



**S.E.P.** TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

## **INSTITUTO TECNOLÓGICO** de Tuxtepec

**"EFECTO ANTITROMBÓTICO DE FRACCIONES PEPTÍDICAS  
BIOACTIVAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRIJOL TERCIOPELO  
(*Mucuna pruriens* var. *utilis*)"**

### **TESIS**

Para Obtener el título de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**I.A. MIGUEL CADEZA BAGLIETTO**

DIRECTOR:

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**

CO-DIRECTOR:

**DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**



MCA-2016/05

TUXTEPEC, OAXACA, JUNIO 2016

## COMITE TUTORIAL

DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

DRA. CECILIA EUGENIA MARTINEZ SANCHEZ

DR. ERASMO HERMAN Y LARA

DRA. ARACELI PÉREZ SILVA

**SEP**

**TECNM**

**SNEST**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO  
de Tuxtepec**



**“EFECTO ANTITROMBÓTICO DE FRACCIONES  
PEPTÍDICAS BIOACTIVAS OBTENIDAS A PARTIR  
DE FRIJOL TERCIOPELO (*Mucuna pruriens* var.  
utilis)”**

**TESIS**

**Para Obtener el Grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

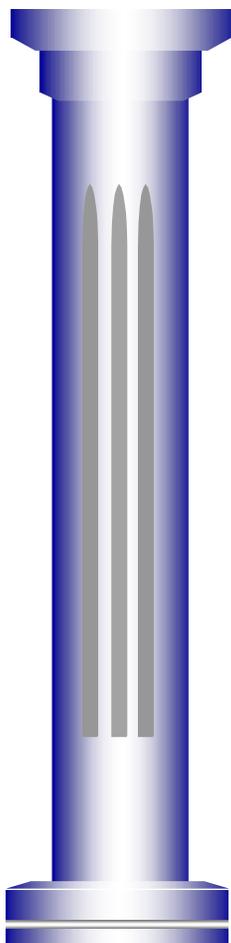
**I.A. MIGUEL CADEZA BAGLIETTO**

**DIRECTOR:**

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**

**CO-DIRECTOR:**

**DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ**



**TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO**

**JUNIO 2016**

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
División de Estudios Profesionales

Procedimiento para la Titulación  
**Autorización de Presentación del Trabajo Profesional**  
Referencia a la Norma ISO 9001:2008 7.5.1

SUBDIRECCION ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
EXPEDIENTE: DEP-ñ/16

Tuxtepec, Oaxaca. **10/JUNIO/2016**  
OFICIO: No. 2396

**I.A. MIGUEL CADEZA BAGLIETTO  
EGRESADO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS  
CON NÚMERO DE CONTROL M14350001  
PRESENTE.**

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE LA COMISIÓN REVISORA INTEGRADA POR LOS C.C. **DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SANCHEZ, DR. ERASMO HERMAN Y LARA Y DRA. ARACELI PÉREZ SILVA** REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO **"EFECTO ANTITROMBÓTICO DE FRACCIONES PEPTÍDICAS BIOACTIVAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRIJOL TERCIOPELO (*Mucuna pruriens var. utilis*)"** PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE **TESIS** DEL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL TÍTULO DE **MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**.

POR LO ANTERIOR Y DE ACUERDO A LOS LINEAMIENTOS INSTITUCIONALES, SE LE DA TRÁMITE LEGAL PARA QUE PROCEDA A LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO PROFESIONAL.

**ATENTAMENTE**  
"CIENCIA Y TÉCNICA PRESENTES AL FUTURO"

  
**M.E. JULIAN KURI MAR**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES.**

C.c.p.-Coord. de titulación  
JKM/has



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TUXTEPEC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES



Av. Dr. Víctor Bra C.P. 68350 Col. 5 de Mayo, Tuxtepec, Oaxaca  
Teléfono: (287) 87 5 10 44 Ext. 103, Fax: (287) 87 5 18 80  
e-mail: [info@ittux.edu.mx](mailto:info@ittux.edu.mx)



RSQC  
INICIO: 2009 09 22  
RECERTIFICACIÓN: 2015 06 25  
TERMINO: 2018 06 25

REGISTRO SGC  
Código ITTUX-AC-PO-008-09  
Revisión: 1  
Fecha de Autorización: 19/Junio/2014

**EFFECTO ANTITROMBÓTICO DE FRACCIONES PEPTÍDICAS BIOACTIVAS  
OBTENIDAS A PARTIR DE FRIJOL TERCIOPELO (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)**

**Por:**

**I. A. MIGUEL CADEZA BAGLIETTO**

**Protocolo de Tesis Propuesta al**

**Instituto Tecnológico de Tuxtepec**

**Como requerimiento parcial para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Alimentos**

**Junio del 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección y supervisión del Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, a quien expreso mi agradecimiento por haber hecho posible la realización exitosa de esta investigación. Muchas gracias por su apoyo.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Erasmo Herman y Lara, la Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez y la Dra. Araceli Pérez Silva, por tomar parte de su tiempo en la revisión y corrección de este trabajo de investigación.

A los profesores investigadores que imparten clases en la Maestría en Ciencias en Alimentos del Instituto Tecnológico de Tuxtepec, por haberme brindado su conocimiento y consejos para guiarme en mi formación como Maestro en Ciencias.

A mis compañeras de generación: Gabriela Aguilar Hernández, Carolina Calderón Chiu y Madeleine Perucini Avendaño, por compartir esta experiencia de la vida conmigo y por la amistad incondicional que me brindaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado mis estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos en esta Institución con número de registro de beca 590122.

## RESUMEN

Cadeza Baglietto, M. M. en C. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Junio, 2016. **“Efecto antitrombótico de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)”**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-directora: Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez.

La trombosis consiste en la obstrucción del flujo de sangre por un trombo en algún vaso arterial o venoso. Los fármacos empleados en el tratamiento de esta enfermedad producen efectos secundarios como hemorragias y trombocitopenia, entre otros. Debido a este problema de salud, diversas investigaciones se han enfocado en la obtención de agentes antitrombóticos de origen natural. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antitrombótico *in vitro* de las fracciones peptídicas bioactivas obtenidas del frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*). Para lograr lo anterior, se obtuvo una harina y concentrado proteínico a partir de *M. pruriens* y se les realizó un análisis químico proximal y determinación de color. Posteriormente se realizaron cinéticas de hidrólisis individual y secuencial empleando las enzimas pepsina y pancreatina y se determinó el grado de hidrólisis (GH) por el método de ortoftaldehído. La actividad antitrombótica se evaluó usando un método turbidimétrico para determinar la concentración que inhibe el 50% de la agregación plaquetaria ( $IC_{50}$ ), siendo los mejores tratamientos los menores valores de  $IC_{50}$ . Los hidrolizados con mayor actividad antitrombótica fueron fraccionados por ultrafiltración usando membranas con corte de peso molecular de 3 y 10 kDa, y a las fracciones obtenidas se les evaluó su actividad biológica antes mencionada. La harina y el concentrado proteínico mostraron un contenido de proteína de 23.47 y 60.68% respectivamente. La harina presentó mayor luminosidad ( $L^* = 91.32$ ) que el concentrado proteínico ( $L^* = 40.89$ ). Las cinéticas de hidrólisis con pepsina, pancreatina y el sistema secuencial pepsina-pancreatina presentaron valores de GH's = 12.93, 17.94 y 27.60% respectivamente. Los hidrolizados con pepsina a los 10 y 60 min de reacción y los hidrolizados con pancreatina a los 30 y 60 min de reacción presentaron la mayor actividad antitrombótica con valores de  $IC_{50} = 7.609$ ,

13.991, 28.716 y 22.814 mg/mL respectivamente, mientras que el hidrolizado secuencial no mostró actividad. Cuando los hidrolizados con mayor actividad fueron separados por ultrafiltración, la fracción de 3-10 kDa del hidrolizado con pepsina a los 60 min de reacción presentó la mayor actividad antitrombótica ( $IC_{50} = 6.010$  mg/mL). El uso de pepsina generó fracciones peptídicas antitrombóticas que podrían ser usadas en el diseño de nuevos productos alimenticios que ayuden a prevenir y/o tratar la trombosis.

## ABSTRACT

Cadeza Baglietto, M. Master in Food Science. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. June, 2016. **“Antithrombotic effect of bioactive peptide fractions obtained from velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)”**. Advisor: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-advisor: Dra. Cecilia Eugenia Martínez Sánchez.

Thrombosis is the obstruction of blood flow by a thrombus in arterial or venous vessel. The drugs used in the treatment of this disease have side effects such as bleeding and thrombocytopenia, among others. Because of these health problems, various investigations have focused on obtaining antithrombotic agents from natural origin. The aim of this study was to evaluate the antithrombotic effect *in vitro* of bioactive peptide fractions obtained from Velvet vean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*). To achieve this, a flour and protein concentrate was obtained from *M. pruriens* and underwent a proximal chemical analysis and determination of color. Later, individually and sequentially kinetic hydrolysis were performed using the enzymes pepsin and pancreatin and degree of hydrolysis (DH) was determined by the method of ophthaldialdehyde. The antithrombotic activity was evaluated using turbidimetric method for determining the concentration inhibiting 50% of platelet aggregation ( $IC_{50}$ ), being the best treatments the lowest values of  $IC_{50}$ . The best hydrolysates with antithrombotic activity were fractionated by ultrafiltration using membranes with MWCO 3 and 10 kDa and the obtained fractions were evaluated for their biological activity. Flour and protein concentrate showed a protein content of 23.47 and 60.68%, respectively. Flour has a higher luminosity ( $L^* = 91.32$ ) than the protein concentrate ( $L^* = 40.89$ ). The kinetics of hydrolysis with pepsin, pancreatin and pepsin-pancreatin sequential system presented values DH's = 12.93, 17.94 and 27.60%, respectively. Hydrolysates with pepsin at 10 and 60 min reaction and hydrolysates with pancreatin at 30 and 60 min reaction showed the highest antithrombotic activity with  $IC_{50} = 7,609, 13,991, 28,716$  and  $22,814$  mg/mL, respectively, while the sequential hydrolyzate shows no activity. When most active hydrolysates were separated by ultrafiltration, 3-10 kDa fraction of the hydrolyzate with pepsin at 60 min reaction showed the greatest antithrombotic activity ( $IC_{50} = 6.010$  mg / mL).

The use of pepsin generated antithrombotic peptide fractions that could be used in the design of new food products that help prevent and / or treat thrombosis.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 TROMBOEMBOLISMO VENOSO .....	3
2.2 ALIMENTOS FUNCIONALES EN LA PREVENCIÓN DE PROBLEMAS DE SALUD.....	6
2.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	7
2.3.1 OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	9
2.3.2 BIODISPONIBILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	13
2.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS .....	14
2.3.4 PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS .....	15
2.3.5 FUENTES DE OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	18
2.4 LEGUMINOSAS COMO FUENTE DE PROTEÍNAS .....	19
2.5 <i>Mucuna pruriens</i> .....	20
III. ANTECEDENTES.....	23
IV. JUSTIFICACIÓN .....	28
V. OBJETIVOS .....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....	30
6.2 OBTENCIÓN DE LA HARINA DE <i>M. pruriens</i> .....	30
6.3 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNIC DE <i>M. pruriens</i> .....	30
6.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA HARINA Y EL CONCENTRADO PROTEÍNIC DE <i>M. pruriens</i> .....	31
6.5 DETERMINACIÓN DE COLOR DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNIC.....	32
6.6 HIDRÓLISIS DEL CONCENTRADO PROTEÍNIC .....	32
6.7 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS .....	33
6.8 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA .....	33
6.9 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS POR ULTRAFILTRACIÓN .....	35
6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNIC DE <i>Mucuna pruriens</i> .....	36
7.2 COLOR DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNIC DE <i>Mucuna pruriens</i> .....	41
7.3 HIDRÓLISIS DEL CONCENTRADO PROTEÍNIC DE <i>Mucuna pruriens</i> .....	44
7.4 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA .....	52
7.4.1 INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE <i>M. pruriens</i> .....	53
7.4.2 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA <i>IN VITRO</i> DE LOS HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE <i>M. pruriens</i> .....	58
7.4.3 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA <i>IN VITRO</i> DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN.....	62

VIII. CONCLUSIONES .....	66
IX. REFERENCIAS .....	68

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Principales enzimas comerciales utilizadas en la obtención de péptidos con diferentes actividades biológicas.	11
2	Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo.	15
3	Composición aminoacídica de semillas de <i>Mucuna pruriens</i> de diferentes lugares de procedencia.	21
4	Composición química proximal de la harina y concentrado proteínico de <i>Mucuna pruriens</i> .	36
5	Color de la harina y concentrado proteínico de <i>Mucuna pruriens</i> .	42
6	Comparación de valores de GH entre los sistemas enzimáticos.	52
7	Inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado proteínico de <i>M. pruriens</i> con pepsina evaluado en una concentración de 2.5 mg/mL.	54
8	Inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado proteínico de <i>M. pruriens</i> con pancreatina.	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Clasificación de enzimas según su actividad catalítica.	10
2	Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de <i>M. pruriens</i> con pepsina.	45
3	Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de <i>M. pruriens</i> con pancreatina.	47
4	Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de <i>M. pruriens</i> con el sistema secuencial pepsina-pancreatina.	50
5	Inhibición de la agregación plaquetaria in vitro de los diferentes tiempos (t) de hidrólisis proteínica de <i>M. pruriens</i> con pepsina, evaluados a 0.5, 1.5 y 2.5 mg/mL.	53
6	Inhibición de la agregación plaquetaria in vitro de los diferentes tiempos (t) de hidrólisis proteínica de <i>M. pruriens</i> con pancreatina, evaluados a 0.5, 1.5 y 2.5 mg/mL.	56
7	Actividad antitrombótica in vitro del hidrolizado proteínico de <i>M. pruriens</i> obtenido con pepsina durante 60 min.	59
8	Actividad antitrombótica in vitro del hidrolizado proteínico de <i>M. pruriens</i> obtenido con pancreatina durante 60 min.	61
9	Actividad antitrombótica in vitro de las fracciones peptídicas de <i>M. pruriens</i> a partir de los hidrolizados con pepsina y pancreatina.	62

## I. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida sedentario y los malos hábitos alimenticios han producido enfermedades que aquejan a la sociedad de hoy en día, un ejemplo de esto, son las enfermedades cardiovasculares. Actualmente en México, las enfermedades cardiovasculares afectan a un elevado porcentaje de la población. Las enfermedades isquémicas del corazón, incluido el tromboembolismo venoso, son la primera causa de muerte a nivel nacional (NAAIS, 2005). El tromboembolismo venoso (TEV) comprende dos condiciones relacionadas: la trombosis venosa profunda (TVP) y la tromboembolia pulmonar (TEP). Al menos 90% de los casos de TEP son resultado de trombosis venosa en las piernas, esto es debido a que la trombosis venosa profunda (TVP) y la TEP son expresiones clínicas de la misma enfermedad (Lee et al., 1999; Heit, 2003). La presentación clínica de un episodio de tromboembolia pulmonar (TEP) representa una serie de eventos hemodinámicos en cascada, que llevan al colapso circulatorio, estado de choque e incluso a la muerte (Santos-Martínez et al., 2008). Los fármacos empleados en el tratamiento de la trombosis resultan costosos y en ocasiones presentan efectos secundarios, por lo que se ha hecho necesario generar alternativas terapéuticas que no presenten estas limitaciones (Arzamendi et al., 2006).

Tomando en cuenta esta problemática de salud humana, se han generado necesidades y oportunidades que pueden ser aprovechados por la ciencia de los alimentos, para el diseño de alimentos específicos provenientes de diferentes materias primas, que pueden fungir como promotores de la salud, es decir, alimentos funcionales (Korhonen, 2002). En este sentido las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector de los alimentos funcionales (Segura-Campos et al., 2013a). En los últimos años, el estudio de los péptidos bioactivos presentes en las secuencias de las proteínas de los alimentos, ha recibido una gran atención desde el punto de vista funcional debido a que presentan diversas actividades biológicas, por ejemplo, funciones antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores. Tales péptidos son inactivos dentro de las proteínas precursoras y pueden ser liberados por proteólisis enzimática (Vioque et al., 2000).

Por todo lo anterior en el presente trabajo de investigación se evaluará el efecto antitrombótico *in vitro* de las fracciones peptídicas bioactivas obtenidas de los hidrolizados de proteínas del frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo, se calcula que en el 2008 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las defunciones registradas a nivel mundial en dicho año. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos y más del 80% se producen en países en desarrollo. Se calcula que para el año 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV y se considera que seguirán siendo la principal causa de muerte (Montero-Granados & Monge-Jiménez, 2010). Actualmente en México, las ECV afectan a un elevado porcentaje de la población. Las enfermedades isquémicas del corazón, incluido el tromboembolismo venoso, son la primera causa de muerte a nivel nacional (NAAIS, 2005).

El tromboembolismo venoso (TEV) comprende dos condiciones relacionadas: la trombosis venosa profunda (TVP) y la tromboembolia pulmonar (TEP), la gravedad de esta última entidad está dada por las alteraciones que se presentan en el pulmón. La muerte súbita sucede en una cuarta parte de los pacientes con TEP; para los médicos clínicos esto es de gran preocupación, debido a que el tiempo para elaborar un diagnóstico y para iniciar una terapia es insuficiente (Heit, 2003). La incidencia anual de TEV es de 1 por 1,000 personas y se incrementa con la edad (Silverstein et al., 1998). La incidencia es menor de un caso por millón en menores de 15 años de edad, mientras que en adultos mayores de 85 años el riesgo es de 1 entre 100 habitantes (Cogo et al., 1994; Heit, 2003). Esta alta incidencia es constante desde 1980 y no se ha podido disminuir a pesar de que se conocen mejor los riesgos que la ocasionan (Heit et al., 2001). En el TEV la presentación clínica característica, como el dolor de piernas, la inflamación y el dolor torácico al respirar, está ausente en más de la mitad de los individuos afectados, incluyendo a aquellos que murieron por TEP. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con TEV importante no se reconocen ni reciben tratamiento (Gama-Hernández & Morales-Blanchir, 2008). Con respecto al riesgo según el género de la persona, se ha observado una mayor incidencia de TEV en hombres y éstos en edad avanzada, así como en mujeres obesas. El peso sugiere una alta incidencia en mujeres durante sus años

de maternidad (Silverstein et al., 1998). Otros factores de riesgo independientes para TEV son: cirugía, trauma, estar hospitalizado o en un asilo, neoplasia maligna con o sin tratamiento con quimioterapia, catéter venoso central, trombosis venosa superficial previa y venas varicosas. Al menos 90% de los casos de TEP son resultado de trombosis venosa en las piernas. De esta manera la TVP y la TEP son expresiones clínicas de la misma enfermedad (Lee et al., 1999).

La trombosis venosa profunda (TVP) se define como la presencia de un coágulo sanguíneo en una vena profunda. Algunos de estos episodios se pasan por alto cuando el trombo o el émbolo son pequeños, no obstruye la luz del vaso sanguíneo y no altera la circulación de la sangre por la existencia de circulación colateral. La TVP usualmente se inicia en las venas profundas de los músculos de la pierna. Si la trombosis se encuentra en este lugar, el riesgo de TEP es muy bajo; sin embargo, cuando se propaga dentro del sistema venoso proximal, el riesgo de TEP aumenta, se calcula que cerca de dos millones de personas que sufren TVP, 600,000 tienen TEP y 60,000 mueren por esta complicación (Cueto-Robledo & Favila-Tello, 2008).

