



S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

**INSTITUTO TECNOLÓGICO
de Tuxtepec**

**"EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTITROMBÓTICA
Y ANTIHIPERTENSIVA DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS
DEL CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens* Ch.)."**

TESIS

Para Obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

L.N. CORAL ABIGAIL MATA RAMÍREZ

DIRECTOR:

DR. JUAN GABRIEL TORRUGO UCO

CO-DIRECTOR:

DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA

MCA-2018/05

TUXTEPEC, OAXACA, JUNIO 2018

COMITÉ TUTORIAL

DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

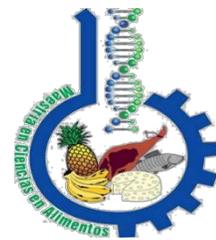
DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA

DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ

DRA. ARACELI PÉREZ SILVA



S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

“Evaluación de las actividades antitrombótica y antihipertensiva de los hidrolizados proteicos del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.)”

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

L.N. CORAL ABIGAIL MATA RAMÍREZ

DIRECTOR:

DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

CO-DIRECTOR:

DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA

JUNIO 2018

TUXTEPEC, OAXACA.



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtepec

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
División de Estudios Profesionales

Procedimiento para la Titulación
Autorización de Presentación del Trabajo Profesional
Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.5.1

SUBDIRECCION ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
EXPEDIENTE: DEP-ñ/18

Tuxtepec, Oaxaca. **6 / JUNIO / 2018**
OFICIO: No. 2297

L.N. CORAL ABIGAIL MATA RAMÍREZ
EGRESADA DE LA MAestrÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M16350001
PRESENTE.

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE LA COMISIÓN REVISORA INTEGRADA POR LOS C.C. **DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA, DRA. CECILIA EUGENIA MARTÍNEZ SÁNCHEZ Y DRA. ARACELI PÉREZ SILVA** REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO **"EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTITROMBÓTICA Y ANTIHIPERTENSIVA DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DEL CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens* Ch)."** PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE **TESIS** DEL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRA 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
EXCELENCIA EN EDUCACIÓN TECNOLÓGICA®
CIENCIA Y TÉCNICA PRESENTES AL FUTURO®

L.I. MARTHA MÓNICA HERNÁNDEZ CRUZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES.

C.c.p.-Coord. de titulación
MMHC/has



“EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTITROMBÓTICA Y
ANTIHIPERTENSIVA DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS OBTENIDOS DEL
CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens* Ch.)”

Por:

L.N. Coral Abigail Mata Ramírez

Tesis propuesta al:

Instituto Tecnológico de Tuxtepec

Como requerimiento parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Alimentos

Junio 2018

DEDICATORIAS

Primeramente, a Dios, por haberme dado la oportunidad de nacer y gozar de todas las circunstancias que ha puesto en mi recorrido por la vida.

A mi esposo Felipe Rodriguez por todo el amor, cariño, respeto y confianza que siempre me ha expresado, gracias por apoyarme hoy y desde siempre, y no permitirme declinar.

A mis padres por el apoyo incondicional, guía y protección que me han entregado sin reclamo y queja alguna, porque sin su impulso nada hubiera sido igual.

A mi bebé Mateo porque es un nuevo motor en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la **Coordinación de Posgrado e Investigación, al Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica, a los Doctores Investigadores** integrantes de la Maestría en Ciencias en Alimentos por haberme permitido formar parte de este posgrado.

Al **Dr. Juan Gabriel Torruco Uco** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por brindarme el apoyo, tiempo y confianza, además de compartirme sus conocimientos y herramientas de trabajo para poder llevar a cabo esta investigación.

A **mi comité tutorial** por haber puesto el interés y tiempo en la revisión de esta investigación.

A cada uno de **mis profesores** de la Maestría en Ciencias en Alimentos por haberme compartido sus conocimientos en cada una de sus clases y exhortarme a interesarme por el mundo de la investigación.

A mi compañera y amiga **Johana Hernández Canseco** por apoyarme y acompañarme en toda dificultad, que tuve durante esta sabia aventura de aprendizaje de la Maestría en Ciencias en Alimentos.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca con registro número 59814 y CVU 742506 otorgada para la realización de los estudios de la Maestría en Ciencias en Alimentos.

RESUMEN

Mata Ramírez, Coral A. Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Junio, 2018. **Evaluación de las actividades antitrombótica y antihipertensiva de los hidrolizados proteicos obtenidos del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.)**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco y Co-Director: Dr. Jesús Rodríguez Miranda.

Las enfermedades crónico-degenerativas (Obesidad, *Diabetes mellitus* y algunas enfermedades cardiovasculares) son las principales causas de muerte en la población a nivel mundial. En México se han reportado un 28% de defunciones a causa de la trombosis y un 25.5% de la población total presentan hipertensión arterial. Dichas enfermedades son tratadas con diversos fármacos de uso permanente, que a largo plazo provocan efectos secundarios en el organismo como hematomas, hemorragias, salpullidos en la piel, tos y son de un alto costo. Por lo que la Ciencia de los Alimentos busca crear opciones terapéuticas que puedan coadyuvar o disminuir el consumo de estos fármacos mediante el uso de fuentes naturales, como los hidrolizados proteicos de origen animal o vegetal. Por ello que se toma en cuenta el chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.) ya que es un insecto que presenta un elevado contenido proteico altamente consumido en diferentes estados (Puebla, Guerrero y Oaxaca) además de ser una fuerte alternativa para la obtención de componentes bioactivos, tales como los péptidos que son secuencias de 2 a 20 aminoácidos que se encuentran inactivos en el interior de una proteína precursora que al ser ingeridos son liberados por proteólisis química o enzimática produciendo un efecto benéfico en los diferentes sistemas, como el cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las actividades antitrombótica y antihipertensiva de los hidrolizados proteicos obtenidos del chapulín (*S. purpurascens* Ch.). Para ello se obtuvo una harina de chapulín y se le realizó un análisis químico proximal y determinación del color mediante los parámetros (L^* , a^* , b^* , C^* , $^{\circ}h$, ΔE). Posteriormente esta harina se sometió a hidrólisis con el uso de las enzimas comerciales Pepsina® y Alcalasa® de manera independiente a diferentes tiempos de reacción. Los hidrolizados proteicos fueron evaluados con el patrón

