ala	6.19	5.85	5.82	5.21	4.79
Pro	7.68	<b>0.87</b>	<b>3.01</b>	<b>ND</b>	7.61
Tir	3.09	4.76	6.67	ND	ND
Val	4.88	5.45	4.14	2.73	4.97
Met	0.50	<b>1.93</b>	<b>0.80</b>	<b>ND</b>	ND
Cis	3.90	0.82	0.62	0.89	0.18
Ile	4.11	<b>4.52</b>	<b>3.33</b>	<b>2.56</b>	4.09
Leu	9.01	9.58	9.29	13.10	10.70
Fen	0.65	<b>6.49</b>	<b>9.43</b>	<b>12.05</b>	5.42
Lis	5.94	<b>7.72</b>	<b>5.15</b>	<b>0.85</b>	4.88
Trp	0.79	<b>0.63</b>	<b>2.12</b>	<b>16.71</b>	4.88
<b>Distribución de Aminoácidos</b>					
Hidrofóbicos	<b>33.34</b>	<b>35.33</b>	<b>37.94</b>	<b>52.36</b>	42.47
Neutros	21.06	23.62	23.05	10.71	13.96
Hidrofílicos	45.61	45.61	39.00	36.94	43.57

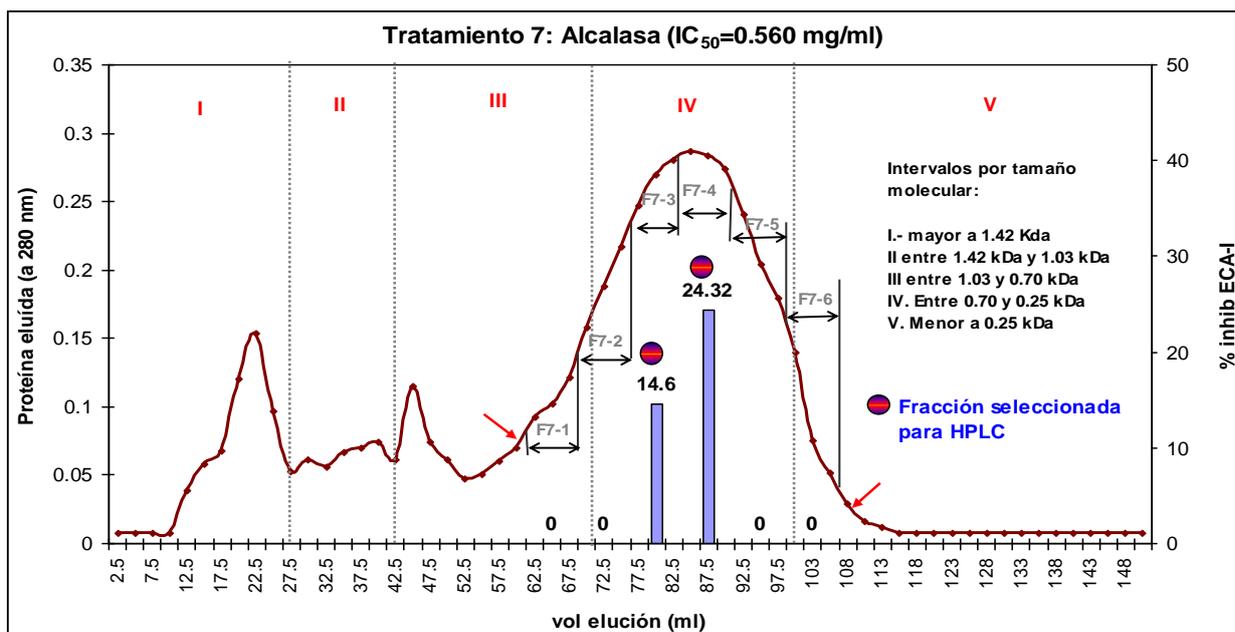
Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis  
<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn  
<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

Al parecer, la presencia de residuos de prolina y de metionina en F4-4 y la ausencia total de los mismos en F4-5, además del incremento en residuos de fenilalanina, triptófano y arginina en ambos, fue lo que contribuyó con el mejor valor de inhibición de ECA-I en la fracción F4-4 (21.08%). En el primer pico de elución P-4, se pudo notar mayor concentración en los residuos de Asx (19.14 mg/100 mg de proteína), prolina (7.61), valina (4.97), isoleucina (4.09) y menor concentración en los residuos de histidina (0.98), arginina (3.17), alanina (4.79) y fenilalanina (5.42).

Con relación al perfil o cromatograma de elución del otro hidrolizado promisorio (H7, Figura 11), se obtuvieron solamente dos fracciones con actividad inhibitoria de la ECA-I: F7-3 y F7-4 con 14.6 y 24.32% de inhibición respectivamente, con pesos moleculares que oscilaron también entre 0.70 y 0.25 kDa (Región IV); en las demás fracciones no se halló actividad antihipertensiva alguna. Así, fue notorio que en el hidrolizado H4, con alcalasa a partir de CP de grano germinado CP<sub>2</sub>, se halló mayor presencia de péptidos con actividad antihipertensiva, no obstante que el IC<sub>50</sub> correspondiente fue ligeramente menor (0.61 mg/ml) que el valor de IC<sub>50</sub> de este último tratamiento (H7: 0.56 mg/ml). De igual forma, se pudo observar que en el perfil de elución de este tratamiento, el pico característico de la región I (P7) (péptidos con tamaño molecular mayor a 1.42 kDa) fue ligeramente menor (Figura 11) que el obtenido con el perfil de elución del tratamiento H4. Este comportamiento estuvo acorde con los GH obtenidos, ya que este pico inferior corresponde a un GH mayor (33.5%) que el obtenido con el tratamiento H4 (24.9%), es decir, en el cromatograma puede apreciarse mayor contenido de péptidos con menor tamaño molecular, resultado de un hidrolizado que tuvo un mayor grado de hidrólisis.

Ambas fracciones con actividad inhibitoria (F7-3, F7-4) fueron seleccionadas para la posterior purificación a través de HPLC. Efectuando una comparación del contenido de aminoácidos de estas dos fracciones con el hidrolizado de partida H7 (Cuadro 20), se hallaron cambios en los niveles de ciertos residuos de aminoácidos.



**Figura 11.** Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H7 obtenido con Alcalasa. Se empleó cromatografía de filtración en gel, empleando sephadex G50 y la proteína eluída se monitoreó a 280 nm. Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA-I, en las seis fracciones, empleando 5  $\mu$ g de proteína para dicho análisis.

En la fracción F7-4 se incrementó el contenido de aminoácidos hidrofóbicos en 19.8% (36.60-43.85 mg/100 mg de proteína), en tanto que en F7-3 este contenido disminuyó ligeramente: 4.1% (36.60-35.09); así mismo, el contenido de prolina, triptófano y Asx se incrementaron en ambas fracciones: prolina 108.3% (1.33-2.77) en F7-3 y 103% en F7-4 (1.33-2.70); triptófano 95.4% en F7-3 (0.65-1.27) y 76.9% en F7-4 (0.65-1.15); Asx 44.8% en F7-3 (8.63-12.50) y 14.4% en F7-4 (8.63-9.87); leucina se incrementó 4.71% en F7-3 (9.76-10.22), en tanto que alanina, isoleucina, fenilalanina e histidina se vieron incrementados en la fracción F7-4 con 104% (6.14-12.56), 64.9% (4.67-7.70), 40.8% (4.88-6.87) y 7.4% (3.93-4.22 mg/100 g de proteína), respectivamente. Los niveles de tirosina, fenilalanina y valina disminuyeron en la fracción F7-3, en 33.8% (4.11-2.78), 24.3% (6.45-4.88) y 12.1% (5.80-5.10), respectivamente, en tanto que los niveles de lisina, cisteína, leucina, serina y Glx disminuyeron en la segunda fracción F7-4: 45% (8.03-4.42), 33.3% (0.75-0.50), 27.9% (9.76-7.03), 16.7% (7.68-6.40) y 15.4% (14.46-12.24 mg/100 mg de proteína), respectivamente.

**Cuadro 20.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F7-3 y F7-4) obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H7 preparado a partir de CP<sub>1</sub> y con Alcalasa 2.4L. Se incluye el perfil de primer pico de elución P7

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				P7
	CP <sub>1</sub>	H7 (IC <sub>50</sub> : 0.56 mg/ml)	F7-3 (IECA: 14.60%)	F7-4 (IECA: 24.32%)	
Asx <sup>1</sup>	12.80	<b>8.63</b>	<b>12.50</b>	<b>9.87</b>	17.16
Glx <sup>2</sup>	15.30	<b>14.46</b>	14.73	<b>12.24</b>	14.91
Ser	7.39	<b>7.68</b>	7.69	<b>6.40</b>	6.39
His	3.24	<b>3.93</b>	2.73	<b>4.22</b>	1.36
Gli	4.67	4.98	5.50	4.20	4.08
Tre	4.40	4.97	4.91	4.67	3.21
Arg	4.96	5.91	5.57	5.61	3.80
Ala	6.08	<b>6.14</b>	6.41	<b>12.56</b>	4.05
Pro	7.62	<b>1.33</b>	<b>2.77</b>	<b>2.70</b>	8.47
Tir	3.54	<b>4.11</b>	<b>2.78</b>	4.03	0.45
Val	4.79	5.80	5.10	5.20	4.03
Met	0.35	<b>1.78</b>	<b>0.22</b>	<b>0.65</b>	ND
Cis	3.87	<b>0.75</b>	0.24	<b>0.50</b>	1.58
Ile	4.30	<b>4.67</b>	4.23	<b>7.70</b>	4.11
Leu	9.19	<b>9.76</b>	<b>10.22</b>	<b>7.03</b>	10.75
Fen	0.52	<b>6.45</b>	<b>4.88</b>	<b>6.87</b>	7.16
Lis	5.99	<b>8.03</b>	8.26	<b>4.42</b>	4.89
Trp	0.98	<b>0.65</b>	<b>1.27</b>	<b>1.15</b>	3.62
<b>Distribución de Aminoácidos</b>					
Hidrofóbicos	<b>34.10</b>	<b>36.60</b>	<b>35.09</b>	<b>43.85</b>	42.19
Neutros	20.90	22.50	20.86	19.79	15.71
Hidrofílicos	45.00	40.96	45.04	36.36	42.10

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

El mayor valor de inhibición de ECA-I en la fracción F7-4 (24.32%) sobre F7-3, pudo deberse al incremento de residuos de aminoácidos con carácter hidrofóbico y al incremento además de fenilalanina y valina.

En el primer pico (P7) que se observa en el cromatograma de elución del hidrolizado H7 (Figura 9), se pudo notar mayor concentración en los aminoácidos: Asx (17.16 mg/100 mg de proteína), cisteína (1.58), prolina (8.47) y triptófano (3.62) y una menor concentración en histidina (1.36), alanina (4.05) lisina (4.89), así como también ausencia de metionina.

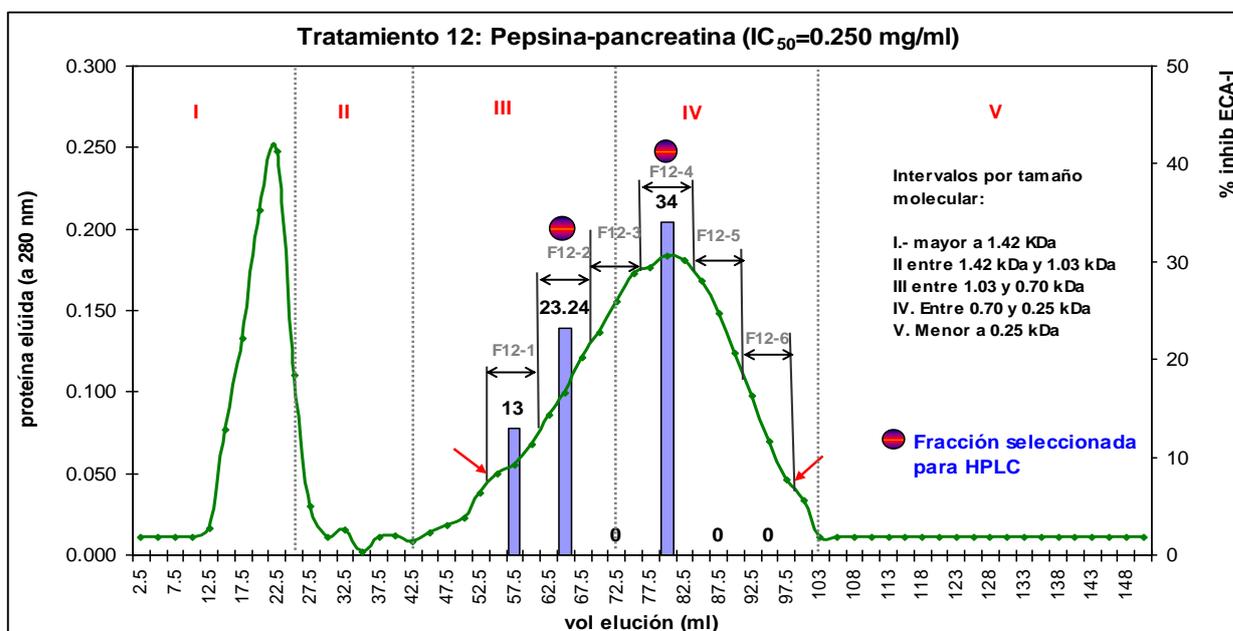
#### **VII.4.2. Fraccionamiento de hidrolizados promisorios con Pepsina-Pancreatina**

Los hidrolizados más promisorios obtenidos con pepsina-pancreatina fueron H12 y H15 con valores de  $IC_{50}$  de 0.25 y de 0.28 mg/ml, respectivamente (Cuadro 14). Como se ha mencionado con anterioridad, los hidrolizados con pepsina-pancreatina tuvieron menores GH que los obtenidos con alcalasa; sin embargo, la actividad inhibitoria de la ECA-I fue mejor; así, en los cromatogramas de elución de los hidrolizados H12 y H15 (Figuras 10 y 11) se pudo notar, en primer lugar, que los picos al inicio de la elución (región I, con peso molecular mayor a 1.42 kDa) son más altos que los picos de elución de los tratamientos obtenidos con alcalasa y esto se debe, precisamente, a que los GH fueron menores, es decir, la concentración del pull de péptidos es menor y esto se puede apreciar en la menor altura de la curva donde están delimitadas las seis fracciones peptídicas a las cuales se les evaluó la actividad inhibitoria de ECA-I. En ambos cromatogramas, resultado de la separación de fracciones peptídicas de H12 y H15 respectivamente (Figuras 12 y 13) también son notorios los mayores poderes de inhibición de la ECA-I en las fracciones evaluadas, pues los porcentajes de inhibición de la ECA-I fueron incluso superiores a 40%.

¶

En el hidrolizado 12 (Figura 12) se obtuvieron 3 fracciones con poder inhibitorio de la ECA-I (F12-1, F12-2 y F12-4) con valores de inhibición de 13, 23.34 y 34 %, 68

respectivamente. Fue notoria la ausencia de actividad inhibitoria de ECA-I en las fracciones F12-3 y F-12-5 que se localizan en ambos extremos de F12-4, dada la actividad inhibitoria hallada en esta fracción; esto pudo deberse a error experimental, mismo que ya no fue corroborado.



**Figura 12.** Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento H12 obtenido con Pepsina-Pancreatina. Se empleó cromatografía de filtración en gel, empleando sephadex G50 y la proteína eluída se monitoreó a 280 nm. Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA-I, en las seis fracciones, empleando 5 µg de proteína para dicho análisis.

El análisis comparativo de aminoácidos respectivos en las fracciones más promisorias F12-2 y F-12-4 con el hidrolizado de partida H12 (Cuadro 20), reveló mayor incremento del contenido de residuos de aminoácidos con carácter en ambas fracciones con 12.33% (33.17-37.26 mg/100 mg de proteína) y 25.6% (33.17-41.66), respectivamente. Se hallaron incrementos notables en los niveles de triptófano, prolina, alanina e isoleucina en ambas fracciones; triptófano se incrementó en un 141.9% (0.74-1.79 mg/100 mg de proteína) en ambos, prolina 139.6% (2.25-5.39) en F12-2 y 55.6% (2.25-3.50) en F12-4, alanina 76.42% (5.26-9.28) en F12-2 y 18.4% (5.26-6.23) en F12-4 e isoleucina 36.9% (4.11-5.63) en F12-2 y 36.4% en F12-4(4.11-4.84). También se notaron incrementos de otros residuos de aminoácidos en F12-2: Asx en 22.6% (12.82-15.92) y glicina en 19.4% (4.90-5.85), Glx en 13.6%

(15.41-17.50); en tanto que en la fracción F12-4 hubo incremento adicional en fenilalanina con 36.4% (6.02-8.21) y en tirosina con 7.2% (4.04-4.33). Por otra parte, se observó disminución en el contenido de metionina, histidina, arginina y serina en ambos; así, metionina disminuyó 59% (1.05-0.43) en F12-2 y 65.7% (1.05-0.36) en F12-4; histidina se redujo 21.4% (3.13-2.46) en F12-2 y 47.9% (3.13-1.63% en F12-4; arginina se redujo en 38.2% (6.10-3.77) en F12-2 y en 0.7% (6.10-6.06) en F12-4. En la primera fracción, F12-2, también fue notable la disminución en el contenido de tirosina (98.8%: 4.04-0.05), fenilalanina (49.7%: 6.02-3.03) y lisina (40.2%: 7.62-4.56), en tanto que en la fracción F12-4 hubo una disminución considerable en lisina (75%: 0.72-0.18), treonina (16.1%: 4.59-3.85) y Glx (12.5%: 15.41-13.49).

Por lo tanto, la mayor actividad inhibitoria hallada en la fracción F12-4 sobre F12-2, se podría explicar con el mayor contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, de fenilalanina, alanina, leucina y a la presencia casi sin cambios en el contenido de arginina (0.7%), además del triptófano y prolina, ya que todos estos residuos de aminoácidos se les ha asociado su incidencia directa sobre ECA-I para propiciar su inhibición (Fitzgerald y Meisel, 2000). En primer pico de elución P12 (Figura 10), mayor a 1.4 kDa, se observó mayor contenido en Asx (14.79 mg/100 mg de proteína), prolina (9.88), cisteína (1.38), leucina (9.68) y triptófano (1.63) y menor contenido en el resto de los demás residuos de aminoácidos, pero más pronunciado en el contenido de tirosina (0.97) y de metionina (0.29).

**Cuadro 21.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F12-2 y F12-4), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H12 preparado a partir de CP<sub>1</sub> y con pepsina-pancreatina. Se incluye el perfil del primer pico de elución P12.