La TEP representa el extremo del TEV. La presentación clínica de un episodio de tromboembolia pulmonar (TEP) representa una serie de eventos hemodinámicos en cascada, desde los imperceptibles hasta los que llevan al colapso circulatorio, estado de choque e incluso a la muerte. Estos eventos representan una condición más grave, como la observada en TEP masiva. Los eventos hemodinámicos finales de una TEP masiva son el resultado de una combinación entre el tamaño del trombo y la función cardiopulmonar previa, y podrían agruparse en tres condiciones: choque, paro cardiorrespiratorio y muerte súbita. (Santos-Martínez et al., 2008).

El tratamiento trombolítico se lleva a cabo con activadores del plasminógeno, como la estreptocinasa (periodo de 3 a 102 meses) o el activador plasminógeno hístico recombinante (alteplasa), seguido de la anticoagulación. El tratamiento trombolítico debe ser continuado hasta que la vena restaure la anatomía valvular normal. Sin embargo, existe la desventaja del riesgo de hemorragia con estreptocinasa o alteplasa, incluyendo hemorragia intracraneal.

Otros compuestos inhiben la formación de fibrina y secundariamente la de protrombina, como la heparina convencional, la heparina de bajo peso molecular y los anticoagulantes orales. No obstante, el uso de los anticoagulantes orales es responsabilidad del paciente y del médico, debido a que algunos anticoagulantes orales pueden ver alterada su eliminación metabólica y su absorción por el uso de otros medicamentos, debido a mecanismos desconocidos. Además, existen algunos medicamentos que evitan la agregación o la adhesividad plaquetaria y que no son anticoagulantes, como el ácido acetilsalicílico y el dipyridamol (Cueto-Robledo & Favila-Tello, 2008; Navarro-Reynoso, 2008).

En general desde el punto de vista terapéutico, para el tratamiento de la trombosis se emplean durante tiempos prolongados fármacos con efecto anticoagulante. Los fármacos antitrombóticos presentan una serie de efectos secundarios tales como hemorragias, neutropenia (reducción de granulocitos), trombocitopenia (reducción de plaquetas) y toxicidad hepática (Arzamendi et al., 2006). Sin embargo, en casos extremos de TVP es necesario restaurar la vena mediante la trombolectomía quirúrgica, que consiste en la remoción incompleta del trombo y la lesión en el endotelio venoso para salvar la extremidad (Cueto-Robledo & Favila-Tello, 2008).

La prevención de la TVP en los pacientes con riesgo es evidentemente preferible a tratar la enfermedad después de que aparece, opinión apoyada por el análisis de costo y efecto (Cueto-Robledo & Favila-Tello, 2008). En este sentido cobra mayor importancia la prevención de dichas patologías, sobre todo desde el punto de vista dieta-salud. En los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. Se ha investigado la presencia de diferentes péptidos bioactivos en proteínas de diversos tipos de alimentos, los cuales tienen la capacidad de actuar de manera beneficiosa sobre diversos procesos fisiológicos del organismo (Córdova-Lizama et al., 2013). Estudios recientes (Cai et al., 2003; Aimutis, 2004) han demostrado que péptidos presentes en la leche y en el suero lácteo, presentan actividad antitrombótica.

Debido a lo anterior y a la creciente búsqueda de los consumidores por alimentos e ingredientes funcionales, es necesario proveer productos que satisfagan estas necesidades y que aporten un valor agregado a la salud por medio de compuestos que potencialicen o agreguen diversas propiedades a los nuevos alimentos, ya sean de carácter funcional, nutrimental o bioactivo (Córdova-Lizama et al., 2013).

## **2.2 ALIMENTOS FUNCIONALES EN LA PREVENCIÓN DE PROBLEMAS DE SALUD**

La dieta puede tener un papel importante en la modulación de varias funciones del cuerpo contribuyendo a un mejoramiento del estado de bienestar, una reducción de riesgos relacionados con ciertas enfermedades e incluso un mejoramiento en la calidad de vida. Estos conceptos son manejados actualmente en la Ciencia de los Alimentos y han llevado a la introducción de una nueva categoría de los alimentos comestibles promotores de la salud, es decir, los alimentos funcionales (Korhonen, 2002). Entre algunos ejemplos, de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, péptidos bioactivos y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (Ashwell, 2001). La preocupación sobre la salud, abarca un número de problemas, necesidades y oportunidades que pueden ser aprovechados para el diseño de alimentos específicos de diferentes materias primas (Korhonen, 2002).

Hoy en día se reconoce en mayor medida que llevar un estilo de vida sano incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y a mantener un buen estado de salud. La necesidad de contar con alimentos que sean beneficiosos para la salud, también se ve apoyada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando a nivel mundial. El aumento de la esperanza de vida, tiene como consecuencia el incremento de la edad promedio de la población, estos dos aspectos han potenciado que los gobiernos, los investigadores, los profesionales de la salud, y la industria alimentaria busquen maneras de establecer una base científica que apoye los fundamentos beneficiosos que se asocian a los

componentes funcionales y alimentos que los contienen. En este sentido las proteínas y péptidos con actividad biológica podrían contribuir a reducir la epidemia mundial de enfermedades crónico degenerativas, causante de un gran número de discapacidades y muertes prematuras. Actualmente las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector de los alimentos funcionales (Segura-Campos et al., 2013a).

## **2.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos que nutricionalmente proporcionan aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo humano. Desde el punto de vista funcional, estos 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 (Korhonen et al., 1998).

En este sentido, desde el punto de vista funcional existen numerosas investigaciones sobre el estudio de las proteínas alimentarias como componentes beneficiosos, en las cuales se estudia la generación de péptidos bioactivos a través de proteínas de diversos alimentos (Vioque & Millán, 2005). El término bioactivo se emplea para describir componentes con diversos tipos de actividad biológica, tales como funciones antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores (Vioque et al., 2000).

En años recientes la Ciencia de los Alimentos y Nutrición se ha interesado en los péptidos biológicamente activos presentes en las proteínas de los alimentos. Tales péptidos son inactivos dentro de la proteína precursora y pueden ser liberados por proteólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal, durante el procesado de alimentos o mediante hidrólisis química o enzimática (Mulero-Cánovas et al., 2011). Los hidrolizados proteínicos se pueden elaborar mediante procesos químicos, ya sea con ácidos o álcalis, o mediante procesos biológicos empleando enzimas. El método enzimático es el más recomendado si los productos serán utilizados en el campo de los alimentos (Vioque et al., 2001). Los péptidos

liberados actúan como componentes reguladores similares a las hormonas, dentro del cuerpo humano. Los péptidos bioactivos son secuencias aminoacídicas que tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, ayudando a prevenir y/o tratar diferentes desordenes en la salud, que favorecen al estado de bienestar de los humanos (Hernández-Ledesma et al., 2013; Segura-Campos et al., 2013a).

La función de los péptidos bioactivos está basada en su composición aminoacídica y su secuencia, además algunos péptidos pueden poseer propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2006). Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud (Vioque et al., 2000). Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, ejerciendo su efecto sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, dependiendo de su secuencia aminoacídica. Su actividad es similar a la de una hormona o fármaco que modula una función fisiológica a través de la interacción de éste con un receptor específico desencadenando una respuesta fisiológica dependiendo de la secuencia aminoacídica de la fracción peptídica aislada de la proteína (FitzGerald & Meisel, 2000). De esta manera, podrían alterar el metabolismo celular y presentar funciones vasoregulatoras, neurotransmisoras, antihipertensivas, antioxidantes y antitrombóticas (Baró et al., 2001).

En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano, animal y vegetal, así como a través de la hidrólisis por microorganismos proteolíticos (Korhonen & Pihlanto, 2006). En la industria de los alimentos, a menudo la hidrólisis enzimática es aplicada para obtener proteínas alimentarias con mejores propiedades funcionales sin la pérdida de su calidad nutritiva, ya que la reacción de la enzima requiere condiciones suaves y tiene mínimos efectos sobre la calidad nutricional de la proteína (Van der Plancken et al., 2003).

### **2.3.1 OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

La hidrólisis de proteínas en los alimentos se lleva a cabo buscando el mejoramiento de las características nutrimentales, el retardo del deterioro, el aumento de la solubilidad, el incremento de la formación de espuma, de las propiedades de coagulación y de la capacidad emulsificante, así como la remoción de sabores y olores desagradables y de sustancias tóxicas o inhibitorias (Lahl & Braun, 1994). En la hidrólisis de proteínas, la escisión de los enlaces peptídicos puede ser llevado a cabo por procesos enzimáticos o químicos. Los procesos químicos que incluyen la hidrólisis ácida o alcalina, tienden a ser difíciles de controlar, y el producto sufre una alta modificación de aminoácidos. Las condiciones de hidrólisis ácida convencional para la determinación de aminoácidos, usa HCl 6 M a 110 °C por más de 24 h, puede destruir al aminoácido triptófano, mientras que la hidrólisis alcalina puede reducir el contenido de los aminoácidos cisteína, arginina, treonina, isoleucina, serina y lisina. Por otra parte la hidrólisis enzimática requiere de condiciones no agresivas, evitando así las condiciones extremas para los tratamientos químicos, además de que no se disminuye el valor nutricional de la proteína (Tavano, 2013).

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Benítez et al., 2008). Las proteasas o enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad, lo cual permite desarrollar hidrolizados proteínicos con características químicas y nutricionales bien definidas (Badui, 2006; Tavano, 2013). Generalmente, las proteasas que se utilizan son mezclas enzimáticas de grado comercial, se venden en estado líquido o sólido y se clasifican de varias formas. Según su origen pueden ser de animales, vegetales, o microorganismos (bacterias y hongos) (Guadix et al., 2000). Durante la hidrólisis, la fuente de proteína, el tipo de enzima, la actividad biológica 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; Mulero-Cánovas et al., 2011).

La especificidad de una proteasa determina la posición en la cual una enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El sitio activo de una enzima tiene un arreglo característico de residuos de aminoácidos los cuales definen la interacción enzima-sustrato. El conocimiento de la especificidad de una proteasa provee información que lleva a una mejor elección para actuar sobre un sustrato específico. La diferencia de especificidad entre proteasas es importante para considerar que proteasa elegir, de acuerdo a la fuente de proteína que será hidrolizada, así como predecir los productos que se obtendrán. Una misma proteína puede producir diferentes hidrolizados usando diferentes proteasas (Tavano, 2013). Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico (Benítez et al., 2008).

En base a su actividad catalítica, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos: endopeptidasas, si hidrolizan enlaces internos de las cadenas peptídicas y exopeptidasas si hidrolizan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (Guadix et al., 2000). Estas últimas pueden dividirse a su vez en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal, como se aprecia en la figura 1 (Vioque et al., 2001).

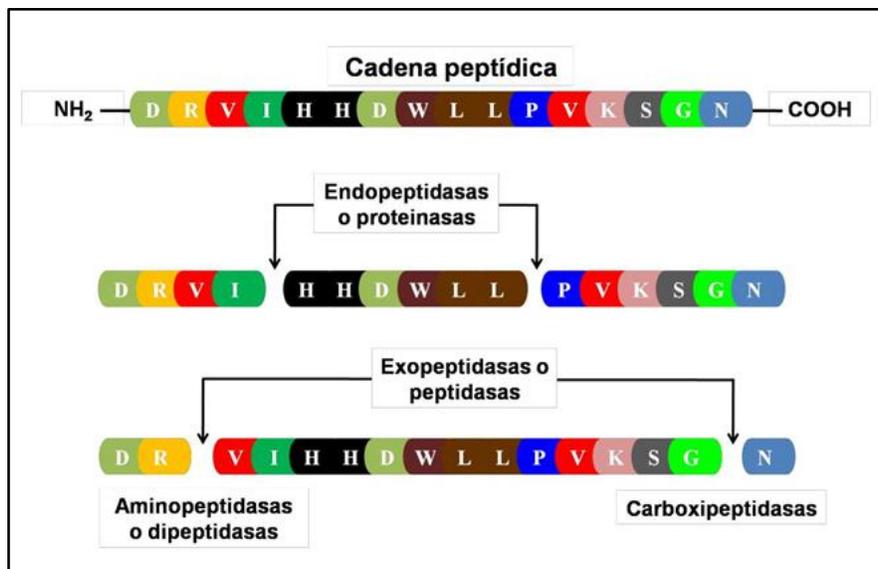


Figura 1. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica (Torruco-Uco et al., 2008).

Dependiendo de la naturaleza del centro catalítico de las proteasas, estas difieren, debido a los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartatoproteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico, o bien el centro activo puede contener cationes metálicos que promueven la catálisis, siendo el más frecuente el zinc (Benítez et al., 2008). En la tabla 1 se muestran algunas proteasas comerciales grado alimenticio que actualmente se encuentran disponibles.

Tabla 1. Principales enzimas comerciales utilizadas en la obtención de péptidos con diferentes actividades biológicas.

Tipo de enzima	Fuente	Nombre	Temp. (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
<b>Serinproteasas</b>					
Animal	(Porcino, bovino)	Tripsina	30-60	7-9	-*Lis (o Arg) ---
		Quimotripsina	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu) ---
		Elastasa		6-8	-*Ala----
Bacteriana	<i>Bacillus licheniformis</i>	Subtilisin.			
		Carlsberg, Alcalasa	50-60	6-10	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Subst. BPN, Subtilisin Novo	40-55	6-10	-*AAhf----
<b>Cisteinproteasas</b>					
Plantas	Papaya	Papaína	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)-
	Piña	Bromelaina	20-65	5-8	AAhf ---
	Látex de Ficus	Ficina		5-8	
<b>Aspartato proteasas</b>					
Animal	Porcino, bovino	Pepsina		1-4	-Fe (o Tir, Leu)*-
	Becerro	Quimosina		4-6	Trp (o Fe, Tir)
Fúngica	<i>Aspergillus saitoi</i>	Aspergillopeptidasa	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *---
		A			
	<i>Rhizopus</i> sp.	Newlasa	40-50	3-6	Similar a la pepsina

<b>Metaloproteasas</b>					
Animal	Páncreas	Carboxipeptidasa A		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
<hr/>					
Bacteriana	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Neutrasa®	40-55	6-7,5	-Fe, Leu, Val*---
	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Termolisina		7-9	-Ile, Leu, Val, Fe*--
<b>Preparaciones enzimáticas</b>					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima	Fruto de la papaya	Papaína cruda		5-9	Amplia especificidad
Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa	Páncreas (bovino y porcino)	Pancreatina	30-80	7-9	Muy amplia especificidad
Mezcla de serin-, aspartato y metaloproteasas.	<i>Aspergillus oryzae</i>	Veron P, Sumicina LP, Biocina A	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
Mezcla de endo- y exoproteasas, actividad en pH alcalino y neutro.	<i>Streptomyces griseus</i>	Pronasa		7-9	Muy amplia especificidad

Fuente: Benítez et al. (2008).

Por otra parte, el grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones

utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez et al., 2008). Dependiendo del 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 siendo los hidrolizados extensivos una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos del organismo (Vioque et al., 2006).

### **2.3.2 BIODISPONIBILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

La digestibilidad de una proteína y la biodisponibilidad de sus aminoácidos es un factor importante el cual determina la calidad de la proteína. El valor nutritivo de las proteínas depende de la capacidad que estas tienen para satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos esenciales. Esto es, debido a que no todas las proteínas son digeridas, absorbidas y utilizadas en el mismo grado. Las diferencias en la digestibilidad de las proteínas podría deberse a diferencias inherentes en la naturaleza de los constituyentes de la proteína alimenticia, los cuales podrían alterar la digestión como resultado de factores anti fisiológicos o por condiciones en el procesamiento que alteran el proceso enzimático de digestión (Adebowale et al., 2005).

Las proteínas y péptidos de la dieta están sujetos a cambios drásticos en su estructura durante los procesos de ingestión, digestión y absorción. El destino metabólico de los aminoácidos es complejo y va desde la utilización como sustrato energético o hasta la síntesis de proteínas y péptidos, pasando por la síntesis de aminoácidos no esenciales o la formación de otros compuestos nitrogenados (Martínez-Augustin & Martínez de Victoria, 2006).

Las proteínas ingeridas son primeramente hidrolizadas por varias proteinasas en el tracto gastrointestinal para producir oligopéptidos, algunos de los cuales pueden ser biológicamente activos, sin embargo algunas proteínas resisten la hidrólisis de las proteinasas permaneciendo intactas en el tracto. Algunos de los oligopéptidos formados durante la hidrólisis por peptidasas son de tamaño pequeño (di y tri-péptidos), los cuales son digeridos por peptidasas que se encuentran en el borde de la superficie de las células epiteliales para producir aminoácidos, no obstante algunos de éstos permanecen sin ser hidrolizados (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. El transportador peptídico PepT1 emplea un gradiente electroquímico transmembranal de protones como fuerza de transporte y con amplia especificidad (Yang et al., 1999). Algunos de los aminoácidos presentes en la célula son utilizados como fuente energética, otros sufren transformaciones metabólicas (transaminación de aminoácidos dicarboxílicos) antes de pasar a la sangre. A su llegada al hígado, una parte de los aminoácidos es captada y utilizada por este órgano, el resto entra en la circulación sistémica y son utilizados por los tejidos periféricos (Martínez-Augustin & Martínez de Victoria, 2006).

### **2.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS**

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica producidos durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de alimentos pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial como nutracéuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedad (Mulero-Cánovas et al., 2011).

Las secuencias aminoacídicas de los péptidos tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, como se observa en la tabla 2, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización; también pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, memoria, dolor, apetito y los efectos de las vías de estrés del sistema

nervioso central, ejerciendo sus efectos a nivel local o en diversos órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Ruiz-Ruiz et al., 2013a).

Tabla 2. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo

Péptidos	Efecto en el organismo
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

Fuente: Iwaniak & Minkiewicz (2007).

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica podrían ayudar a reducir la actual problemática de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial (WHO, 1999).

### 2.3.4 PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS

La trombosis consiste en la obstrucción local del flujo de sangre por una masa en algún vaso arterial o venoso, causando que los tejidos irrigados por este vaso sufran isquemia. Los trombos resultan de un desequilibrio en la activación de los procesos homeostáticos normales, esto causa la formación de trombos en el tejido vascular no lesionado (Montero-Granados & Monge-Jiménez, 2010). El proceso natural de la homeostasis tiene como finalidad mantener un delicado equilibrio que permite el flujo de sangre sin obstrucción a través de las venas, mientras que también permite su coagulación en respuesta a una lesión. Sin embargo una mala función de este proceso puede llevar a la pérdida del equilibrio

homeostático, resultando en la formación de un coágulo en las venas. Esto se debe a que dentro de los vasos sanguíneos, tejido muerto o depósitos de colesterol podrían formar superficies rugosas sobre las paredes de los vasos sanguíneos. La falta de un mecanismo en las plaquetas para distinguir la necesidad de reparar la rotura de los vasos sanguíneos y la pared rugosa de vasos sanguíneos no dañados, conlleva a un evento trombótico anormal. Las plaquetas, por lo tanto, tienen un rol importante durante este proceso (Pollina, 1996).

Los cuatro pasos fundamentales involucrados en el proceso de la trombosis son: a) la activación del complejo receptor glicoproteínico IIb/IIIa de las plaquetas por medio de diferentes agonistas, tales como ciertas proteínas sanguíneas y enzimas (ADP, trombina, colágeno y epinefrina); b) la adhesión de una plaqueta a la lesión vascular por medio de receptores de superficie celular; c) la agregación plaquetaria en una gran masa colectiva llamada trombo; d) comienza la coagulación debido a una cascada de procesos bioquímicos, formándose una malla tridimensional impermeable (Pollina, 1996).