electroforético SDS-PAGE y con las actividades antes mencionadas, además del valor de IC_{50} . La harina de chapulín presentó un valor proteico de 77.92%. Los parámetros de color mostraron un valor de $L^* = 48.21$. El mayor %GH se obtuvo con la enzima Alcalasa® a 90 min (26.5%). El patrón electroforético SDS-PAGE obtuvo bandas de amplio y bajo peso molecular, que van desde los 250 a < 10 kDa para ambas enzimas, sin embargo, la Alcalasa® mostró hidrolizados de menor peso molecular en comparación con la enzima Pepsina. El mayor porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria se dio a los 15 min (26.35%) a una concentración de 2.5 mg/mL con el hidrolizado de Pepsina. Sin embargo, el mejor valor de IC_{50} fue de 6.61 mg/mL a los 5 min, con el hidrolizado de Alcalasa®. La mayor actividad inhibitoria de la ECA-I se presentó con el hidrolizado obtenido con Alcalasa®, a una concentración de 2000 ppm después de 5 min con un valor de inhibición de 98.95% y un IC_{50} de 0.01 mg/mL a los 30 min. La harina de chapulín ha demostrado ser una buena alternativa para la obtención de hidrolizados proteicos con las actividades antitrombótica y antihipertensiva.

ABSTRACT

Mata Ramírez, Coral A. Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Junio, 2018. **Evaluation of the antithrombotic and antihypertensive activities of the protein hydrolysates obtained from the grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.)**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco y Co-Director: Dr. Jesús Rodríguez Miranda.

Chronic degenerative diseases (Obesity, *Diabetes mellitus* and some cardiovascular diseases) are the main causes of death in the population worldwide. In Mexico, 28% of deaths were reported due to thrombosis and 25.5% of the total population of arterial hypertension. These diseases are treated with several drugs of permanent use, which in the long term cause side effects in the body such as bruises, hemorrhages, rashes on the skin, and high cost. That is why food science seeks to create therapeutic options that can affect the consumption of these animals through the use of natural sources, such as protein hydrolysates of animal or vegetable origin (*Sphenarium purpurascens* Ch.) This is an insect that has a high protein content highly consumed in different states (Puebla, Guerrero and Oaxaca) as well as being a strong alternative for obtaining the bioactive components, like those that are sequences of 2 to 20 amino acids that are inactive inside a precursor protein that when ingested are released by the chemical or enzymatic protein that produce a beneficial effect in different systems, such as cardiovascular, digestive, immune and nervous. The objective of this work was to evaluate the antithrombotic and antihypertensive activities of the protein hydrolysates obtained from the grasshopper (*S. purpurascens* Ch.). For this, it was he obtained a grasshopper flour and a proximal chemical analysis and a determination of the color by the parameters (L^* , a^* , b^* , C^* , $^{\circ}h$, ΔE) was done. Later this flour was brought to hydrolysis with the use of the commercial enzymes Pepsina® and Alcalasa® independently at different reaction times. The protein hydrolysates were evaluated with the SDS-PAGE electrophoretic pattern and with the aforementioned activities, in addition to the IC_{50} value. Grasshopper flour had a protein value of 77.92%. The color parameters showed a value of $L^* = 48.21$. The highest %DH was obtained with the Alcalasa® enzyme at 90 min (26.5%). The

SDS-PAGE electrophoretic pattern achieved powerful bands and low molecular weight, ranging from 250 to <10 kDa for both enzymes, however, Alcalasa[®] showed lower molecular weight hydrolysates compared to the enzyme Pepsin[®]. The highest percentage of inhibition of platelet aggregation was given at 15 min (26.35%) at a concentration of 2.5 mg/mL with the Pepsin[®] hydrolysate. However, the best IC_{50} value was 6.61 mg/mL after 5 min, with the Alcalase[®] hydrolysate. The highest inhibitory activity of the ECA-I was presented with the hydrolysate obtained with Alcalasa[®], at a concentration of 2000 ppm after 5 min with an inhibition value of 98.95% and an IC_{50} of 0.01 mg/mL at 30 min. Grasshopper flour has a good alternative for obtaining hydrolyzed proteins with antithrombotic and antihypertensive activities.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Enfermedades crónicas degenerativas en México.	3
2.2 Hipertensión arterial.....	5
2.3 Sistema renina-angiotensina.	7
2.4 Características de la ECA.	8
2.5 Tratamiento farmacológico antihipertensivo.....	8
2.6 Trombosis venosa profunda.....	9
2.7 Tratamiento farmacológico antitrombótico.	12
2.8 Péptidos bioactivos	12
2.9 Fuentes de obtención y principales actividades biológicas.	13
2.10 Obtención de hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas	13
2.10.1 Método químico para la obtención de péptidos.....	14
2.10.2 Método fermentativo para la obtención de péptidos.....	15
2.10.3 Método enzimático para la obtención de péptidos.	16
2.10.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	17
2.10.5 Filtración en gel	19
2.11 Péptidos antihipertensivos.....	20
2.12 Péptidos antitrombóticos.....	21
2.13 Entomofagia.....	22
2.14 Chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.).....	23
3. ANTECEDENTES	26
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo General	31
5.2 Objetivo Específicos.....	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Materiales	32
6.2 Métodos	32
6.2.1 Obtención de la harina de chapulín <i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.	32

6.2.2	Determinación de la composición proximal de la harina del <i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.....	32
a)	Humedad (Método 925.09):	32
b)	Proteína cruda (Método 954.01):	33
c)	Grasa cruda (Método 920.39):.....	34
d)	Fibra cruda (Método 962.09):	35
e)	Cenizas (Método 923.03):	36
6.2.3	Determinación de los parámetros de color.....	37
6.2.4	Hidrólisis enzimática de los concentrados proteínicos del <i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.....	37
6.2.5	Determinación del grado de hidrólisis	38
6.2.6	Determinar el patrón electroforético de los hidrolizados con mayor actividad inhibidora de la ECA y agregación plaquetaria	39
6.2.7	Evaluación “ <i>in vitro</i> ” de las actividades biológicas de los hidrolizados proteínicos.....	39
6.2.8	Inhibición “ <i>in vitro</i> ” de la agregación plaquetaria.....	39
6.2.9	Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de la ECA.....	41
6.2.10	Análisis Estadístico	42
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
7.1	Análisis químico proximal de la harina de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.).....	43
7.2	Análisis de color de la harina de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.)	46
7.3	Hidrolisis enzimática de la harina de Chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) rica en proteínas.....	48
7.4	Electroforesis (SDS-PAGE).....	51
7.5	Actividad antitrombótica	55
7.5.1	Inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados proteicos obtenidos del chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.).....	55
7.5.2	Actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria <i>in vitro</i>	59
7.6	Actividad antihipertensiva	61
7.6.1	Evaluación de la Inhibición de la ECA <i>in vitro</i>	61
7.6.2	Actividad inhibitoria de la ECA <i>in vitro</i>	64
8.	CONCLUSIONES.....	67
9.	REFERENCIAS	69