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				P12
	CP <sub>1</sub>	H12 (IC <sub>50</sub> : 0.25 mg/ml)	F12-2 (IECA: 23.24%)	F12-4 (IECA: 34.05%)	
Asx <sup>1</sup>	12.80	<b>12.82</b>	<b>15.72</b>	12.96	<b>14.79</b>
Glx <sup>2</sup>	15.30	15.41	17.50	13.49	15.02
Ser	7.39	<b>7.50</b>	<b>6.75</b>	<b>6.15</b>	6.69
His	3.24	3.13	2.46	1.63	2.02
Gli	4.67	<b>4.90</b>	<b>5.85</b>	4.76	4.08
Tre	4.40	4.59	5.26	3.85	3.75
Arg	4.96	<b>6.10</b>	<b>3.77</b>	<b>6.06</b>	5.08
Ala	6.08	<b>5.26</b>	<b>9.28</b>	<b>6.23</b>	4.82
Pro	7.62	<b>2.25</b>	<b>5.39</b>	<b>3.50</b>	<b>9.88</b>
Tir	3.54	<b>4.04</b>	<b>0.05</b>	4.33	<b>0.27</b>
Val	4.79	<b>4.93</b>	<b>5.10</b>	<b>4.94</b>	4.75
Met	0.35	<b>1.05</b>	<b>0.43</b>	<b>0.36</b>	<b>0.29</b>
Cis	3.87	0.72	0.83	0.18	<b>1.38</b>
Ile	4.30	<b>4.11</b>	<b>5.63</b>	<b>4.84</b>	3.96
Leu	9.19	<b>8.82</b>	6.61	<b>11.80</b>	<b>9.68</b>
Fen	0.52	<b>6.02</b>	3.03	<b>8.21</b>	5.71
Lis	5.99	7.62	4.56	4.96	6.20
Trp	0.98	<b>0.74</b>	<b>1.79</b>	<b>1.79</b>	<b>1.63</b>
<b>Distribución de Aminoácidos</b>					
Hidrofóbicos	34.10	<b>33.17</b>	<b>37.26</b>	<b>41.66</b>	40.71
Neutros	20.86	21.75	18.74	19.25	16.18
Hidrofílicos	45.04	45.08	43.99	39.09	43.11

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

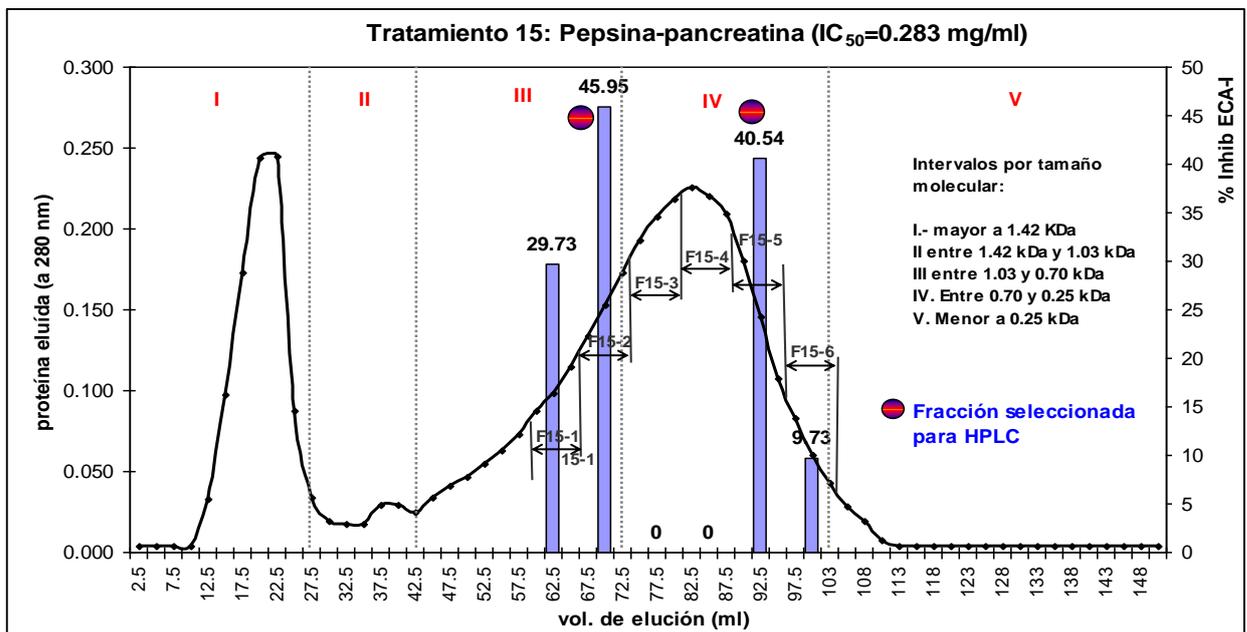
Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

De acuerdo al cromatograma de elución correspondiente al hidrolizado H15 (Figura 13), se hallaron 4 fracciones con actividad inhibitoria de la ECA-I (F15-1, F15-2, F15-

5 Y F15-6) con porcentajes de inhibición de 29.73, 45.95, 40.54 y 9.73%, respectivamente. Las primeras dos fracciones (F15-1 y F15-2) tuvieron pesos moleculares entre 1.03 y 0.70 kDa, en tanto que en las otras dos restantes (F15-5 y F15-6) el peso molecular fue menor (entre 0.70 y 0.25 kDa). Al igual que con las fracciones a partir de H12, fue notoria la ausencia de actividad de inhibición en las fracciones recolectadas en la parte de en medio de la curva de elución (F15-3 y F15-4); esto pudo ser debido a error de experimentación, sin embargo ya no se repitió la determinación en ambas fracciones. Con relación a los resultados de inhibición, se podría afirmar que con CP obtenido a partir de grano germinado de *P. lunatus* en un tiempo de dos días, se puede obtener mayor diversidad de péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I, es decir, que con el grano germinado existe una mayor probabilidad de hallar péptidos con propiedades inhibitorias, pues se produjeron un mayor número de fracciones con porcentajes de inhibición de la ECA-I. Las fracciones con mayor actividad inhibitoria F15-2 y F15-5 fueron seleccionadas para la posterior purificación por HPLC.



**Figura 13.** Perfil de elución del hidrolizado correspondiente al tratamiento 15 obtenido con Pepsina-Pancreatina. Se empleó cromatografía de filtración en gel, empleando sephadex G50 y la proteína eluida se monitoreó a 280 nm. Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA-I, en las seis fracciones, empleando 5  $\mu$ g de proteína para dicho análisis.

Efectuando un análisis comparativo en el perfil de aminoácidos totales entre las dos fracciones más promisorias obtenidas por cromatografía de filtración en gel a partir del hidrolizado de partida H15 (Cuadro 22), se pudo notar disminución del contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la fracción F15-2 en un 9,5%: 36.36-32.89 mg/100 mg de proteína incremento de este valor en la fracción F15-5 en un 40.2%: 36.36-50.96. En ambas fracciones fue notorio el incremento en los niveles de Asx, alanina y Glx. Asx se incrementó 114.5% (7.32-15.70) en F15-2 y 83.3% (7.32-13.42) en F15-5; alanina tuvo un incremento de 16.7% (5.94-6.93) en F15-2 y 17.3% (5.94-6.97) en F15-5 y Glx aumentó en un 27.7% (14.37-18.35) en F15-2 y en un 4.5% (14.37-15.02) en F15-5. Así mismo, fue notorio el incremento del nivel de prolina en F15-2 (286%: 1.0-3.86), de triptófano (892%: 0.64-6.35), fenilalanina (97.03%: 6.74-13.28) y leucina (49.4%: 9.91-14.81) en la fracción F-15-5. Por otra parte en la fracción F15-2 se disminuyeron los niveles de triptófano (96.9%: 0.64-0.02), tirosina (92.7%: 4.63-0.34), metionina (84.1%: 1.64-0.26), fenilalanina (47.5%: 6.74-3.54) y arginina (24.2%: 6.44-4.88), en tanto que, en la segunda fracción F15-5, fue notoria la disminución en los residuos aminoacídicos histidina (67.5%: 3.81-1.24), serina (64.9%: 8.12-2.85), treonina (42%: 5.14-2.98), arginina (28.9%: 6.44-4.93) y ausencia de prolina, tirosina, metionina y cisteína.

Posiblemente la ausencia de estos residuos de aminoácidos, sobre todo prolina y metionina, contribuyó a la menor disminución de la actividad inhibitoria de F15-5 (40.54%) en comparación con F15-2 (45.95%), no obstante que esta última fracción presentó un menor contenido de residuos de aminoácidos con carácter hidrofóbico. En el primer pico (P15), se incrementaron los niveles en los aminoácidos Asx, Glx, prolina, cisteína y triptófano con niveles de 16.04, 17.89, 7.29, 1.50 t 3-39 mg/100 mg de proteína, respectivamente, así como también disminución de ciertos aminoácidos entre los que destacaron serina y lisina, con concentraciones de 5.72 y 6.65 mg/ml y ausencia de tirosina y de metionina. Las curvas de elución y los porcentajes de inhibición de la ECA-I de las diferentes fracciones peptídicas que se obtuvieron a partir de los cuatro hidrolizados con mayor actividad antihipertensiva tuvieron un comportamiento muy similar a los obtenidos en la separación por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, de un hidrolizado a partir de proteínas de

girasol, empleando el mismo sistema secuencial Pepsina-Pancreatina (Figura 14), con un tiempo de hidrolizado de 6 h (Megías y col., 2004),

**Cuadro 22.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I (F15-2 y F15-5), obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir del hidrolizado H15 preparado a partir de CP<sub>2</sub> y con pepsina-pancreatina. Se incluye el perfil del primer pico de elución P15

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)				P15
	CP <sub>2</sub>	H15 (IC <sub>50</sub> : 0.280 mg/ml)	F15-2 (IECA: 45.95%)	F15-5 (IECA: 40.54%)	
Asx <sup>1</sup>	12.47	<b>7.32</b>	<b>15.70</b>	<b>13.42</b>	<b>16.04</b>
Glx <sup>2</sup>	16.10	<b>14.37</b>	<b>18.35</b>	<b>15.02</b>	<b>17.89</b>
Ser	7.26	8.12	7.32	2.85	<b>5.72</b>
His	3.17	3.81	2.27	1.24	1.36
Gli	4.84	5.13	5.74	3.68	3.96
Tre	4.41	5.14	4.95	2.98	3.45
Arg	5.02	<b>6.44</b>	<b>4.88</b>	<b>4.93</b>	5.05
Ala	6.19	<b>5.94</b>	<b>6.93</b>	<b>6.97</b>	4.50
Pro	7.68	<b>1.00</b>	<b>3.86</b>	<b>ND</b>	<b>7.29</b>
Tir	3.09	<b>4.63</b>	<b>0.34</b>	<b>ND</b>	ND
Val	4.88	<b>5.75</b>	<b>5.20</b>	<b>4.65</b>	4.85
Met	0.50	<b>1.64</b>	<b>0.26</b>	<b>ND</b>	ND
Cis	3.90	<b>0.89</b>	<b>0.89</b>	<b>ND</b>	<b>1.50</b>
Ile	4.11	4.75	4.86	4.89	4.00
Leu	9.01	<b>9.91</b>	8.22	<b>14.81</b>	9.50
Fen	0.65	<b>6.74</b>	3.54	<b>13.28</b>	4.86
Lis	5.94	7.80	6.66	4.94	<b>6.65</b>
Trp	0.79	<b>0.64</b>	0.02	<b>6.35</b>	<b>3.39</b>
<b>Distribución de Aminoácidos</b>					
Hidrofóbicos	33.34	<b>36.36</b>	<b>32.89</b>	<b>50.96</b>	38.82
Neutros	21.06	23.91	19.25	9.51	14.63
Hidrofílicos	45.61	39.74	47.87	39.54	46.55

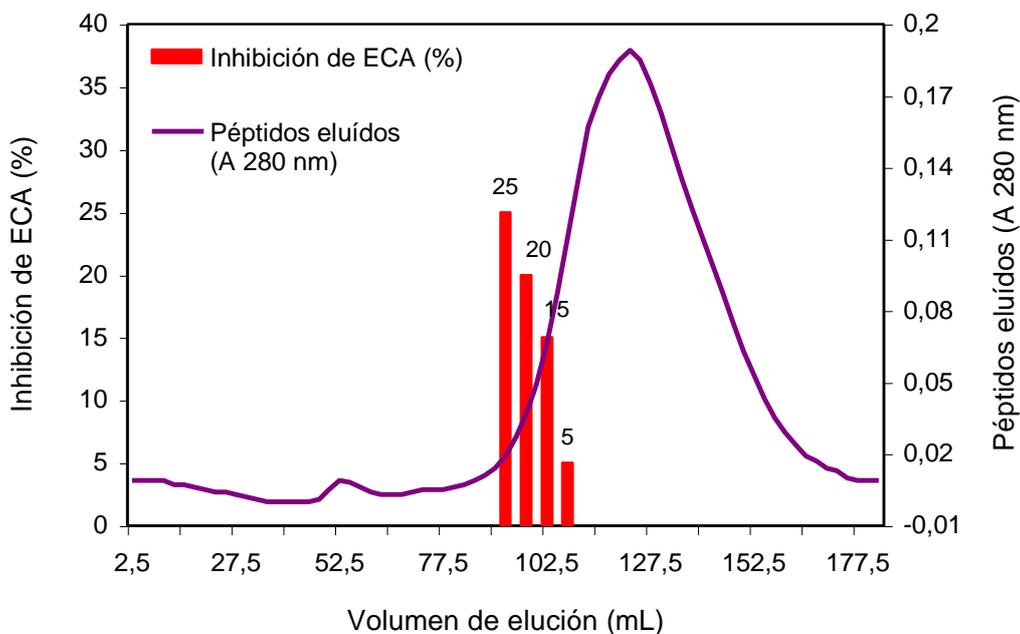
Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

lo que hace suponer la existencia de una ligera similitud en la secuencia de aminoácidos que conforman las proteínas del frijol lima con las del girasol. Los péptidos obtenidos con actividad antihipertensiva en el girasol tuvieron mayores pesos moleculares que los obtenidos a partir de frijol lima.



**Figura 14.** Perfil de elución del hidrolizado proteico de girasol obtenido tras la acción secuencial de pepsina y pancreatina en una columna de filtración en gel Sephadex G-50 (Megías y col., 2004)

En el perfil de aminoácidos de las ocho fracciones más promisorias obtenidas de ambos sistemas enzimáticos, con excepción de ciertos aminoácidos, la gran mayoría presentó similitud en dicho perfil (Cuadro 23). Fue notorio el contenido superior de Asx en la fracción F15-2 (18.35 mg/100 mg de proteína), así como también fue evidente el menor contenido de aminoácidos con carácter hidrofóbico en esta misma fracción F15-2 (32.89%) , que tuvo el mayor valor de inhibición de ECA-I (45.95%); la explicación de este hecho pudo deberse a que el orden o secuencia de los residuos de aminoácidos que conforman los péptidos de esta fracción contribuyen con un acceso más ventajoso hacia los sitios activos de ECA-I para causar su inhibición, sobre los demás péptidos contenidos en las otras fracciones. En los péptidos antihipertensivos se ha visto que los tres últimos residuos de aminoácidos en la

región C-terminal son los que le confieren la actividad de inhibición en el péptido. (Megías y col., 2004).

**Cuadro 23.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I, obtenidas por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, a partir de CP<sub>1</sub> y de CP<sub>2</sub>

Contenido (g/100 g of protein)								
Aminoácido	CP <sub>1</sub>				CP <sub>2</sub>			
	F7-3 (IECA: 14.60%)	F7-4 (IECA: 24.32%)	F12-2 (IECA: 23.24%)	F12-4 (IECA: 34.05%)	F4-4 (IECA: 21.08%)	F4-5 (IECA: 17.84%)	F15-2 (IECA: 45.95%)	F15-5 (IECA: 40.54%)
Asx <sup>1</sup>	12.50	9.87	15.72	12.96	11.66	15.18	15.70	13.42
Glx <sup>2</sup>	14.73	12.24	17.50	13.49	10.64	13.25	<b>18.35</b>	15.02
Ser	7.69	6.40	6.75	6.15	7.10	2.34	7.32	2.85
His	2.73	4.22	2.46	1.63	3.22	ND	2.27	1.24
Gli	5.50	4.20	5.85	4.76	4.99	4.16	5.74	3.68
Tre	4.91	4.67	5.26	3.85	3.68	3.32	4.95	2.98
Arg	5.57	5.61	3.77	6.06	8.35	7.66	4.88	4.93
Ala	6.41	12.56	9.28	6.23	5.82	5.21	6.93	6.97
Pro	2.77	2.70	5.39	3.50	3.01	ND	<b>3.86</b>	ND
Tir	2.78	4.03	0.05	4.33	6.67	ND	0.34	ND
Val	5.10	5.20	5.10	4.94	4.14	2.73	<b>5.20</b>	4.65
Met	0.22	0.65	0.43	0.36	0.80	ND	0.26	ND
Cis	0.24	0.50	0.83	0.18	0.62	0.89	0.89	ND
Ile	4.23	7.70	5.63	4.84	3.33	2.56	4.86	4.89
Leu	10.22	7.03	6.61	11.80	9.29	13.10	8.22	14.81
Fen	4.88	6.87	3.03	8.21	9.43	12.05	3.54	13.28
Lis	8.26	4.42	4.56	4.96	5.15	0.85	6.66	4.94
Trp	1.27	1.15	1.79	1.79	2.12	16.71	0.02	6.35
<b>Distribución de Aminoácidos</b>								
Hidrofóbicos	<b>35.09</b>	<b>43.85</b>	<b>37.26</b>	<b>41.66</b>	<b>37.94</b>	<b>52.36</b>	<b>32.89</b>	<b>50.96</b>
Neutros	20.86	19.73	18.74	19.25	23.05	10.71	19.25	9.51
Hidrofílicos	45.04	36.36	43.99	39.09	39.00	36.94	47.87	39.54

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

Efectuando un análisis similar en el perfil de aminoácidos en los cuatro picos que eluyeron en primer término en cada cromatograma y que fueron los de mayor tamaño molecular, se pudo observar, con excepción de ciertos aminoácidos, un comportamiento similar en los perfiles respectivos (Cuadro 24). Así, fue notorio el incremento de Asx (19.14 mg/100 mg de proteína) en P4, histidina (2.02) y prolina (9.88) en P12 y fenilalanina (7.16) en P7; notable disminución de cisteína (0.18) en P4 y de triptófano (1.63) en P12. Es posible que estas fracciones que eluyeron en primer término y de alto peso molecular estén constituidos por oligopéptidos, por lo que sería interesante evaluar la actividad antimicrobiana en ellos; es bien sabida la relación estrecha entre los péptidos de alto peso molecular con dicha actividad antimicrobiana (Clare y Swaisgood, 2000; Darragh, 2002).

En resumen, en esta primera purificación de péptidos en los cuatro hidrolizados más promisorios (H4, H7, H12 y H15) por cromatografía de filtración en gel empleando sephadex G50, se obtuvo un total de catorce fracciones peptídicas (nueve a partir de concentrado proteínico de grano germinado), seleccionando ocho fracciones para la posterior purificación por HPLC (Cuadro 25), donde las mayores actividades de inhibición de ECA-I fueron obtenidas mediante la hidrólisis secuencial pepsina-pancreatina.

**Cuadro 24.** Comparativo en la composición de aminoácidos en los picos que eluyeron en primer término y con pesos moleculares mayores a 1.4 kDa

<b>Contenido</b>				
<b>(g/100 g of protein)</b>				
<b>Aminoácido</b>	<b>P4</b>	<b>P7</b>	<b>P12</b>	<b>P15</b>
Asx <sup>1</sup>	<b>19.14</b>	17.16	14.79	16.04
Glx <sup>2</sup>	15.40	14.91	15.02	17.89
Ser	6.04	6.39	6.69	5.72
His	0.98	1.36	<b>2.02</b>	1.36
Gli	4.07	4.08	4.08	3.96
Tre	3.66	3.21	3.75	3.45
Arg	3.17	3.80	5.08	5.05
Ala	4.79	4.05	4.82	4.50
Pro	7.61	8.47	<b>9.88</b>	7.29
Tir	ND	0.45	0.27	ND
Val	4.97	4.03	4.75	4.85
Met	ND	ND	0.29	ND
Cis	<b>0.18</b>	1.58	1.38	1.50
Ile	4.09	4.11	3.96	4.00
Leu	10.70	10.75	9.68	9.50
Fen	5.42	<b>7.16</b>	5.71	4.86
Lis	4.88	4.89	6.20	6.65
Trp	4.88	3.62	<b>1.63</b>	3.39
<b>Distribución de Aminoácidos</b>				
Hidrofóbicos	42.47	42.19	40.71	38.82
Neutros	13.96	15.71	16.18	14.63
Hidrofílicos	43.57	42.10	43.11	46.55