Durante la agregación plaquetaria que ocurre en el proceso de la trombosis, el fibrinógeno se enlaza a receptores específicos situados en la superficie de las plaquetas, permitiendo su agregación y la formación de fibrina (Jollés et al., 1986). Esta agregación plaquetaria está mediada por el enlace del fibrinógeno a su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, esta unión involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) del fibrinógeno (Mulero-Cánovas et al., 2011).

Por tanto, lograr la inhibición de la agregación plaquetaria y evitar las subsecuentes etapas que conllevan a un episodio trombótico, puede ser llevado a cabo mediante la prevención de la unión del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa (Pollina, 1996). Esto ha llevado a diversas investigaciones a desarrollar péptidos que contengan la secuencia RGD o que puedan mimetizarla para que sean capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación plaquetaria (Mulero-Cánovas et al., 2011).

En la secuencia RGD, una unidad catiónica, en este caso el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido  $\beta$ -carboxílico del Asp, es requerida para la actividad inhibitoria. Además, la distancia entre estos grupos funcionales catiónicos y aniónicos es un factor importante en potencia (Miyashita et al., 1999). El primer criterio que debe cumplir un péptido del tipo RGD es un ángulo pseudo dihedral (orientación relativa de las cadenas laterales de Arg y Asp) en un intervalo  $\geq -45^\circ$  o  $\leq +45^\circ$ , para exhibir actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria. Una vez cumplido este criterio, a mayor distancia entre los centros de carga opuestas (9.9 Å promedio) y/o los  $C^\beta$  de la Arg y Asp (4.5-9 Å), mayor es la actividad biológica (Kostidis et al., 2004). Por otra parte, existen diversos péptidos que mimetizan la secuencia RGD y que han presentado actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria. Un ejemplo son los péptidos con secuencia: Cys-Asp-Cys, diseñado y sintetizado mediante un procedimiento en fase sólida a partir de  $N^\alpha$ -t-Boc-L-Cys-(Acm)-OH para cisteína y  $N^\alpha$ -t-Boc-L-Asp(OBzl)-OH para ácido aspártico (Stavarakoudis et al., 2001); Ser-Ser-Gly-Glu, obtenido a partir de hidrolizados proteínicos de soya (Lee & Kim, 2005) y Cys-Arg-Pro, obtenido a partir de péptidos de semilla de colza (*Brassica napus*) (Zhang et al., 2008). Debido a todo lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a la GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis (Mulero-Cánovas et al., 2011).

La búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y el manejo de esta patología ha conducido al estudio de nuevos productos o ingredientes de uso seguro y efectivo, como los péptidos con efecto antitrombótico, los cuales han sido aislados de diversas fuentes como la caseína bovina (Rojas-Ronquillo et al., 2012), frijol lima (*Phaseolus lunatus*) (Córdova-Lizama et al., 2013), hongo chaga (*Inonotus obliquus*) (Hyun et al., 2006), mejillón azul (*Mytilus edulis*) (Jung & Kim, 2009), proteína de soya (Lee & Kim, 2005), pez limanda (*Limanda aspera*) (Rajapakse et al., 2005), semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) (Sabbione et al., 2015), semilla de colza (*Brassica napus*) (Zhang et al., 2008), cuya actividad biológica está relacionada con su similitud estructural con la cadena del fibrinógeno humano, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios superficiales, inhibiendo así, la agregación que da lugar a la formación de trombos (Baró et al., 2001).

### **2.3.5 FUENTES DE OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos bioactivos, siendo los más estudiados los péptidos aislados de la leche humana y de vaca, además se han aislados péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas muy diversas: sardina, maíz, soya, gelatina (Baró et al., 2001).

Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes alimenticias como: proteína miofibrilar de porcino (Saiga et al., 2003), yema de huevo (Yoshii et al., 2001; Miguel et al., 2006), del músculo y esqueleto de pescado (Neves et al., 2004; Je et al., 2004), de la proteína de la leche (caseínas) y suero de la leche (Warner et al., 2001; Sipola, 2002; Hosono et al., 2002; Gobbetti et al., 2004).

Como las proteínas animales, tradicionalmente empleadas por su gran valor nutritivo y propiedades funcionales, son difíciles de adquirir debido a su elevado costo de producción, ha sido necesario buscar alternativas de menor costo, de fuentes regionales y con la viabilidad de reducir los riesgos de enfermedades crónicas, siendo las proteínas vegetales la mejor alternativa (Córdova-Lizama et al., 2013). En países desarrollados, las proteínas vegetales son consideradas tanto como ingredientes funcionales versátiles, y como componentes biológicamente activos, más que como nutrientes (Adebowale et al., 2005). Recientemente se ha encontrado que las fuentes de origen vegetal presentan un contenido elevado de proteínas, el cual es importante para ser explotadas en la obtención de ciertos componentes bioactivos como son: péptidos, fracciones peptídicas y aminoácidos libres, que pueden tener cierta actividad benéfica al organismo (Clemente et al., 1999). En respuesta, la ciencia de los alimentos se ha enfocado en las proteínas de leguminosas, en un esfuerzo por obtener fuentes de proteínas no convencionales para desarrollar ingredientes nutricionales o funcionales (Betancur-Ancona et al., 2008). Esto se debe a que las leguminosas son de bajo costo y son una fuente de proteína abundante (Adebowale & Lawal, 2004).

## 2.4 LEGUMINOSAS COMO FUENTE DE PROTEÍNAS

Las proteínas vegetales han atraído el interés como ingredientes de sistemas alimentarios alrededor de muchas partes del mundo. El éxito final de la utilización de proteínas vegetales como aditivos, depende de las características que imparten a los alimentos. En países desarrollados, las proteínas vegetales son consideradas ingredientes funcionales o componentes biológicamente activos (Adebowale et al., 2007). México posee una amplia diversidad de recursos naturales con potencial para la obtención y aislamiento de compuestos fisiológicamente activos conocidos como nutraceuticos. Tales compuestos tienen aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales, como es el caso de los péptidos con actividad biológica (Lajolo, 2002). Entre los recursos vegetales empleados para la alimentación, destacan las leguminosas debido a que son la principal forma de obtención de proteínas de estratos socioeconómicos que tienen limitado acceso a proteínas de origen animal, debido a su alto costo de producción y comercialización (SAGARPA, 2000). La creciente preocupación por la salud, ha conducido a una renovada conciencia en la demanda de alimentos con componentes biológicamente activos y la utilización de proteínas vegetales con este fin, siendo las leguminosas una fuente importante de estas. Las leguminosas constituyen una importante parte de la dieta de un gran sector de la población, es una fuente alimentaria de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas (Kala & Mohan, 2010).

La familia de las leguminosas es la tercera más importante dentro del reino vegetal, con 650 géneros y 18,000 especies que crecen en todos los medios y regiones climáticas, sin embargo solamente se utilizan alrededor de 20 de manera regular en la alimentación humana y animal o en la industria oleaginosa. Este grupo vegetal se distingue por su habilidad de fijar nitrógeno atmosférico y transferirlo al suelo para convertirlo en proteína. Las semillas de leguminosas son el segundo grupo alimenticio en importancia para humanos y animales después de los cereales, y son de dos a tres veces más ricas en proteína que éstos, con valores que van según la especie de 17 a 40% (Olvera-Novoa & Olivera-Castillo, 2000). Sin embargo, las leguminosas son utilizadas en la dieta de millones de personas, por lo que ha sido constante la búsqueda de leguminosas con alto contenido proteínico, sugiriendo el uso de leguminosas no convencionales (Mohan & Janardhanan, 1995). Recientemente se han

usado leguminosas silvestres subutilizadas como fuente de proteína vegetal. Dentro de estas leguminosas silvestres, se encuentra el género *Mucuna*, que se extiende en regiones tropicales y subtropicales y son considerados una alternativa de fuente proteínica (Kala & Mohan, 2010).

## **2.5 *Mucuna pruriens***

*Mucuna pruriens* es una especie de leguminosa subutilizada que crece principalmente en Asia, África y en partes de América (Vadivel & Janardhanan, 2000). El nombre común varía según el idioma y país donde se cosecha, en México es frijol terciopelo (Kala & Mohan, 2010). El frijol terciopelo pertenece al género *Mucuna*, el cual incluye aproximadamente 100 especies de bejucos y arbustos que se encuentran a través de las regiones tropicales del mundo. Existen cuatro variedades botánicas de *M. pruriens*: *M. pruriens* var. *utilis* es la variedad cultivada que no pica, *M. pruriens* var. *pruriens* (“pica pica”) tiene pelos urticantes que contienen el compuesto irritante mucanain, *M. pruriens* var. *hirsuta*, de la India, y *M. pruriens* var. *sericophylla*, de las Filipinas. El frijol terciopelo se usa principalmente como un cultivo de cobertura, los cuales aportan materia orgánica y nitrógeno (N) al suelo. Se informan rendimientos de biomasa fresca de 5.5 a 21 ton/ha y de N de hasta 331 kg/ha (Brunner et al., 2011).

*Mucuna pruriens* es una leguminosa con un alto contenido de proteína (23-35%) y tiene una calidad nutricional comparable con otras leguminosas, como por ejemplo, la soya y el frijol lima. Es por esto que *Mucuna pruriens* tiene un potencial como una fuente de proteína alternativa y económica (Herrera-Chalé et al., 2014). Las proteínas de *Mucuna pruriens* se clasifican de acuerdo a su solubilidad y se encuentran en diferentes porcentajes: albúminas solubles en agua (63.5-69.4%), globulinas solubles en solución salina (18.7-24.3%), prolaminas solubles en alcohol (6.2-15.4%) y glutelinas solubles en NaOH (0.12-0.25%). El alto contenido de albúminas en esta leguminosa es responsable de su importancia nutricional debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, lisina y aminoácidos azufrados, además que la alta solubilidad en agua de estas proteínas, es una ventaja desde el punto de vista de su uso en productos alimenticios (Adebowale et al., 2007).

El valor nutritivo de las proteínas depende de la capacidad de satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos esenciales. *Mucuna pruriens* tiene un contenido total de aminoácidos esenciales de 555 mg g<sup>-1</sup> de proteína. En la tabla 3 se aprecia la composición de aminoácidos de *Mucuna pruriens*, esta composición aminoacídica es mayor que los valores recomendados para niños en edad escolar. Por lo que *Mucuna pruriens* podría ser una buena fuente de aminoácidos esenciales. Sin embargo, *Mucuna pruriens* contiene solo cantidades trazas de los aminoácidos metionina y cisteína, no obstante, ya ha sido reportado que las leguminosas tienen niveles bajos de estos aminoácidos. Es notable también el alto contenido de lisina, debido a que este aminoácido es deficiente en las dietas basadas en cereales (Adebowale et al., 2005).

Tomando en consideración lo anterior, la leguminosa *Mucuna pruriens* puede plantearse como una opción para la obtención de productos con un alto contenido de proteína, como los concentrados proteínicos, a partir de los cuales se podrían generar vía modificación enzimática *in vitro*, péptidos con actividad biológica, con potencial para ser empleados como ingredientes nutracéuticos o como aditivos en el desarrollo de sistemas alimentarios (Herrera-Chalé et al., 2014).

Tabla 3. Composición aminoacídica de semillas de *Mucuna pruriens* de diferentes lugares de procedencia (mg g<sup>-1</sup> de proteína cruda).

Aminoácido	Lugar de procedencia de las semillas de <i>M. pruriens</i>		
	Ibadan, Nigeria <sup>A</sup>	Marthandam, Tamil Nadu, India <sup>B</sup>	Calkiní, Campeche, México <sup>C</sup>
Alanina	67.4	32.2	53.0
Arginina	89.8	52.8	75.2
Ácido aspártico + asparagina	167.0	114.0	176.0
Cisteína	Traza	10.1	26.3 <sup>D</sup>
Ácido glutámico + glutamina	158.0	123.0	166.3
Glicina	56.7	43.0	72.3
Histidina	36.7	34.7	30.8

Isoleucina	96.7	41.6	49.5
Leucina	77.8	78.8	93.3
Lisina	78.5	61.8	92.1
Metionina	Traza	7.2	26.3 <sup>D</sup>
Fenilalanina	70.9	47.0	136.4 <sup>E</sup>
Prolina	125.0	50.6	ND
Serina	43.2	43.7	70.4
Treonina	46.7	35.8	58.8
Triptófano	20.9	12.2	14.4
Tirosina	60.9	44.5	136.4 <sup>E</sup>
Valina	57.8	42.3	60.7

---

<sup>A</sup> (Adebowale et al., 2005)

<sup>B</sup> (Siddhuraju & Becker, 2005)

<sup>C</sup> (Betancur-Ancona et al., 2008)

<sup>D</sup> Metionina + cisteína

<sup>E</sup> Fenilalanina + tirosina

ND, no determinado

### III. ANTECEDENTES

Actualmente se han realizado investigaciones sobre la utilización de péptidos con actividad antitrombótica obtenidos mediante hidrólisis enzimática con el fin de solucionar los problemas de salud ocasionados por la trombosis (Rajapakse et al., 2005; Lee & Kim, 2005; Zhang et al., 2008; Córdova-Lizama et al., 2013; Sabbione et al., 2015).

Rajapakse et al. (2005), evaluaron la actividad antitrombótica de hidrolizados proteínicos obtenidos del pez limanda (*Limanda aspera*), usando siete enzimas diferentes: alcalasa, neutrasa, pepsina, papaína,  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina y la enzima cruda del ciego pilórico del atún (TPCCE, por sus siglas en inglés). Determinaron la actividad anticoagulante de los hidrolizados mediante las pruebas de coagulación de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT, por sus siglas en inglés), tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés) y tiempo de trombina (TT). Los resultados mostraron que todos los hidrolizados después de 4 h de reacción, prolongaron APTT, pero no PT y TT, sin embargo, la mayor prolongación de APTT se presentó en el hidrolizado de  $\alpha$ -quimiotripsina ( $68.4 \pm 0.5$  s), por lo que este hidrolizado fue fraccionado secuencialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), identificaron el peso molecular de la fracción purificada en 12.01 kDa. La secuencia aminoacídica (TDGSEDYGILEIDSR) fue determinada por un secuenciador de proteínas automatizado acoplado a un sistema HPLC. Determinaron la especificidad de la actividad sobre los factores de coagulación activados, usando una prueba de coagulación modificada de APTT, con lo que identificaron que la fracción inhibió el factor FXIIa y fue nombrada YAP, por su acrónimo en inglés *yellowfin sole anticoagulant protein* (Proteína anticoagulante del pez *Limanda*). Se determinó la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria mediada por adenosín difosfato (ADP), trombina y colágeno. Los resultados mostraron que la inhibición de la agregación mediada por la trombina fue mayor que la mediada por ADP en todas las concentraciones de YAP evaluadas, no obstante, la agregación

fue completamente inhibida en concentraciones de 600 y 660  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Lo anterior, indicaron estos autores se debió a que YAP es un potente inhibidor del receptor de superficie celular glicoproteínico GPIIb/IIIa. A pesar de lo anterior, YAP no inhibió la adhesión plaquetaria mediada por el colágeno vía glicoproteína GPIa/IIa. Se concluyó, que los hidrolizados de proteína del pez limanda son moléculas bioactivas potentes.

Lee & Kim (2005), evaluaron la actividad antitrombótica de fracciones peptídicas obtenidas mediante la hidrólisis enzimática secuencial de aislados proteínicos de soya, usando una endopeptidasa (Promod 278) y una exopeptidasa (Promod 279). La evaluación de la capacidad de inhibición de la agregación plaquetaria inducida con adenosín difosfato (ADP) se determinó en un plasma rico en plaquetas obtenido de sangre de ratas. Estos autores observaron que los hidrolizados tuvieron actividad de inhibición con  $IC_{50}$  (concentración media inhibitoria) de 2 mg/mL, y para encontrar a los principales péptidos antitrombóticos, los hidrolizados fueron separados secuencialmente mediante cromatografía de filtración en gel, HPLC de fase reversa y HPLC de intercambio iónico. El cromatograma que obtuvieron por filtración en gel, mostró que todas las fracciones presentaron inhibición de la agregación plaquetaria, sin embargo, las fracciones con número 127 y 130 presentaron mayor actividad y se usaron para la separación en HPLC de fase reversa, donde el cromatograma obtenido mostró la fracción con más actividad inhibitoria y esta fue separada mediante HPLC de intercambio iónico, donde obtuvieron dos fracciones que presentaron mayor actividad. Estas fracciones fueron sujetas a una determinación de pesos moleculares mediante espectrometría de masas de ionización por electroatomizador, identificando los pesos moleculares de la primera y segunda fracción (381.3 y 391.3 Da respectivamente). La secuenciación de aminoácidos de estas fracciones mediante Procise<sup>®</sup> fue, SSGE (Ser-Ser-Gly-Glu) y DEE (Asp-Glu-Glu). Estas fracciones peptídicas presentaron un  $IC_{50}$  de 480 y 460  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Zhang et al. (2008), evaluaron la actividad antioxidante y antitrombótica de péptidos y fracciones peptídicas obtenidos por extracción enzimática acuosa a partir de semillas de colza (*Brassica napus*). La extracción de los péptidos (CRPs) y sus fracciones (RP25 y RP55) fue realizada con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa y tuvieron un peso molecular  $\leq$

600 Da. El ensayo de la actividad antitrombótica se llevó a cabo evaluando la capacidad para inhibir la coagulación del fibrinógeno catalizada con trombina. Los resultados mostraron que los péptidos de *Brassica napus* poseen una marcada actividad antitrombótica. Para CRPs, el efecto inhibitorio fue de 90% a concentraciones de 30 y 40 mg/mL, aunque el efecto inhibitorio no fue dependiente de la dosis. El efecto inhibitorio de RP25 y RP55 fue de 90% en concentraciones de 50 mg/mL, sin embargo, estas dos fracciones peptídicas exhibieron que a menor concentración, disminuyó la actividad antitrombótica. Estos resultados fueron comparados con la actividad antitrombótica de la heparina, un fármaco común para el tratamiento de la trombosis, que mostró tener un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, con una dosis media efectiva (ED<sub>50</sub>) de 0.07 mg/mL. Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad antioxidante, indicaron que RP55 y CRPs mostraron mayor poder reductor del radical DPPH<sup>+</sup> que RP25 con un ED<sub>50</sub> 72, 41 y 499 µg/mL, respectivamente. Estos autores concluyeron que las proteínas y péptidos de *Brassica napus* podrían ser usados para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, además de que las actividades antioxidante y antitrombótica son nuevas características funcionales que presentaron los péptidos de la semilla de colza, expandiendo sus aplicaciones como ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales.

Córdova-Lizama et al. (2013), determinaron la actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados enzimáticos de concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*, empleando pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, P7000). Estos autores obtuvieron un grado de hidrólisis (GH) de 12.4% (hidrolizado extensivo). El análisis de la agregación plaquetaria inducida con ADP de forma *in vitro*, se realizó empleando sangre humana proporcionada por voluntarios sanos. Estos autores obtuvieron como resultados, una reducción de la agregación plaquetaria de 2, 4, 30, 88 y 100% con concentraciones de muestra de 0.5, 1.5, 2.5 y 4.5 mg/mL, respectivamente, sin embargo, indicaron que el 100% de inhibición de la agregación plaquetaria pudo deberse a una saturación del plasma que evitó el paso del haz de luz, independientemente de si se forma agregación, dado que se empleó un método óptico. En cuanto a la actividad anticariogénica, el hidrolizado redujo la desmineralización del calcio y del fósforo presentes en una matriz de hidroxiapatita en 50.0 y 55.8%, respectivamente. Se concluyó que los hidrolizados proteínicos de *Phaseolus*

*lunatus*, podrían ser utilizados como ingredientes nutracéuticos en el desarrollo de alimentos funcionales o como productos farmacéuticos.