LISTA DE TABLAS

TABLA No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1	Clasificación de los niveles de presión sanguínea en adultos.	9
2	Métodos enzimático y químico para la separación de péptidos.	19
3	Contenido de aminoácidos del <i>Sphenarium purpurascens</i> Ch. (g/100 g proteína).	28
4	Composición proximal de la harina de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.)	43
5	Color de la harina de Chapulín (HCh)	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1	Autorreporte de enfermedades crónico degenerativas de la población mexicana de 50 y más años de edad, según género.	8
2	Trombo formado en un vaso sanguíneo.	14
3	<i>Sphenarium purpurascens</i> Ch. hembra y macho.	27
4	Hidrólisis enzimática de la harina de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i> Ch.) rica en proteínas con la enzima Alcalasa®.	47
5	Hidrólisis enzimática de la harina de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) rica en proteínas con la enzima pepsina 48	48
6	Patrón electroforético (SDS-PAGE) de hidrolizados de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenidos a diferentes tiempos de reacción con la enzima Alcalasa®	52

7	Patrón electroforético (SDS-PAGE) de hidrolizados de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenidos a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina.	53
8	Inhibición de la agregación plaquetaria “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) con Alcalasa obtenidos a diferentes tiempos (min) de reacción a concentraciones de 1.5, 2.5 y 5 mg/mL.	55
9	Inhibición de la agregación plaquetaria “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) con Pepsina obtenidos a diferentes tiempos (min) de reacción a concentraciones de 1.5, 2.5 y 5 mg/mL.	57
10	Actividad antitrombótica “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizado proteínico de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenido con Alcalasa® diferentes tiempos (min) de reacción.	58
11	Actividad antitrombótica “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción.	59
12	Inhibición de la ECA “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenido con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción y a concentraciones de 100, 500, 1000 y 2000 PPM.	61
13	Inhibición de la ECA “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción y a concentraciones de 100, 500, 1000 y 2000 ppm.	62
14	Actividad antihipertensiva “ <i>in vitro</i> ” de los hidrolizados proteínicos del chapulín (<i>S. purpurascens</i> Ch.) obtenido con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción.	64
15	Actividad antihipertensiva “ <i>in vitro</i> ” del hidrolizado proteínico de <i>S. purpurascens</i> Ch. obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción.	65

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a las estadísticas proporcionadas por la Secretaria de Salud (SSA, 2015), el Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía (INEGI, 2010) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012), acerca de las enfermedades crónico degenerativas, son las que lideran las principales causas de muerte en México, siendo la Hipertensión Arterial y la Trombosis, las que en cifras tienen mayor número de afectados con altas incidencias de muerte (SSA, 2015). Dichas enfermedades son tratadas con diversos fármacos, los cuales para la hipertensión arterial los medicamentos sugeridos actúan sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA) inhibiendo su acción sobre esta, misma que evita que se altere la presión arterial normal en sangre cuando circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano, estos medicamentos pueden ser el Captropil[®], Lisinopril[®], Enalapril[®], (Pierre, 2009), entre otros, presentando contraindicaciones, tales como, alteraciones secundarias a corto y largo plazo, como tos, salpullidos en la piel, además de no poder ser tomadas por personas con enfermedad renal o mujeres embarazadas (Torruco, 2009). Por otro lado, la trombosis el medicamento sugerido es un anticoagulante, mismo que impedirá que se formen coágulos o los que existan se vuelvan más grandes, teniendo un efecto de dilución en la sangre. Algunos de los fármacos sugeridos para la trombosis son la Heparina[®] y Warfarina[®], los cuales con su ingesta excesiva y uso constante pueden ocasionar hematomas, hemorragias, sangrados en la nariz o encías, hipersensibilidad, fiebre y comezón (Cadeza 2016). Por tal motivo, se han buscado fuentes alternativas en sustitución al uso del medicamento para cada una de las enfermedades anteriormente mencionadas, como puede ser el uso de péptidos bioactivos promoviendo la disminución de reacciones secundarias, y/o susceptibilidad de alergias a medicamentos por el uso prolongado de estos y bajos costos monetarios.

Los péptidos son secuencias de aminoácidos entre 2 a 15 residuos de aminoácidos (Vioque *et al.*, 2000), los cuales podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores. Estos péptidos han presentado diversas

actividades biológicas tales como: antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos antimicrobianos, antitrombóticos, anticariogénicos e inmunomodulados. Además, está demostrado que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, logrando ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto intestinal y a nivel sistémico (Erdmann *et al.*, 2007).

Los péptidos bioactivos pueden ser obtenidos a partir de diferentes fuentes de origen animal como la caseína, el requesón hecho a base de suero de la leche, leche fermentada, músculos de pollo, carne de cerdo y pescado, entre otras, así como también han sido aislados de fuentes vegetales como el gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol mungo, etc. (Das Neves *et al.*, 2006). Cabe mencionar que, dependiendo la fuente proteica, del tipo de enzima usada y de las condiciones del procesado para la obtención de péptidos, fracciones peptídicas y la actividad biológica obtenida serán distintas.