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

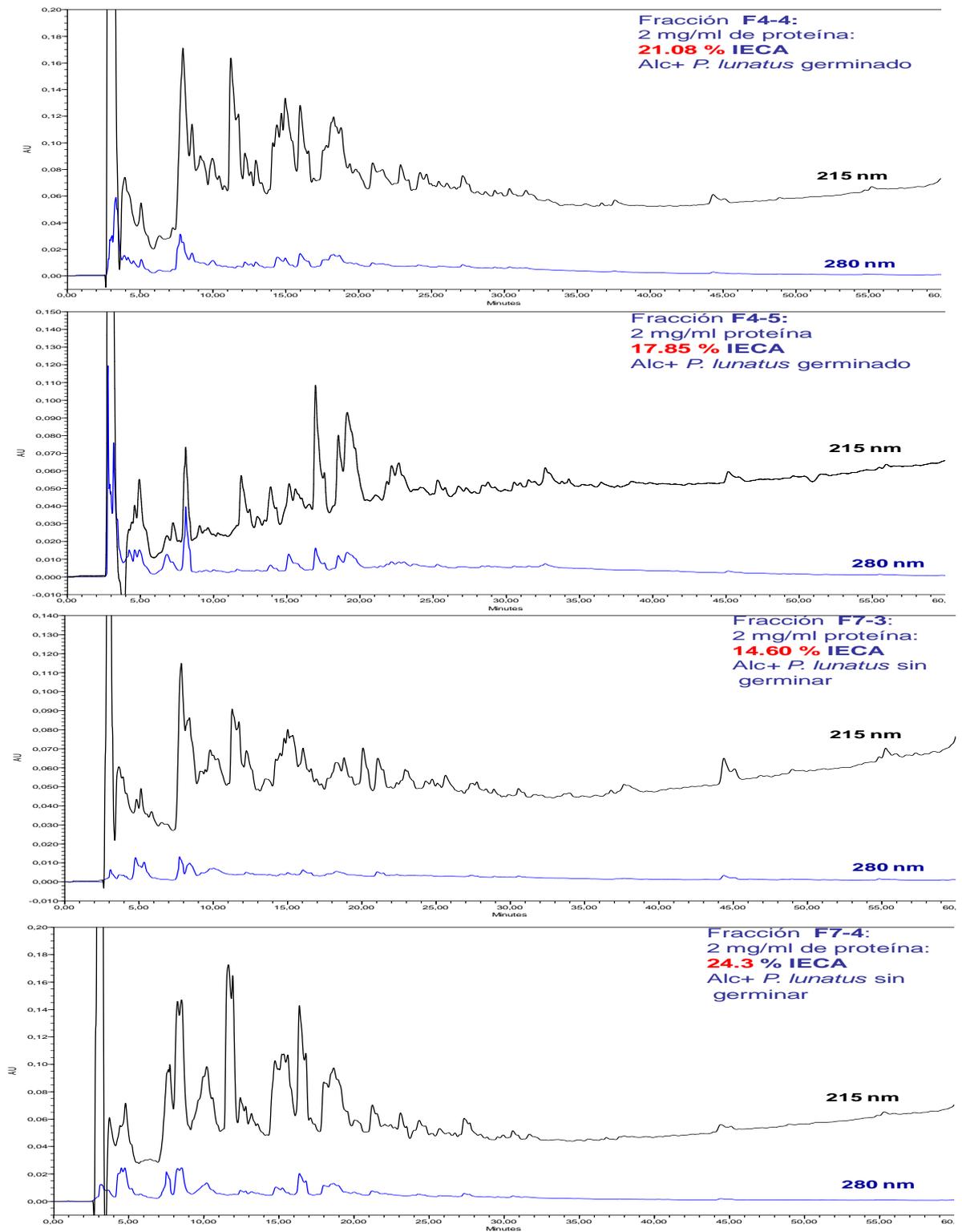
**Cuadro 25.** Fracciones obtenidas por Cromatografía de filtración en gel con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I

<b>Fracción</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Fuente de CP</b>	<b>Enzima Empleada</b>	<b>% inhibición ECA-I</b>
F4-4	4	Grano germinado	Alcalasa	21.08
F4-5	4	Grano germinado	Alcalasa	17.84
F7-3	7	Grano sin germinar	Alcalasa	14.60
F7-4	7	Grano sin germinar	Alcalasa	24.32
F12-2	12	Grano sin germinar	Pepsina-Pancreatina	23.24
F12-4	12	Grano sin germinar	Pepsina-Pancreatina	34.00
F15-2	15	Grano germinado	Pepsina-Pancreatina	45.95
F15-5	15	Grano germinado	Pepsina-Pancreatina	40.54

## **VII.5. Purificación de fracciones peptídicas más promisorias por HPLC**

### **VII.5.1. Purificación de fracciones más promisorias obtenidas con alcalasa a partir de cromatografía de filtración en gel**

Se empleó una columna semipreparativa RP-HPLC-C<sub>18</sub> para la purificación preliminar de las fracciones F4-4 y F4-5 a partir de H4, F7-3 y F7-4 a partir de H7. Se inyectaron 2 mg/ml de proteína en cada determinación, leyéndose los picos a dos longitudes de onda (215 y 280 nm) de las cuales, a 215 nm se tuvo una mejor resolución. Como puede apreciarse en cada uno de los cromatogramas respectivos de la figura 15, la gran mayoría de los picos eluyeron en los primeros 30 min de la prueba, finalizando ésta en un tiempo total de 80 min.



**Figura 15** Cromatografía semipreparativa RP-HPLC C<sub>18</sub> de las fracciones más promisorias (F4-4, F4-5, F7-3, F7-4), obtenidas con alcalasa.

Se escogió continuar con la purificación de la fracción F7-4 por presentar picos bien definidos, además de que fue la fracción que presentó mayor actividad inhibitoria de ECA-I (24.3%). Así, se seleccionaron tres tiempos de recolección de muestra para hacer el siguiente fraccionamiento, recolectando la primera fracción en el intervalo de tiempo entre 10 y 15 min (F7-A), la segunda entre 15-20 min (F7-B) y la tercera fracción entre 20-25 min (F7-C). Las fracciones que eluyeron antes de los 10 min no fueron recolectadas porque se ha visto en la literatura que al efectuar la purificación en estas mismas condiciones, las fracciones que eluyen al principio no presentan actividad de inhibición de ECA-I, o bien, las inhibiciones han sido bajas comparados con las fracciones que van eluyendo posteriormente y que son, precisamente, fracciones con mayor porcentaje de hidrofobicidad; esta peculiaridad ha sido observada en la purificación de hidrolizados de garbanzo (Pedroche y col, 2002b), en hidrolizados de colza (Pedroche y col., 2004b) y en hidolizados de girasol (Megías y col., 2004). Se ha sugerido que esto es debido a que los péptidos inhibidores de ECA son ricos en aminoácidos hidrofóbicos (Meisel, 1998), que provocan mayores tiempos de retención en una columna cromatográfica hidrofóbica (Yust y col., 2003).

Después de efectuar el fraccionamiento de F7-4 en la columna semipreparativa en repetidas ocasiones, se evaluó la actividad inhibitoria en estas nuevas fracciones, con valores de inhibición de 14.27% para la fracción F7-A, 30.67% para la fracción F7-B y 25.84% para la fracción F7-C, tomando 5  $\mu\text{g}$  de proteína en las determinaciones de la actividad antihipertensiva *in vitro*. Dado que la segunda fracción (F7-B) fue la que tuvo la mayor actividad inhibitoria, esta fracción fue seleccionada para continuar con la purificación a través de la columna analítica, de la cual fueron obtenidas ocho nuevas fracciones como se muestran en el cromatograma respectivo (Figura 16). La separación en esta etapa fue en menor tiempo (50 min) y las ocho fracciones, recolectadas entre 26-38 min, presentaron actividad inhibitoria de ECA-I, donde las tres últimas fracciones (F7B-6, F7B-7 y F7B-8) tuvieron la mayor actividad de inhibición con valores de 40.6, 48.8 y 32.4% e  $\text{IC}_{50}$  de 2.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 3.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente (Figura 17).

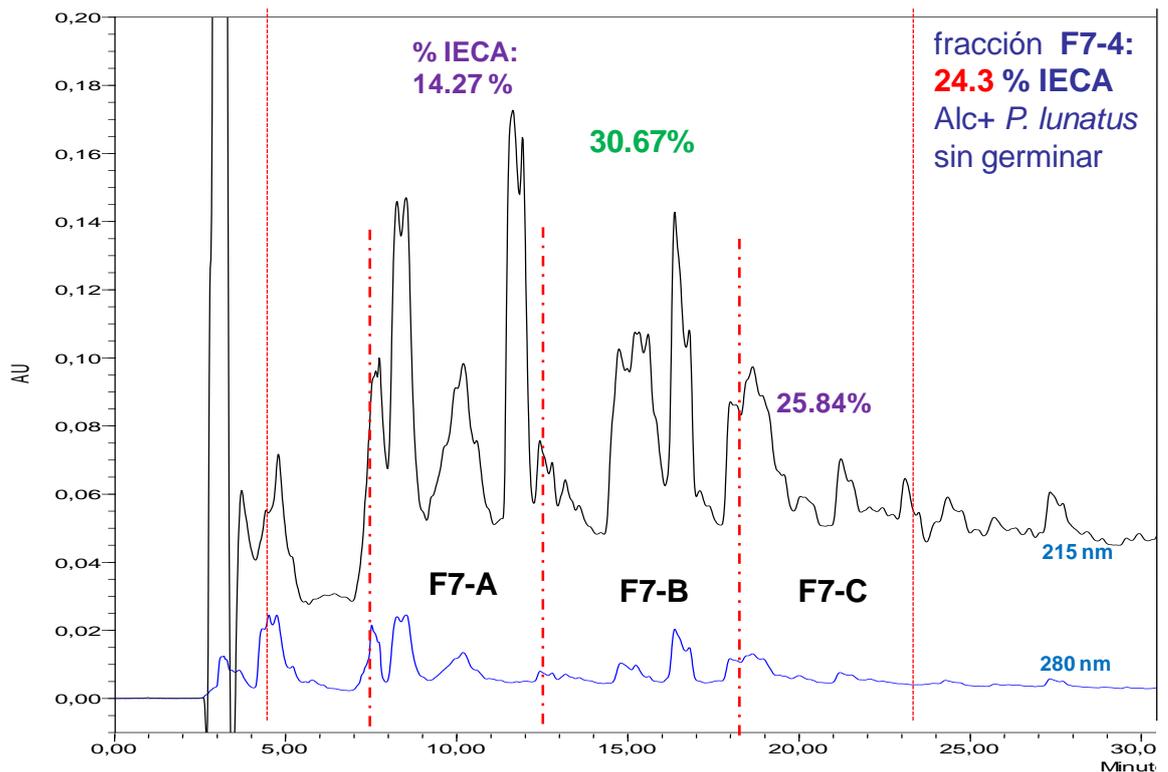


Figura 16. Cromatograma de la muestra F7-4 separada por HPLC en columna semipreparativa

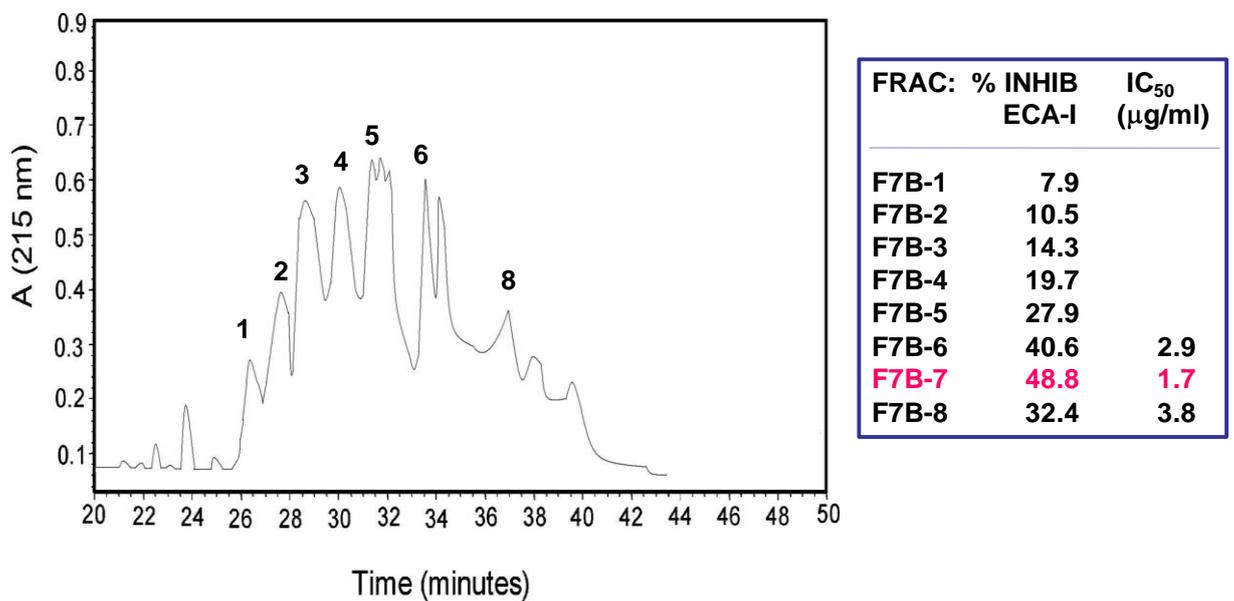


Figura 17. Cromatograma de la muestra F7-B con mayor actividad antihipertensiva, obtenida por RP-HPLC en columna analítica y valores de inhibición de ECA-I en los picos recolectados

Aunque la inhibición de ECA por estas fracciones es entre 150 y 205 veces menor que la del captopril ( $IC_{50}$ :0.000534  $\mu$ g/ml), estas actividades son similares, o incluso mejores, a las observadas en otros péptidos inhibidores de ECA purificados hasta ahora (Meisel, 1997; Yamamoto y col., 1997; FitzGerald y Murray, 2006; Megías y col., 2004).

Se efectuó un análisis de aminoácidos en las tres fracciones con mayor actividad de inhibición comparándola con la fracción de partida (F7-4). Los resultados (Cuadro 26), revelaron un mayor incremento en los niveles de residuos de aminoácidos hidrofóbicos: 3.3% (43.85-45.29 mg/100 mg de proteína) en F7B-6, 19.1% (43.85-52.22) en F7B-7 y 9.4% (43.85-47.96) en F7B-8. Fue notorio el incremento de triptófano, leucina, serina, isoleucina, Asx y valina en las tres fracciones; así, triptófano se incrementó 93.9%:1.15-2.23, 269.6%:1.15-4.25 y 188.7%:1.15-3.32, respectivamente en F7B-6, F7B-7 y F7B-8. Leucina en 68%:7.03-11.81, 50.6%:7.03-10.59 y 72%:7.03-12.09, respectivamente; serina en 53.6%:6.40-9.83, 24.8%: 6.40-7.99) y 30.5%: 6.40-8.35, respectivamente; isoleucina 30.8%: 7.70-10.07, 41.2%: 7.70-10.87 y 28.3%: 7.70-9.88, respectivamente; Asx en 15.5%: 9.87-11.40, 3.85%: 9.87-10.25 y 36.2%: 9.87-13.44, respectivamente y valina 4%: 5.20-5.41, 31.2%: 5.20-6.82 y 12.5%:5.20-5.85, respectivamente; de forma adicional, prolina y fenilalanina se concentraron en la fracción F7B-7, lo que hace suponer mayor actividad inhibitoria sobre las demás fracciones por este hecho; prolina se incrementó en 21.9%:2.70-3.29 mg/100 mg de proteína y fenilalanina en 10.8%: 6.87-7.61. Los residuos arginina, metionina, tirosina y alanina experimentaron disminución en sus niveles de concentración; así, arginina disminuyó 60.9%: 5.61-2.19 en F7B-6 y en F7B-8, 67.4%:5.61-1.83 en F7B-7; metionina disminuyó 33.8%: 0.65-0.43, 46.2%: 0.65-0.35 y 64.6%: 0.65-0.23 en las tres fracciones respectivamente; tirosina 31.8%: 4.03-2.75, 45.4%: 4.03-2.20 y 66.5%: 4.03-1.35, respectivamente; alanina 30.8%: 12.60-8.72, 32.9%: 12.60-8.46 y 23.7%: 12.60-9.62, respectivamente.

**Cuadro 26.** Composición de aminoácidos en las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de ECA-I (7B-6, 7B-7 y 7B-8), obtenidas por HPLC a partir de la muestra F7-4 obtenida con Alcalasa 2.4L

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)					
	CP <sub>1</sub>	H7 (IC <sub>50</sub> :0.56 mg/ml)	F7-4 IECA:24.3%	F7B-6 40.6%	F7B-7 48.8%	F7B-8 32.4%
Asx <sup>1</sup>	12.80	8.63	<b>9.87</b>	<b>11.40</b>	<b>10.25</b>	<b>13.44</b>
Glx <sup>2</sup>	15.30	14.46	12.24	8.67	8.57	10.63
Ser	7.39	7.68	<b>6.40</b>	<b>9.83</b>	<b>7.99</b>	<b>8.35</b>
His	3.24	3.93	4.22	4.04	2.29	2.11
Gli	4.67	4.98	4.20	6.11	5.65	4.80
Tre	4.40	4.97	4.67	5.87	4.89	4.67
Arg	4.96	5.91	<b>5.61</b>	<b>2.19</b>	<b>1.83</b>	<b>2.19</b>
Ala	6.08	6.14	<b>12.60</b>	<b>8.72</b>	<b>8.46</b>	<b>9.62</b>
Pro	7.62	1.33	<b>2.70</b>	1.43	<b>3.29</b>	2.13
Tir	3.54	4.11	<b>4.03</b>	<b>2.75</b>	<b>2.20</b>	<b>1.35</b>
Val	4.79	5.80	<b>5.20</b>	<b>5.41</b>	<b>6.82</b>	<b>5.85</b>
Met	0.35	1.78	<b>0.65</b>	<b>0.43</b>	<b>0.35</b>	<b>0.23</b>
Cis	3.87	0.75	0.50	0.17	0.44	1.23
Ile	4.30	4.67	<b>7.70</b>	<b>10.07</b>	<b>10.87</b>	<b>9.88</b>
Leu	9.19	9.76	<b>7.03</b>	<b>11.81</b>	<b>10.59</b>	<b>12.09</b>
Fen	0.52	6.45	<b>6.87</b>	5.18	<b>7.61</b>	4.89
Lis	5.99	8.03	4.42	3.70	3.56	3.28
Trp	0.98	0.65	<b>1.15</b>	<b>2.23</b>	<b>4.25</b>	<b>3.32</b>
<b>Distribución de aminoácidos</b>						
Hidrofóbicos	34.10	36.60	<b>43.85</b>	<b>45.29</b>	<b>52.22</b>	<b>47.96</b>
Neutros	20.90	22.50	19.79	24.72	21.16	20.40
Hidrofílicos	45.00	40.96	36.36	30.00	26.50	31.64

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

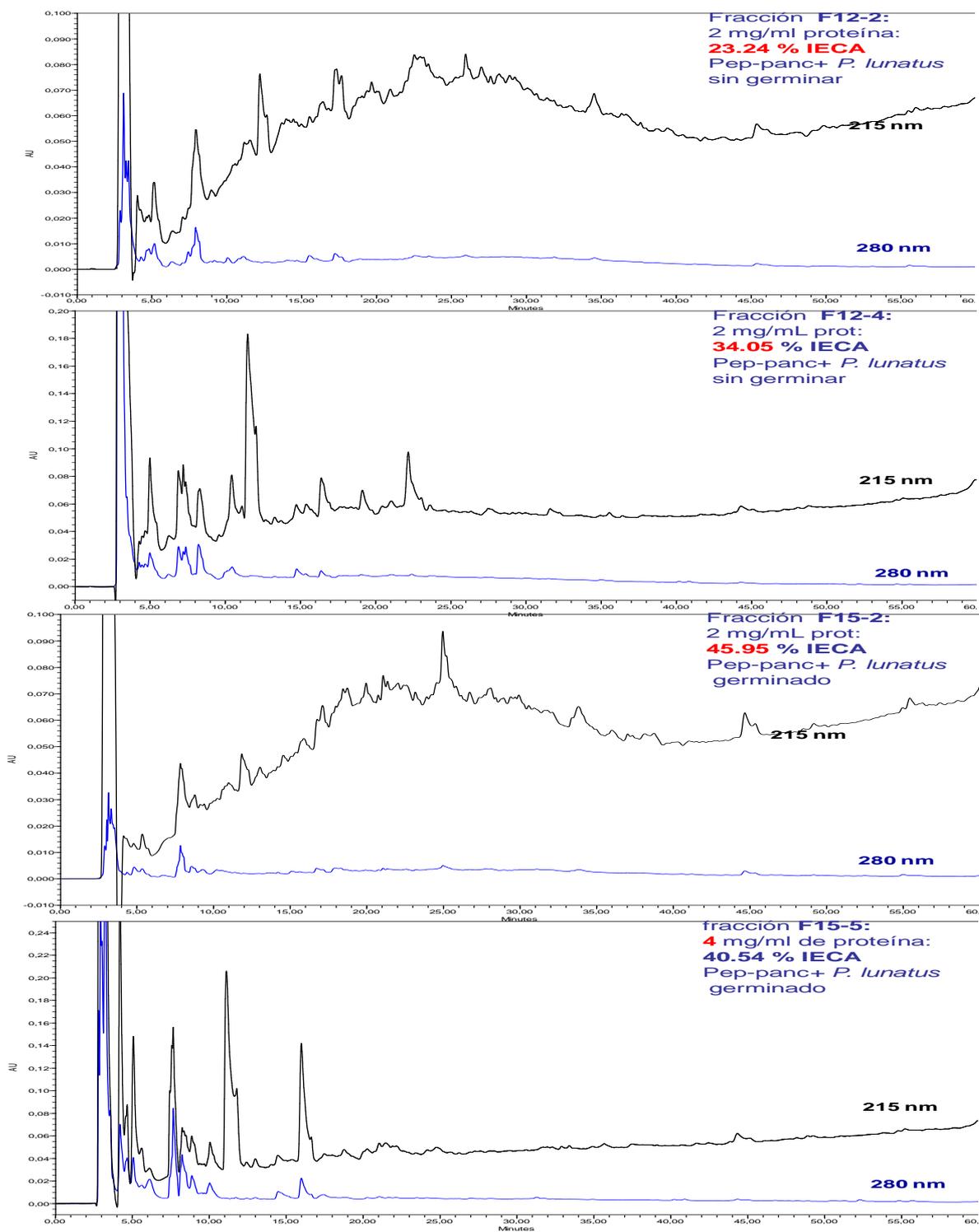
<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