Sabbione et al. (2015), evaluaron la actividad antitrombótica de fracciones de proteínas e hidrolizados enzimáticos a partir del aislado proteínico de semillas de amaranto *Amaranthus mantegazzianus*. El aislado proteínico que se obtuvo por precipitación isoeléctrica (pH 5) y la obtención de las fracciones de albuminas y globulinas por extracción secuencial con solventes, fueron obtenidos a partir de harina de las semillas de amaranto. La hidrólisis enzimática del aislado proteínico y las fracciones, se realizó usando alcalasa (pH 10, 37 °C) y tripsina (pH 8, 37 °C). Los hidrolizados fueron caracterizados fisicoquímicamente y evaluaron su actividad antitrombótica mediante la capacidad para inhibir la coagulación del fibrinógeno catalizada con trombina y las pruebas de coagulación de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT, por sus siglas en inglés), tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés) y tiempo de trombina (TT, por sus siglas en inglés). Estos autores observaron que las fracciones y los hidrolizados presentaron diferentes perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida tricina (tricina-SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), disminuyendo el número y la intensidad de bandas de masas moleculares que fueron menores a 26 kDa, lo que indicó que los polipéptidos de estas fracciones son sustrato para la enzimas, convirtiéndose en péptidos más pequeños. La evaluación de la capacidad para prevenir la formación de coágulos de fibrina catalizado por trombina, indicó que la fracción de glutelina sin hidrolizar e hidrolizada (GH 25.9%), presentó la mayor actividad de inhibición con un  $IC_{50}$  de 0.080 y 0.074 mg/mL, respectivamente. Además de esta evaluación, las pruebas de coagulación que son usadas comúnmente en los laboratorios bioquímicos clínicos y que evalúan la actividad antitrombótica en diferentes etapas de la cascada de coagulación, se correlacionaron y confirmaron los resultados obtenidos en la evaluación anterior. Se concluyó que la hidrólisis de las proteínas de amaranto mejoró la actividad antitrombótica mediante la unión de estas al fibrinógeno o mediante la inhibición de la actividad de la trombina.

Estos estudios, ponen de manifiesto el gran potencial de los hidrolizados proteínicos enzimáticos, a partir de materias primas alimenticias, para conferirles la actividad

antitrombótica a los péptidos obtenidos, sugiriendo con esto, soluciones alternativas a los medicamentos usados contra la trombosis, así como su posible uso en la formulación de alimentos funcionales y/o nutraceuticos.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Los péptidos con actividad biológica, son actualmente estudiados debido a los beneficios sobre la salud que estos presentan, como es la actividad antitrombótica. Debido a esto, en el presente trabajo, se propone la utilización de péptidos bioactivos como una solución alternativa ante las desventajas que presentan los medicamentos usados para tratar la enfermedad de la trombosis, los cuales provocan efectos secundarios como hemorragias, neutropenia, trombocitopenia y toxicidad hepática. Además de lo anterior, los medicamentos resultan costosos y se usan durante periodos largos de tratamiento.

Debido a que la principal fuente de obtención de péptidos bioactivos han sido principalmente las proteínas de origen animal y que éstas tienen un elevado costo de producción y son difíciles de adquirir, en este estudio se utilizó proteína de origen vegetal, por su menor costo de adquisición y prometedora actividad biológica que ya ha sido discutida con anterioridad, lo que la convierte en la mejor alternativa para la obtención de compuestos benéficos para la salud. Entre los recursos vegetales empleados en las investigaciones plasmadas en el apartado III referente a los antecedentes del presente trabajo, las leguminosas han mostrado tener actividad antitrombótica.

El frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*) es una leguminosa subutilizada que presenta un alto contenido de proteína, lo que hace suponer a esta materia prima como una opción para la obtención de productos con un alto contenido de proteína, como son los concentrados proteínicos, a partir de los cuales, se pueden generar péptidos con actividad biológica antitrombótica vía modificación enzimática *in vitro*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antitrombótica de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas obtenidas mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas del frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*).

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obtener una harina y concentrado proteínico a partir del frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*).
- b) Realizar un análisis químico proximal y de color a la harina y concentrado proteínico de *M. pruriens*.
- c) Obtener los grados de hidrólisis a diferentes tiempos de reacción, mediante la hidrólisis enzimática del concentrado proteínico empleando las enzimas comerciales pepsina y pancreatina.
- d) Evaluar *in vitro* la actividad biológica antitrombótica de los hidrolizados proteínicos obtenidos de *M. pruriens*.
- e) Obtener las fracciones peptídicas por ultrafiltración de los hidrolizados proteínicos que hayan mostrado mayor actividad antitrombótica.
- f) Evaluar la actividad biológica *in vitro* de las fracciones peptídicas obtenidas.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Se emplearon granos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) provenientes de la cosecha 2014 del municipio de Jesús Carranza, Veracruz, México. Los granos fueron trasladados a los laboratorios de Ciencia de Alimentos e Ingeniería de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tuxtepec donde fueron procesados.

Todos los reactivos utilizados en los análisis fueron de marcas registradas como Sigma, J. T. Baker (Phillisburg, NJ, USA). Las enzimas se adquirieron de los laboratorios Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### 6.2 OBTENCIÓN DE LA HARINA DE *M. pruriens*

Los granos se limpiaron manualmente seleccionando los mejores y eliminando las impurezas que contenían, posteriormente fueron secados durante 48 h a una temperatura de 45 °C y molidos en una licuadora industrial (Tapisa®, T 5L, México) hasta obtener una harina capaz de pasar a través de un tamiz de pruebas físicas (Mont inox®, México) con una malla No. 20 (0.850 mm), seguido de esto, se realizó otra molienda, para disponer de una harina con menor tamaño de partícula (malla No. 80, 0.177 mm) (Segura Campos et al., 2010).

### 6.3 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE *M. pruriens*

Se empleó el método reportado por Betancur-Ancona et al. (2004), con algunas modificaciones. La harina se dispersó en agua destilada en una relación 1:6 p/v y se ajustó el pH a 11 con NaOH 1 N. La dispersión fue agitada por 1 h a 400 rpm con un agitador mecánico (Heidolph, RZR 1, Alemania), posteriormente la suspensión se filtró a través de tamices de malla No. 80 (0.177mm) y 100 (0.149 mm) secuencialmente para eliminar la fibra. El residuo sólido fue lavado cinco veces con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua

de lavado con el sobrenadante de la suspensión inicial. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante rico en proteína fue decantado y se ajustó el pH a 4.5 (punto isoeléctrico) con HCl 1.0 N, la solución se centrifugó a  $4,500 \times g$  por 30 min en una centrífuga compacta de sobremesa (Hettich zentrifugen, Rotina 380 R, Alemania). El precipitado fue secado en una liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.5 Liter, Estados Unidos de América) a  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $13 \times 10^{-3}$  mbar.

#### **6.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA HARINA Y EL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE *M. pruriens***

La composición química proximal se determinó de acuerdo con los métodos siguientes (AOAC, 2012):

- Humedad (Método 925.09): se determinó por la pérdida de peso después de secar la muestra en estufa (Riossa, H-41, México) a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h.
- Proteína cruda (Método 954.01): se determinó mediante el método Kjeldahl, por digestión ácida y destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.
- Grasa cruda (Método 920.39): se cuantificó después de la extracción de la muestra durante 1 h con hexano en un sistema Soxhlet.
- Fibra cruda (Método 962.09): se calculó el residuo orgánico combustible e insoluble que se obtuvo después de que la muestra fue sometida a digestiones ácida y alcalina.
- Cenizas (Método 923.03): se calculó como el peso remanente después de calcinar la muestra a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 h.
- Extracto libre de nitrógeno (ELN): los carbohidratos totales se estimaron por diferencia al 100% como el extracto libre de nitrógeno (ELN).

## 6.5 DETERMINACIÓN DE COLOR DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNICÓ

El color de la harina y del aislado proteínico se determinó mediante un colorímetro (HunterLab, UltraScan® Vis, Estados Unidos de América). Se obtuvieron los valores L\* (Luminosidad), a\* (grado de color desde -verde a +rojo) y b\*(grado de color desde -azul a +amarillo). El equipo instrumental fue calibrado con un estándar blanco. Los valores de L\*, a\* y b\* del estándar blanco fueron 99.57, -0.13 y 0.04 respectivamente, donde L\* = 100 se asocia con el blanco y L\* = 0 con el negro (Wani et al., 2013). La diferencia de color total  $\Delta E$  fue calculada usando la ecuación No. 1:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (1)$$

Donde  $\Delta L$  es la diferencia entre el valor L\* del estándar y la muestra,  $\Delta a$  es la diferencia entre el valor de a\* del estándar y la muestra,  $\Delta b$  es la diferencia entre el valor b\* del estándar y la muestra.

## 6.6 HIDRÓLISIS DEL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ

La hidrólisis enzimática se efectuó empleando las enzimas comerciales Pepsina® y Pancreatina®, de manera independiente y secuencial. La hidrólisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Herrera-Chalé et al. (2014), con algunas modificaciones. La hidrólisis se llevó a cabo con una concentración de sustrato de 4%, una relación enzima-sustrato 1/10, temperatura de 37 °C, pH 2 para pepsina, pH 7.5 para pancreatina, durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min para cada enzima. La hidrólisis con el sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina, se realizó en un tiempo total de reacción de 60 min, la primera digestión se efectuó con pepsina hasta la mitad del tiempo (30 min) usando una concentración de sustrato del 4%, una relación enzima/sustrato 1/10, a una temperatura de 37 °C y un pH de 2. La segunda digestión se realizó añadiendo enzima pancreatina, a la misma temperatura, relación enzima/sustrato y tiempo, modificando el pH a 7.5. Las hidrólisis se detuvieron colocando las muestras en un baño de agua a 80 °C durante 20 min, finalmente se

centrifugaron a  $1,317 \times g$  por 20 min, la porción soluble se conservó en un congelador horizontal con puerta sólida (Torrey, CH15, México).

## 6.7 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El porcentaje del grado de hidrólisis (% GH) se determinó por el método de ortoftaldehído (OPA, por sus siglas en inglés). Este método se basa en la reacción entre los grupos amino y el OPA en presencia de un grupo tiol, formando un compuesto colorido detectable a 340 nm. Para la obtención del grado de hidrólisis se aplicó la ecuación No. 2:

$$\%GH = \left( \frac{h}{h_{\text{tot}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde  $h$  es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y  $h_{\text{tot}}$  es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína, dependiente de la composición aminoacídica de la materia prima (Nielsen et al., 2001).

## 6.8 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA

Para la determinación de la actividad antitrombótica se empleó sangre humana proporcionada por voluntarios sanos que mostraron tener un conteo normal de plaquetas, tiempo de coagulación dentro de los límites y que no presentaron cuadros de enfermedad inflamatoria, tromboembólica o hemorrágica, además de que no tomaron alcohol o algún medicamento (aspirina u otro agente anti-inflamatorio) por al menos 2 semanas, permitiéndose únicamente el uso de paracetamol y dieron su consentimiento después de haber sido informados sobre el objetivo de la prueba. Los voluntarios donadores permanecieron en ayuno durante 12 h antes de la toma de muestra sanguínea (Brito et al., 2010; Rull et al., 2015). La agregación plaquetaria se determinó según los métodos reportados por Marrufo-Estrada et al. (2013) y Yu et al. (2016), con algunas modificaciones.

La sangre colectada, se colocó de inmediato en tubos Vacutainer (4.5 mL) con citrato de sodio al 3.2% (relación anticoagulante/sangre 1:9 v/v) para evitar la coagulación y se mantuvo a temperatura ambiente para ser usada dentro de las siguientes 3 h. Posteriormente se centrifugaron a  $127 \times g$  durante 15 min a temperatura ambiente para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) como sobrenadante. La fase residual se centrifugó de nuevo a  $2000 \times g$  durante 10 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El conteo de plaquetas en el PRP no fue ajustado a un intervalo determinado (Sakariassen et al., 2012). El PRP (900  $\mu\text{L}$ ) fue incubado a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min, con 50  $\mu\text{L}$  de la solución del hidrolizado o fracción peptídica (concentraciones 0.5, 1.5, 2.5, mg/mL) disuelto en NaCl al 0.9%. La agregación plaquetaria fue inducida por adición de 50  $\mu\text{L}$  de ADP (100  $\mu\text{M}$ ) disuelto en NaCl al 0.9% durante 5 min, a  $37^\circ\text{C}$  y agitación a 1000 rpm. Transcurrido este tiempo, la agregación plaquetaria fue medida como la disminución en la transmitancia a 660 nm a través del PRP, mediante un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis, Estados Unidos de América). El control fue llevado a cabo con la solución de NaCl al 0.9% sin la muestra de prueba. El 100% de transmitancia fue ajustado con el PPP. La agregación plaquetaria fue expresada como el cambio porcentual en la transmitancia del PRP con respecto al PPP. La inhibición de la agregación plaquetaria fue calculada mediante la ecuación No. 3:

$$\text{Inhibición de la agregación plaquetaria (\%)} = (A - B)/(A) \times 100 \quad (3)$$

Donde A representa el grado de agregación plaquetaria (cambio en el porcentaje de la transmitancia comparado con el PPP) en el PRP sin las muestras y B representa el grado de agregación el PRP con las muestras. La actividad inhibitoria fue graficada contra la concentración de la muestra usada y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular el  $IC_{50}$  con la ecuación No. 4:

$$IC_{50} = (50 - b)/m \quad (4)$$

Donde  $b$  es la intercepción y  $m$  es la pendiente.

## **6.9 OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS POR ULTRAFILTRACIÓN**

La porción soluble de cada hidrolizado enzimático que presentó la mejor actividad biológica fue ultrafiltrada (Merck Millipore, modelo 2000, Estados Unidos de América) para obtener tres fracciones, utilizando dos membranas con corte de peso molecular de 10 y 3 kDa. Colectando de manera separada el retenido y el permeado. Las fracciones se denominaron como: < 3 kDa, 3-10 kDa y > 10 kDa (Cho et al., 2004).

## **6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar), los datos obtenidos de los análisis químico proximal, color, hidrólisis enzimática y actividad antitrombótica, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia del 95% y en todos los casos se realizó una comparación de medias por el método de mínima diferencia significativa (LSD, por su acrónimo en inglés) para establecer las diferencias entre los tratamientos. Todos estos análisis se efectuaron utilizando el paquete computacional Minitab® 16 (Montgomery, 2007).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE *Mucuna pruriens*

La caracterización química proximal de la harina y concentrado proteínico del frijol terciopelo (*M. pruriens* var. utilis) se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Composición química proximal de la harina y concentrado proteínico de *Mucuna pruriens*.

Componentes (%)	Harina	Concentrado proteínico
Humedad	10.62 ± 0.27 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.16 <sup>a</sup>
Proteína	23.47 ± 0.28 <sup>a</sup>	60.68 ± 0.75 <sup>b</sup>
Grasa	3.96 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.17 ± 0.05 <sup>b</sup>
Fibra	1.53 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.08 <sup>a</sup>
Cenizas	3.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.32 ± 0.26 <sup>a</sup>
ELN	67.49 ± 0.11 <sup>b</sup>	28.93 ± 0.85 <sup>a</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar y expresados en porcentaje (%) en base seca con excepción de humedad. <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). ELN = extracto libre de nitrógeno.

La harina tuvo un contenido de proteína cruda de 23.47%, mientras que en el concentrado proteínico fue 60.68%, siendo este resultado significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al de la harina. El contenido proteínico hallado en la harina fue similar a lo obtenido en otros estudios

que utilizaron *M. pruriens*, como los realizados por Mohan & Janardhanan (1995), quienes reportaron un contenido de proteína cruda de 25.7% para la harina de *Mucuna pruriens* procedente de Mundanthurai Wildlife Sanctuary, Distrito Kattabomman, India. De igual forma Siddhuraju et al. (2000), obtuvieron contenidos de proteína de 29.83 y 26.25% para harina de frijol *Mucuna pruriens* cosechados en Marthandam, India y el Distrito Salem, Tamil Nadu, India, respectivamente. Mientras que Agbede & Aletor (2005), reportaron 27.5% de proteína para una especie de frijol *Mucuna* cultivado en Akure, Nigeria. Además, el contenido de proteína hallado para la harina en el presente estudio, fue semejante con el reportado para la harina de otras fuentes botánicas, como son: el frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol de chanco (*Canavalia ensiformis*) con un contenido de proteína de 24.07 y 26.86%, respectivamente (Chel-Guerrero et al., 2002); Chia (*Salvia hispanica*, L.) con un valor proteínico de 23.99% (Segura-Campos et al., 2013b); frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) con 22.80%, frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.60%, frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.37%, frijol blanco (*Phaseolus vulgaris* L.) con 25.73%, frijol arroz rojo (*Vigna umbellata* L.) con 25.68%, frijol mungo (*Vigna radiate* L.) con 27.10% y frijol caupí (*Vigna sinensis* S.) con 24.58% (Du et al., 2014). Debido al contenido proteínico hallado en el presente estudio para la harina de *Mucuna pruriens*, esta leguminosa podría ser una buena fuente de proteína para la alimentación humana, debido a que el promedio de ingesta recomendado es de 23-50 g por día (Adebowale et al., 2005).

Con respecto al contenido de proteína hallado en este trabajo de investigación, para el concentrado proteínico de *M. pruriens*, éste fue similar a lo reportado por otros estudios, como el realizado por Corzo-Ríos et al. (2000), quienes reportaron un contenido de proteína para la harina y concentrado proteínico de 27.79 y 65.98%, respectivamente, a partir de granos de frijol terciopelo cosechados en el ejido La Libertad, Escárcega, Campeche, México. Betancur-Ancona et al. (2008), obtuvieron contenidos proteínicos de 27.8 y 66.6% para la harina y concentrado proteínico de una variedad de frijol terciopelo cultivado en Calkiní, Campeche, México. Mientras que Ngatchic et al. (2013), reportaron valores de 27.2 y 58.8%, para la harina y concentrado proteínico de un frijol terciopelo cosechado en Camerún. Todos estos trabajos de investigación, han reportado contenidos de proteína

similares para la harina y concentrado proteínico obtenidos del frijol terciopelo *Mucuna pruriens*, sin embargo, se deben considerar algunas características que diferencian el contenido proteínico encontrado en el presente trabajo y las investigaciones antes citadas, como son: el tipo de suelo donde fueron cosechados las vainas del frijol (incluyendo suelos ácidos y de baja fertilidad), la altitud a la cual se realizó la siembra (0-1600 m sobre el nivel de mar, altitud preferente), temperatura del medio ambiente (19-27 °C temperatura óptima), tiempo y estación de maduración de las vainas (2-3 meses, preferentemente en otoño) y el método de sembrado (al voleo en la superficie de terreno recién arado, sembrado a 2.5 cm de profundidad, con o sin soporte para las vainas). No obstante, se debe considerar que el género *Mucuna*, aunque posee solo cuatro variedades botánicas, como ya se ha mencionado en la sección 2.5 *Mucuna pruriens*, incluye aproximadamente 100 especies de bejucos y arbustos que se encuentran a través de las regiones tropicales del mundo (Brunner et al., 2011).