Tomando en cuenta la variedad de fuentes de obtención de los péptidos, en dicho trabajo se ocupó una fuente poco convencional requerida para este tipo de investigaciones, como es el chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch). Mismo que dentro de sus escasas evaluaciones a sus características físico-químicas, existen algunos reportes en donde indican ser abundantes en un macronutriente como lo son las proteínas, pudiendo ser útil para la obtención de péptidos bioactivos. Sin embargo, es importante mencionar que el *Sphenarium purpurascens* en zonas Centro Sur de nuestro país y en el Estado de Oaxaca es usado para consumo humano y debido a su abundancia en sembradíos es considerado como una plaga, por lo que se le sugiere dar un uso positivo explotando esta materia prima. Además de que existen pocos reportes científicos sobre su posible actividad biológica de esta fuente distinta a las comúnmente utilizadas.

Por lo anterior, en el presente trabajo de investigación se evaluaron las actividades biológicas antihipertensiva y antitrombótica de los hidrolizados proteínicos obtenidos del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades crónicas degenerativas en México.

En lo que al tema de salud respecta, en los años 70's y 80's, la mayoría de los países del mundo se caracterizaron por vivir una transición epidemiológica, dando paso de las enfermedades infectocontagiosas y parasitarias, a las enfermedades crónico degenerativas (OMS, 2013). Esta transición epidemiológica se encuentra estrechamente relacionada con las estructuras ambientales, sociales, económicas, culturales, demográficas, sociales, laborales y tecnológicas; que se perciben en los cambios que se han presentado dentro de la globalización, urbanización, cambios en el estilo de vida actual, predominando hábitos alimenticios inadecuados, inactividad física, sedentarismo, entre otros, dando como consecuencia una esperanza de vida baja, y evolucionando de manera rápida, siendo una de las principales causas de muerte, bajo precedente de la mortalidad de las Enfermedades No Transmisibles (ENT) (SSA, 2015).

En México, las ENT constituyen un problema de salud pública, y las enfermedades del corazón son las principales causas de muerte. Cada año ocurren cerca de 70,000 defunciones por este motivo, de las cuales 44,070 muertes son presentadas por enfermedad isquémica del corazón, donde 24,102 defunciones son presentadas en hombres y 19,965 en mujeres, además se han reportado 26,000 muertes a causa de las enfermedades cerebrovasculares. Otras enfermedades, como la hipertensión arterial, dislipidemias y obesidad, son factores de riesgo que elevan la probabilidad de presentar estos padecimientos, específicamente enfermedades isquémicas del corazón y enfermedades cerebrovasculares (INEGI, 2013).

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en el año 2012 (ENSANUT, 2012) reportaron que una de las principales enfermedades crónicas degenerativas es la Hipertensión Arterial (HTA), mostrando cifras crecientes desde 1994 con 26.6% de la población, para el año 2000 un 30.7%, teniendo un aumento relativamente alto de un 15.4% para estos años, seis años más tarde las cifran

aumentaron únicamente un 0.01%, pero para el 2012 se presentó un aumento de un 2.2%, teniendo un 31.5% de la población total. Dadas estas cifras se menciona que en la actualidad las enfermedades cardiovasculares son de mayor incidencia en el país, siendo la HTA el principal factor de riesgo que determina la prevalencia de estas enfermedades y sus complicaciones.

Por otro lado, las cifras dadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el año 2013, las enfermedades crónicas degenerativas en hombres y mujeres en un intervalo de edad de 50 y más años, fueron la hipertensión arterial, diabetes y artritis. Les siguen, afecciones pulmonares, infartos, embolias y cáncer (Figura 1).

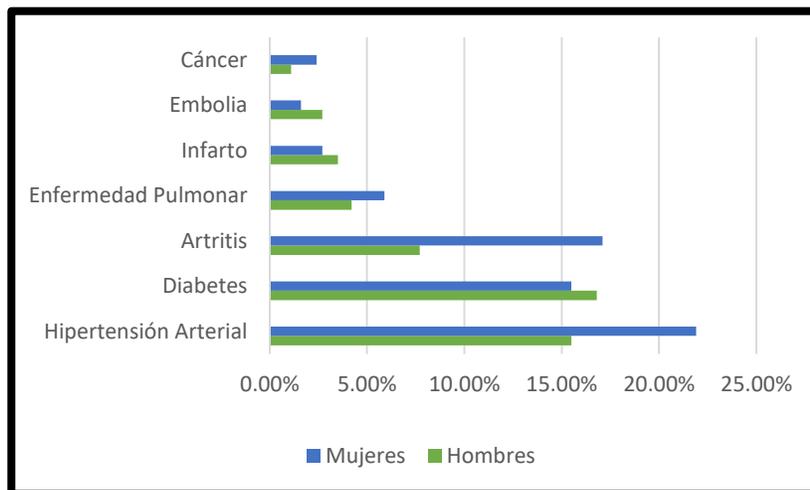


Figura 1. Autorreporte de enfermedades crónico degenerativas de la población mexicana de 50 y más años de edad, según género. **Fuente:** (INEGI, 2013).

En lo que respecta a la trombosis coronaria según la Secretaría de Salud (SSA), en México representa también una de las primeras causas de mortalidad, sin embargo, se desconocen las cifras exactas del número de trombosis, pero según estimaciones mundiales, en México, pueden existir entre 400,000 y 500,000 casos de trombosis por año. Su incidencia es de un 30% en pacientes que son intervenidos quirúrgicamente y hasta un 50% de los que son sometidos a prótesis de cadera o de rodilla. Estas cifras disminuyen con profilaxis antitrombótica.

2.2 Hipertensión arterial.

La tensión arterial (TA) es el resultado de la fuerza con que la sangre presiona contra las paredes de los vasos sanguíneos (arterias) a medida que es bombeada por el corazón. Los vasos sanguíneos son los encargados de llevar la sangre desde el corazón a todo el organismo. La tensión arterial se mide en milímetros de mercurio (mm/Hg) y se registra en forma de dos números separados por una barra. El primero corresponde a la tensión arterial sistólica, la más alta, que se produce cuando el corazón se contrae. El segundo corresponde a la tensión arterial diastólica, la más baja, que se produce cuando el músculo cardíaco se relaja entre un latido y otro. La TA normal en un adulto se define como una tensión sistólica de 120 mm/Hg y una tensión diastólica de 80 mm/Hg. Los niveles normales de ambas presiones, son particularmente importantes para el funcionamiento eficiente de órganos vitales como el corazón, el cerebro o los riñones, y para la salud y el bienestar en general (Mancia *et al.*, 2013) La Hipertensión Arterial (HTA) es una afección en la cual la presión en los vasos sanguíneos es continuamente alta y es definida como la elevación de los valores sistólicos y diastólicos por encima de los límites de la tolerancia referidos en la Tabla 1, la tensión sistólica igual o superior a 140 mm/Hg y una tensión diastólica igual o superior a 90 mm/Hg (OMS, 2013). Cuanta más alta es la tensión arterial, más tiene que trabajar el corazón para bombear la sangre.