### **VII.5.2. Purificación de fracciones más promisorias obtenidas con pepsina-pancreatina a partir de cromatografía de filtración en gel**

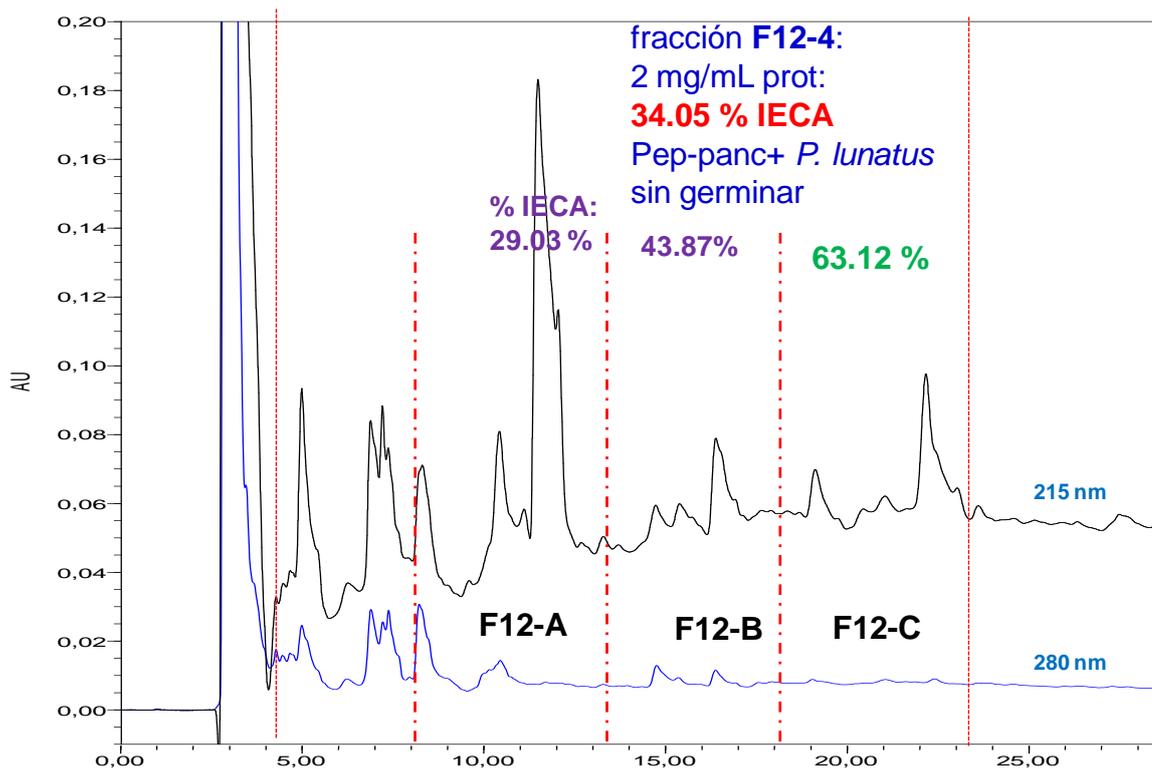
Mediante HPLC y empleando la columna semipreparativa RP-C<sub>18</sub>, se efectuó la purificación preliminar de las fracciones F12-2 y F12-4 a partir de H12, F15-2 y F15-5 a partir de H15, inyectando 2 mg/ml de proteína en cada determinación, leyéndose los picos a dos longitudes de onda (210 y 280 nm). En los cromatogramas respectivos de estas fracciones (Figura 18) se pudo notar que la gran mayoría de los picos eluyeron en los primeros 30 min de la prueba, finalizando ésta también en 80 min. De igual forma, se pudo notar una mejor resolución de los picos a una longitud de onda de 215 nm.

En los cromatogramas de las fracciones F12-2 y F15-2 no se obtuvo una buena resolución en los picos, debido a bajas concentraciones de la proteína en las muestras recolectadas por cromatografía de filtración en gel. Así, estas dos fracciones fueron descartadas para la posterior purificación, escogiendo en las dos fracciones restantes, la fracción F12-4 por ser la que mayor contenido de muestra pudo recolectarse para la posterior purificación con la columna analítica, no obstante que la fracción F15-5 tuvo mayor poder de inhibición de ECA-I. Cabe señalar que valdría la pena, en futuras investigaciones, purificar también esta última fracción.



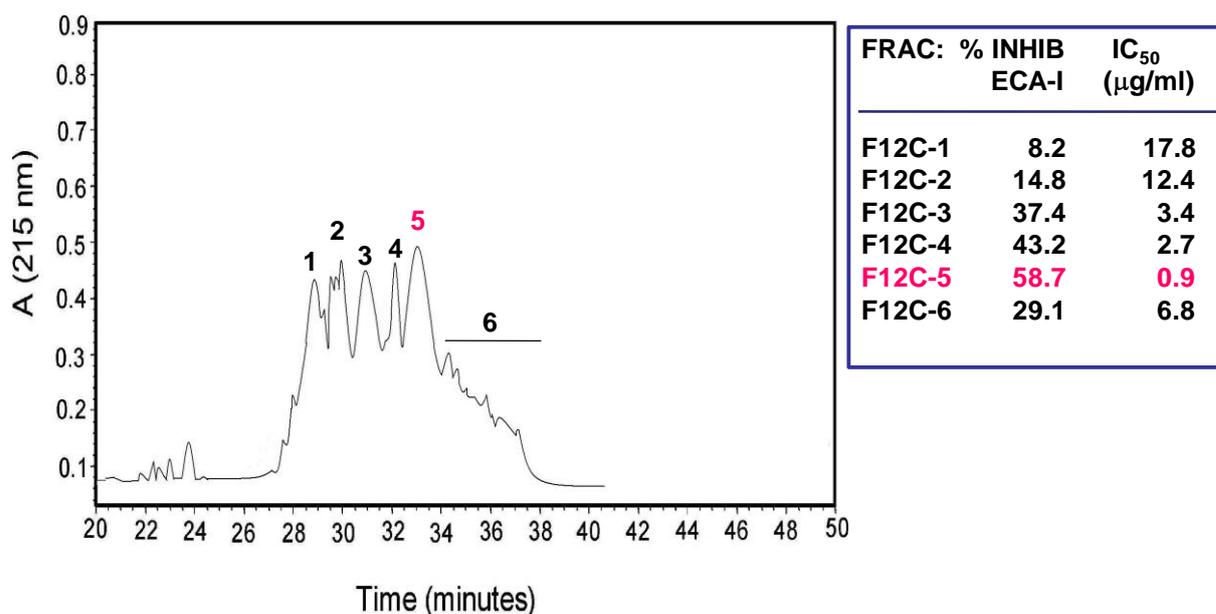
**Figura 18** Cromatografía semipreparativa RP-HPLC-C<sub>18</sub> de las fracciones más prometedoras (F12-2, F12-4, F15-2, F15-5), obtenidas con pepsina-pancreática.

Por lo tanto, se continuó con la purificación de la fracción F12-4, seleccionando tres tiempos de recolección de muestra para efectuar el posterior fraccionamiento, recolectando la primera fracción en el intervalo de tiempo entre 10 y 15 min (F12-A), la segunda entre 15-20 min (F12-B) y la tercera fracción entre 20-25 min (F12-C). Al igual que con la purificación preliminar de la fracción F7-4, las fracciones que eluyeron antes de los 10 min (Figura 19) fueron descartadas por las razones antes descritas (nula o poca probabilidad de valores interesantes de actividad inhibitoria de ECA-I). Después de efectuar el fraccionamiento de F12-4 en la columna semipreparativa en repetidas ocasiones, se evaluó la actividad inhibitoria en estas nuevas fracciones, con valores de inhibición de 29.037% para la fracción F12-A, 43.87% para la fracción F12-B y 63.12025.84% para la fracción F12-C, tomando 5  $\mu$ g de proteína en las determinaciones de la actividad antihipertensiva *in vitro*. Estas nuevas fracciones a partir de pepsina-pancreatina, recolectadas por HPLC empleando la columna semipreparativa, tuvieron mayor poder de inhibición sobre aquellas fracciones peptídicas a partir de alcalasa. Estos datos concuerdan con el mayor poder de inhibición de los hidrolizados preparados a partir de pepsina-pancreatina sobre los hidrolizados obtenidos con alcalasa.



**Figura 19.** Cromatograma de la muestra 12-4 separada por RP-HPLC en columna semipreparativa y valores de inhibición de ECA-I en las fracciones recolectadas.

Se escogió la tercera fracción (F12-C) con mayor actividad inhibitoria para continuar con la posterior purificación a través de la columna analítica, de la cual fueron obtenidas seis nuevas fracciones como se muestran en el cromatograma respectivo (Figura 20). El tiempo de elución de las muestras también fue de 50 min y las seis fracciones, recolectadas entre 29-38 min, presentaron actividad inhibitoria de ECA-I con valores entre 8.2 y 58.7%. A las tres fracciones con mayor poder inhibitorio de ECA-I (12C-3: 37.4%, 12C-4: 43.2% y 12C-5: 58.7%) se les determinó  $IC_{50}$  con valores de 3.4  $\mu\text{g/ml}$ , 2.7  $\mu\text{g/ml}$  y 0.90  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.



**Figura 20.** Cromatograma de la muestra 12-C con mayor actividad antihipertensiva, obtenida por HPLC en columna analítica y valores de inhibición en los seis regiones recolectadas

Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos son similares a los obtenidos en otros péptidos inhibidores de ECA-I purificados hasta ahora (Meisel, 1997; Yamamoto y col., 1997; FitzGerald y Murray, 2006; Megías y col., 2004).

En el análisis comparativo de perfiles de aminoácidos en las tres fracciones con mayor actividad de inhibición comparándola con la fracción de partida (F12-4) se evidenció la concentración de metionina y prolina en las fracciones 12C-4 y 12C-5 (Cuadro 27); metionina se incrementó 941.7% (0.36-3.75 mg/100mg de proteína) en el primero y 2905.6% (0.36-10.82) en el segundo; en tanto que prolina se incrementó 212.9%: 3.50-10.95 en el primero y 312.9%: 3.50-14.45 en el segundo. El único residuo de aminoácido que presentó incremento en todas las fracciones fue el triptófano, con 25.7%: 1.79-2.25) en la fracción F12C-3, 208.9%: 1.79-5.53 en la fracción F12C-4 y 303.9%: 1.79-7.23 en la fracción F12C-5. Fue evidente también el incremento de ciertos aminoácidos en la primera fracción F12C-3; así valina se incrementó 202%: 4.94-14.92; Asx se incrementó 34.9%: 12.96-17.49 y leucina se incrementó 10.2%: 11.80-13.00. Dos residuos de aminoácidos experimentaron

disminución en la concentración: arginina y alanina; el primero disminuyó 72.6% (6.06-1.66), 48.2% (6.06-3.14) y 64.7% (6.06-2.14) en las tres fracciones respectivamente; alanina disminuyó 26.5% (6.23-4.58), 32.7% (6.23-4.19) y 42.9% (6.23-3.56); tirosina experimentó descenso en la fracción F12C-3 (68.8%: 4.33-1.35) y en la fracción F12C-4 (81.3%: 4.33-0.81), en tanto que en la fracción F12C-5 hubo ausencia de este aminoácido; no se registró presencia de cisteína en estas tres fracciones recolectadas. En general hubo un incremento considerable en el contenido de residuos de aminoácidos con carácter hidrofóbico: 44.4% (34.05-49.16) en la primera fracción (F12C-3), 57.8% (34.05-53.74) en la segunda (F12C-4) y 81.2% (34.05-61.69) en la tercera (F12C-5). Al parecer, el contenido considerable de aminoácidos hidrofóbicos, de prolina, de metionina y de fenilalanina contribuyeron a la mejor actividad de inhibición de ECA-I obtenida en esta tercera fracción (58.7%) sobre las demás fracciones.

Con excepción en los niveles de ciertos aminoácidos, se pudo observar similitud en los perfiles de las seis fracciones recolectadas por RP-HPLC (Cuadro 28). Se podría afirmar que el mayor contenido de prolina y de triptófano en las fracciones más promisorias (F7B-7, F12C-4 y F12C-5), de metionina en F12C-4 y F12C-5 y de fenilalanina en las fracciones F7B-7 y F12C-4, juegan un papel predominante en los valores más altos alcanzados de actividad antihipertensiva, sobre las demás fracciones restantes.

**Cuadro 27.** Composición de aminoácidos en las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de ECA-I (12C-3, 12C-4 y 12C-5), obtenidas por HPLC a partir de la muestra F12-4 obtenida con pepsina-pancreatina

Aminoácido	Contenido (g/100 g of protein)					
	CP <sub>1</sub>	H12 (IC50:0.250 mg/ml)	F12-4 IECA:34.05%	F12C-3 37.4%	F12C-4 43.2%	F12C-5 58.7%
Asx <sup>1</sup>	12.80	12.82	<b>12.96</b>	<b>17.49</b>	15.66	12.53
Glx <sup>2</sup>	15.30	15.41	<b>13.49</b>	<b>9.56</b>	<b>7.21</b>	<b>5.98</b>
Ser	7.39	7.50	6.15	5.75	6.93	4.94
His	3.24	3.13	1.63	2.04	2.04	1.73
Gly	4.67	4.90	4.76	4.14	3.51	3.87
Thr	4.40	4.59	3.85	4.03	2.53	2.63
Arg	4.96	6.10	<b>6.06</b>	<b>1.66</b>	<b>3.14</b>	<b>2.14</b>
Ala	6.08	5.26	<b>6.23</b>	<b>4.58</b>	<b>4.19</b>	<b>3.56</b>
Pro	<b>7.62</b>	<b>2.25</b>	<b>3.50</b>	2.10	<b>10.95</b>	<b>14.45</b>
Tir	3.54	4.04	4.33	1.35	0.81	ND
Val	4.79	4.93	<b>4.94</b>	<b>14.92</b>	4.85	3.14
Met	<b>0.35</b>	1.05	0.36	0.58	<b>3.75</b>	<b>10.82</b>
Cis	3.87	0.72	<b>0.18</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
Ile	4.30	4.11	4.84	5.81	6.34	7.94
Leu	9.19	8.82	<b>11.80</b>	<b>13.00</b>	11.04	10.81
Phe	0.52	6.02	<b>8.21</b>	<b>5.93</b>	<b>7.08</b>	<b>3.74</b>
Lis	5.99	7.62	4.96	4.89	4.53	4.53
Trp	<b>0.98</b>	0.74	1.79	<b>2.25</b>	<b>5.53</b>	<b>7.23</b>
<b>Distribución de aminoácidos</b>						
Hidrofóbicos	34.10	33.17	34.05	<b>49.16</b>	<b>53.74</b>	<b>61.69</b>
Neutros	20.90	21.75	41.66	15.27	13.78	11.43
Hidrofílicos	45.00	45.08	19.25	35.64	32.57	26.91

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

**Cuadro 28.** Composición de aminoácidos en las fracciones con mayor inhibición de ECA-I, obtenidas por RP-HPLC a partir de la fracción F7-4 y de la fracción F12-4 obtenidas por cromatografía de filtración en gel.

Contenido (g/100 g of protein)						
Aminoácido	Alcalasa			Pepsina-Pancreatina		
	F7B-6	F7B-7	F7B-8	F12C-3	F12C-4	F12C-5
	<b>40.6%</b>	<b>48.8%</b>	<b>32.4%</b>	<b>37.4%</b>	<b>43.2%</b>	<b>58.7%</b>
Asx <sup>1</sup>	11.40	10.25	13.44	17.49	15.66	12.53
Glx <sup>2</sup>	8.67	8.57	10.63	9.56	7.21	5.98
Ser	9.83	7.99	8.35	5.75	6.93	4.94
His	4.04	2.29	2.11	2.04	2.04	1.73
Gli	6.11	5.65	4.80	4.14	3.51	3.87
Tre	5.87	4.89	4.67	4.03	2.53	2.63
Arg	2.19	1.83	2.19	1.66	3.14	2.14
Ala	8.72	8.46	9.62	4.58	4.19	3.56
Pro	1.43	<b>3.29</b>	2.13	2.10	<b>10.95</b>	<b>14.45</b>
Tir	2.75	2.20	1.35	1.35	0.81	ND
Val	5.41	6.82	5.85	14.92	4.85	3.14
Met	0.43	0.35	0.23	0.58	<b>3.75</b>	<b>10.82</b>
Cis	0.17	0.44	1.23	ND	ND	ND
Ile	10.07	10.87	9.88	5.81	6.34	7.94
Leu	11.81	10.59	12.09	13.00	11.04	10.81
Fen	5.18	<b>7.61</b>	4.89	5.93	<b>7.08</b>	3.74
Lis	3.70	3.56	3.28	4.89	4.53	4.53
Trp	2.23	<b>4.25</b>	3.32	2.25	<b>5.53</b>	<b>7.23</b>
<b>Distribución de Aminoácidos</b>						
Hidrofóbicos	<b>45.29</b>	<b>52.22</b>	<b>47.96</b>	<b>49.16</b>	<b>53.74</b>	<b>61.69</b>
Neutros	24.72	21.16	20.40	15.27	13.78	11.43
Hidrofílicos	30.00	26.50	31.64	35.64	32.57	26.91

Aminoácidos hidrofóbicos: Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp

Aminoácidos neutros : Ser, Gli, Tre, Tir, Cis

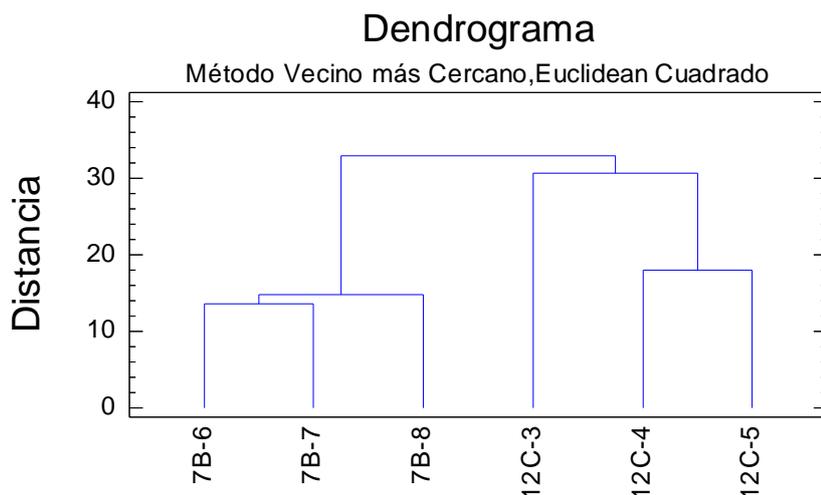
<sup>1</sup> Asx: Asp+Asn

<sup>2</sup> Glx: Glu+Gln

Por carecer de muestra suficiente en estas nuevas seis fracciones recolectadas ya no se pudo efectuar la secuenciación. Debido a la presencia de casi todos los 18 aminoácidos en todos y cada uno de seis perfiles respectivos, se pudo notar mayor

probabilidad de hallarse dos o más péptidos en los picos cromatográficos, indicando que aún faltaban varias etapas de purificaciones posteriores, ya que para efectuar la secuenciación es importante que en el pico cromatográfico se encuentre un solo tipo de péptido, ya que al haber dos o más péptidos, el método de secuenciación que se había seleccionado tiene esta limitante (Megías y col., 2009). Otra técnica de purificación y secuenciación más efectiva emplea HPLC acoplado a dos equipos de espectroscopía de masas de manera secuencial, mediante electrospray (Silva-Sánchez y col., 2008), pudiéndose efectuar la secuenciación sin importar la presencia de dos o más péptidos presentes; ya no hubo tiempo suficiente en esta investigación para emplear dicha técnica y conocer la secuencia de los aminoácidos que conforman los péptidos aislados por HPLC y con mayor actividad inhibitoria de ECA-I.