Por otra parte, el contenido de humedad en la harina y concentrado proteínico fue 10.62 y 2.66% de muestra, respectivamente. El contenido de humedad hallado en la harina fue parecido a lo reportado por otros autores, como Mohan & Janardhanan (1995), quienes encontraron un contenido de humedad de 11.60%, para la harina de *M. pruriens* procedente del Distrito Kattabomman, India. Kala & Mohan (2010), reportaron un contenido de humedad de 11.25%, para la harina de un frijol terciopelo cultivado en el Distrito Tirunelveli, India. Además, el contenido de humedad hallado en la presente investigación fue semejante a lo reportado para el frijol lima (*Phaseolus lunatus*) con 14.88% (Chel-Guerrero et al., 2002); frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*) con un contenido de 8.8% (Torruco-Uco et al., 2009); frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) con 10.0%, frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) con un contenido de 9.2%, frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con 9.4%, frijol blanco (*Phaseolus vulgaris* L.) con 9.7%, frijol arroz rojo (*Vigna umbellata* L.) con 9.8%, frijol mungo (*Vigna radiate* L.) 9.5% y frijol caupí (*Vigna sinensis* S.) con 9.7% (Du et al., 2014). El contenido de humedad puede ser atribuido a la microestructura de cada materia prima utilizada en los diferentes estudios, que es responsable de ligar moléculas de agua en mayor o menor grado (Betancur-Ancona et al., 2009; Torruco-Uco, 2009).

El contenido de humedad del concentrado proteínico del frijol *M. pruriens* obtenido fue menor en comparación con lo reportado para la misma leguminosa por Corzo-Ríos et al. (2000) y Herrera-Chalé et al. (2014), quienes reportaron contenidos de humedad de 8.09 y 7.06%, respectivamente. De igual forma, el contenido de humedad hallado en el presente estudio fue menor al contenido de humedad de concentrados proteínicos de otras fuentes botánicas, como son *Canavalia ensiformis* (8.71%) (Chel-Guerrero et al., 2002), *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* (4.8 y 6.5%, respectivamente) (Torruco-Uco et al., 2009) y *Phaseolus vulgaris* L. (7.38-9.55%) (Wani et al., 2014). El menor contenido de humedad hallado en el concentrado proteínico representa una ventaja en términos de vida de anaquel y preservación de la calidad del concentrado proteínico y es atribuido a la etapa de liofilización que se llevó a cabo durante el proceso de obtención del mismo (Adebowale, et al., 2005; Herrera-Chalé et al., 2014).

En cuanto al contenido de grasa cruda, la harina de *M. pruriens* tuvo un valor de 3.96% en base seca, mientras que en el concentrado proteínico fue 6.17%, siendo este valor significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al contenido de grasa en la harina. El contenido de grasa cruda hallado en la harina de frijol terciopelo, fue parecido a lo obtenido por Siddhuraju & Becker (2005), quienes reportaron un contenido de grasa cruda de 4.34%, para un frijol terciopelo cosechado en Marthandam, Tamil Nadu, India. Mientras que el contenido de grasa cruda hallado en el concentrado proteínico, fue similar a lo reportado para *M. pruriens* en otras investigaciones, como las realizadas por Corzo-Ríos et al. (2000), con contenidos de grasa de 2.83 y 19.26%, para la harina y concentrado proteínico. Del mismo modo Betancur-Ancona et al. (2008) reportaron valores de 2.8 y 4.7%, para la harina y concentrado proteínico respectivamente, mientras que Ngatchic et al. (2013), obtuvieron contenidos de grasa cruda de 6.8 y 7.1%, respectivamente para la harina y concentrado proteínico de esta leguminosa. Esto fue similar a lo reportado para otras fuentes botánicas, las cuales, presentaron contenidos de grasa cruda en la harina y concentrado proteínico de: 1.5 y 3.5% para garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Sánchez-Vioque et al., 1999), 1.67 y 5.12% para frijol de chanco (*Canavalia ensiformis*) (Chel-Guerrero et al., 2002) y 1.5 y 4.7% para frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) (Torruco-Uco et al., 2009). De la misma forma que en el presente trabajo, estos estudios

presentaron un mayor contenido de grasa cruda en el concentrado proteínico y esto puede ser atribuido a la saponificación de los lípidos en el medio alcalino producido con hidróxido de sodio (pH 11) durante la concentración proteínica, provocando que estos lípidos saponificados se hayan solubilizado en la fase acuosa, para después ser acarreados junto con el precipitado proteínico, siendo esta saponificación dependiente de la composición de ácidos grasos de cada leguminosa usada en los estudios antes mencionados (Sánchez-Vioque et al., 1999; Chel-Guerrero et al., 2002; Torruco-Uco, 2009).

El contenido de fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (ELN) en la harina de frijol terciopelo fue 1.53 y 67.49%, respectivamente. En comparación con otros autores, el contenido de fibra cruda fue menor, no siendo así para el ELN que fue similar a lo reportado por Siddhuraju & Becker (2005), quienes encontraron valores de fibra cruda y ELN de 7.35 y 54.69%, respectivamente en la harina de *M. pruriens* cosechado en Marthandam, Tamil Nadu, India; de igual forma en el trabajo realizado por Adebawale et al. (2005), quienes reportaron contenidos de fibra cruda y ELN 7.91 y 44.9%, en la harina de *M. pruriens* cosechado en Ibadan, Nigeria y Agbede & Aletor (2005), obtuvieron 7.1 y 49.0%, para los granos de frijol terciopelo cultivado en Akure, Nigeria. Las diferencias entre los resultados de los estudios antes citados y los resultados obtenidos en el presente trabajo, fue debido principalmente a las condiciones de cultivo, madurez del grano y variedad de las especies (Chel-Guerrero et al., 2002). Sin embargo, en el concentrado proteínico los contenidos de fibra cruda y ELN disminuyeron a 0.89 y 28.93%, respectivamente. Este comportamiento ha sido observado para la harina y concentrado proteínico de *M. pruriens*, en las investigaciones hechas por Corzo-Ríos et al. (2000), con una disminución de 9.42 a 0.35% para fibra y 56.45 a 12.45% para ELN, usando granos de frijol terciopelo cosechados en el ejido La Libertad, Escárcega, Campeche, México; Betancur-Ancona et al. (2008) hallaron una disminución de 9.4 a 3% para fibra y 56.5 a 23.0% para ELN, en estudios hechos a partir de *M. pruriens* proveniente de Calkiní, Campeche, México; mientras que Ngatchic et al. (2013), reportaron una disminución de 6.3 a 1.7% para fibra y 56.6 a 28.2% para ELN, usando granos de frijol terciopelo cosechados en Camerún. Esto se debió a que durante el proceso de obtención del concentrado proteínico de *M. pruriens* se realizó una etapa de separación de estos

componentes. Esto resultó conveniente desde el punto de vista de la calidad final del concentrado, debido a que los componentes no proteínicos afectan al mismo (Bojórquez-Balam et al., 2013). No obstante, los carbohidratos, constituidos principalmente por almidón y pequeñas cantidades de otros carbohidratos solubles, pueden permanecer remanentes en el concentrado proteínico, esto debido a la dificultad de eliminación del almidón atrapado en la matriz proteínica mediante el procedimiento usado (Chel-Guerrero et al., 2002).

El contenido de cenizas encontrado en la harina de *M. pruriens* fue 3.56%, mientras que en el concentrado fue 3.32%, mostrando que no hubo diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre estos dos valores. Sin embargo, en el trabajo realizado por Betancur-Ancona et al. (2008), se presentó un aumento en el contenido de cenizas en el concentrado proteínico en comparación con la harina (3.5 a 5.4%), esto debido a la adición de NaOH requerido para ajustar el pH durante el proceso de concentración de las proteínas (Herrera-Chalé et al., 2014). En este trabajo, el NaOH no representó un inconveniente para el producto final, probablemente debido a que para obtener el precipitado de proteínas, se ajustó el pH a 4.5 y posteriormente el precipitado proteínico se ajustó a un pH de 7.

## **7.2 COLOR DE LA HARINA Y CONCENTRADO PROTEÍNICOS DE *Mucuna pruriens***

Los resultados de color, obtenidos para la harina y concentrado proteínico de *M. pruriens* se muestran en la tabla 5. La harina tuvo un valor  $L^* = 91.32$ , el cual es estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) que el hallado para el concentrado proteínico ( $L^* = 40.89$ ). El parámetro  $a^*$  fue -0.27 en la harina mientras que en el concentrado proteínico fue 0.90 y el parámetro  $b^*$  fue de 7.93 y 3.09 para la harina y concentrado proteínico, respectivamente. Estas diferencias de color se vieron reflejadas en los valores de  $\Delta E$  que fueron 11.42 y 58.77 para la harina y concentrado respectivamente. Este cambio de color puede ser atribuido a la eliminación del contenido de almidón que fue removido durante la elaboración del

concentrado proteínico, debido a que este contenido de almidón presentó un color blanco al momento de ser separado, por lo que su contribución al color del concentrado se vio reducida.

Tabla 5. Color de la harina y concentrado proteínico de *Mucuna pruriens*.

Muestras	Parámetros			
	L*	a*	b*	ΔE
Estándar blanco	99.57 ± 0.32	-0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.01	ND
Harina	91.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	-0.27 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.93 ± 0.02 <sup>b</sup>	11.42 ± 0.00 <sup>a</sup>
Concentrado proteínico	40.89 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	58.77 ± 0.01 <sup>b</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), exceptuando el estándar blanco. ND = no determinado.

No obstante, los valores obtenidos para el concentrado proteínico fueron similares a lo reportado por Adebowale et al. (2007), quienes compararon el color de aislados proteínicos de *M. pruriens* obtenidos mediante un procedimiento parecido al realizado en este estudio, pero usando diferentes medios de extracción (NaOH 0.1 M, ácido ascórbico al 0.5%, EDTA con ácido ascórbico al 0.5%, cisteína al 0.5%, sulfito de sodio al 0.25% y agua destilada), reportando valores de L\* = 37.22, a\* = 1.22, b\* = 2.27 y ΔE = 57.09, para el tratamiento con NaOH a pH 11, siendo este medio de extracción de proteínas y valor de pH, los que fueron usados en el presente estudio para obtener el concentrado proteínico, por lo que los resultados presentaron semejanzas con estos investigadores. Además, estos autores indicaron que el

oscurecimiento del concentrado proteínico podría ser debido al oscurecimiento enzimático ocasionado por la reacción de la enzima polifenoloxidasas con los componentes fenólicos álcali-lábiles liberados en el medio de extracción del concentrado proteínico.

Las enzimas que catalizan este tipo de reacción de oscurecimiento pertenecen a las oxidoreductasas y dentro de este grupo de enzimas se encuentra la catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), denominada trivialmente como polifenoloxidasas. Muchos compuestos fenólicos son oxidados por esta enzima, teniendo como sustratos más importantes a las catequinas, ésteres de ácido cinámico, 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa), y tirosina. Los productos finales de estas reacciones son macromoléculas muy complejas (melaninas), resultado de la polimerización de diversos compuestos (quinonas) que son producidos por la actividad de la polifenoloxidasas y dependiendo de la intensidad de esta polimerización, las melaninas varían su color desde un ligero amarillo hasta un café oscuro. Debido a que se ha reportado que *Mucuna pruriens* contiene una gran cantidad de L-dopa (0.12 – 0.17 g 100 g<sup>-1</sup>) y tirosina (44.5 - 60.9 mg g<sup>-1</sup> de proteína cruda), estos pueden reaccionar con la enzima polifenoloxidasas y reducir a estos dos compuestos a melanina, produciendo un color oscuro en el concentrado proteínico obtenido a partir de esta leguminosa (Adebowale et al., 2007; Badui, 2006).

La formación de un color oscuro es indeseable en algunos alimentos debido a que afecta adversamente la comerciabilidad, calidad sensorial e incluso el valor nutricional del producto final. Adebowale et al. (2007), obtuvieron un color más aceptable, usando ácido ascórbico al 0.5% o sulfito de sodio al 0.25% como medio de extracción durante la obtención del concentrado proteínico, debido a que inhiben el oscurecimiento enzimático por reacción con los grupos carbonilos intermediarios, impidiendo la reacción de oscurecimiento. Sin embargo el sulfito de sodio ha sido prohibido en los productos alimenticios debido al riesgo que representa para la salud humana. El ácido ascórbico ha sido usado para inhibir el oscurecimiento en frutas frescas y congeladas. Sin embargo, estos autores, reportaron que el mejor rendimiento de proteína fue hallado usando el medio alcalino producido con NaOH,

haciendo más accesible a las proteínas de *M. pruriens* a la digestión enzimática debido a que son parcialmente desnaturalizadas. Además de esto, los constituyentes nitrogenados del frijol terciopelo, al igual que otras leguminosas, son altamente solubles en NaOH.

### **7.3 HIDRÓLISIS DEL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE *Mucuna pruriens***

Durante la hidrólisis de proteínas, el parámetro clave para el monitoreo de la reacción, es el grado de hidrólisis (GH), el cual es definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos. El GH está determinado por las condiciones establecidas durante la hidrólisis (concentración del sustrato, relación enzima sustrato, tiempo, pH, temperatura, tipo de enzima y actividad enzimática). El sistema enzima-proteína y los parámetros de hidrólisis usados, tienen influencia directa sobre la forma de la curva de hidrólisis. El GH es útil para comparar las propiedades entre diferentes hidrolizados proteínicos. En el presente trabajo, se realizó la determinación del GH mediante el método de orto-ftaldehído (OPA, por sus siglas en inglés), el cual se basa en la reacción específica entre el reactivo OPA y grupos amino primarios, en presencia de ditiotreitól (DTT), formando un compuesto coloreado detectable a 340 nm (Nielsen et al., 2001; Spellman et al., 2003; Torruco-Uco, 2009; Quist et al., 2009; Gómez-Gómez, 2014).

El concentrado proteínico de *M. pruriens* hidrolizado con pepsina se muestra en la figura 2, éste fue relizado en una relación enzima-sustrato de 1:10, pH 2 y 37 °C y presentó un GH = 12.51% en los primeros 10 min de haber iniciado la reacción, no obstante, los mayores valores de GH fueron 13.91, 13.74 y 14.04%, en los tiempos de reacción 20, 30 y 40 min respectivamente, pasado este tiempo de hidrólisis, a los 50 min de reacción, el GH disminuyó significativamente hasta 11.46%, sin embargo, en el min 60 (GH = 12.93%) no se observó diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con los tiempos 10, 20, 30 y 40 min.

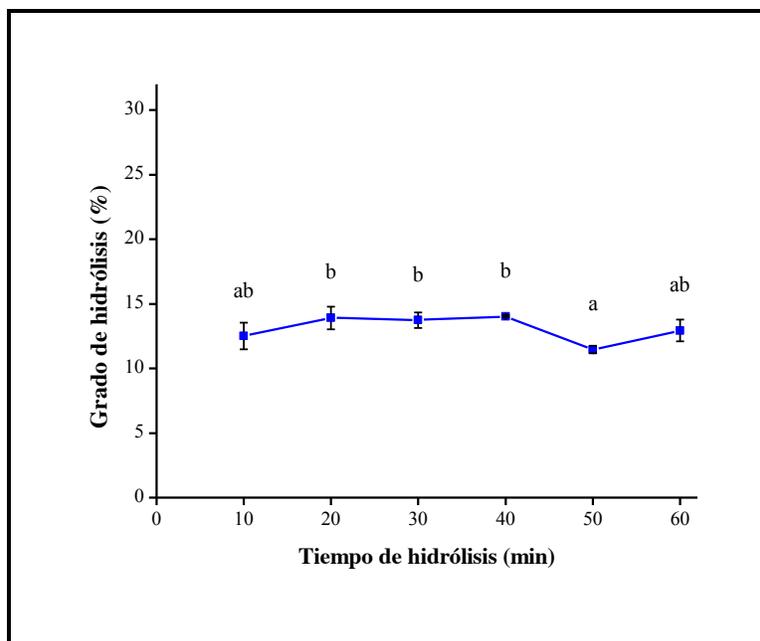


Figura 2. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *M. pruriens* con pepsina.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-b</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

La cinética de hidrólisis obtenida con pepsina en el presente estudio, tuvo un comportamiento similar a lo reportado por Megías et al. (2004), quienes indicaron haber observado un GH  $\approx$  10% durante los primeros 10 min de reacción y un posterior estado de estabilización, reportando un GH  $\approx$  13% después de 180 min de reacción con pepsina, a partir de harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). De igual forma, Kong et al. (2007), reportaron que no hubo diferencia significativa entre los valores de GH para hidrolizados hechos con pepsina durante 24 h a partir del gluten de trigo. Mientras que, Megías et al. (2008), realizaron una hidrólisis con pepsina durante 180 min a partir de un aislado proteínico de semillas de girasol y obtuvieron un grado de hidrólisis alto (GH  $\approx$  10%) en los primeros 10 min de reacción, indicando que este valor disminuyó posteriormente y reportaron que el mayor GH fue de aproximadamente 14%, a los 50 min de reacción. Del mismo modo, Torres-Fuentes et al. (2011), indicaron haber obtenido una velocidad de reacción alta durante los primeros 10 min de hidrólisis con pepsina a partir del aislado proteínico de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) obteniendo un GH de 16.3% transcurrido 180

min de hidrólisis. Por otro lado Córdova-Lizama et al. (2013), obtuvieron un GH de 12.4%, para un hidrolizado a partir del concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*, durante un tiempo total de reacción de 10 min. El comportamiento de las cinéticas de hidrólisis con pepsina reportado por las investigaciones antes mencionadas y los resultados observados en el presente estudio, son semejantes, debido a que presentan un GH alto en los primeros 10 min de iniciada la hidrólisis y una etapa de estabilización casi constante posterior a este tiempo de reacción.

Después de un GH inicial alto, éste disminuyó, entrando a una fase estacionaria, por lo que a un tiempo de reacción prolongado, el GH no presentó diferencia, de esta forma menores tiempos de reacción pueden ser una ventaja en cuanto al gasto de tiempo y energía (Betancur-Ancona et al., 2014). Una característica común de los sistemas enzima/proteína está asociada a la inhibición del sustrato y en segundo orden, a la desactivación de la enzima con respecto a su concentración y la del sustrato (Torruco-Uco, 2009). La Pepsina es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión, tiene actividad endopeptidasa, hidroliza aminoácidos hidrofóbicos, preferentemente aromáticos, hidrolizando por el extremo C-terminal de los residuos fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina, y en menor grado ácido glutámico, por lo que su acción rompe las cadenas de polipéptidos en secciones más cortas, es decir, que mediante su acción se producen aminoácidos libres, pero la mayoría de los productos son oligopéptidos (Benítez et al., 2008; Bojórquez-Balam et al., 2013; Luna-Vital et al., 2014). Cabe mencionar, que los valores de GH obtenidos en el presente trabajo, son clasificados como hidrolizados extensivos (>10%), siendo este tipo de hidrolizados utilizados en Nutrición Clínica, además de que son una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos en el organismo (Córdova-Lizama et al., 2013; Megías et al., 2004).

La figura 3 muestra la cinética de hidrólisis del concentrado proteínico de *M. pruriens* realizada con pancreatina en una relación enzima-sustrato de 1:10, pH 7.5 y 37 °C. De la

misma forma que el hidrolizado con pepsina, se obtuvo un GH alto durante los primeros 10 min de empezada la hidrólisis (GH = 14.28%), posteriormente a los 20 min de reacción el GH fue 17.62%, mientras que a los tiempos 30, 40 y 50 min los valores de GH fueron 18.71, 19.26 y 18.90%, respectivamente, no habiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre estos tres tiempos de hidrólisis, mientras que a los 60 min el GH fue 17.94%.