Tabla 1. Clasificación de los niveles de presión sanguínea en adultos.

Categoría	Sistólica (mm/Hg)	Diastólica (mm/Hg)
Nivel de presión		
Óptima	<120	<80
Normal	120-129	80-84
Normal Alta	130-139	85-89
Grado 1 (Leve)	140-159	90-99
Grado 2 (moderado)	160-170	100-109
Grado 3 (extremo)	180 o más	110 o más

Fuente: (OMS, 2013).

La hipertensión arterial en su mayoría de veces no presenta síntomas. Pero cuando esto sucede, en ocasiones se manifiesta con síntomas como cefalea, dificultad respiratoria, mareos, dolor torácico, palpitaciones o hemorragia nasal. Ignorar estos síntomas puede ser peligroso, pero tampoco se les puede interpretar siempre como indicativos de hipertensión. Siendo esto una señal de advertencia grave con la necesidad de modificar significativamente el modo de vida. Esta patología puede afectar de manera silenciosa y llegar a matar, sugiriendo mantener controlada su TA (Vidalón, 2010).

Si no se controla la hipertensión puede provocar infarto de miocardio, hipertrofia ventricular y, finalmente, insuficiencia cardíaca. En los vasos sanguíneos, la presión alta puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura, además también puede promover a fugas de sangre hacia el cerebro y esto puede causar accidentes cerebrovasculares (Fernández, 2013).

La hipertensión arterial es una patología multifactorial, dentro de las causas principales son el tabaquismo, sedentarismo, inactividad física, estar sometido a estrés constante, la ingestión de sodio en cantidades mayores a las que un individuo en particular se le sugiere y factores genéticos. Además, cualquiera que sea la causa también existe una relación agregada y sumamente importante con base bioquímico-metabólico de respuesta hormonal, incluyendo el sistema renina angiotensina y celular. Todas ellas pueden ocurrir y coincidir con varias maneras simultáneas y precipitar el proceso hipertensivo (Wagner-Grau, 2010).

La HTA puede ser tratada por diferentes medios, es decir con tratamiento farmacológico o tratamiento nutricional, dentro de este tratamiento nutricional podemos decir que, a partir de diferentes fuentes alimentarias, ya sean de productos de origen animal o vegetal se han obtenido pequeñas fracciones aisladas de las proteínas, llamados péptidos, los cuales contienen una actividad biológica más allá de su contenido nutricional (Mancia *et al.*, 2013). Es entonces que los péptidos con actividad antihipertensiva son un buen recurso para el tratamiento o prevención de la hipertensión arterial, ya que, su acción se encuentra relacionada

en función al sistema renina-angiotensina en relación con la enzima convertidora de angiotensina I (Paul *et al.*, 2006).

2.3 Sistema renina-angiotensina.

El Sistema Renina Angiotensina (SRA) se encuentra ligado directamente con la regulación de la presión arterial sanguínea (Baños *et al.*, 2012). El SRA es un sistema neurohumoral que, en condiciones fisiológicas, interviene en la regulación de la presión arterial y la homeostasis de líquidos corporales, este sistema tiene diversas acciones en el sistema cardiovascular, incluyendo un potente efecto vasoconstrictor, síntesis y secreción de aldosterona en las glándulas suprarrenales con lo que aumenta la reabsorción tubular de sodio renal, el volumen plasmático circulante efectivo y por ende la presión arterial (Berl, 2009).

El SRA interactúa con el óxido nítrico sintetizado en el endotelio, y con el simpático (Masaki, 1997). La renina es una enzima proteolítica (proteasa aspártica) que se sintetiza en el aparato yuxtaglomerular de la pared de la arteriola aferente renal 1 e inicia una cascada actuando sobre su sustrato (Paul *et al.*, 2006).

El angiotensinógeno (Ao), es una glicoproteína de 452 aminoácidos, de la familia de las alfa-2-globulinas, sintetizada en el hígado (aunque hay evidencias de que es producido también en el tejido adiposo), y lo transforma en el decapeptido denominado Angiotensina I (Ang I) (Baños *et al.*, 2012). Una vez obtenida la Ang I a partir del Ao por la acción de la renina, es convertida proteolíticamente en angiotensina II (Ang II) por la ECA (enzima convertidora de angiotensina), principalmente a nivel pulmonar (Atlas, 2007).

Sin embargo, ahora se sabe que muchos tejidos, incluidos vasos sanguíneos, riñón, corazón y cerebro son capaces también de generar en forma local Ang II a través de vías no dependientes de la ECA (vías no-ECA) como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (teniendo como sustrato la Ang I) y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el Ao) (Walter *et al.*, 2003).

2.4 Características de la ECA.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) o kininasa II es un componente fundamental del SRA. Es producida en el endotelio de los tejidos somáticos como una proteína transmembrana que tiene dos dominios activos, sobre los cuales actúan los inhibidores de la ECA (Benavente *et al.*, 2010). La ECA también es producida en los testículos por un promotor alternativo, que genera una forma específica con un solo sitio activo.

La ECA remueve el dipéptido carboxílico terminal del decapeptido Ang I para generar la Ang II y degrada la bradiquinina que es un vasodilatador, lo que produce aumento de la presión arterial (Feldstein y Romero, 2007). La ECA es el vínculo más importante entre el SRA y el sistema de quininas, porque no solo convierte a la Ang I a Ang II sino también porque degrada a las quininas. Los inhibidores de la ECA potencian las acciones de la bradiquinina al reducir su degradación, lo que aumenta el acoplamiento de la bradiquinina a sus receptores B1 y B2 en las células endoteliales (Santeliz *et al.*, 2008). También, alteran las afinidades de los sitios de acoplamiento a los receptores B2 de la membrana. Se han identificado otros productos de degradación de la Ang I, como la Ang 1-730, la Ang III y la Ang IV. La actividad de la ECA tiene un pH óptimo de 7 a 8 y cae rápidamente con la disminución de pH (Feldstein y Romero, 2007).