Efectuando un dendograma con los perfiles de aminoácidos en las seis fracciones recolectadas (Figura 21), se pudo notar posibles similitudes en las secuencias de aminoácidos de los péptidos contenidos en las fracciones 7B-6 y 7B-7 ( $p > 0.05$ ), pero diferentes a la secuencia de la fracción 7B-8 ( $p < 0.05$ ); similitud también en la secuencia de residuos de aminoácidos entre las fracciones 12C-4 y 12C-5 ( $p > 0.05$ ), pero diferentes a la secuencia de los péptidos contenidos en la fracción 12C-3. Cabe hacer notar que las fracciones con contenido similar en residuos de aminoácidos 7B-6 y 7B-7 tuvieron mejores valores de  $IC_{50}$  (2.9 y 1.7  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) sobre la fracción 7B-8, en tanto que las fracciones similares 12C-4 y 12C-5 presentaron mejores valores de  $IC_{50}$  (2.7 y 0.9  $\text{mg/ml}$ , respectivamente) sobre la fracción 12C-3, por lo que el análisis efectuado con el dendograma reveló una relación directa entre el contenido de aminoácidos y la actividad antihipertensiva.



**Figura 21.** Dendrograma de las 6 fracciones más promisorias

A pesar de que no se pudo revelar la secuencia de aminoácidos en los péptidos con mayor actividad inhibitoria, es probable hallar la presencia de al menos uno de los cuatro residuos de aminoácidos que se fueron incrementando en las diversas etapas de purificación: fenilalanina, prolina, triptófano y metionina, en las tres últimas posiciones de la región C-terminal. Estos hallazgos son acordes con la literatura, ya que está bien documentada la presencia de estos residuos de aminoácidos en los péptidos con actividad inhibitoria de ECA-I. La forma de inhibición hacia el sitio activo de la ECA-I podría darse mediante el anclaje directo de los grupos carbonilo de región C-terminal en los residuos de aminoácidos fenilalanina, prolina y triptófano con el átomo de zinc presente en el sitio activo de la ECA-I (denominado hipotéticamente como  $S_1$ ), nulificando su valencia y causando la inhibición de hidrólisis de dicho sitio activo; se ha propuesto también que la región N-terminal contribuye con esta inhibición al anclarse en las regiones aledañas al átomo de zinc con cargas negativas ( $S'_1$  y  $S'_2$ ); en el caso de metionina, el anclaje directo con el átomo de zinc de la ECA-I (sitio  $S_1$ ) ocurre con el átomo de azufre presente en su estructura, simular al grupo sulfhidrilo del captopril (Cushman y col., 1987 y 1989).

En este trabajo de investigación, estos péptidos obtenidos mediante hidrólisis de concentrados proteínicos a partir de grano germinado y sin germinar empleando las enzimas alcalasa, pepsina y pancreatina se podrían emplear en la formulación de alimentos funcionales para tratar trastornos originados por la hipertensión arterial. Sin bien alcalasa es una enzima que se caracteriza por generar péptidos con carácter hidrofóbico que confieren cierto nivel de amargor en alimentos, también puede generar péptidos bioactivos con capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I, involucrada de manera directa en la presión arterial. Pepsina y pancreatina son enzimas propias del sistema gastrointestinal en el organismo humano. Sin bien es cierto que las enzimas empleadas en este estudio fueron extraídas del páncreas bovino, los resultados hallados en este trabajo de investigación pueden servir como marco de referencia para la generación de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva en el tracto gastrointestinal. La ventaja del empleo de pepsina-pancreatina sobre otras enzimas para la generación de péptidos *in vitro* es que pueden llegar con más facilidad hacia el torrente sanguíneo y efectuar su labor antihipertensiva. Precisamente, aquellos péptidos que se obtengan en hidrólisis *in vitro* con otras enzimas, al llegar al tracto gastrointestinal tienen la probabilidad de ser hidrolizados por pepsina-pancreatina disminuyendo o anulando la función biológica benéfica para lo cual fueron creados.

Finalmente, las fracciones peptídicas obtenidas en este trabajo de investigación, mediante hidrólisis de concentrados proteínicos a partir de grano germinado y sin germinar empleando las enzimas alcalasa, pepsina y pancreatina, se podrían emplear en la formulación de alimentos funcionales para tratar trastornos originados por la hipertensión arterial.

## VIII. CONCLUSIONES

1.- Se logró recuperar el 34.3% de proteína en la obtención de concentrado proteínico a partir de grano sin germinar de *Phaseolus lunatus*. En grano germinado, esta recuperación fue ligeramente menor, de 30.84 %.

2.- Los GH obtenidos en los hidrolizados proteínicos con alcalasa, oscilaron entre 24.12 y 58.94 % hallándose actividad inhibitoria de ECA-I, con valores de  $IC_{50}$  entre 0.56 y 2.11 mg/ml.

3.- En el sistema secuencial enzimático pepsina-pancreatina, los GH oscilaron entre 15.35 y 37.07 %, pero con mejores valores de poder inhibitorio de ECA-I. En estos tratamientos enzimáticos, los valores de  $IC_{50}$  oscilaron entre 0.25 y 0.69 mg/ml.

4.- El GH no necesariamente está relacionado con la actividad antihipertensiva.

5.- En la cromatografía por filtración en gel de los hidrolizados H4, H7, H12 y H15 con mayor actividad antihipertensiva se recolectaron catorce fracciones peptídicas con valores de inhibición de ECA-I entre 8.65-45.9% y con pesos moleculares entre 1 y 0.75kDa.

6.- En la purificación por HPLC de las dos fracciones más promisorias F7-4 y F12-4 ambos a partir de CP<sub>1</sub>, se recolectaron fracciones peptídicas con mayor poder de inhibitorio de ECA-I. En F7-4 se recolectaron tres fracciones promisorias (F7B-6, F7B-7 y F7B-8) con  $IC_{50}$  entre 1.7 y 3.8  $\mu$ g/ml; a partir de F12-4, las fracciones promisoras fueron F12C-3, F12C-4 y F12C-5 con  $IC_{50}$  entre 0.9 y 3.4  $\mu$ g/ml

7.- En el perfil de aminoácidos de estas seis nuevas fracciones fue evidente el incremento de prolina, triptófano, metionina y fenilalanina, así como también en el contenido de aminoácidos hidrofóbicos.

8.- Las fracciones peptídicas obtenidas en esta investigación se podrían emplear en la formulación de alimentos funcionales para tratar trastornos originados por la hipertensión arterial.

## NOMENCLATURA

### Aminoácidos:

**A = Ala** Alanina

**B = Asx** Puede ser D ó N

**C = Cys** Cisteína

**D = Asp** Ácido aspártico

**E = Glu** Ácido glutámico

**F = Phe** Fenilalanina

**G = Gly** Glicina

**H = His** Histidina

**I = Ile** Isoleucina

**K = Lys** Lisina

**L = Leu** Leucina

**M = Met** Metionina

**N = Asn** Asparragina

**P = Pro** Prolina

**Q = Gln** Glutamina

**R = Arg** Arginina

**S = Ser** Serina

**T = Thr** Treonina

**V = Val** Valina

**W = Trp** Triptófano

**X** Aminoácido no determinado

**Y = Tyr** Tirosina

**Z = Glx** Puede ser E ó Q

## **Continuación Abreviaturas**

**Ao** Angiotensinógeno

**Ang-I** Angiotensina-I

**Ang 1-7** Angiotensina 1-7

**Ang 1-9** Angiotensina 1-9

**Ang-II** Angiotensina-II

**AT<sub>1</sub>** receptores AT<sub>1</sub>

**AT<sub>2</sub>** receptores AT<sub>2</sub>

**AT<sub>3</sub>** receptores AT<sub>3</sub>

**AT<sub>4</sub>** receptores AT<sub>4</sub>

**Ca<sub>2+</sub>** ion calcio

**COOH** Grupo carboxilo terminal

**GH** Grado de hidrólisis (%)

**Da** Daltones

**ECA** Enzima Convertidora de Angiotensina

**ECA-I** Enzima Convertidora de Angiotensina-I

**ECA-2 o hECA** Enzima homóloga de la ECA

**ECV** enfermedades cardiovasculares

**g** gramo

**HTAS** hipertensión arterial sistémica

**h** hora(s)

**ha** hectárea

**H<sub>2</sub>O** molécula de agua

**sECA** forma somática de la ECA-I

**IC<sub>50</sub>** cantidad de proteína requerida que inhibe 50% la actividad de la ECA

**kDa** KiloDaltones

**K<sup>+</sup>** catión potasio

**M** molaridad

**min** minutos

**ml** mililitro

**N** normalidad

**Na<sup>+</sup>** catión sodio

**NaOH** hidróxido de sodio

**Continuación Abreviaturas**

**NH<sub>2</sub>**

grupo amino terminal

**nM** nanomoles

**pH** potencial de hidrógeno

**ppm** partes por millón

**p/v** relación peso-volumen

**RCV** riesgo cardiovascular

**SRA** Sistema Renina-Angiotensina

**tECA** forma testicular de la ECA

**μl** microlitro

**μM** micromoles

**μg** microgramo

## IX. REFERENCIAS

- Abubakar, A, Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, e Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*; 81:3131-3138.
- Adamson, N.,J., Reynolds, E.C. (1995). Characterization of Multiply Phosphorylated Peptides Selectively Precipitated from Pancreatin Casein Digest. *Journal of Dairy Science* 78:2653-2659.
- Adler-Nissen J (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256-1262.
- Alaiz M, Navarro JL, Giron J, y Vioque E (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *Journal of Cromatography*, 591, 181–186.
- Anon (1999). *International Rules for Seeds Testing*. Published by The International Seed Testing Association (ISTA), Switzerland.
- A.O.A.C. (1995). *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemist*, 15th Ed. Washington D.C.
- Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. e itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57:319-324.
- Arnoldi A, D'Agostina A, Boschin G, Lovati MR, Manzoni C y Sirtori CR (2001). Soy protein components active in the regulation of cholesterol homeostasis. *Special Publication - Royal Society of Chemistry*. 269 *Biologically-Active Phytochem Food*:103-106.
- Arntfield SD, Ismond MAH, Murray ED (1985). The fate of antinutritional factors during the preparation of a faba bean protein isolate using a micellization technique. *Can Inst Food Sci Technol J*. 18:137-143.
- Augustin J y Klein P (1989). Nutrient Composition of Raw, Cooked, Canned and Sprouted Legumes. In *Legumes*. Chap. 7, Ed. Matthews and Dekker, New York pp. 187-204.
- Badui-Dergal, S. (1986). *Química de los alimentos*. 3ª edición, editorial Alhambra Mexicana, México:15-16.
- Bau H, Villaume C, Nicolas J, Méjean L (1997). Effect of Germination on Chemical Composition, Biochemical Constituents and Antinutritional Factors of Soya Bean (*Glycine max*) Seeds. *Journal of Science Food and Agriculture*; 73: 1-9.
- Betancur AD, Pérez FV, y Chel GL (1998). *Procesamiento Tecnológico del grano de Phaseolus lunatus : Extracción y Caracterización de Proteína y Almidón*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). *Memorias Seminario de Investigación Precompetitiva XI.8*. Quito, Ecuador.

- Betancur-Ancona D, Gallegos-Tintoré S y Chel-Guerrero L (2004b). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. Journal of Science of Food and Agriculture. Vol. 84:1193-1201.
- Bourges H (1987). Las Leguminosas en La Alimentación Humana. Cuadernos de Nutrición. 10:17-32.
- Brown, N.J. y Vaughan, D.E. (1998). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. Circulation. Journal of the American Heart Association; 97:1411-1420.
- Bünning, P. (1987). Kinetic properties of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 10:S31-S35.
- Byun HG y Kim SK (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. Process Biochemistry, 36, 1155–1162.
- Clare, D. A. y Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. Journal of Dairy Science, 83:1187-1195.
- Coates, D., Isaac, R.E., Cotton, J., Siviter, R., Williams, T.A. Shirras, A., Corvol, P. y Dive, V. (2000). Biochemistry. 39: 8963-8969.
- Collins R, Peto R, Macmahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO y Hennekens CH (1990). Blood Pressure, stroke and coronary artery disease. Part 2. Short term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. Lancet; 335: 827-838.
- Colomé C, Bilbao T, Ledesma L y Zumárraga R (1993). Evaluación preliminar de Algunos Tóxicos Naturales en Leguminosas de mayor Consumo en el Estado de Yucatán. Tecnología de Alimentos 28:8-13.
- Corvol, P. Williams, T.A. y Soubrier, F. (1995). Methods Enzymol., 248:283-305.
- Corvol, P. y Williams, T.A. (1996). In Barrett, A.J., Rawlings, N.D. y Woessner, J.F. (eds), Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, New York: 1066-1076.
- Cushman, D.W. y Cheung, H.S. (1971a). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. Biochim Pharmacol 20:1637-1648.
- Cushman, D. W., Ondetti, M.A., Gordon, E.M., Natarajan, S., Karanewsky, D.S., Krapcho, J. y Petrillo Jr., E.W. (1987). Rational design and biochemical utility of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 10:S17-S30.
- Cushman, D.W., Wang, F.L., Fung, W.C., Grover, G.J., Harvey, C.M., Scalese, R.J., Mitch, S.L. y Deforrest, J.M. (1989). Comparisons in vitro, ex vivo, and in vivo of the actions of seven structurally diverse inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). British Journal of Clinical Pharmacology, 28:115S-131S.
- Chau, C.F., Cheung, K.C.P. y Wong, Y.S. (1997). Effect of various processing methods on antinutrientes and in vitro digestibility of protein and starch of two indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(7):2500-2503.

- Chel GL (2001). Fraccionamiento de las proteínas del grano de *P. lunatus* y sus principales características bioquímicas, térmicas y funcionales. Tesis de doctorado. ENCB Instituto Politécnico Nacional. México D.F. pp. 47-52.
- Chel-Guerrero L, Pérez-Flores V, Betancur-Ancona D, Dávila-Ortíz (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50(3):584-591.
- Chiba, H. y Yoshikawa, M. (1991). Bioactive peptides derived from food proteins. *Kagaku to Seibutsu*, 29:454-458.
- Chobaniam AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ, and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Comité (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA*:289:2560-2572.
- Cho MJ, Unklesbay N, Hsieh FH y Clarke AD (2004). Hydrophobicity of Bitter Peptides from Soy Protein Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* (52):5895-5901.
- Dagnia GS, Petterson DS, Bell RR y Flanagan FV (1992) Germination alters the chemical composition and protein quality of Lupin seed. *J Sci Food Agric* 60: 419-423.
- Darragh, A. J. (2002). Physiological impact of milk protein-encrypted bioactive peptides. *Bulletin of the International Dairy Federation.*, 375:25-31.
- Deddish, P.A., Wang, L., Jackman, H.L., Michel, B., Wang, J., Skidgel, R.A. y Erdös, E.G. (1996). Single domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characteristics and properties. *J Pharmacol Exp Ther.*279:1582–89.
- Dibofori AN, Okoh PN, Onigbinde AO. Effect of germination on the cyanide and oligosaccharide content of lima beans (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Food Chemistry* 1994; 51:133-136.
- Dorer, F.E., Skeggs, L.T. Kahn, J.R., Lentz, K.E. y Levine, M. (1970). Angiotensin-converting enzyme: Method of assay and partial purification. *Anal Biochem* 33:102-113.
- Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51(21):6300-6308.
- Dzudie, T. y Hardy, J. (1996). Physicochemical and functional properties of flours prepared from common beans and green mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4(10):3029-3032.
- FAO/WHO/UNU (2002). Agricultural bulletin board on data collection, dissemination and quality of statistics. Geneva: World Health Organization.
- FitzGerald RJ y Meisel H (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Bri J Nutr*:84:S33-S37.

- FitzGerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*. 134: 980-988.
- Fotherby MD y Panayiotou B (1999). Antihypertensive therapy in the prevention of stroke: what, when and for whom? *Drugs*, 58, 663–674.
- Fujita, H. y Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44:123-127.
- Fujita H, Yokohama K, y Yoshikawa M (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65, 564–569.
- Fujita T (2000). Soya proteins, water-soluble fibers and gelatins, basic aminoacids, and/or basic peptides as compositions for prevention of obesity. *Jpn Kokai Tokkyo Koho, JP 2000001440 A2 7*, 5 pp.
- Fukushima D (1991). Structures of Plant Storage Proteins and their Functions. *Food Rev. Int.* 7: 356-381.
- Giami AY (2003a). Nutritional evaluation of germinated fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seeds. *Plant food for human nutrition* 58:1-9.
- Giami AY (2003b). Effect of germination on bread-making properties of wheat fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) seed flour blends. *Plant food for human nutrition* 58:10-13.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3898-3904.
- He G, Xuan G, Ruan H (2005). Optimization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition by rice dregs hydrolysates using response surface methodology. *Journal of Zhejiang University Science*; 6B (6):508-513.
- Johnston, J.I. (1992). Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of Hypertension*, 10:S13-S26.
- Jung, W., Mendis, E., Je, J., Park, P., Son, B., W., Kim, H., C., Choi, Y., K. y Kim, S. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Food Chemistry*; 94: 26-32
- Hayakari M, Kondo Y, y Izumi H (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84, 361–369.
- Helmer, O.M. (1957). Differentiation between two forms of angiotonina by means of spirally cut strips of rabbit aorta. *Am J Physiol* 188:571-577.
- Henn, L.R. y Netto, M.F. (1998). Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(8):3009-3015.

- Hoover R, Rorke SC y Martin AM (1991). Isolation and Characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Starch. *J. Food Biochem.* 15:117-136.
- Hyun CK. y Shin HK. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry.* 36, 65–71.
- Izzo JI y Black H R (2003). *Hypertension Primer, The essentials of high blood pressure, basic science, population science and clinical management*, third edition, from the Council for High Blood Pressure Research, American Heart Association.
- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., & Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, 41, 1961–1966.
- Karaki, H., Doi, K., Sugino, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakam, U. y Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 96:367-371.
- Karaki, H., Kuwahara, M., Sugano, S., Doi, C., Doi, K., Matsumura, N. y Shimizu, T. (1993). Oral administration of peptides derived from bonito bowels decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats by inhibiting angiotensin-converting enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 104:351-353.
- Kasai N e Hikehara H (2005). Stepwise Extraction of Proteins and Carbohydrates from Soybean Seed. *J. Agric. Food Chem.* (53):4245-4252.
- Kay ED (1979). *Legumbres Alimenticias*. Acribia S.A. España. pp. 394-400.
- Kim SY, Peter SW y Khee CR (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. Vol. 38: 651-656.
- Kim YK, Yoon S, Yu DY, Lonnerdal B y Chung B H (1999). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\alpha$ 1-casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research*, 66, 431–439.
- Kitts D D (1993). Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Can. J. Physiol. Pharm.* 72, 423-434.
- Kornberg, H.L. y Beevers, H., (1957). The glycoylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Biochem. Biophys. Acta* 26, 517–531.
- Levens, N.R. (1985). Control of intestinal absorption by the renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology*, 249:G3-G15.
- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, McKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL y Robertson JW (1998). Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet*, 352, 179–184.

- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McInnes GT, Meredith PA, Murray LS y Reid JL (1999). Is cancer related to hypertension or to its treatment? *Clinical Experimental Hypertension*, 21, 937–946.
- Li, C. H., Matsui, T., Matsumoto, K., Yamasaki, R. y Kawasaki, T. (2002). Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *Journal of Peptide Science*, 8:267-274.
- Li GH, Le GW, Liu H and Shi YH (2005). Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Sci Tech Int*. 11(4): 281-287.
- Loscalzo J, Creager MA y Dzau V (1996). *Vascular Medicine, a textbook of vascular biology and diseases*. 2nd. Edition, Little, Brown and Company, Boston, New York, Toronto & London.
- Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK y Sirtori CR (2000). Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *Journal of Nutrition*;130(10):2543-2549.
- Maeno, M., Yamamoto, N. y Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79:1316-1321.
- Mark KS y Davis TP (2000). Stroke: development, prevention and treatment with peptidase inhibitors. *Peptides*, 21, 1965–1973.
- Marczak, E.D., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, A.W., Yoshikawa, M.(2003). New antihypertensive peptides isolated from rapessed. *Peptide*.24: 791-798.
- Martínez, R.R. (2003). Hidrólisis enzimática de concentrados proteínicos de *Phaseolus lunatus* utilizando proteasas comerciales. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. FIQ-UADY. Mérida, Yucatán, México: 33-34.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykininpotentiating activity on the uterus and ileum of rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49:1405-1409.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987a). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitors derived from an enzymatic hydrolysate of casein. 5.Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha$ s1-casein.*Agricultural and Biological Chemistry*, 51:2557-2561.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987b). Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51:1581-1586.
- Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M y Osajima Y (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 2244–2245.