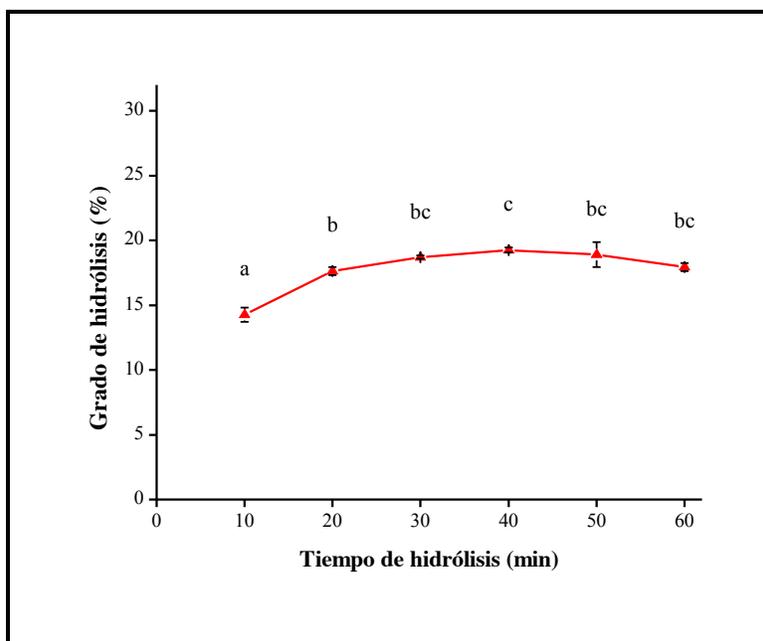


Figura 3. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *M. pruriens* con pancreatina. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-c</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados son semejantes a los reportados por Qi et al. (1997), quienes obtuvieron valores de GH de 11 y 17% para hidrolizados a partir del aislado proteínico de soya (*Glycine max*, var. Hutcheson) producidos con pancreatina durante 60 y 180 min respectivamente. Sin embargo, Kong et al. (2007), reportaron un valor menor a lo obtenido en el presente estudio cuando hidrolizaron gluten de trigo con pancreatina observando un GH de aproximadamente 12% después de 360 min de reacción. Valdez-Ortiz et al. (2012), reportaron valores de GH desde 12 hasta 34% para hidrolizados con pancreatina durante 2 h a partir de concentrados proteínicos de frijol *Phaseolus vulgaris* de tres diferentes cosechas. Medina-Godoy et al.

(2012), obtuvieron un hidrolizado de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) usando pancreatina, el cual presentó un GH de 8.03% después de 120 min de reacción. Por otra parte, Durak et al. (2013), reportaron valores de GH de 33.62, 22.28, 20.25, 13.29 y 47.04% para el concentrado proteínico y fracciones proteínicas de albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas respectivamente, a partir de hidrolizados del frijol adzuki (*Vigna angularis*) obtenidos con pancreatina durante 2 h, siendo los GH's de las fracciones de albúminas y globulinas semejantes a los valores de GH hallados en el presente estudio a los 30, 40 y 50 min de reacción, probablemente debido a que *M. pruriens* se compone en mayor proporción por estas fracciones proteínicas, como ya ha sido descrito en la sección 2.5 *Mucuna pruriens*. Mientras que Betancur-Ancona et al. (2014), reportaron un GH cercano a 10% para un hidrolizado con pancreatina de 120 min de reacción, a partir del concentrado proteínico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Las variaciones entre los valores de GH reportados por las investigaciones antes citadas y los datos obtenidos en el presente estudio, son probablemente debido a las diferencias entre los métodos que fueron usados para la extracción proteínica, o quizás también debido a diferencias en el perfil proteínico, lo que permite a los diferentes extractos proteínicos de cada materia prima, tener mayor o menor grado de susceptibilidad a la proteólisis usando pancreatina (Carrasco-Castilla et al., 2012).

La Pancreatina es una mezcla de proteasas digestivas con actividad endopeptidasa debido a que se compone por las enzimas tripsina, quimiotripsina y elastasa, las cuales, rompen los enlaces extremos de los grupos carboxilo de aminoácidos básicos, aromáticos y alifáticos; también tiene actividad exopeptidasa por su composición de carboxipeptidasa A y B que escinden en el extremo C-terminal preferentemente de aminoácidos básicos e hidrofóbicos; por lo que la hidrólisis con pancreatina produce una mezcla de oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libres (30-40%), que son absorbidos a lo largo del intestino delgado (Luna-Vital et al., 2014; Bojórquez-Balam et al., 2013).

La liberación controlada de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática a partir de proteínas, es una de las tendencias más prometedoras en lo que concierne a aplicaciones

médicas de los hidrolizados proteínicos con un grado de hidrólisis mayor al 10%, mientras que los hidrolizados con un menor grado de hidrólisis (menor al 10%), son usados para mejorar las propiedades funcionales de harinas o aislados proteínicos (Segura-Campos et al., 2010). Los péptidos con actividad biológica han sido generalmente aislados a partir de proteínas alimentarias mediante la hidrólisis con enzimas digestivas tales como, pepsina, pancreatina y quimiotripsina (Herrera-Chalé et al., 2014). Sin embargo, la producción de hidrolizados extensivos ( $\text{GH} > 10\%$ ), requiere el uso de más de una proteasa, debido a que una sola enzima no puede lograr tan alto grado de hidrólisis durante un periodo de tiempo razonable (Marrufo-Estrada et al., 2013). Por esta razón, un sistema secuencial pepsina-pancreatina fue usado en el presente estudio para producir hidrolizados extensivos con un mayor GH en comparación con los sistemas enzimáticos individuales.

Se llevó a cabo una digestión con pepsina durante 30 min, seguido de una incubación con pancreatina por otros 30 min. El comportamiento durante los primeros 30 min de reacción con pepsina, es presentado en la figura 4 y éste tuvo el mismo comportamiento que en la cinética individual que se muestra en la figura 2 y que fue discutido anteriormente. La actividad de la enzima pancreatina, en el hidrolizado secuencial produjo un GH de 20.34%, a los 40 min de reacción, mientras que, a los 50 min de reacción el GH fue 24.66%, siendo este valor significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al tiempo de reacción anterior y transcurrido 60 min de reacción, el GH fue 27.60%, el cual no mostró diferencia estadística significativa comparado con el tiempo de reacción anterior.

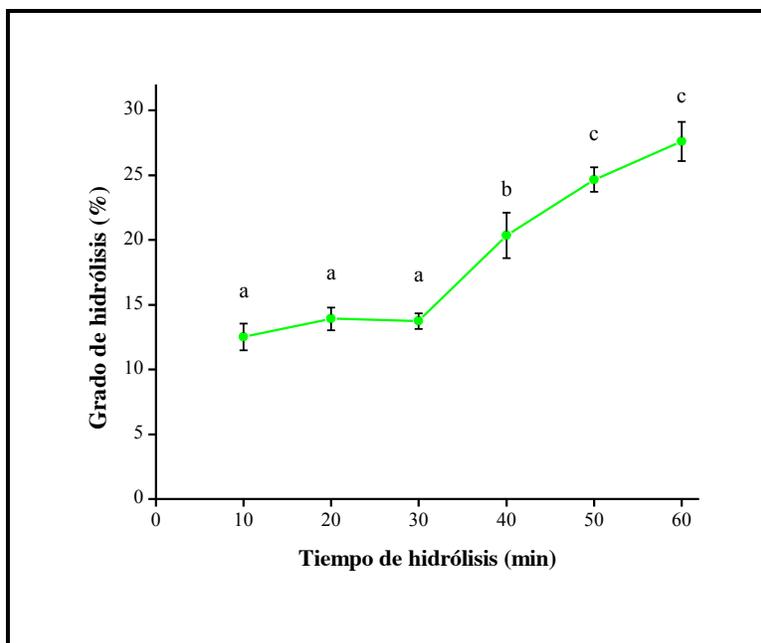


Figura 4. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *M. pruriens* con el sistema secuencial pepsina-pancreatina.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>a-c</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

El GH final obtenido en este estudio, fue menor comparado con lo obtenido por Megías et al. (2004), quienes reportaron un GH de 37% después de 360 min de reacción secuencial con pepsina y pancreatina, a partir de un aislado proteínico de girasol (*Helianthus annuus* L.). Sin embargo fue similar a lo hallado por Quist et al. (2009), quienes reportaron valores de GH de 21.4 y 25.1% en hidrolizados secuenciales con pepsina y pancreatina a partir de la harina desengrasada de cacahuete crudo y tostado respectivamente, sin embargo, estos resultados fueron obtenidos después de 24 h de reacción. No obstante, Segura-Campos et al. (2010), obtuvieron un GH de 35.74% para un hidrolizado secuencial pepsina-pancreatina a partir de un concentrado proteínico de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) durante 90 min de reacción. Barbana & Boye (2010), hidrolizaron el concentrado proteínico de dos variedades de garbanzo provenientes de tres cultivos, usando un sistema enzimático secuencial con pepsina, tripsina y quimiotripsina durante 150 min, reportando GH de 31.08, 34.41 y 40.78% y en el año 2011 estos investigadores realizaron la hidrólisis de dos variedades de lentejas (*Common Blaze* y *Laird*) usando el mismo sistema secuencial (pepsina, tripsina y

quimiotripsina), encontrando valores de GH de 27.08 y 29.07% para ambas variedades respectivamente (Barbana & Boye, 2011), siendo estos valores semejantes a los hallados en el presente estudio. Otra investigación que obtuvo valores similares fue la realizada por Torres-Fuentes et al. (2011), quienes reportaron un GH de 27.03% para un hidrolizado secuencial con pepsina (180 min) y pancreatina (180 min), a partir del aislado proteínico de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). En otro estudio realizado por Carrasco-Castilla et al. (2012), llevaron a cabo un tratamiento con pepsina durante 90 min, seguido por una incubación con pancreatina durante 120 min para un concentrado proteínico de frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris* L.), hallando un GH de 16%, el cual es menor al encontrado en la presente investigación. Mientras que, Marrufo-Estrada et al. (2013), emplearon alcalasa y un sistema secuencial pepsina-pancreatina durante 60, 90 y 120 min para producir hidrolizados a partir del aislado proteínico de la harina desengrasada de semillas de piñón (*Jatropha curcas*) y obtuvieron valores de GH de 11.7, 13.9 y 12.4% con alcalasa y 19.1, 21.1 y 21.5% con pepsina-pancreatina para cada tiempo de hidrólisis. De igual forma, Ruiz-Ruiz et al. (2013b), realizaron un estudio donde compararon hidrolizados hechos con sistemas secuenciales alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina por 90 min a partir del aislado proteínico de *Phaseolus vulgaris* L. y hallaron valores de GH de 43.01 y 26.15% para ambos sistemas respectivamente, siendo el último valor, similar a lo encontrado en el presente estudio. Recientemente, Guzmán-Méndez et al. (2014), reportaron un GH de 28.78% para un hidrolizado secuencial con pepsina-pancreatina de 90 min, hecho a partir del concentrado proteínico de *Phaseolus vulgaris*; y Betancur-Ancona et al. (2014), obtuvieron valores de GH de 33.29 y 28.47% para hidrolizados secuenciales con alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina respectivamente, a partir del concentrado proteínico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), durante 120 min de reacción.

En la tabla 6 se muestra la comparación de los valores de GH entre los tres sistemas enzimáticos (pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina) evaluados a los 40, 50 y 60 min de reacción. Se observó que el sistema enzimático secuencial presentó porcentajes de GH más altos en comparación con los sistemas enzimáticos individuales, aunque la hidrólisis con

pancreatina durante 40 min de reacción no presentó diferencia significativa con la hidrólisis secuencial al mismo tiempo de reacción.

Tabla 6. Comparación de valores de GH entre los sistemas enzimáticos.

Sistema enzimático	Tiempo de hidrólisis (min)		
	40	50	60
Pepsina	14.04 ± 0.09 <sup>a</sup>	11.46 ± 0.30 <sup>a</sup>	12.93 ± 0.84 <sup>a</sup>
Pancreatina	19.26 ± 0.19 <sup>b</sup>	18.90 ± 0.97 <sup>b</sup>	17.94 ± 0.31 <sup>b</sup>
Secuencial	20.34 ± 1.76 <sup>b</sup>	24.66 ± 0.96 <sup>c</sup>	27.60 ± 1.50 <sup>c</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar y expresados en porcentaje (%). <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Como ya se había mencionado anteriormente, pepsina es la principal enzima proteolítica generada en el estómago durante la digestión de los alimentos, mientras que pancreatina incluye proteasas como tripsina, quimiotripsina y elastasa, las cuales son liberadas por el páncreas en el intestino delgado, por lo que la acción sistemática secuencial de estas dos enzimas produjeron péptidos resistentes a ellas, los cuales pueden ser absorbidos por las células epiteliales digestivas en el intestino delgado donde serán biodisponibles y probablemente ejercerán sus actividades biológicas (Segura-Campos et al., 2010).

## 7.4 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA

En este trabajo se analizó la actividad antitrombótica de los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* mediante la determinación del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria que se muestra en la sección 7.4.1, mientras que en la sección 7.4.2 se muestran los resultados

de los valores de  $IC_{50}$  que fueron calculados para cada tiempo de hidrólisis, para determinar cuales fueron los mejores tratamientos.

#### 7.4.1 INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE *M. pruriens*

El hidrolizado obtenido con pepsina mostró que durante el curso de la reacción enzimática se produjo algún grado de inhibición de la agregación plaquetaria, esto se observa en la figura 5. Sin embargo, no se observó un patrón de actividad con respecto al transcurso del tiempo de hidrólisis, por consiguiente, se hallaron valores de 16.60 y 12.06% para los tiempos de hidrólisis inicial y final (10 y 60 min), respectivamente y que fueron evaluados en una concentración de 2.5 mg/mL. No obstante, cada tiempo de hidrólisis mostró un aumento de la actividad antiplaquetaria en relación directa al aumento de la concentración del hidrolizado.

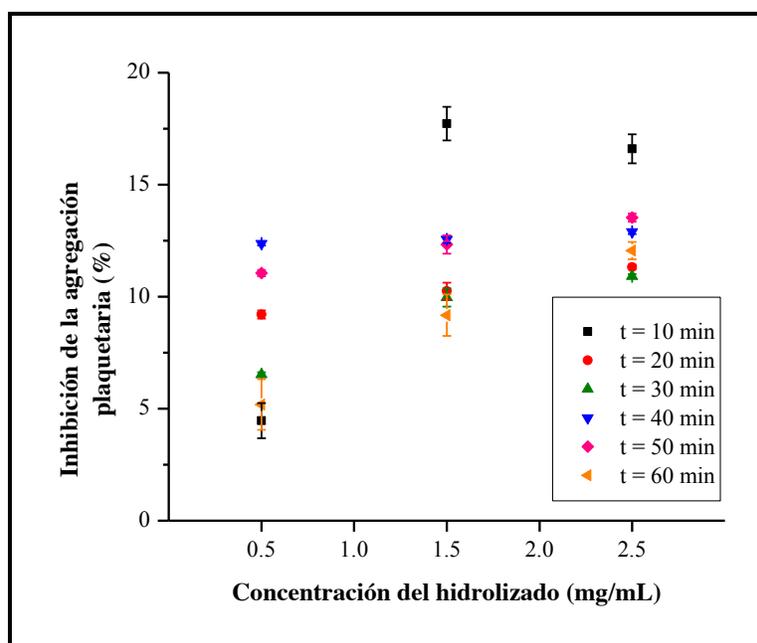


Figura 5. Inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* de los diferentes tiempos (t) de hidrólisis proteínica de *M. pruriens* con pepsina, evaluados a 0.5, 1.5 y 2.5 mg/mL.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

En la tabla 7 se presenta el análisis estadístico de la actividad antiplaquetaria de los tiempos de hidrólisis cuando fueron evaluados en una concentración de 2.5 mg/mL. El hidrolizado proteínico con pepsina presentó el valor más alto de inhibición de la agregación plaquetaria (16.60%) en los primeros 10 min de reacción, siendo este valor significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los tiempos de hidrólisis restantes.

Tabla 7. Inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado proteínico de *M. pruriens* con pepsina evaluado en una concentración de 2.5 mg/mL.

<b>Tiempo de hidrólisis enzimática (min)</b>	<b>Inhibición de la agregación plaquetaria (%)</b>
10	16.603 ± 0.646 <sup>c</sup>
20	11.322 ± 0.108 <sup>a</sup>
30	10.914 ± 0.100 <sup>a</sup>
40	12.902 ± 0.102 <sup>b</sup>
50	13.534 ± 0.185 <sup>b</sup>
60	12.057 ± 0.385 <sup>ab</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>a-c</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Este nivel de inhibición de la agregación plaquetaria es comparable con lo obtenido por Yu et al. (2016), quienes hallaron aproximadamente 15% de actividad en una concentración de 0.5 mg/mL para un hidrolizado con tripsina a partir de las fracciones proteínicas albúminas y glutelinas de cebada de montaña (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.) procedente del Noroeste de China, en un tiempo total de hidrólisis de 14 h. De igual forma Cian et al. (2015), encontraron una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria cercana a 18% cuando evaluaron 60 mg/mL de un hidrolizado con proteasa alcalina por 2 h (GH = 13.7%),

a partir de una macro alga (*Pyropia columbina*) proveniente de Comodoro Rivadavia, Argentina. Mientras que Córdova-Lizama et al. (2013), hallaron un nivel de inhibición plaquetaria de 30% a una concentración de 2.5 mg/mL, a partir de un hidrolizado realizado con pepsina durante 10 min de reacción (GH = 12.4%) a partir de *Phaseolus lunatus* cosechado en Yucatán, México. Por otra parte, Rojas-Ronquillo et al. (2012), determinaron la actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina a partir de la caseína bovina fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota durante 42 h, encontrando una actividad antitrombótica aproximadamente de 20%, después de 15 h de fermentación, siendo este valor comparable a lo hallado para el hidrolizado obtenido con pepsina en el presente estudio.

La actividad antiplaquetaria de los hidrolizados proteínicos se evaluó de forma *in vitro* usando plasma sanguíneo humano rico en plaquetas inducido con ADP como agonista de la agregación plaquetaria. Las plaquetas, por lo tanto, son un componente crítico en la formación de trombos arteriales y la inhibición farmacológica efectiva de la agregación plaquetaria es el objetivo primario del tratamiento antitrombótico (Marrufo-Estrada et al., 2013). Los péptidos que inhiben la agregación plaquetaria, podrían ser un tratamiento prometedor en la prevención de la trombosis (Kong et al., 2014).

El efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria que presentó el hidrolizado proteínico de *M. pruriens* obtenido con pancreatina se muestra en la figura 6. La hidrólisis con pancreatina inhibió la agregación plaquetaria después de 30 min de reacción ya que presentó menor actividad antiplaquetaria que el hidrolizado con pepsina. Aunado a lo anterior, no se observó una tendencia clara de inhibición sobre la agregación plaquetaria con respecto al tiempo de hidrólisis, por lo que, a los 30 y 60 min de reacción, evaluados con una concentración final de 2.5 mg/mL, no se presentó diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), esto se puede observar en la tabla 8.