2.5 Tratamiento farmacológico antihipertensivo.

La relación entre la presión arterial y el riesgo cardiovascular es fuerte, es por ello que se han desarrollado medicamentos para tratar de regular esta enfermedad. Las listas de los fármacos antihipertensivos incluyen a los diuréticos, betabloqueadores, antagonistas selectivos de alfa 1-adrenoreceptores, alfa y beta bloqueadores, los vasodilatadores directos, los medicamentos calcioantagonistas, los inhibidores simpáticos de acción central, los inhibidores de la Ang II (IECA) y los antagonistas del receptor de la Ang II (ARA II) (Pierre, 2009).

Dichos fármacos actúan de manera diferentes en el sistema, sin embargo, el uso desmedido de estos fármacos puede resultar contraproducente en nuestro organismo, un ejemplo de estos son los inhibidores de la ECA su uso durante el primer trimestre de embarazo puede estar asociado con el incremento de malformaciones congénitas en el recién nacido (Herrera, 2012)

Debido a lo anterior, se ha reconocido que las proteínas de los alimentos proporcionan una rica fuente de péptidos biológicamente activos que pueden funcionar en sustitución del tratamiento farmacológico.

2.6 Trombosis venosa profunda.

La trombosis venosa profunda (TVP) se refiere a la obstrucción específica del flujo de la sangre en algún vaso sanguíneo, arterial o venoso provocada por un coágulo o un trombo (Chertcoff *et al.*, 2009), esta obstrucción ocurre en territorio arterial o venoso e induce la detención de la sangre (isquemia). Si la isquemia se prolonga, se produce una lesión celular irreversible, una muerte de los tejidos (necrosis) la cual puede afectar cualquier órgano provocando un infarto (Gonzales, 2006). El estadio clínico alterado que induce a un individuo a presentar un evento trombótico se le denomina Trombofilia o Estado Protrombótico.

Es importante hacer la diferenciación entre un coágulo o un trombo, ambos se forman del mismo modo, sin embargo, la formación de un trombo es un suceso siempre provocado por una patología, mientras que la formación de un coágulo es una respuesta homeostática de muy alto valor biológico evitando así la muerte de una persona por hemorragia. Su inicio y crecimiento están regulados por el tiempo y espacio de la obstrucción. De esta manera un trombo es un coágulo que se formó en un lugar y tiempo equivocados y que puede alojarse en venas, arterias, capilares o en las mismas cavidades cardíacas (Figura 2). Dependiendo de factores hemodinámicos, el trombo se forma por una malla que tiene proporciones variables de fibrina y plaquetas y que engloba otros elementos celulares de la sangre como glóbulos rojos y blancos (Majluf y Espinosa, 2007).

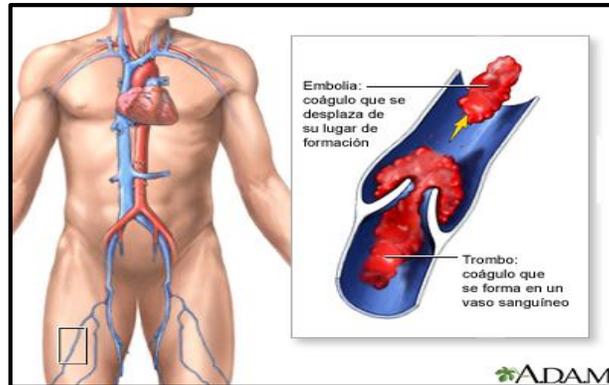


Figura 2. Trombo formado en un vaso sanguíneo.

Fuente: Medline Plus®. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/>

Existe una tríada etiopatogénica llamada de Virchow el cual incluye:

- *Estasis venosa:* asociada a la permanencia prolongada de pie o sentado, siendo más frecuente en personas sedentarias y obesas, en pacientes postrados, como en enfermedades graves, traumatismos o postoperatorios. En los pacientes quirúrgicos, el riesgo comienza, durante la inducción anestésica debido a los efectos hemodinámicos que producen desde la disminución del gasto cardíaco hasta la venodilatación y desaparición de los mecanismos de la bomba muscular (Villas y Veira del Rio, 2009).
- *Coagulopatías o estados de hipercoagulabilidad:* donde el sistema de coagulación está alterado incluyen enfermedades neoplásicas, embarazo y diferentes terapias hormonales. En estos casos se produce un aumento del fibrinógeno y de algunos factores de la coagulación (VII, VIII, IX y X). Algunas patologías cursan con déficit en los inhibidores de la coagulación (proteína C y S, antitrombótico III) favoreciendo los procesos trombóticos (Villas y Veira del Rio, 2009).
- *Lesiones endoteliales:* activan las vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación. Se favorece la adhesividad en las plaquetas, con la liberación de sustancias

capaces de estimular la coagulación en contacto con el colágeno subendotelial. Esto altera el equilibrio entre factores agregantes y antiagregantes, desapareciendo los factores sistema fibrinolítico, como sucede en los traumatismos, vías centrales y marcapasos. Además, existen zonas turbulentas en el árbol venoso que facilitan la formación de un trombo, tales como los senos valvulares (Villas y Veira del Rio, 2009).

Sus manifestaciones clínicas, gravedad y naturaleza dependen del vaso obstruido. Las consecuencias clínicas de una trombosis incluyen múltiples y diversas complicaciones agudas o crónicas que pueden dejar secuelas graves y discapacidades hasta llegar a la muerte del individuo. La edad >40 años se ha establecido como un factor de riesgo para la trombofilia para la cual si el paciente manifiesta otros factores de riesgo se incrementa el riesgo de trombosis (SSA, 2010).

Por otro lado, es importante también hablar sobre el embolismo pulmonar el cual se produce cuando un trombo alojado en algún lugar del sistema venoso de retorno se desprende y aloja al árbol arterial pulmonar. Esto produce un infarto del parénquima pulmonar donde hay áreas ventiladas, pero no profundas, con bronco-constricción e hipoxemia, cuya gravedad depende de su extensión. El diagnóstico de TVP es clínico, aunque en muchas ocasiones es totalmente asintomático. Entre los signos se encuentran la flogosis (dolor, edema y/o fiebre), la presencia de cianosis e ingurgitación venosa superficial. Con la aparición de disnea, hemoptisis y dolor torácico se debe sospechar en una embolia pulmonar (Gonzales, 2006).