- Matsufuji H, Matsui T, Ohshige S, Kawasaki T, Osajima K y Osajima Y (1995). Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 59, 1398–1401.
- Matsui T, Li CH y Osajima Y (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal of Peptide Science*, 5, 289–297.
- Matsui T, Li CH, Tanaka T, Maki T, Osajima Y y Matsumoto K (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 23, 427–431.
- Matsui, T., Yuki-yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. (2002c). Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:80-86.
- Megías C. (2008). Purificación de péptidos bioactivos a partir de hidrolizados proteicos de girasol. Tesis de doctorado. Instituto de la Grasa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas: 189-201.
- Megías C, Yust MM, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alaiz M y Millán F y Vioque J (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide after Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. *J Agric. Food Chem.* (52):1928-1932.
- Megías C, Pedroche J, Yust MM, Alaiz M, Girón-Calle J, Millán F y Vioque J (2009). Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *LWT - Food Science and Technology*. 42: 228-232.
- Meisel H (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43, 119-128.
- Meisel H (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust J Dairy Tech.*56:83-92.
- Meisel H y Bockemann W (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:207-215.
- Meisel, H. y Schlimme, E. (1994). Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). In  $\beta$ -casomorphins and related peptides: recent developments, ed. V. Brantl and H. Teschemacher. Weinheim, Germany: VCH, pp. 27-33.
- Miguel, M., Alexandre, M.A., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2006). Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:726-731.

- Mito, K., Kuwahara, M., Matsumura, N., Shimizu, T., Sugano, S. y Karaki, H. (1996). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *European Journal of Pharmacology*, 304:93-98.
- Miura H (2002). Nonsugar beverages and diet compositions containing soybean protein hydrolysates. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 2002010764 A2 15, 4 pp.
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. y Maruyama, S. (1991a). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in an  $\alpha$ -zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55:1313-1318.
- Montgomery DC (1998). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericano. Décima impresión; México:101-115.
- Mullally, M.M., Meisel, H. y Fitzgerald, R.J. (1996). Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 377:259-260.
- Mullally MM, Meisel H, y FitzGerald RJ (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402, 99–101.
- Mullally, M.M., Meisel, H. y Fitzgerald, R.J. (1997b). Identification of a novel Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402:99-101.
- Murray CJL y Lopez AD (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet*; 349: 1269-1276.
- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K y Kuwata T (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*; 281(1):11-17.
- Nakagomi, K., Yamada, R., Ebisu, H., Sadakane, Y., Akizawa, T. y Tanimura, T. (2000). Isolation of acein-2, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from a tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Letters*, 467:235-238.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. y Takano, T. (1995a). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78:777-783.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. y Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78:1253-1257.
- Neves RAM, De Mira NVM y Marquez UML (2004). Caracterización de hidrolizados enzimáticos de pescado. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas* 24 (1).jan-mar:101-108.
- Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001; 66 (5): 642-646.
- Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppala, A., Piilola, K., Korpela, R., Tossavainen, O., Korhonen, H. y Vapaatalo, H. (2000).  $\alpha$ -lactorphan lowers

- blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66:1535-1543.
- Oka, T., Morihara, K. (1970). Specificity of Pepsin: Size and property of the active site. *Febs Letters* (10):222-224
- Ortega-Nieblas, M. (1996). Protein quality and nutritional factors of wild legume seed from the Sonoran desert. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8):3130-3132.
- Oshima, G., Shimabukuro, H. y Magasawa, K. (1979). Peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 566:128-137.
- Oshodi AA y Aletor VA (1993). Functional Properties of Haemagglutinins (Lectins) Extracted From Some Edible Varieties of Lima Beans (*Phaseolus lunatus* Linn). *Int. J. Food Sci. Nut.* 44:133-136.
- Otto, T., Balk, B. y Czuchajowska, Z. (1997). Wet fractionation of garbanzo bean and pea flours. *Cereal Chemistry* 74(2):141-146.
- Paredes-López O y Ondorica-Falomir C (1986). Production of safflower protein isolates: Composition, yield and protein quality. *Journal of Science and Food Agriculcture* 37:1104-1109.
- Paredes LO y Mora ER (1989). Germination of amarant seeds- effect on nutrient, composition and color. *J. Food Sci.* 54 (3) 761-763.
- Parvathy, S., Oppong, S. Y., Karran, E. H., Buckle, D. R., Turner, A. J. y Hooper, N. M. (1997).Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochemical Journal*, 327:37-43.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F. y Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:960-965.
- Pedroche, J.; Yust, M.M.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Mateo, C.; Guisán, J.M.; Millán, F. (2002b) Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enzyme and Microbial Technology.* 31, 711-718.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Megías, C., Lqari, H., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F. and Vioque, J. (2004b). Utilisation of rapeseed protein for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry.* 354-358.
- Pérez FV (1999). Caracterización fisicoquímica y funcional de harinas y concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis*. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Química. Universidades Autónoma de Yucatán.

- Pihlanto, A., Rokka, T. y Korhonen, H. (1998). Angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptides from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8:325-331.
- Pihlanto, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. y Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67:53-64.
- Pitt B (1997). ACE inhibitors in heart failure: prospects and limitations. *Cardiovascular Drug Therapy*, 11, 285–290.
- Readhead (1990). Utilización de Alimentos Tropicales: Frijoles Tropicales. Estudio FAO. Alimentación y Nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 51-53.
- Rodríguez-Ambriz, S.L., Martínez-Ayala, A.L., Millán, F. y Dávila-Ortiz, G. (2005). Composition and Functional Properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60:99-107.
- Rodríguez C, Frias J, Vidal-Valverde C, Hernández A.(2008). Correlation between some nitrogen fractions, lysine, histidine, tyrosine, and ornithine contents during germination of peas, beans, and lentils. *Journal of Food Chemistry*; 108: 245-252.
- Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuda, S., Morimatsu, F. y Nishimura, T. (2006). Actino Mechanism of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Chicken Breast Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54:942-945.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (2000). Isolation and structural análisis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83:1434-1440.
- Sánchez-Vioque R, Clemente A, Vioque J, Bautista J y Millán F (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional propeties and protein characterization. *Journal of Food Chemistry*. Vol. 64:237-243.
- Sangronis E, Rodríguez M, Cava R y Torres A (2006). Protein quality of germinated *Phaseolus vulgaris*. *European Food of Research Technology*. Vol. 222:144-148.
- Seppo L, Kerojoki O, Suomalainen T y Korpela R (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*;57:124-127.
- Silva-Sánchez C, Barba de La Rosa AP, León-Galván MF , De Lumen BO, León-Rodríguez A y González de Mejía E (2008). Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 1233-1240.
- Skeggs, L.T., Kahn, J.R. y Shumway, N.P. (1956). The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med* 103:295-299.

- Smacchi E y Gobbetti M (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol*;17:129-141.
- Soubrier, F., Hubert, C., Testut, P., Nadaud, S., Alhenc-gelas, F. y Corvol, P. (1993a). Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *Journal of Hypertension*, 11:471-476.
- Suetsuna, K. (1998). Isolation and characterisation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9:415-419.
- Suetsuna, K. y Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11:450-454.
- Sullivan GH y Davenport LR (1993). Dry Edible Beans: a New Crop Opportunity For the East North Central Region. In : *New Crops*. Janick, J., Simon, J.E. (Eds),. Wiley, New York. pp. 585-588.
- Stevens, R.L. Micalizzi, E.R., Fesler, D.C. y Pals, D.T. (1972). Angiotensin I converting enzyme of calf lung. Method of assay an partial purification. *Biochemistry* 11:2999-3007.
- Takano T (1998). Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int Dairy J*; 8(5/6):375-381.
- Tauzin J, Miclo L y Gaillard JL (2002). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine RS2-casein. *FEBS Lett*: 6:369-374.
- Turner, A.J. y Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23:177-183.
- Tzacos, A.G, Galanis, A., Spyroulias, G.A., Cordopatis, P., Manessi-Zoupa, E. y Gerothanassis, I.P. (2003). Structure-function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl- activation and peptide hydrolysis mechanisms. *Journal of Protein Engineering*. 16 (12): 993-1003.
- Utsumi S (1992). *Plant Food Protein Engineering. Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press. pp 89-208.
- Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, y Thuillez C (2000). Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure: role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation*, 102, 351–356.
- Vázquez, V.A, Cruz, A.N-M, Vázquez, C.A. y Millán, P.A. (1998). Inhibidores de la Enzima de Conversión de la Angiotensina en el Tratamiento de la Hipertensión Arterial. *Revista Cubana de Farmacología*. 32 (3): 204-210.
- Velásquez-Monroy O., Rosas- Peralta M., Lara-Esqueda A., Pastelón-Hernández G., Attie F. y Tapia-Conver R. (2000). Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA). *Archivos de Cardiología de México* Vol. 72 (1): 2-15.

- Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Yust MM y Millán F (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Revista Grasas y Aceites*. Vol. 52, Fasc.2:127-131.
- Wu, J.P. y Ding, X.L. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:501-506.
- Wu, J.P. y Ding, X.L. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35:367-375.
- Yamamoto, N., Akino, A. y Takano, T. (1994b). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77:917-922.
- Yamamoto, N (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*; 43, 129-134.
- Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, 82:1388-1393.
- Yamamoto N y Takano T (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*; 43:159-164.
- Yang, H.Y, Erdös, E.G. y Levin, Y. (1971). Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Therap* 177:291-300.
- Yang Y, Marczak ED, Yokoo M, Usui H y Yoshikawa M (2003). Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4897-4902.
- Yokokawa K, Chiba H y Yoshikawa M (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 56, 1541-1545.
- Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takeyama H e Itani T (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 128: 27-33.
- Yoshioka, M., Erickson, R., Woodley, J., Gulli, R., Guan, D. y Kim, Y. S. (1987). Role of rat intestinal brush-border membrane angiotensin-converting enzyme in dietary protein digestion. *American Journal of Physiology*, 253:G781-G786.
- Yust MM, Pedroche J, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J y Millán F (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestión of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry; Elsevier* (81):363-369.

## PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS, UNA ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO DE ORIGEN NATURAL: UNA REVISIÓN

### ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES, AN ALTERNATIVE FOR TREATMENT OF NATURAL ORIGIN: A REVIEW

Torruco-Uco, J. G.<sup>2</sup>; Domínguez-Magaña, M. A.<sup>2</sup>; Dávila-Ortíz, G.<sup>2</sup>; Martínez-Ayala, A.<sup>3</sup>; Chel-Guerrero, L. A.<sup>1</sup>; Betancur-Ancona, D. A.<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Av. Juárez No. 421 Cd. Industrial, C.P. 97288, Apdo. Postal 1226-A Mérida, Yucatán, México. <sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México. <sup>3</sup>Centro de Desarrollo de Producto Bióticos. Instituto Politécnico Nacional, México.

Recibido/Received 25-02-2008; aceptado/accepted 09-07-2008

\*Autor para la correspondencia/Corresponding author. E-mail: bancona@uady.mx

#### Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death in the world and Mexico is not exception, since a great number of people suffer of hypertension and the use of synthetic drug for the control of this disease can cause in the organism diverse secondary reactions, such as: cough, taste perturbation, rash in the skin, among others. An alternative for the prevention and/or treatment of high blood pressure is the use of bioactive compounds obtained from natural sources (animal or vegetable) such as the antihypertensive peptides, since these can reduce the arterial pressure in the organism, through of the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition which is the responsible in to alter the blood pressure in the organism. Due to the above-mentioned, already exist in the European market, in Japan and USA products diverse that contain tripeptides such as Valine-Proline-Proline (VPP) and Isoleucine-Proline-Proline (IPP) and these they have the capacity in reducing the arterial pressure in human. The aim of this review is to diffuse more the use of antihypertensive peptides as an alternative in the treatment of the arterial pressure.

#### Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial y México no es la excepción, ya que existe un gran número de personas que padecen de hipertensión arterial y el uso de medicamentos sintéticos para el control de dicha enfermedad pueden causar diversos efectos secundarios en el organismo, tales como: tos, perturbación en el sabor, salpullido en la piel, entre otros. Por lo que, una alternativa para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión arterial es el uso de componentes bioactivos obtenidos de fuentes naturales (animal o vegetal) tales como los péptidos antihipertensivos, ya que estos pueden reducir la presión arterial en el organismo, mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la cual es la responsable que se altere la presión sanguínea en el organismo. Debido a lo anterior, ya existen en el mercado Europeo, en Japón y EUA diversos productos que contienen tripéptidos tales como Valina-Prolina-Prolina (VPP) y Ileucina-Prolina-Prolina (IPP) y estos tienen la capacidad en reducir la presión arterial en humanos. Por lo que, el objetivo de esta revisión es difundir el uso de los péptidos antihipertensivos como una alternativa en el tratamiento de la presión arterial.

Keywords: Protein, antihypertensive peptides, arterial hypertension, functional food

Palabras clave: Proteína, péptidos antihipertensivos, hipertensión arterial, alimento funcional

#### INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud a nivel mundial han incrementado ya que casi 17 millones de personas mueren anualmente y las causas que producen esta mortalidad se atribuye a diversos factores relacionados con enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, índice de colesterol elevado, diabetes, el estilo de vida (obesidad,

falta de actividad física, mala nutrición, tabaquismo), una mala educación y la pobreza (WHO, 2002). En México, las cifras también están aumentando con respecto a éste tipo de enfermedades, principalmente en el caso de la hipertensión arterial, ya que la prevalencia de esta enfermedad para el año 2000 fue del 30,05 %, es decir, más de 16 millones de mexicanos entre los 20 y 60 años padecen esta enfermedad, siendo los estados del norte de

la República Mexicana, los que alcanzaron cifras mayores con un 30 % de incidencia. La Encuesta Nacional de Salud en el 2000 en México, mostró de manera notable que el 61 % de los hipertensos de este país desconocían ser portadores del mal, situación que es de extrema importancia ya que, en general, el paciente acude al médico cuando ya han transcurrido varios años desde su inicio y probablemente ya existe en su mayoría daños a órganos vitales como el corazón, cerebro, retina y riñón (Velázquez *et al.*, 2003).

La hipertensión arterial es un padecimiento multifactorial que puede dañar órganos vitales tales como los mencionados anteriormente, por lo que está considerada como un problema importante de salud pública. Sin embargo, esta enfermedad ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos que inhiben a la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), mecanismo responsable de la alteración de la presión normal de la sangre, cuando esta circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano. Entre los medicamentos más comunes en el mercado se encuentran los inhibidores de la ECA, los  $\beta$ -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, una de las desventajas de estos medicamentos de origen sintético, es que son caros y además pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo en su uso como la tos, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel (Atkinson y Robertson, 1979).

Actualmente la ciencia de los alimentos está promoviendo un nuevo concepto de nutrición que incluye a aquellos alimentos que presentan una potencialidad en el mejoramiento de la salud y disminuyen los riesgos de enfermedades en el cuerpo humano (Korhonen, 2002), por lo que, muchas industrias alimentarias han incluido en sus productos destinados para consumo humano ciertos nutrientes y componentes bioactivos extraídos de fuentes animales y vegetales, capaces de ofrecer garantías de salud a los consumidores. Entre los beneficios que ofrecen estos productos se encuentran aquellos que están enriquecidos con péptidos bioactivos que tienen la capacidad de disminuir la presión arterial en el ser humano, por lo que, ya existen en el mercado diversos productos como el Evolus™ siendo éste el primero en ser comercializado en Finlandia en el año 2000, el LH™ en Islandia, el Vita de Kaiku™ en España, el Emmi-Evolus™ en Portugal que básicamente son leches fermentadas por diferentes especies de lactobacilos que actúan sobre la caseína, el principal componente de la leche (Jauhiainen *et al.*, 2002) y el Calpis™ el cual es elaborado en Japón y se obtiene igual por fermentación mediante el uso cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Hata *et al.*, 1996). En todos los casos anteriores la acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por VPP e IPP los cuales, purificados o como componentes de

los productos hidrolizados, han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto (Rasmussen, 2005). Con base a lo anterior, actualmente diversos investigadores se han dado a la tarea de aislar y purificar péptidos con actividad antihipertensiva de diferentes fuentes vegetales y animales, siendo la fuente vegetal la que está cobrando mayor importancia debido a que son materias primas que pueden obtenerse más fácilmente, tienen bajo costo y porque pueden presentar diversas actividades fisiológicas sobre el organismo humano, entre la cual destaca el efecto antihipertensivo. Debido a lo anterior, el objetivo de esta revisión es dar a conocer el amplio panorama de los péptidos antihipertensivos y su posible uso en la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial en el ser humano.

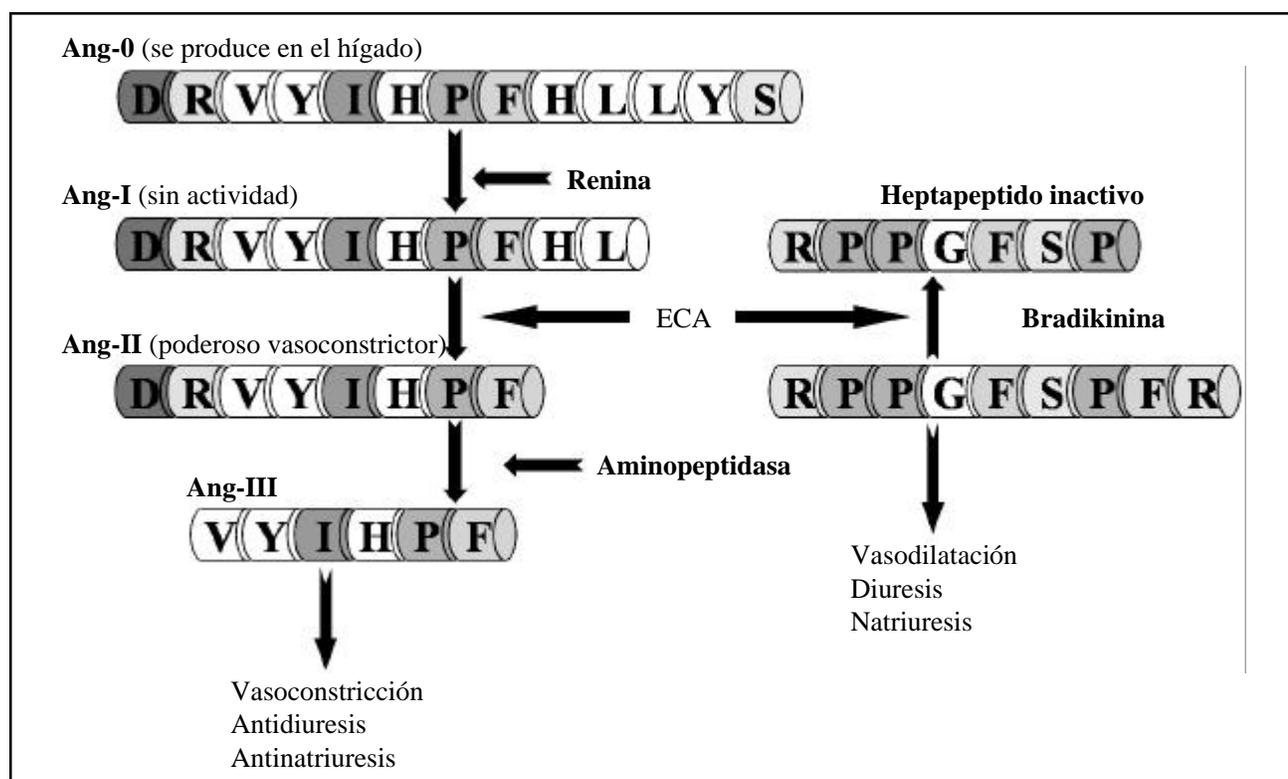
### Generalidades de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial es elevación patológica de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos (Hong *et al.*, 2003) y está asociada con daño en las arterias y en diversos parénquimas (conglomerados de células de igual diámetro formando meatos entre sí y que pueden elaborar y almacenar sustancias). Entre estos, son especialmente susceptibles el corazón, riñón, cerebro y retina, cuyo daño es proporcional tanto a la magnitud como a la duración de la hipertensión (Loscalzo *et al.*, 1996). Los niveles normales de presión arterial de una persona sana debe de ser de 120/80 mmHg (presión sistólica/diastólica). Sin embargo, una presión arterial alta se considera cuando los niveles sobrepasan de 130/85 mmHg de presión y es cuando se le debe prestar atención a la misma para ser atendida y poder controlarla antes que incremente y pueda dañar órganos importantes. A niveles mayores de 180/110 mmHg (denominada de grado 3 ó extremo) se pueden presentar en el individuo apoplejías (embolias) causando parálisis e inclusive la muerte (Rosas *et al.*, 2005).

### Papel del sistema renina-angiotensina sobre la presión arterial

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los sistemas de regulación central de la presión arterial sanguínea y la patogénesis de la hipertensión está estrechamente asociada con desórdenes del SRA (Matsui *et al.*, 2003). Este sistema estimula la activación simpática de secreción de renina por las células yuxtglomerulares (Brown y Vaughan, 1998), siendo el riñón, la principal fuente de renina activa en la circulación, aunque también se han encontrado en diversos tejidos de animales y humanos, tales como el cerebro, glándula adrenal, glándula submandibular, ovarios, testículos, próstata, cerebro, entre otros (Pan y Gross, 2005).