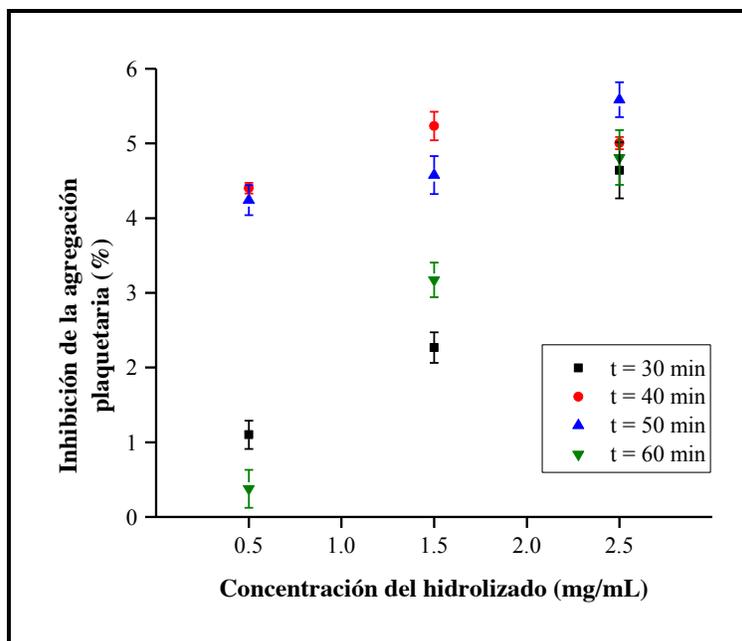


Figura 6. Inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* de los diferentes tiempos (t) de hidrólisis proteínica de *M. pruriens* con pancreatina, evaluados a 0.5, 1.5 y 2.5 mg/mL. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

El nivel de inhibición de la agregación plaquetaria alcanzado a los 40 y 50 min de hidrólisis con pancreatina fue 5.00 y 5.59%, respectivamente, a una concentración de 2.5 mg/mL. Zhang et al. (2008), reportaron una actividad antitrombótica aproximadamente de 10% para la inhibición de la coagulación del fibrinógeno a partir de la extracción enzimática acuosa con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa por 4 h a partir de semillas de colza (*Brassica napus*) proveniente de China y evaluado en una concentración de 10 mg/mL. De igual forma, Sabbione et al. (2015), evaluaron la actividad antitrombótica de la fracción de albúminas de semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) cosechadas en La Pampa, Argentina, que fue sujeta a la acción enzimática de alcalasa y tripsina por 40 min (GH = 15.7%), encontrando una inhibición de la formación de trombos (inhibición de la polimerización de fibrina catalizada por trombina) aproximadamente de 10% en una concentración del hidrolizado cercana a 2 mg/mL.

Tabla 8. Inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado proteínico de *M. pruriens* con pancreatina evaluado en una concentración de 2.5 mg/mL.

Tiempo de hidrólisis enzimática (min)	Inhibición de la agregación plaquetaria (%)
30	4.639 ± 0.376 <sup>a</sup>
40	5.004 ± 0.108 <sup>ab</sup>
50	5.586 ± 0.100 <sup>b</sup>
60	4.811 ± 0.102 <sup>a</sup>

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* obtenidos con pepsina y pancreatina de forma individual, mostraron tener actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria de manera dependiente de la concentración. Estos resultados sugieren que péptidos con actividad antiplaquetaria podrían haberse generado a partir de la modificación enzimática de las proteínas de esta leguminosa. Estos péptidos posiblemente contengan un segmento RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en su secuencia ya que se ha demostrado que la arginina participa en la unión entre el fibrinógeno y la glicoproteína GPIIb/IIIa ubicada en la membrana de las plaquetas. El grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg (catión) interacciona mediante un enlace iónico con la estructura de grupo carboxilo del Asp presente en el complejo GPIIb/IIIa (Córdova-Lizama et al., 2013). No obstante, también pueden estar presentes péptidos que asemejen este arreglo estructural para antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación plaquetaria (Mulero-Cánovas et al., 2011).

Por el contrario el sistema enzimático secuencial con pepsina-pancreatina, llevado a cabo con una digestión por 30 min con pepsina seguido de una incubación durante 30 min con

pancreatina no mostró algún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida con ADP (100  $\mu$ M). Esto indicó que el hidrolizado secuencial pepsina-pancreatina podría no contener péptidos antiplaquetarios. Esta ausencia de péptidos con actividad antitrombótica ya ha sido reportada mediante el uso secuencial de enzimas gástricas, por ejemplo, Rojas-Ronquillo et al. (2012), determinaron que 2 fracciones peptídicas denominadas 6A y 8A obtenidas partir de la caseína bovina fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota durante 27 h, perdieron completamente su actividad antitrombótica después de ser sometidas a una hidrólisis con las enzimas gástricas pepsina y tripsina, además que una tercera fracción llamada 5B disminuyó considerablemente su actividad.

En párrafos anteriores se mencionó que pepsina debido a su actividad endopeptidasa puede generar cadenas peptídicas de diferentes tamaños, mientras que pancreatina incluye proteasas tales como tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasas que le confieren actividad endo y exopeptidasa para producir tanto cadenas peptídicas, como hasta aminoácidos libres (Segura-Campos et al., 2010). Probablemente la acción conjunta de estas dos enzimas produjeron un estado de equilibrio entre la generación y degradación de péptidos con actividad antiplaquetaria (Megías et al., 2004).

#### **7.4.2 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA *IN VITRO* DE LOS HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DE *M. pruriens***

Para determinar que tiempos de hidrólisis presentaron la mejor actividad antitrombótica de ambos sistemas enzimáticos con pepsina y pancreatina, se determinó el valor de  $IC_{50}$  de cada muestra, es decir, la concentración que inhibe el 50% de la agregación plaquetaria, a partir de las curvas de inhibición obtenidas. En la figura 7 se muestran los valores de  $IC_{50}$  para la actividad antitrombótica del hidrolizado con pepsina a partir de las proteínas de *M. pruriens*. Los resultados indicaron que el hidrolizado con pepsina presentó la mayor actividad antitrombótica a los 10 y 60 min de reacción con valores de  $IC_{50} = 7.61$  y 13.99 mg/mL

respectivamente, siendo significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a los demás tiempos de hidrólisis.

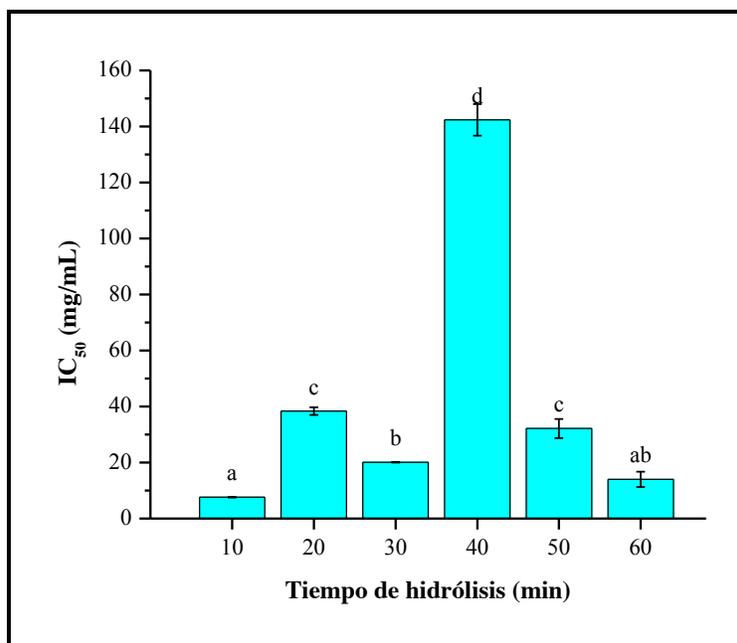


Figura 7. Actividad antitrombótica *in vitro* del hidrolizado proteínico de *M. pruriens* obtenido con pepsina durante 60 min.

<sup>a-d</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados fueron semejantes a los valores encontrados por Sabbione et al. (2015) ya que a partir de semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) obtuvieron las fracciones proteicas de albuminas y globulinas hidrolizadas con alcalasa y tripsina por 40 min, y estos hidrolizados presentaron actividad antitrombótica obteniendo valores de  $IC_{50} = 7.36$  y  $9.38$  mg/mL, respectivamente. Por otra parte, Lee & Kim (2005), evaluaron la actividad antitrombótica del hidrolizado enzimático secuencial de un aislado proteínico de soya, usando una endopeptidasa (Promod 278) y una exopeptidasa (Promod 279) y obtuvieron un valor de  $IC_{50} = 2$  mg/mL, el cuál es menor comparado con los resultados del presente estudio. Mientras que Marrufo-Estrada et al. (2013), emplearon alcalasa y un sistema secuencial pepsina-pancreatina durante 120 min a partir del aislado proteínico de la harina desengrasada

de semillas de piñón (*Jatropha curcas*) y hallaron que el hidrolizado obtenido con el sistema secuencial pepsina-pancreatina no mostró actividad antitrombótica. Sin embargo, el hidrolizado que obtuvieron con alcalasa mostró efecto inhibitorio del 50% a una concentración de 171.6 mg/mL. Recientemente Yu et al. (2016), realizaron una digestión gástrica *in vitro* con pepsina, tripsina y pancreatina durante un tiempo total de 6 h a partir de la harina desengrasada de avena (*Avena sativa* L.), cebada de montaña (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.) y trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), hallando una marcada actividad al término de la digestión con valores de  $IC_{50}$  de 0.282, 0.290 y 0.328 mg/mL para los hidrolizados gastrointestinales de las harinas de avena, cebada de montaña y trigo sarraceno respectivamente, por lo que indicaron que el uso de estas proteasas tuvo un efecto positivo, contrario a la investigación realizada por Marrufo-Estrada et al. (2013), quienes no hallaron actividad antitrombótica usando enzimas gástricas. Ésta diferencia puede deberse a la composición proteínica de cada materia prima utilizada como fuente de proteínas en esos estudios, así como en la presente investigación. Por lo tanto, la hidrólisis secuencial pudo haber producido cadenas peptídicas con diferentes tamaños, composición y secuencia de aminoácidos, y con esto afectar la actividad biológica.

La figura 8 muestra la actividad antitrombótica del hidrolizado obtenido con pancreatina durante 60 min de reacción. Estos resultados indican que la mayor actividad se presentó en los tiempos 30 y 60 min de hidrólisis con valores de  $IC_{50} = 28.72$  y  $22.81$  mg/mL, respectivamente, las cuales no mostraron diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

En el año 2007 Yang et al., evaluaron la actividad antitrombótica de los hidrolizados proteínicos del huevo blanco (método de hidrólisis no reportado), hallando un  $IC_{50} = 50$  mg/mL, por lo que mostró menor actividad en comparación con lo obtenido en el presente trabajo de investigación. Por otra parte, Zhang et al. (2008), reportaron una actividad antitrombótica cercana al 90% en una concentración de 30 mg/mL a partir de la extracción enzimática acuosa de semillas de colza (*Brassica napus*) con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa por 4 h, no obstante, la concentración (30 mg/mL) utilizada por esa

investigación es similar a la concentración (28.716 y 22.814 mg/mL) de los dos mejores valores de  $IC_{50}$  que presentó el hidrolizado proteínico con pancreatina usado en el presente estudio. Mientras que Cian et al. (2015), utilizaron una concentración de 60 mg/mL para evaluar la inhibición de la agregación plaquetaria inducida con ADP, hallando una actividad cercana al 18% y 45% para los hidrolizados con proteasa alcalina (2 h de reacción) y el sistema secuencial proteasa alcalina-flavourzima (4 h de reacción), a partir de la macro alga (*Pyropia columbina*).

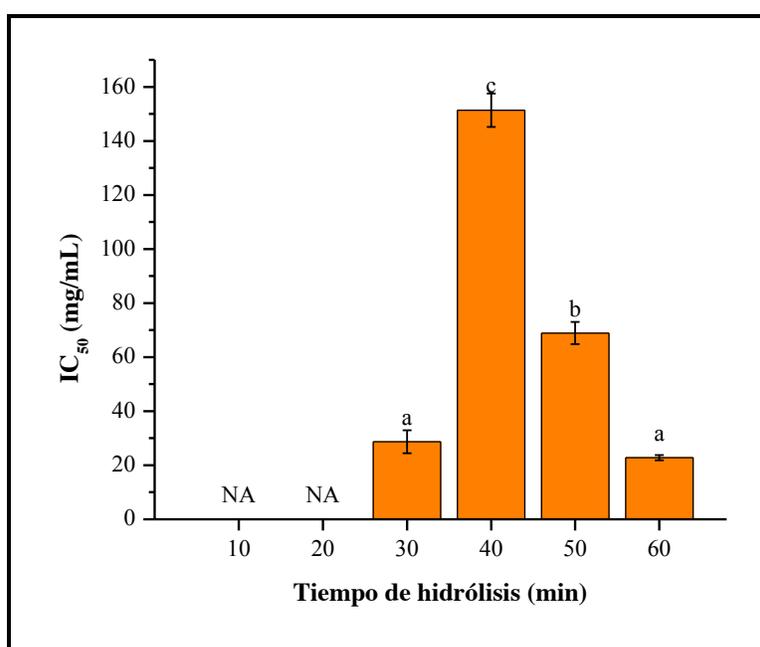


Figura 8. Actividad antitrombótica *in vitro* del hidrolizado proteínico de *M. pruriens* obtenido con pancreatina durante 60 min.

<sup>a-c</sup>Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). NA (No presentó actividad antiplaquetaria).

Por lo todo lo anterior, los resultados obtenidos en éste trabajo de investigación, muestran la efectividad de los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* producidos con pepsina y pancreatina de manera independiente para inhibir la agregación plaquetaria. Esto sugiere que la modificación de las proteínas de esta leguminosa con proteasas podría generar péptidos bioactivos con posible beneficio a la salud humana.

### 7.4.3 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA *IN VITRO* DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN

Después de evaluar la actividad antitrombótica *in vitro* de los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* obtenidos con pepsina y pancreatina, se eligieron los tratamientos que presentaron mayor actividad. Los tratamientos fueron los hidrolizados con pepsina a los 10 y 60 min, y los hidrolizados con pancreatina a los 30 y 60 min de reacción. Posteriormente estos fueron fraccionados mediante ultrafiltración usando dos membranas con corte molecular de 3 y 10 kDa y se evaluó su actividad antitrombótica, ésta se muestra en la figura 9.

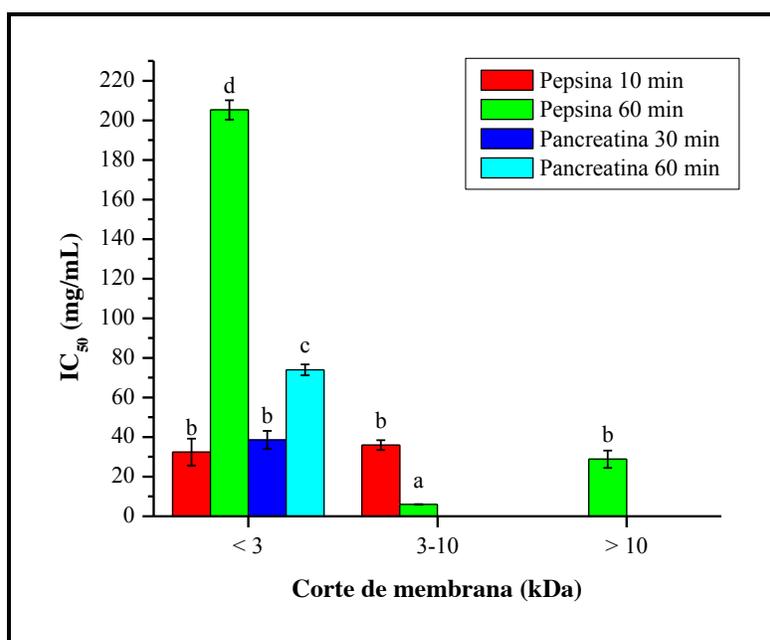


Figura 9. Actividad antitrombótica *in vitro* de las fracciones peptídicas de *M. pruriens* a partir de los hidrolizados con pepsina y pancreatina.

<sup>a-d</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento ( $p < 0.05$ ).

El hidrolizado proteínico de *M. pruriens* con pepsina de 10 min, no mostró actividad en la fracción > 10 kDa, sin embargo para las fracciones de 3-10 y < 3 kDa presentaron valores de  $IC_{50} = 35.93$  y  $32.38$  mg/mL, respectivamente. Estos resultados mostraron una disminución

de la actividad antitrombótica con respecto al hidrolizado con pepsina de 10 min sin fraccionar, que presentó un  $IC_{50} = 7.61$  mg/mL. Mientras que las fracciones  $> 10$ , 3-10 y  $< 3$  kDa obtenidas a partir del hidrolizado con pepsina por 60 min presentaron valores de  $IC_{50} = 28.84$ , 6.01 y 205.24 mg/mL, respectivamente. Al ser comparados estos resultados con el mismo hidrolizado de pepsina de 60 min sin fraccionar ( $IC_{50} = 13.99$  mg/mL), se observó que la fracción peptídica de peso molecular de 3-10 kDa presentó mayor actividad antitrombótica que el hidrolizado.

Respecto a las fracciones obtenidas para el hidrolizado proteínico con pancreatina por 30 y 60 min, se presentó actividad únicamente en la fracción  $< 3$  kDa con valores de  $IC_{50} = 38.57$  y 73.93 mg/mL, respectivamente, sin embargo estos valores fueron menores en comparación con los hidrolizados sin fraccionar. La diferencia de actividad antitrombótica entre los hidrolizados y sus respectivas fracciones posiblemente se debe a la pérdida de estabilidad estructural necesaria para presentar actividad antitrombótica; un ejemplo del requerimiento estructural es que a mayor distancia entre los centros de carga opuestas de las cadenas laterales aminoacídicas (9.9 Å promedio) y/o los  $C^{\beta}$  de la Arg y Asp (4.5-9 Å), mayor es la actividad biológica (Kostidis et al., 2004).

La fracción de 3-10 kDa del hidrolizado con pepsina de 60 min fue el mejor tratamiento, y es semejante a lo obtenido por Kumaran et al. (2011), quienes evaluaron la actividad antitrombótica de una proteasa fibrinolítica purificada mediante la combinación de técnicas de fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y una columna cromatográfica Sephadex G-150, a partir del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* proveniente del sur de la India, hallando un efecto inhibitor de la agregación plaquetaria inducida por ADP con un valor de  $IC_{50} = 2.4$  mg/mL, y presentó una masa molecular de 33.2 kDa y una secuencia aminoacídica QQRFPQRYVQLVITVDHVMN. Por otra parte, Hyun et al. (2006) usaron membranas de corte de peso molecular de 3 y 10 kDa para ultrafiltrar un extracto etanólico del micelio ASI 74006 del hongo chaga (*Inonotus obliquus*) que obtuvieron en Suwon, Corea del Sur y hallaron que la fracción  $< 3$  kDa presentó la mayor

actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria con 81.7% y posteriormente esta fue purificada mediante una columna cromatográfica Sephadex G-10 y HPLC de fase reversa, para identificar al péptido inhibidor, el cual presentó una actividad antiplaquetaria de 91.6% y un  $IC_{50} = 0.16$  mM, y mediante un Sistema de Análisis Fluorométrico identificaron la secuencia WGC. De igual forma Yu et al. (2016), ultrafiltraron con membranas de corte molecular de 3 y 10 kDa un hidrolizado con tripsina durante 14 h a partir de las globulinas de avena (*Avena sativa* L.) procedente del Noroeste de China y encontraron mayor porcentaje de actividad antitrombótica cercana a 75 y 78% para las fracciones < 3 y 3-10 kDa, respectivamente, evaluadas en una concentración de 0.5 mg/mL.

La potencia de un inhibidor de la agregación plaquetaria es usualmente expresada como  $IC_{50}$ , el cual fue determinado por el análisis de regresión del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria contra la concentración del inhibidor o el logaritmo de la concentración del inhibidor, de tal forma que se dificulta la comparación exacta de los valores de  $IC_{50}$  entre diferentes investigaciones. Aunado a esto, la conversión de las unidades de  $\mu\text{g/mL}$  a  $\mu\text{M}$ , complica aún más la comparación cuando se trata de péptidos purificados (Guang & Phillips, 2009).