Por lo anterior mencionado es de suma importancia encontrar una solución farmacéutica y nutricia trascendental a efecto de realizar medidas de prevención primaria y secundaria adecuadas.

2.7 Tratamiento farmacológico antitrombótico.

El objetivo del tratamiento en la trombosis venosa es prevenir y tratar las posibles complicaciones, como son la extensión del coágulo, la embolia pulmonar aguda, disminuir el riesgo de trombosis recurrente y de complicaciones tardías como el síndrome posttrombótico y la insuficiencia venosa crónica (Arzamendi *et al.*, 2006).

La terapia anticoagulante de mantenimiento se realiza por medio de anticoagulantes orales como los acenocumarol o warfarina. Su administración ha de comenzar en el primer día del tratamiento, tras la dosis de carga de HBPM (heparinas de bajo peso molecular) o de HNF (factor nuclear de hepatocitos). Dado que los anticoagulantes orales (ACO) tardan al menos 72 h en actuar, se debe mantener durante al menos 5 o 6 días el solapamiento entre HNF/HBPM y los ACO. Se retira la heparina cuando la razón normalizada internacional (international normalized ratio [INR]) sea mayor de 2, durante 2 días consecutivos (Llanos, 2001).

De igual forma ocurre con los péptidos antitrombóticos en acción para la sustitución de los fármacos de dicho padecimiento, los cuales poseen mecanismos de respuesta a favor de su sistema contrarrestando el uso de los medicamentos antitrombóticos (Arzamendi *et al.*, 2006).

2.8 Péptidos bioactivos

Las proteínas de la dieta son conocidas tradicionalmente por proporcionar una fuente de energía y los aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de varias funciones del cuerpo. Además, contribuyen a las propiedades físico-químicas y sensoriales de los alimentos ricos en proteína. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han ganado un aumento de valor debido al amplio conocimiento que se tiene sobre los péptidos fisiológicamente activos (Chen *et al.*, 2003).

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de tamaño pequeño, entre 2 a 15 residuos de aminoácidos los cuales podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores

hormonales y neurotransmisores. La administración oral de péptidos bioactivos puede ejercer su efecto, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. Estos péptidos bioactivos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína original y pueden ser liberados durante: 1) hidrólisis enzimática de las proteínas, 2) a través de la hidrólisis por microorganismos proteolíticos y 3) a través de la acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas, y en combinación de estas 3 por ejemplo: 1 - 2 ó 1 - 3 (Pérez *et al.*, 2012).

Está demostrado que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, logrando ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto intestinal y a nivel sistémico (Erdmann *et al.*, 2007). Cabe destacar que, dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usada y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos es distinta (Mulero *et al.*, 2011) y de la combinación y secuencia de los aminoácidos obtenidos.

2.9 Fuentes de obtención y principales actividades biológicas.

Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales; entre las primeras se pueden mencionar a la caseína, el queso a base de suero de la leche (requesón), de leche fermentada, del músculo de pollo y pescado entre otras y de origen vegetal se han aislado del gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol mungo, etc. (Das Neves *et al.*, 2006) los cuales han presentado diversas actividades biológicas como antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores (Megías *et al.*, 2004).

2.10 Obtención de hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas

Es innegable que las proteínas son los materiales que desempeñan el mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos, las cuales van desde formar parte de la organización estructural básica de la célula, hasta funciones metabólicas y reguladoras. Toda esta variedad de actividades bioquímicas son las

que definirán la identidad de un ser vivo. En consecuencia, han sido el foco de atención de los científicos a través del tiempo. En el afán de comprenderlas mejor, se ha intentado sintetizarlas en el laboratorio llegando a desarrollar la técnica de síntesis de péptidos, donde la hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y por consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres, información importante al poseer características de las proteínas naturales (Lira, 2007). Estas rupturas de enlaces pueden producirse por diferentes métodos que van desde el método químico pasando la obtención biológica, enzimática, por ultrafiltración, HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y la filtración en gel.

2.10.1 Método químico para la obtención de péptidos

Los aislados proteínicos son preparados mediante el uso de un medio alcalino hasta alcanzar un pH entre 7 a 8.5, proceso mediante el cual favorece la solubilización de las proteínas desnaturalizadas durante la preparación de los aislados (Wolf, 1970). Sin embargo, los intervalos de pH alcalino pueden variar, ya que, algunas proteínas como las gluteínas requieren de pH alcalinos o superiores a 11 en la extracción para poder ser extraídas (Vioque *et al.*, 2001a). Posteriormente para la obtención de aislados proteínicos es ajustar el pH 4.5 el cual es el punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas, provocando que estas se precipiten, para que sean separadas por centrifugación o filtración (Wolf, 1970).

La hidrólisis química catalizada por ácidos o bases ha sido extensamente practicada para obtener hidrolizados proteínicos, con buenas propiedades funcionales, sin embargo la catálisis química presenta algunas dificultades en el control de la hidrólisis debido a otros materiales orgánicos, que pudieran estar presentes en el sustrato, tales como, la presencia de monocloropropanol (3-cloro-1,2 propanediol, 3-MPCPD) y dicloropropanol (1,3-dicloro-2-propanol, DCP) que resultan por la hidrólisis de lípidos y de la presencia de sales de sodio del ácido glutámico (MSG) en la neutralidad del producto final (Wanasundara *et al.*, 2002a). Además, las hidrólisis ácidas de los concentrados y aislados proteínicos se

producen mediante la división química de la unión de péptidos en una región específica por ejemplo al oxidar la cisteína y metionina, destruir serina y treonina, y convertir la glutamina y asparagina en glutamato y aspartato, respectivamente, disminuyendo la calidad de la proteína y su valor biológico (Manninen, 2004). Asimismo, en la Tabla 2 se presentan algunos agentes divisores químicos para las separaciones proteínicas.

Tabla 2. Métodos enzimático y químico para la separación de péptidos.