El angiotensinógeno (Ao) es una glicoproteína que se produce en el hígado y es el sustrato inicial del sistema renina-angiotensina-aldosterona. La renina es la enzima



**Figura 1.** Modelo del sistema renina-angiotensina (SRA) (De la Serna, 2006).

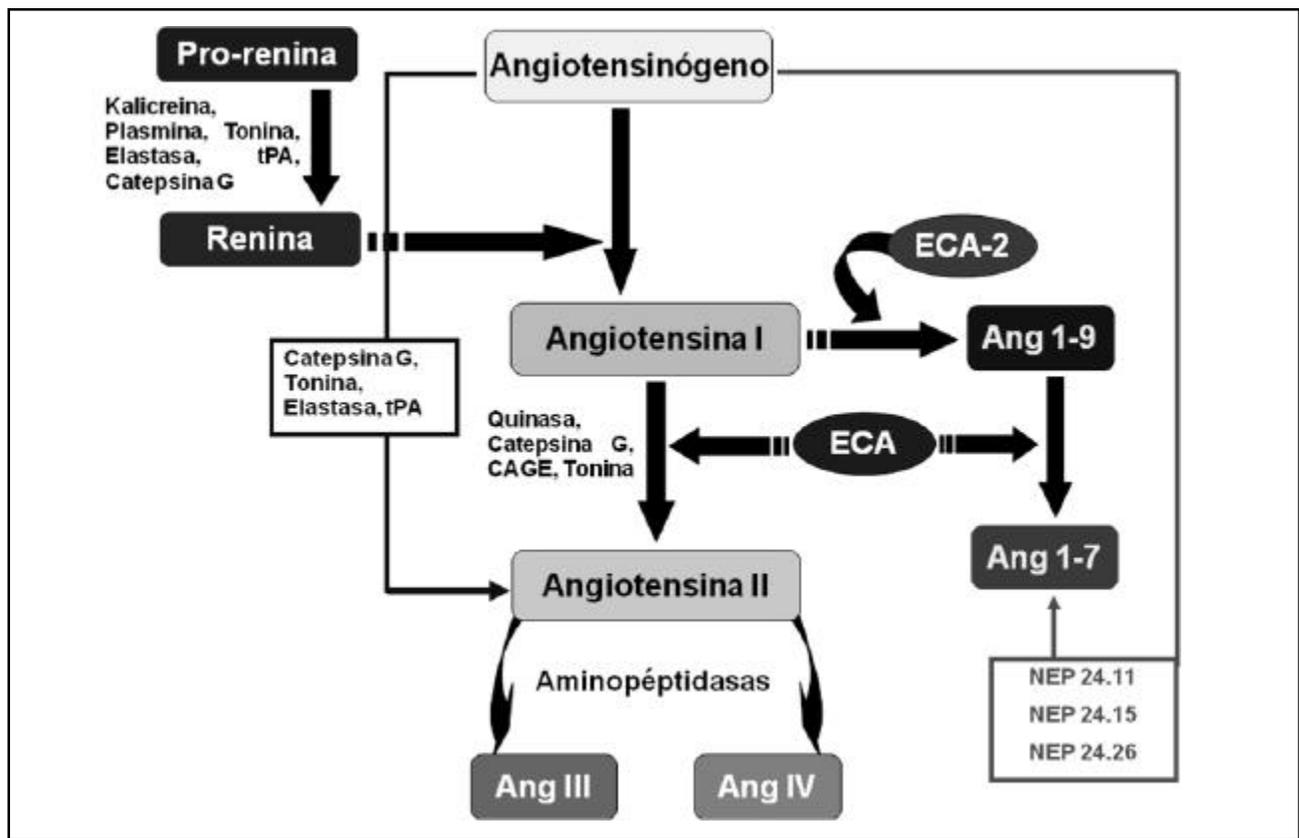
**Figure 1.** Model of the renin-angiotensin system (RAS) (De la Serna, 2006).

que reacciona con el Ao circulante, dando lugar a un decapeptido, la angiotensina-I (Ang-I) (Scow *et al.*, 2003). La ECA o kininasa II es una dipeptidil carboxipeptidasa I, (kininasa II, EC 3,4,15,1) zinc metalopeptidasa, la cual es sintetizada en el pulmón. La ECA rompe el dipéptido del C-Terminal de la Ang-I convirtiéndola en angiotensina-II (Ang-II) el cual es el componente activo principal del sistema renina-angiotensina-aldosterona e inhibe al péptido vasodilatador bradikinina y también causa la expansión de volumen a través de la retención de sodio (vía aldosterona y vasoconstricción renal) y retención de fluidos (vía hormona antidiurética) (Figura 1). La Ang-II es un potente vasoconstrictor, ya que actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso simpático, tanto periféricamente como centralmente para incrementar el tono vascular. Las acciones de la Ang-II están mediadas por los receptores  $AT_1$  los cuales activan efectos perjudiciales (provoca vasoconstricción) y los receptores  $AT_2$  causan efectos benéficos (provocan la vasodilatación) en el organismo (Scow *et al.*, 2003). Por otro lado, también se ha identificado una variante de la ECA, la cual es conocida como ECA-2, y tiene la capacidad de convertir a la Ang-I en Ang 1-9 (nonapéptido), que no tiene acción vascular, pero puede ser convertido por la ECA en Ang 1-7 que es un vasodilatador. La ECA-2 no hidroliza a la bradikinina; mientras que la Ang 1-7 puede bloquear la vasoconstricción

inducida por la Ang-II en arterias del humano. Es importante destacar que existen diversos mecanismos alternativos para la transformación de la Ang-I en Ang-II que no requieren la presencia de la ECA, a través de otras enzimas como la quinasa, la catepsina G y la CAGE por sus siglas en inglés (Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme). La Ang-I también puede ser convertida en el hexapéptido Ang 1-7 por ciertas endopeptidasas tisulares tales como la endopeptidasa neutral NEP 24.11, NEP 24.15 y NEP 24.26 (Figura 2) (De la Serna, 2006).

### Tratamiento de la hipertensión arterial

La importancia clínica del bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona se ha vuelto cada vez más clara durante los últimos 20 años. Muchos médicos utilizan los inhibidores de la ECA o los bloqueadores de los receptores de angiotensina (BRA) como terapia de primera línea para la hipertensión, por lo que, existe una tendencia en la combinación de estos dos agentes valiosos, ya que la combinación de dos o más antihipertensivos actúan en el control de la presión arterial y otras veces minimizan los efectos secundarios que cada uno de ellos puedan ocasionar por separado. Por ello es importante reconocer las principales interacciones farmacológicas, tanto benéficas como perjudiciales de los fármacos antihipertensivos (Codario, 2005).



**Figura 2.** Mecanismos de formación de angiotensina-II (Ang-II) en el sistema renina-angiotensina (De la Serna, 2006).

**Figure 2.** Mechanisms of formation of angiotensin-II (Ang-II) in the renin-angiotensin system (De la Serna, 2006).

El primer fármaco que demostró actividad de inhibición de la ECA fue el Captopril el cual fue sintetizado por Ondetti *et al.*, (1977); este fármaco demostró ser activo por vía oral, impidiendo así la conversión de la Ang-I en Ang-II. Cabe mencionar que los medicamentos utilizados para inhibir la ECA, tal como el Captopril pueden ocasionar efectos secundarios, como los mencionados anteriormente (Atkinson y Robertson, 1979). Además de la prevención de la hipertensión y apoplejías, los inhibidores de la ECA han sido estudiados para el tratamiento de la deficiencia cardíaca crónica e infarto al miocardio (Pitt, 1997). Asimismo han sido propuestos para el tratamiento del cáncer (Lever *et al.*, 1999). Después de una década de utilización del Captopril, han aparecido una multitud de fármacos con capacidad de inhibición de la ECA, que difieren de éste por la ausencia de un grupo sulfhídrico en la formulación química y una vida media más prolongada, lo que permite utilizarlos en una sola dosis diaria (Vázquez *et al.*, 1998).

Baltar *et al.*, (2004) mencionan que todos los fármacos usados para el tratamiento de la hipertensión arterial en el embarazo atraviesan la placenta, por lo que pueden afectar al feto indirectamente disminuyendo el flujo útero-placentario o directamente a través de la circulación

umbilical. Por otro lado, Cooper *et al.* (2006) alertaron que el uso de inhibidores de la ECA como: Benazapril (Lotensin), Captopril (Capoten), Enalapril/Enalaprilat (Vasotec oral e inyectable), Fosinopril (Monopril), Lisinopril (Zestril y Prinivil), Moexipril (Univasc), Perindopril (Aceon), Quinapril (Accupril), Ramipril (Altace) y Trandolapril (Mavik) (datos soportados por la FDA 221-02-3003) durante el primer trimestre de embarazo, puede estar asociado con el incremento de riesgo de malformaciones congénitas del recién nacido. Debido a lo anterior, surge el interés por identificar a los alimentos como fuentes naturales de inhibidores de la ECA (péptidos antihipertensivos).

#### **Las proteínas de la dieta: fuentes de biopéptidos**

Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos, tanto nutricional como funcionalmente. Desde el primer punto de vista, son una fuente de aminoácidos, los cuales son esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo. Desde el punto de vista funcional, estas afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, así como también, muchas proteínas de la dieta pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo humano, ya que poseen propiedades

biológicas que hacen a estos componentes ingredientes potenciales por su bioactividad o como alimentos promotores de la salud. De igual forma estas proteínas pueden afectar la funcionalidad tecnológica de los productos finales proyectados, por lo que es un factor esencial para aplicar o desarrollar tecnologías para conservar o regular el aumento de componentes bioactivos en sistemas alimenticios (Korhonen *et al.*, 1998). En las últimas décadas, diversas investigaciones han mostrado que los péptidos bioactivos pueden ser derivados de las proteínas de la dieta y estos pueden estar presentes como entidades independientes o codificadas en la proteína original y que durante la digestión gastrointestinal o procesamiento de los alimentos, estos péptidos son liberados de la proteína precursora (Vioque *et al.*, 2006).

Los péptidos bioactivos son pequeñas cadenas peptídicas compuestas por 2 a 15 residuos de aminoácidos (Vioque *et al.*, 2000). Sin embargo, Kitts y Weiler (2003) mencionan que los péptidos bioactivos obtenidos de los alimentos pueden presentar entre 2 y 9 residuos de aminoácidos. Aunque puede haber excepciones ya que existen péptidos con más de 20 residuos de aminoácidos, tal como la lunasina, péptido extraído de la soya con actividad anticancerígena probada en ratas el cuál presenta 43 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5400 Da (Jeong *et al.*, 2002).

Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales; entre las primeras se pueden mencionar a la caseína, el queso a base de suero de la leche (requesón), de leche fermentada, del músculo de pollo y pescado entre otras y de origen vegetal se han aislado del gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol mungo, etc. (Das Neves *et al.*, 2006; Megías *et al.*, 2004) los cuales han presentado diversas actividades biológicas como antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores, por lo que el estudio de más fuentes vegetales para extraer estos péptidos con diferentes actividades biológicas, principalmente aquellos con actividad antihipertensiva, esta siendo un atractivo en el sector industrial (alimentos y farmacéutica) ya que podrían ser incluidos en diversos sistemas alimenticios y/o medicamentos para lograr su efecto en el organismo del consumidor final.

### **Péptidos antihipertensivos**

Los péptidos antihipertensivos son los péptidos bioactivos más estudiados de los alimentos, ya que éstos muestran actividad por la inhibición de la ECA, la cual está relacionada con la regulación de la presión arterial por la modulación del sistema renina-angiotensina (Wang y González de Mejía, 2005). Ferreira (1965) fue el primero en aislar del veneno de la cobra brasileña (*Bothrops jararaca*) pequeños péptidos que exhibían una fuerte actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), siendo denominados como factores

potenciadores de bradikinina. Cheung y Cushman (1973) estudiaron la inhibición de la ECA de esos péptidos, concluyendo que la inhibición es de tipo competitivo y que los inhibidores se ligan a la enzima de la misma manera que ésta se liga al sustrato. De igual forma enfatizaron la importancia de los tres últimos residuos de aminoácidos en el grupo C-terminal tanto para los sustratos como para los inhibidores. Con respecto a los inhibidores observaron que todos presentaron un residuo de Prolina (P) en la penúltima posición de la molécula del grupo C-terminal. Sin embargo, esto no es una regla general para establecer que los péptidos antihipertensivos deben su actividad a la presencia de éste aminoácido (P), ya que se han aislado e identificado la secuencia de aminoácidos de diferentes péptidos que provocan la inhibición de la ECA (Tabla 1), y han demostrado que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en su grupo C-terminal (HL, FR y AP) también determina el efecto sobre la inhibición de la ECA (Cheung *et al.*, 1980).

Péptidos con actividad inhibitoria de la ECA han sido aislados de diferentes fuentes, así por ejemplo Pozo-Bayón *et al.*, (2007) aislaron fracciones peptídicas de bajo peso molecular con actividad inhibitoria de la ECA en vinos blanco y rojo, y estos presentaron principalmente residuos de aminoácidos B «Asx» (puede ser ácido aspártico o asparagina), Z «Glx» (puede ser ácido glutámico o glutamina) y V «Val».

Yang *et al.* (2003) aislaron cuatro nuevos péptidos de espinaca con actividad antihipertensiva probados en ratas hipertensas espontáneamente, encontrando nuevas secuencias de aminoácidos que presentaron efecto inhibitorio sobre la ECA, con secuencias MRWRD (Met-Arg-Trp-Arg-Asp), MRW (Met-Arg-Trp), LRIPVA (Leu-Arg-Ile-Pro-Val-Ala) y IAYKPAG (Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly). Los péptidos con mayor actividad fueron el MRW disminuyendo la presión arterial a las 2 h después de la administración, seguida por el péptido MRWRD con 4 h después de la dosis.

### **Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática**

Los hidrolizados enzimáticos han sido utilizados para muchos propósitos, tales como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios, en la formulación de productos farmacéuticos y de aplicación clínica específica, así como para reducir la alergenicidad de la proteína y en la obtención de péptidos bioactivos (Tardioli *et al.*, 2003). Durante la hidrólisis de las proteínas, la elección de la enzima y las condiciones del proceso influyen en la composición de péptidos en el hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades funcionales (Van der Ven *et al.*, 2002). Atendiendo a su grado de hidrólisis (GH), los productos proteínicos pueden ser clasificados en hidrolizados parciales (GH <10 %) y extensivos (GH >10 %), cada uno de ellos presenta propiedades específicas que afectan a su utilización (Vioque *et al.*, 2006). Para lograr lo anterior un gran número de enzimas exógenas



enzima que rompe enlaces internos del extremo COOH del aminoácido principalmente cuando hay presencia de Phe (F), Trp (W), Tyr (Y) y Leu (L) y ocasionalmente cuando hay Met (M) y Asn (N). Je *et al.*, (2004) aislaron de Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) un péptido con actividad inhibitoria de la ECA mediante el uso de pepsina [enzima que hidroliza internamente del extremo NH<sub>2</sub> del aminoácido cuando hay presencia de Leu (L), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)], el cual, presentó la secuencia de aminoácidos FGASTRGA y un valor de IC<sub>50</sub> = 14,7 μM (IC<sub>50</sub> se define como la concentración de péptidos en 1 mg de proteína/ml requerido para inhibir el 50% la actividad de la ECA). Mizuno *et al.* (2004) utilizaron una proteasa de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*) para obtener péptidos cortos con actividad antihipertensiva ricos en prolina a partir de hidrolizados de la caseína de la leche.

Sin embargo, la hidrólisis enzimática de proteínas frecuentemente conduce a la producción de un intenso sabor amargo, debido a la presencia de péptidos fuertemente hidrofóbicos, mientras que la reducción del número de aminoácidos aromáticos en los hidrolizados proteínicos mejora su sabor, el cual es un factor importante para el uso satisfactorio de una dieta especial (Tardioli *et al.*, 2003). Para lograr lo anterior se hace uso de enzimas de forma secuencial que generan altos grados de hidrólisis y reducen el contenido de aminoácidos hidrofóbicos, ejemplo de ello es que Pedroche *et al.* (2002) emplearon enzimas comerciales Alcalase™ 2,4 L (endoproteasa) y Flavourzyme™ 1000 MG (endo y exoproteasa) y obtuvieron hidrolizados proteínicos con un grado de hidrólisis (GH) de 65 %, esto es debido a que la Alcalase™ incrementa el número de sitios de N-terminales lo cual facilita la hidrólisis por la Flavourzyme™ que presenta ambas actividades.

### Estudios *in vitro* e *in vivo* de los péptidos antihipertensivos

Diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* para comprender el mecanismo de acción de los péptidos que inhiben la ECA, se resumen en dos puntos importantes: 1) tiene importancia fisiológica, porque en la administración oral, estos péptidos bioactivos tienen que llegar al torrente sanguíneo en una forma activa para ejercer su efecto antihipertensivo, ya que la digestión gastrointestinal y el transporte son las principales barreras de la biodisponibilidad de los péptidos y 2) la digestión por proteasas gastrointestinales puede ser usado como un proceso de producción de péptidos inhibitorios de la ECA, con la ventaja de que los péptidos que se forman son resistentes a la digestión fisiológica después de su ingestión (Vermeirssen *et al.*, 2003). Saiga *et al.* (2006) evaluaron el mecanismo de acción de péptidos que inhiben la ECA obtenidos del músculo de pechuga de pollo, ya que mediante un estudio previo obtuvieron la secuencia de un péptido denominado P4 (G-F-Hyp-G-T-Hyp-G-L-Hyp-G-

F) del cual, se sintetizaron seis secuencias de péptidos mediante el uso de un sintetizador simultáneo de péptidos-múltiples (modelo PSSM-8; Shimadzu, Kyoto, Japón). Los péptidos sintetizados que mostraron actividad de inhibición de la ECA *in vitro* fueron los que tenían en el C-terminal residuos de Hyp-G-F con un IC<sub>50</sub> = 433 μM, y en el N-terminal residuos de F-Hyp-G con un IC<sub>50</sub> = 171 μM. Aunque la presencia de seis residuos (Hyp-G-L-Hyp-G-F) en el C-terminal presentaron una fuerte actividad inhibitoria con un IC<sub>50</sub> = 10 μM y cuando el residuo de F del C-terminal del péptido original (P4) fue eliminado el valor de actividad inhibitoria cambió a un IC<sub>50</sub> = 25000 μM indicando que la F en el C-terminal del péptido es muy importante para la inhibición de la ECA.

Hata *et al.* (1996) evaluaron un placebo controlado de un producto fermentado japonés (Calpis™) con cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la presión sanguínea de 30 pacientes mayores de edad con hipertensión arterial y encontraron que a la octava semana de ingerir esta bebida fermentada la presión sanguínea sistólica disminuyó en 14,1 ± 3,1 mm/Hg y la presión sanguínea diastólica disminuyó en 6,9 mm/Hg. De manera similar, Seppo *et al.*, (2003) realizaron el primer estudio de una bebida de leche fermentada (Valio™) con cepas de *Lactobacillus helveticus* (LBK-16H) y evaluaron un placebo control, utilizándose para ello 39 pacientes hipertensos de forma aleatoria, logrando disminuir la presión sanguínea sistólica en 6,7 ± 3,0 mm/Hg y la presión sanguínea diastólica disminuyó en 3,6 ± 1,9 mm/Hg. En ambos experimentos se encontraron dos tripéptidos Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) con actividad antihipertensiva, mismos que en estudios previos habían disminuido la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (Nakamura *et al.*, 1995).

El mecanismo de acción de los péptidos antihipertensivos es de forma similar a la de los fármacos, ya que los tres últimos residuos de aminoácidos adyacentes a la región C-terminal de los péptidos que presentan actividad antihipertensiva se enlazan fuertemente al sitio activo de la ECA y se ha observado que éstos tienen una mayor especificidad de inhibición hacia aquellos péptidos que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) en las tres últimas posiciones de la región C-terminal. Cabe mencionar que los residuos de aminoácidos como la K y R en las posiciones mencionadas anteriormente pero con carga positiva en el grupo ε amino también pueden contribuir en la inhibición de la ECA (Fitzgerald y Meisel, 2000).

Sin embargo, se ha postulado que este mecanismo de acción puede darse mediante interacciones de un enlace aniónico en sitios distintos a la región catalítica del sitio activo produciéndose un tipo de inhibición alostérica. Fitzgerald y Meisel (2000) mencionan que debido a que la ECA posee dos sitios catalíticos, puede existir diferencia en la afinidad por el sustrato, por lo que los péptidos bioactivos solamente pueden inhibir uno de los dos sitios

catalíticos, aunque todavía faltan elementos suficientes para reforzar esta afirmación.