En este sentido, Lee & Kim (2005) evaluaron la actividad antitrombótica de fracciones peptídicas obtenidas de los hidrolizados enzimáticos de aislados proteínicos de soya con endopeptidasa (Promod 278) y exopeptidasa (Promod 279). Ellos, separaron las fracciones inhibitorias y purificaron e identificaron dos péptidos, SSGE (Ser-Ser-Gly-Glu) y DEE (Asp-Glu-Glu) que presentaron un  $IC_{50}$  de 480 y 460  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Por otra parte Hwang et al. (2011), evaluaron la agregación plaquetaria inducida con ADP de un pool de péptidos de entre 1 y 10 kDa obtenidos por hidrólisis enzimática producida por Nong Shim Co. Ltd (Seúl, Corea del Sur) y esta fracción de péptidos presentó un  $IC_{50} = 267.40$   $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que Rojas-Ronquillo et al. (2012) determinaron la actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina a partir de la caseína bovina fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota provenientes de un fermentado de leche comercial Soful (Yakult<sup>®</sup>, México)

durante 42 h, encontrando la mayor actividad antitrombótica de 80.7%, después de 27 h de fermentación y posteriormente los péptidos inhibidores fueron fraccionados por cromatografía de exclusión, obteniendo fracciones con masa molecular menor a 6 kDa, y reportaron que la mayor relación de eficiencia de inhibición (IER) fue 0.73%/concentración del péptido ( $\mu\text{g/mL}$ ) de una fracción llamada 6A. En otro estudio, realizado por Kong et al. (2014), aislaron un péptido a partir del gusano de seda rígida (*Bombyx batryticatus*) que inhibió la agregación plaquetaria inducida por colágeno y epinefrina con valores de  $IC_{50} = 91.14$  y  $104.5 \mu\text{M}$ , respectivamente y fue nombrado BB.

El análisis de la agregación plaquetaria *in vitro* utilizado en el presente estudio utilizó un plasma rico en plaquetas inducido con ADP, sin embargo también se pueden usar otros agonistas como colágeno, epinefrina y trombina (Kong et al., 2014). Además, este método *in vitro* utilizó niveles hiperfisiológicos del agonista para producir una agregación plaquetaria en el intervalo de 70 a 90%, debido a que en niveles fisiológicos se produce una agregación inestable, retardada y por debajo del 20%. Lo anterior es de suma importancia en el monitoreo de la función de las plaquetas. Así, la actividad inhibitoria *in vivo* no puede ser predicha en comparación directa con estudios *in vitro* (Borgwardt et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación, sugieren la presencia de péptidos antitrombóticos que podrían estar ampliamente presentes en las proteínas de *M. pruriens* hidrolizadas con pepsina y pancreatina y sus fracciones peptídicas de 3-10 y  $< 3$  kDa que podrían ser usados como novedosos compuestos para la prevención y manejo de la trombosis. La seguridad ha sido una consideración clave en la evaluación de la eficacia de un agente farmacológico para modular la actividad plaquetaria. Más y más personas están a favor de agentes naturales para la terapia de la trombosis. Por lo tanto, compuestos bioactivos aislados de materias primas alimenticias son atractivamente recomendados para la prevención de esta patología y las enfermedades cardiovasculares en general (Yu et al., 2016).

## VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un concentrado de proteínas (60.68%) a partir de la harina de *M. pruriens*, que sirvió como sustrato para la acción enzimática de pepsina y pancreatina.
- El concentrado de *M. pruriens* presentó un color oscuro ( $L^* = 40.89$ ) en comparación con la harina ( $L^* = 91.32$ ). Por lo que este producto rico en proteínas podría ser utilizado en sistemas alimenticios donde su contribución al color no afecte su comerciabilidad.
- La hidrólisis del concentrado proteínico de *M. pruriens* con el sistema pepsina-pancreatina presentó un mayor GH (27.60%), comparado con los valores obtenidos de las hidrólisis individuales con pepsina y pancreatina (12.93 y 17.94% respectivamente). Esto indicó que se produjo mayor rompimiento de enlaces aminoacídicos por el uso del sistema enzimático secuencial.
- El hidrolizado obtenido con pepsina mostró la mejor actividad antitrombótica con valores de  $IC_{50} = 7.61$  y  $13.99$  mg/mL en los tiempos de hidrólisis de 10 y 60 min. Mientras que el hidrolizado con pancreatina mostró su mayor efecto antitrombótico a los tiempos de hidrólisis de 30 y 60 min con valores de  $IC_{50} = 28.716$  y  $22.814$  mg/mL, respectivamente. Éstos resultados indicaron que en esos hidrolizados posiblemente se encuentren diversos péptidos que pueden inhibir el acoplamiento entre el fibrinógeno y los receptores glucoproteínicos GPIIb/IIIa ubicados en la membrana de las plaquetas. Ya que ésta unión involucra el reconocimiento de la secuencia RGD del fibrinógeno, estos péptidos antitrombóticos posiblemente contienen esta secuencia aminoacídica o alguna estructura que la mimetice.

- Después de que fueron identificados los mejores tiempos de hidrólisis con actividad antitrombótica, éstos fueron fraccionados y la fracción de 3-10 kDa del hidrolizado con pepsina a los 60 min de reacción fue la que presentó la mayor actividad antitrombótica ( $IC_{50} = 6.01$  mg/mL). Por lo tanto, esta fracción peptídica podría ser usada en el diseño de nuevos productos alimenticios que ayuden a prevenir y/o tratar la trombosis.

## IX. REFERENCIAS

- Adebowale, K., & Lawal, O. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, 37(4), 355-365.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, A., & Oshodi, A. A. (2005). Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*, 89(1), 37-48.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi, A. A., & Niranjana, K. (2007). Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean. *Food Chemistry*, 104(1), 287-299.
- Agbede, J. O., & Aletor, V. A. (2005). Studies of the chemical composition and protein quality evaluation of differently processed *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* seed flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 89-103.
- Aimutis, W. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition*, 134(4), 989-985.
- AOAC International. (2012). *Official methods of analysis* (19 ed.). Gaithersburg, MD: The Association.
- Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., & Heras, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(8), 2H-10H.
- Ashwell, M. (2001). Functional foods: A simple scheme for establishing the scientific basis for all claims. *Publication Health Nutrition*, 4(3), 859-863.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Mexico: Alhambra Mexicana.

- Barbana, C., & Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), 1642-1649.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94-101.
- Baró, L., Jiménez, B., Martínez, A., & Bouza, J. (2001). Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintore, S., Delgado-Herrera, A., Pérez-Flores, V., Ruelas, A. C., & Chel-Guerrero, L. (2008). Some physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 816-823.
- Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 128-137.
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 2-8.

- Bojórquez-Balam, E., Ruiz Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 139-154). Barcelona: OmniaScience Monographs.
- Borgwardt, K., Bonifatius, S., & Gardemann, A. (2008). Acidic peptides enhanced genistein-dependent inhibition of human platelet aggregation: potential protective effect of digestible peptides plus genistein against atherosclerosis. *Nutrition research*, 28(8), 523-531.
- Brito, F. C., Kummerle, A. E., Lugnier, C., Fraga, C. A., Barreiro, E. J., & Miranda, A. L. (2010). Novel thienylacylhydrazone derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A2 synthesis inhibition. *European journal of pharmacology*, 638(1), 5-12.
- Brunner, B., Beaver, J., & Flores, L. (2011). *Mucuna*. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales Estación Experimental de Lajas, Lajas, Puerto Rico.
- Cai, F., Shen, P., Morgan, M., & Reynolds, E. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal*, 48(4), 240-243.
- Carew, L. B., & Gernat, A. G. (2006). Use of velvet beans, *Mucuna* spp., as a feed ingredient for poultry: a review. *World's Poultry Science Journal*, 62(1), 131–144.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J., . . . Dávila-Ortiz, G. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food chemistry*, 135(3), 1789-1795.
- Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Dávila-Ortiz, G. (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.
- Cho, J., Unklesbay, N., Hsieh, F., & Clarke, D. (2004). Hydrophobicity of Bitter Peptides from Soy Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5895-5901.
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & Drago, S. R. (2015). Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 881-888.
- Clemente, A., Vioque, J., & Millán, F. (1999). Hidrolizados proteicos de origen vegetal. Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa. 2(6), 25-32.
- Cogo, A., Bernardi, E., Prandoni, P., Girolami, B., Noventa, F., Simioni, P., & Girolami, A. (1994). Acquired risk factors for deep-vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Archives of internal medicine*, 154(2), 164-168.
- Córdova-Lizama, A., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de firjol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 123-137). Barcelona: OmniaScience.
- Corzo-Ríos, L., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 15(1), 37-41.
- Cueto-Robledo, G., & Favila-Tello, M. I. (2008). Trombosis venosa profunda. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 41-60). México D. F.: Alfil.

- Du, S. K., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 308-313.
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., & Świeca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food chemistry*, 141(3), 2177-2183.
- FitzGerald, R., & Meisel, H. (2000). Milk Protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(1), S33-S37.
- Gama-Hernández, E., & Morales-Blanhir, J. E. (2008). Factores de riesgo para tromboembolismo venoso. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 1-12). México, D. F.: Afil.
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Grizzello, C. (2004). Angiotensin I-converting-enzymeinhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 173-188.
- Gómez Gómez, A. L. (2014). Obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec.
- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- Guang, C., & Phillips, R. D. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120.
- Guzmán-Méndez, B., Jaramillo-Flores, M. E., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1859-1868.

- Heit, J. A. (2003). Risk factors for venous thromboembolism. *Clinics in chest medicine*, 24(1), 1-12.
- Heit, J. A., Melton, L. J., Lohse, C. M., Petterson, T. M., Silverstein, M. D., Mohr, D. N., & O'Fallon, W. M. (2001). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients vs community residents. *In Mayo Clinic Proceedings*, 76(11), 1102-1110.
- Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B., & Hsieh, C. (2013). 1997-2012: Fifteen Years of Research on Peptide Lunasin. En B. Hernández-Ledesma, & C. Hsieh, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* (págs. 3-22). Croatia: Publishing Process Manager.
- Herrera-Chalé, F. G., Ruiz-Ruiz, J. C., Acevedo-Fernández, J. J., Betancur-Ancona, D. A., & Segura-Campos, M. R. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10), 1691–1698.
- Hosono, A., Otani, H., Yasui, H., & Watanuki, M. (2002). Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. *Animal Science Journal*, 73(4), 241-256.
- Hwang, J. T., Ahn, C. W., Kim, H. J., Lee, K. A., Park, O. J., & Kwon, D. Y. (2011). Black soybean peptide mixture purified from *Rhynchosia volubilis* exerts antioxidant activity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and improves thrombosis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6477-6483.
- Hyun, K. W., Jeong, S. C., Lee, D. H., Park, J. S., & Lee, J. S. (2006). Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides*, 27(6), 1173-1178.
- Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 5-15.

- Je, J., Park, P., Kwon, J., & Kim, A. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7842-7845.
- Jollés, P., Levy, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., . . . Caen, J. (1986). Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from  $\epsilon$ -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158(2), 379-382.
- Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2009). Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chemistry*, 117(4), 687-692.
- Kala, B. K., & Mohan, V. (2010). Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Lesser Known Pulses of the Genus, *Mucuna*. *Advances in BioResearch*, 1(2), 105-116.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102(3), 759-763.
- Kong, Y., Xu, C., He, Z. L., Zhou, Q. M., Wang, J. B., Li, Z. Y., & Ming, X. (2014). A novel peptide inhibitor of platelet aggregation from stiff silkworm, *Bombyx batryticatus*. *Peptides*, 53, 70-78.
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79-88.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto-Lepälä, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and processing on bioactive proteins and peptides*, 9(8-9), 307-319.
- Kostidis, S., Stavrakoudis, A., Biris, N., Tsoukatos, D., Sakarellos, C., & Tsikaris, V. (2004). The relative orientation of the Arg and Asp side chains defined by a pseudodihedral angle as a key criterion for evaluating the structure–activity relationship of RGD peptides. *Journal of Peptide Science*, 10(8), 494-509.

- Kumaran, S., Palani, P., Nishanthi, R., & Kaviyarasan, V. (2011). Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an isolate (VK12) of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its antithrombotic activity. *Medical mycology journal*, 52(2), 153-162.
- Lahl, J., & Braun, J. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food choice. *Food Technology*, 10(1), 68-71.
- Lajolo, F. M. (2002). Functional foods: Latin American perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88(S2), S145-S150.
- Lee, B. W., Hsu, S. I., & Stasior, D. S. (1999). *Medicina basada en la evidencia*. Marbán: Massachusetts General Hospital.
- Lee, K.-A., & Kim, S.-H. (2005). SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. *Food Chemistry*, 90(3), 389-393.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., Mejía, E. G., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
- Marrufo-Estrada, D. M., Segura-Campos, M. R., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. *Food Chemistry*, 138(1), 77-83.
- Martínez-Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2), 1-14.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1974-1981.

- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(10), 1973-1977.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., . . . Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(7), 1928-1932.
- Miguel, M., Aleixandre, A., 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*(3), 726-731.
- Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishumura, K., Hayashi, Y., . . . Ueno, T. (1999). Structure activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *63*(10), 1684-1690.
- Mohan, V. R., & Janardhanan, K. (1995). Chemical analysis and nutritional assessment of lesser known pulses of the genus, *Mucuna*. *Food Chemistry*, *52*(3), 275-280.
- Montero-Granados, C., & Monge-Jiménez, T. (2010). Patología de la trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, *68*(591), 73-75.
- Montgomery, D. C. (2007). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa S.A. de C.V.
- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá-Martínez, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, *23*(5), 219-227.

- NAAIS. Núcleo de Acopio y Análisis de Información en Salud. (2005). *Distribución geográfica y la salud de los mexicanos 2000 y 2005*. Obtenido de <http://sigsalud.insp.mx/naais/index.html>
- Navarro-Reynoso, F. P. (2008). Anticoagulantes y fibrinolíticos en tromboembolia pulmonar. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 197-210). México, D. F.: Alfil.
- Neves, M., De Mira, M., & Marquez, L. (2004). Caracterição de Hidrolisados Enzimáticos de Pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(1), 101-108.
- Ngatchic, J. T., Sokeng, S. D., Njintang, N. Y., Maoundombaye, T., Oben, J., & Mbofung, C. M. (2013). Evaluation of some selected blood parameters and histopathology of liver and kidney of rats fed protein-substituted mucuna flour and derived protein rich product. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 46-53.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dammann, C. (2001). Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-648.
- Olvera-Novoa, M. A., & Olivera-Castillo, L. (2000). Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. En R. Civera-Cerecedo, C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie, & L. E. Cruz-Suárez, *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (págs. 327-348). La Paz, B. C. S., México.
- Pollina, E. (1996). Design and Synthesis of RGD Mimetics as Potent Inhibitors of Platelet Aggregation. *Journal of Undergraduate Sciences*, 3, 119-126.
- Qi, M., Hettiarachy, N., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62(6), 1110-1115.
- Quist, E. E., Phillips, R. D., & Saalia, F. K. (2009). The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1717-1721.

- Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22), 2607-2619.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., & García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147-154.
- Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37(1), 26-35.
- Ruiz-Ruiz, J., Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013a). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico . En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero , & D. Betancur Ancona, *Biactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 11-27). Barcelona: OmniaScience.
- Rull, G., Mohd-Zain, Z. N., Shiel, J., Lundberg, M. H., Collier, D. J., Johnston, A., . . . Corder, R. (2015). Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. *Vascular pharmacology*, 71, 70-78.
- Sabbione, A. C., Scilingo, A., & Añón, M. C. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 171-177.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. (2000). *Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México, 1990-2000*.
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661-3667.

- Sakariassen, K. S., Femia, E. A., Daray, F. M., Podda, G. M., Razzari, C., Pugliano, M., . . . Rothlin, R. P. (2012). EV-077 in vitro inhibits platelet aggregation in type-2 diabetics on aspirin. *Thrombosis research*, *130*(5), 746-752.
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, *64*(2), 237-243.
- Santos-Martínez, L. E., Bautista-Bautista, E., Pulido-Zamudio, T., Martínez-Guerra, M. L., & Sandoval-Zárate, J. (2008). Hallazgos clínicos y hemodinámicos en el tromboembolismo venoso. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 13-40). México, D. F.: Alfil.
- Segura-Campos, M. R., Chel Guerrero, L. A., & Betancur Ancona, D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(14), 2512-2518.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013b). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, *50*(2), 723-731.
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013a). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. Barcelona: OmniaScience.
- Shimizu, M. (2004). Food-Derived Peptides and Intestinal Functions. *BioFactors*, *21*(1-4), 43-47.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2005). Nutritional and antinutritional composition, in vitro amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed mucuna beans (*Mucuna pruriens* var. *utilis*): an under-utilised legume. *Food Chemistry*, *91*(2), 275-286.

- Siddhuraju, P., Becker, K., & Makkar, H. P. (2000). Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 6048-6060.
- Siddhuraju, P., Vijayakumari, K., & Janardhanan, K. (1996). Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2636-2641.
- Silverstein, M. D., Heit, J. A., Mohr, D. N., Petterson, T. M., O'Fallon, W. M., & Melton, L. J. (1998). Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine*, *158*(6), 585-593.
- Sipola, M. (2002). Effects of milk products and milk protein-derived peptides on blood. Doctoral Thesis. Institute of Biomedicine Pharmacology. University of Helsinki.
- Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, *13*(6), 447-453.
- Stavarakoudis, A., Bizos, G., Eleftheriadis, D., Kouki, A., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., . . . Tsikaris, V. (2001). A three-residue cyclic scaffold of non-RGD containing peptide analogues as platelet aggregation inhibitors: design, synthesis, and structure-function relationships. *Biopolymers*, *56*(1), 20-26.
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *90*, 1-11.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *129*(2), 485-490.
- Torruco-Uco, J. G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus*

- vulgaris). Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(10), 1597-1604.
- Torruco-Uco, J., Domínguez-Magaña, M., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *6*(2), 158-168.
- Vadivel, V., & Janardhanan, K. (2000). Nutritional and anti-nutritional composition of velvet bean: an under-utilized food legume in south India. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *51*(4), 279-287.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT-Food Science and Technology*, *46*(1), 91-96.
- Van der Plancken, I., Van Remoortere, M., Indrawati, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2003). Heat-Induced Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis: a Kinetic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(13), 3819-3823.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, A., & Voragen, J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 2938-2946.
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.

- Vioque, J., Clemente, A., Bautista, J., & Millán, F. (2001). *Jornadas Internacionales sobre Proteínas Alimentarias*. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., . . . Millán, F. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology, III JIPCA*, 99-102.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51(5), 361-365.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2014). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Wani, A. A., & Gill, B. S. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 278-284.
- Warner, E., Kanekanian, A., & Andrews, A. (2001). Bioactivity of milk proteins: anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 151-153.
- WHO. World Health Organization. (1999). International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *Journal of Hypertension*, 17, 151-183.
- Yang, C., Dantzig, A., & Pidgeon, C. (1999). Intestinal Peptide Transport Systems and Oral Drug Availability. *Pharmaceutical Research*, 16(9), 1331-1343.
- Yang, W. G., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4), 449-451.

- Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H., & Itani, T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(1), 27-33.
- Yu, G., Wang, F., Zhang, B., & Fan, J. (2016). In vitro inhibition of platelet aggregation by peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), highland barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins. *Food Chemistry*, 194, 577-586.
- Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 521-527.