### **Biodisponibilidad de los péptidos bioactivos**

Las proteínas y péptidos de la dieta están sujetos a cambios drásticos en su estructura durante los procesos de ingestión, digestión y absorción. La proteína ingerida es primero hidrolizada por varias proteinasas en el tracto gastrointestinal para producir oligopéptidos, algunos de los cuales puede ser biológicamente activos, mientras que algunas proteínas resisten a las proteinasas permaneciendo intactas en el tracto. Algunos de los oligopéptidos que son producidos después de ser hidrolizados por peptidasas a di y tri-péptidos que son digeridos por peptidasas que se encuentran en el borde en cepillo de la superficie de las células epiteliales para producir aminoácidos, mientras que otros permanecen sin ser hidrolizados hasta aminoácidos (Shimizu, 2004). Los di y tri-péptidos pueden ser absorbidos en forma intacta, atravesando la membrana intestinal, con ayuda de un sistema de transportadores peptídicos específicos, ejemplo de ello es el transportador peptídico PepT1, el cual emplea un gradiente electroquímico transmembranal de protones como fuerza de transporte y con amplia especificidad (Yang *et al.*, 1999).

También cabe mencionar que las proteínas y los péptidos pueden ser transportados pasivamente a través de la vía paracelular. La vía paracelular es una ruta de transporte no-degradativa manteniendo intactas las proteínas y los péptidos (Shimizu, 2004). El uso de un cultivo de células de monocapa Caco-2 del intestino humano sobre un filtro semipermeable demostró que la parte de la secuencia VPP adicionada por el lado apical de las células en monocapas pueden ser transportadas paracelularmente por el lado basal en una forma intacta, aunque una cantidad significativa de VPP fue transportada por células del intestino por la vía del transporte de péptidos, PepT1 y por aminoácidos hidrolizados por peptidasas intracelulares. Por lo que, en este estudio sugiere la importancia de la difusión pasiva paracelular como el principal mecanismo de transporte de pequeños péptidos bioactivos (Satake *et al.*, 2002)

### **Perspectivas de uso de los péptidos antihipertensivos en la industria de los alimentos**

La dieta y/o sus componentes pueden contribuir a mejorar el estado de bienestar, a reducir los riesgos relacionados con ciertas enfermedades y regular el mejoramiento en la calidad de vida. Debido a lo anterior, los avances recientes en la ciencia de los alimentos y la nutrición han sostenido el concepto de que la dieta juega un papel significativo en la modulación de varias funciones en el cuerpo. Estos nuevos conceptos han conducido a la introducción de una nueva categoría de los alimentos comestibles que promuevan la salud, es decir, los alimentos

funcionales (Diplock *et al.*, 1999). La actividad de un alimento funcional esta basada en los componentes bioactivos, los cuales pueden estar contenidos naturalmente en el producto, pero usualmente requieren de formulaciones con tecnologías apropiadas con el objeto de optimizar las propiedades benéficas deseadas. Para este fin, a menudo es necesario el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para lograr con ello un mínimo procesamiento (Korhonen, 2002).

La aplicación de tecnologías en el procesamiento debe enfocarse en dos aspectos importantes: (1) mantener al máximo la bioactividad durante el procesamiento y almacenamiento de los productos formulados y (2) la liberación de los componentes bioactivos deseados en los sitios requeridos del cuerpo (Bellisle *et al.*, 1998). Por lo anterior, es recomendable resaltar que también se deben tener en cuenta los procesos de manufactura aplicados a los productos que se están desarrollando ya que existen evidencias que el procesamiento de algunos productos pueden inactivar los componentes bioactivos que en el se encuentran; por ejemplo un tratamiento ácido destruye la glutamina y asparragina, mientras que un tratamiento alcalino destruye la cisteína, serina y treonina y produce lisinoalanina y D-aminoácidos (Amantharaman y Finot, 1993). Otros tratamientos químicos tales como la acilación, glicosilación, fosforilación, aquilación reductiva, succinilación o lipofilización pueden mejorar la funcionalidad de las proteínas pero ello puede implicar también efectos negativos debido a los posibles residuos químicos y modificación de aminoácidos, por lo que los tratamientos químicos de las proteínas destinados para consumo humano de la dieta deben ser desarrollados con precaución en la industria de los alimentos (Korhonen *et al.*, 1998).

Cabe mencionar que actualmente diversas empresas están incluyendo en sus productos componentes bioactivos, entre éstas se encuentra la compañía Valio LTD International (Finlandia), en la que se desarrolló un producto a fines del año 2000 llamado Evolus™ mientras que Vita Corporación Alimentaria (en España) desarrolló otro producto denominado Vita de Kaiku, ambos son leches fermentadas y el Evolus es una combinación de *Lactobacillus helveticus* y minerales. Esta cepa bacteriana tiene la capacidad de hidrolizar la proteína láctea (caseína) y formar con ellos péptidos bioactivos los cuales tienen la secuencia aminoacídica de IPP y VPP tripéptidos que actúan en la inhibición de la ECA. Además de que los componentes de ambos productos presentan un efecto benéfico sobre la presión sanguínea debido a su bajo contenido de sodio, presentan propiedades nutrimentales generadas por la adición benéfica de calcio, potasio y magnesio (Jauhainen *et al.*, 2002). En la Figura 4 se pueden observar los diversos productos que existen a la venta en el mercado Europeo (a, b y c), en Japón (d) y en los EUA (e), los cuales presentan actividad antihipertensiva en el organismo.

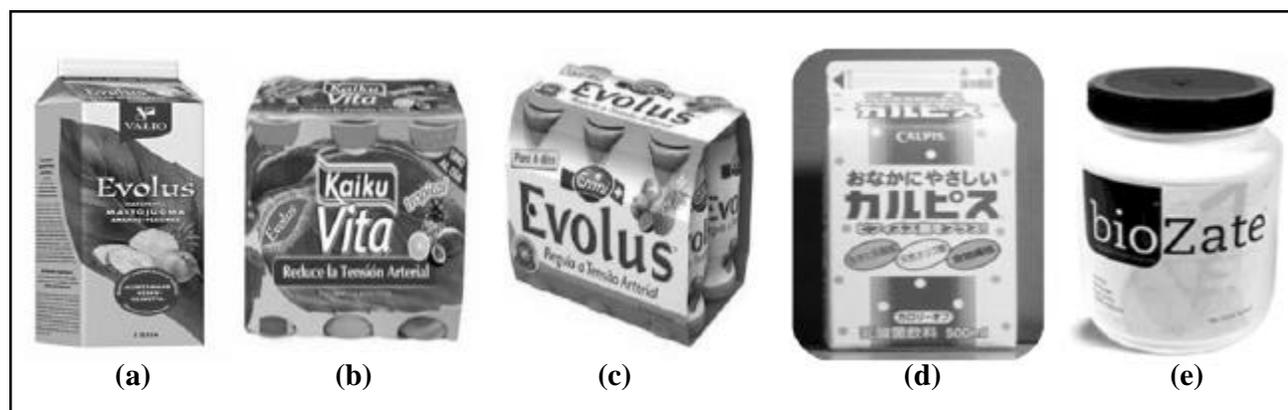


Figura 4. Productos que presentan actividad antihipertensiva.

Figure 4. Products with antihypertensive activity.

## CONCLUSIONES

Los péptidos antihipertensivos son una alternativa para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial; las cifras de muertes tanto a nivel mundial como nacional se han incrementado por ésta enfermedad. Aunque el tratamiento de este padecimiento se ha llevado a cabo con medicamentos sintéticos como el Captopril, Enalapril, entre otros, estos fármacos pueden presentar ciertas reacciones secundarias: tos, pérdida del sentido del gusto e inclusive provocar malformaciones congénitas, por lo que, actualmente diversos científicos e investigadores están prestando mayor atención a los componentes bioactivos de fuentes naturales (animales y vegetales) que tengan un efecto antihipertensivo sobre el organismo humano. Por lo anterior, diversas industrias (Valio LTD International, Kaiku Corporación Alimentaria, entre otras) han incluido en sus productos tripéptidos que presentan secuencia de aminoácidos de IPP y VPP los cuales pueden inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la cual es la responsable que se altere la presión sanguínea en el organismo. Sin embargo, hace falta buscar más materiales de origen natural, localmente situadas, ricas en proteínas para extraer péptidos con actividad antihipertensiva y estos mismos puedan incluirse en sistemas alimenticios para ofrecerlos al público consumidor que padece de hipertensión arterial.

## AGRADECIMIENTOS

Esta revisión está enmarcada dentro del proyecto 25796 "Purificación y caracterización de péptidos con bioactividad antihipertensiva, antioxidante y antimicrobiana aislados de frijoles lima (*Phaseolus lunatus*) y caupí (*Vigna unguiculata*)", financiado por el CONACYT-México, y del proyecto "Purificación de péptidos con bioactividad antihipertensiva y antioxidante

obtenidos de frijol endurecido (*Phaseolus vulgaris*)" financiado por la industria Mexicana Coca-Cola como parte de la Cátedra 2007 para Jóvenes-Investigadores.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anantharaman, K.; Finot, P. A. 1993. Nutritional Aspects of Food Proteins in Relation to Technology. *Food Review International* **9**, 629-655.
- Atkinson, A. B.; Robertson, J. I. S. 1979. Captopril in the Treatment of Clinical Hypertension and Cardiac Failure. *Lancet* **2**, 836-839.
- Baltar, M. J.; Marín, I. R.; Álvarez, G. J. 2004. Toxicidad Fetal de los Fármacos Antihipertensivos. *Hipertensión* **21**(9), 455-465.
- Bellisle, F.; Diplock, A. K.; Hornstra, G.; Koletzko, B.; Roberfroid, M.; Salminen, S.; Saris, W. H. M. 1998. Functional Food Science in Europe. *British Journal of Nutrition* **80**, S1-S193.
- Brown, J. N.; Vaughan, E. D. 1998. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation* **97**, 1411-1420.
- Cheung, H. S.; Cushman, D. W. 1973. Inhibition of Homogeneous Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung by Synthetic Venom Peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochim Biophys Acta* **293**, 451-463.
- Cheung, H-S.; Wang, F-L.; Ondetti, A. M.; Sabo, F. Emily.; Cushman, W. David. 1980. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Importance of the COOH-Terminal Dipeptide Sequence. *The Journal of Biological Chemistry* **255**(2), 401-407.
- Codario, A. R. 2005. ¿Qué es Mejor, Usar un Inhibidor de la ECA, un BRA o Ambos? Lo que nos Dicen los Estudios Clínicos. *Atención Médica* **18**(6), 52-66.
- Das Neves, M. R. A.; Campos, T.; Márquez, L. U. M. 2006. Modulação da Pressão Arterial por Hidrolisados Protéicos. *Brazilian Journal of Food Technology* **III** JIPCA, 81-86.
- De la Serna, F. 2006. Curso: Insuficiencia Cardíaca Crónica: Capítulo 4: Sistema Renina-Angiotensina. pp 42-63.
- Diplock, A. T.; Agget, P. J.; Ashwell, M.; Bornet, F. Fern, E. B.; Roberfroid, M. B. 1999. Scientific Concepts of

- Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition* **81**(suppl.) S1-S27.
- Ferreira, S. H. 1965. A Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) Present in the Venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacology* **24**, 163-169.
- Fitzgerald, R. J.; Meisel, H. 2000. Milk Protein-Derived Peptide Inhibitors of Angiotensin-I Converting Enzyme. *British Journal of Nutrition* **84**, S33-S37.
- Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P.; Camacho, F. 2000. Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. *Ars Pharmaceutica* **41**(1), 79-89.
- Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; Nakajima, K.; Nakamura, Y.; Tokano, T. 1996. A Placebo-Controlled Study of the Effect of a Sour Milk on Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* **64**, 767-771.
- Hong, E.; Bravo, G.; Villalobos-Molina, R. (2003). Hipertensión Arterial. *Avance y Perspectiva*, **22**, 243-249.
- Jauhiainen, T.; Korpela, R.; Mäyrä-Mäkinen, A. 2002. VALIO: Information About the Evolus® Fermented Milk. Printed by Lars Eriksen. Finland, pp 1-15.
- Je, J. Y.; Park, P. J.; Kwon, J. Y.; Kim, A. K. 2004. A Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Frame Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 7842-7845.
- Jeong, J. H.; Lam, Y.; De Lumen, O. B. 2002. Barley Lanasin Suppresses Ras-induced Colony Formation and Inhibits Core Histone Acetylation in Mammalian Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5903-5908.
- Jung, W.-K.; Mendis, E.; Je, J.-Y.; Park, P.-J.; Son, W. B.; Kim, C. H.; Choi, K. Y.; Kim, S.-K. 2006. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Yellowfin Sole (*Limanda aspera*) Frame Protein and Its Antihypertensive Effect in spontaneously Hypertensive Rats. *Food Chemistry* **94**, 26-32.
- Kamath, V.; Niketh, S.; Chandrashekar, A.; Rajini, S. P. 2007. Chymotryptic Hydrolysates of α-Kafrin, the Storage Protein of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Exhibited Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Chemistry* **100**, 306-311.
- Kitts, D. D.; Weiler, K. 2003. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Desing* **9**(16), 1309-1323.
- Korhonen, H.; Pihlanto-Iepälä, A.; Rantamäki, P.; Tupasela, T. 1998. Impact of Processing on Bioactive Proteins and Peptides. *Trends in Food Science and Technology* **9**, 307-319.
- Korhonen, H. 2002. Technology Options for New Nutritional Concepts. *International Journal of Dairy Technology* **55**(2), 79-88.
- Kuba, M.; Kumi, T.; Tawata, S.; Takeda, Y.; Yasuda, M. 2003. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolate from Tofuyo Fermented Soybean Food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**(6), 1278-1283.
- Lee, N.-Y.; Cheng, J.-T.; Enomoto, T.; Nakamura, I. 2006. The antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide containing in bovine lactoferrin. *Chinese Journal of Physiology* **49**(2), 67-73.
- Lever, A. F.; Hole, D. J.; Gillis, C. R.; McInnes, G. T.; Meredith, P. A.; Murray, L. S.; Reid, J. L. 1999. Is Cancer Related to Hypertension or to Its Treatment?. *Clinical and Experimental Hypertension* **21**(5-6), 937-946.
- Loscalzo, J.; Creager, M. A.; Dzau, V. 1996. Vascular Medicine, a textbook of vascular biology and diseases. 2nd. Edition, Little, Brown and Company, Boston, New York, Toronto & London.
- Matsui, T.; Tamaya, K.; Seki, E.; Osajima, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T. 2002. Val-Tyr as a Natural Antihypertensive Dipeptide can be Absorbed into the Human Circulatory Blood System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **29**, 204-208.
- Matsui, T.; Hayashi, A.; Tamaya, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T.; Murakami, K., and Kimoto, K.-I. 2003. Depresson Effect Induced by Dipeptide, Val-Tyr, in Hypertensive Transgenic Mice is due, in Part, to the Suppression of Human circulating Renin-Angiotensin System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **30**, 262-265.
- Megías, C.; Yust, M. M.; Pedroche, J.; Lquari, H.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F.; Vioque, J. 2004. Purification of an ACE Inhibitory Peptide after Dydrolisis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Proetin Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1928-1932.
- Miguel, M.; Aleixandre, A. M.; Ramos, M.; López-Fandiño, R. 2006. Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 726-731.
- Mizuno, S.; Nishimura, S.; Matsuura, K.; Gotou, T.; Yamamoto, N. 2004. Release of Short and Proline-Rich Antihypertensive Peptides from Casein Hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* Protease. *Journal of Dairy Science* **87**, 3183-3188.
- Nakagomi, K.; Yamada, R.; Ebisu, H.; Sadakane, Y.; Akizawa, T.; Tanimura, T. 2000. Isolation of Casein-2, a Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from a Tryptic Hydrolysate of Human Plasma. *Federation of European Biochemical Societies Letters (FEBS Letters)* **467**, 235-238.
- Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S.; Takano, T. 1995. Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *Journal of Dairy Science* **78**(4), 777-783.
- Ondetti, M. A.; Rubin, B.; Cushman, D. W. 1977. Design of Specific Inhibitors of Angiotensin I-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science* **196**, 441-444.
- Pan, L.; Gross, W. K. 2005. Transcriptional Regulation of Renin: An Update. *Hypertension*, **45**, 3-8.
- Pedroche, J.; Yust, M. M.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M. Millán, F.; Vioque, J. 2002. Utilisation of Chickpea Protein Isolates for Production of Peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 960-965.
- Pitt, B. 1997. ACE Inhibitors in Heart Failure: Prospects and Limitations. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **11**, 285-290.

- Pozo-Bayón, M. A.; Alcaide, M. J.; Polo, M. C.; Pueyo, E. 2007. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Compounds in White and Red Wines. *Food Chemistry* **100**, 43-47.
- Rasmussen, M. 2005. Clinical studies with Evolus®. In Special symposium: Foods & Functionals: Research, results, partnership and progress. pp 1-36.
- Rosas, P. M.; Lara, E. A.; Pastelín, H. G.; Velázquez, M. O.; Martínez, R. J.; Méndez, O. A.; Lorenzo, N. J. A.; Lomelí, E. C.; González, H. A.; Herrera, A. J.; Tapia, C. R.; Attie, F. 2005. Re-Encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. *Archivos de Cardiología de México* **75**(1), 96-111.
- Saiga, A.; Okumura, T.; Makihara, T.; Katsuda, A.-I.; Morimatsu, F.; Nishimura, T. 2006. Action Mechanism of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Chicken Breast Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 942-945.
- Satake, M.; Enjoh, M.; Nakamura, Y.; Takano, T.; Kawamura, Y.; Arai, S.; Shimizu, M. 2002. Transepithelial Transport of the Bioactive Tripeptide, Val-Pro-Pro, in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 378-384.
- Scow, T. D.; Smith, G. E.; Shaughnessy, F. A. 2003. Combination Therapy with ACE Inhibitors and Angiotensin-Receptor Blockers in Heart Failure. *Clinical Pharmacology*, **68**(9), 1795-1798.
- Seppo, L.; Jauhiainen, T.; Poussa, T.; Korpela, R. 2003. A Fermented Milk High in Bioactive Peptides Has a Blood Pressure-Lowering Effect in Hypertensive Subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* **77**, 326-330.
- Shimizu, M. 2004. Food-Derived Peptides and Intestinal Functions. *BioFactors* **21**, 43-47.
- Tardioli, W. P.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, M. J.; Giordano, C. R. L. 2003. Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnology Progress* **19**(2), 565-574.
- Van der Ven, C.; Gruppen, H.; De Bont, A. B. D.; Voragen J. G. A. 2002. Correlations between Biochemical Characteristics and Foam-Forming and -Stabilizing Ability of Whey and Casein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2938-2946.
- Vázquez, V. A.; Cruz, A. N. M.; Vázquez, C. A.; Millán, P. A. 1998. Inhibidores de la Enzima de Conversión de la Angiotensina en el Tratamiento de la Hipertensión Arterial. *Revista Cubana de Farmacología* **32**(3), 204-210.
- Velázquez, M. O.; Rosas, P. M.; Lara, E. A.; Pastelín, H. G. (ENSA-2000); Attie, F.; Tapia, R. C. 2003. Prevalencia e Interrelación de las Enfermedades Crónicas no Transmisibles y Factores de Riesgo Cardiovascular en México. *Archivos de Cardiología de México* **73**, 62-77.
- Vermeirssen, V.; Van, C. J.; Devos, L.; Verstraete, W. 2003. Release of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity During in Vitro Gastrointestinal Digestión: from Batch Experiment to Semicontinuous Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5680-5687.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M. M.; Millán, F. 2000. Péptidos Bioactivos en Proteínas de Reserva. *Grasas y Aceites* **51**(5), 361-365.
- Vioque, J.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M. M.; Millán, F. 2001. Obtención y Aplicaciones de Hidrolizados Proteicos. *Grasas y Aceites* **52**(2), 132-136.
- Vioque, J.; Pedroche, J.; Yust, M. M.; Lqari, H.; Megías, C.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F. 2006. Peptídeos Bioactivos em Proteínas Vegetais de Reserva. *Brazilian Journal of Food Technology* **III** JIPCA, 99-102.
- Wang, W.; Gonzalez de Mejía, E. 2005. A new Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-Related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **4**, 63-78.
- WHO, 2002. World Health Organization. The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Ginebra. pp 13-15.
- Yang, C. Y.; Dantzig, A. H.; Pidgeon, C. 1999. Intestinal Peptide Transport Systems and Oral Drug Availability. *Pharmaceutical Research* **16**, 1331-1343.
- Yang, Y.; Marczak, D. E.; Yokoo, M.; Usui, H.; Yoshikawa, M. 2003. Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4897-4902.