Tipo de método	Agente de división	Especificidad
Enzimático	Tripsina	Lado C-Terminal de Arg y Lis
	Pepsina	No especifico
	Quimiotripsina	Lado C- Terminal de residuos hidrófobos
	Glutamil endopeptidasa	Lado C- terminal de glutamina y asparagina
Químico	Bromuro de cianógeno	Lado C- Terminal de Metionina
	Ácido diluido	Asparagina y prolina
	BNPS-escatol	Triptófano

Fuente: (Agilent, 2013)

2.10.2 Método fermentativo para la obtención de péptidos.

Durante el proceso de la fermentación, las bacterias ácido lácticas hidrolizan las proteínas de la leche, principalmente caseínas, en péptidos y aminoácidos que se utilizan como fuentes de nitrógeno necesarias para su crecimiento. Por lo tanto, los péptidos bioactivos pueden ser generados por bacterias iniciadoras y no iniciadoras utilizados en la fabricación de productos lácteos fermentados (Hernández *et al.*, 2011). Las leches fermentadas han sido reconocidas por ser el alimento saludable desde hace mucho tiempo en donde se utilizan fuentes

biológicas como las bacterias *Bifidobacterium* y bacterias ácido lácticas, siendo aún más valiosas desde el punto de vista del mantenimiento de la salud e importante medicina preventiva.

Se ha demostrado que el sistema proteolítico de los *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis ssp. diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* pueden hidrolizar proteínas de la leche y liberar péptidos con capacidad antihipertensiva. Los mejores péptidos inhibidores de la ECA son caracterizados por poseer residuos de VPP y IPP los cuales se encuentran en leche fermentada con *L. helveticus* y el cual ya es comercializado en Japón (Hernández *et al.*, 2011).

2.10.3 Método enzimático para la obtención de péptidos.

La manera más común de producir péptidos bioactivos es a través hidrólisis enzimática de las moléculas de proteínas enteras como se muestran en la Tabla 2. Una gran variedad de estudios ha demostrado la liberación de ECA I y/o péptidos antihipertensivos de proteínas de los alimentos, por hidrólisis con las enzimas gastrointestinales, tales como la pepsina, tripsina, y quimotripsina. Existen reportes donde se describen la ocurrencia de péptidos inhibidores de la ECA en hidrolizados de las especies bovina, ovinos y caprinos κ -caseína en la hidrólisis con varias enzimas digestivas (Torruco, 2009). Además, el uso de microorganismos vivos para la obtención de enzimas proteolíticas de fuentes bacterianas y fúngicas ha sido también utilizado para generar péptidos bioactivos a partir de diferentes proteínas (Hernández *et al.*, 2011). El uso de enzimas disponibles en el mercado de proteasas de calidad alimentaria derivados de microorganismos para hidrolizar proteínas de los alimentos es ventajoso ya que estas enzimas son de bajo costo y seguro, y el rendimiento de los productos son muy altos (Ueno *et al.*, 2004).

Recientemente, el interés de los tecnólogos de alimentos ha recurrido a la utilización de diferentes técnicas, tales como alta presión y calor desnaturalizante

y ultrasonidos de potencia para modificar la estructura de proteínas y aumentar la hidrólisis enzimática. En comparación con la proteólisis a presión atmosférica, no se detectaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la hidrólisis patrón cuando la proteólisis con tripsina se llevó a cabo bajo tratamientos por alta presión (Korhonen y Pihlanto, 2005). La exposición prolongada a los ultrasonidos de alta intensidad se ha demostrado que inhibe la actividad catalítica de una serie de enzimas en alimentos. Sin embargo, en algunos casos, las enzimas se ha encontrado que aumentan su actividad después de exposiciones cortas a ultrasonidos (Hernández *et al.*, 2011).

2.10.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Esta herramienta ha sido muy útil para la purificación y caracterización de péptidos. Es capaz de separar el péptido de interés de una mezcla formada durante la síntesis de péptidos, incluso si el producto esperado se encuentra contaminado con un péptido al que sólo le hace falta un aminoácido (Karamac *et al.*, 2005). Los tipos principales de HPLC utilizados para la separación de péptidos son:

Cromatografía por exclusión de tamaño. Este tipo de cromatografía también conocida como filtración en gel, no es una técnica muy efectiva para separar péptidos contaminantes del péptido de interés, a menos que haya una diferencia importante en el tamaño (aunque ya se han diseñado columnas que pueden separar péptidos con masas moleculares del rango de 100-7000 Da). Pese a ser la menos efectiva de las cromatografías utilizadas, puede ser implementada en las primeras etapas del proceso de purificación, sobre todo si lo que se desea es deshacerse de otro tipo de contaminantes como los grupos protectores o agentes acoplantes (Karamac *et al.*, 2005).

Cromatografía de intercambio iónico. Es muy útil para separar mezclas de péptidos, particularmente cuando especies cargadas han sido removidas de la secuencia esperada. Puede ser capaz de separar especies cargadas que difieren

por sólo una carga neta. Para purificación de péptidos sintéticos es usada con mayor frecuencia una columna de intercambio catiónico.

Cromatografía de fase reversa. Es el método más utilizado para separar péptidos debido a que es generalmente superior a los otros dos en velocidad y eficiencia. Ofrece un amplio rango de manipulación de las características de las fases móvil y estacionaria para mejorar las separaciones peptídicas entre los que se encuentran:

1. Variación de los grupos funcionales de la fase estacionaria. Los ligandos funcionales que usualmente se encuentran en la fase estacionaria de RP-HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa) con cadenas hidrocarbonadas de 8 o 18 carbonos; sin embargo, algunos contaminantes como grupos protectores, agentes acoplantes no son exitosamente separados. Péptidos muy hidrofóbicos también presentan problemas para purificarse, ya que las interacciones con los compuestos acoplados a la fase estacionaria son muy fuertes. Para solucionar ambos problemas mencionados, se ha optado por sustituir los hidrocarburos de 8 átomos de carbono por cianopropil, el cual ha resultado muy eficiente para la purificación de los casos expuestos (Lira, 2007).

2. Efecto de las sales en la fase móvil. La adición de sales a la fase móvil, generalmente de 50 a 100 mM, en un rango de pH aproximado de 4-7, es tradicionalmente utilizado para suprimir las interacciones de grupos silanol libres con solutos positivamente cargados.

3. Efecto de la elevación de la temperatura en la purificación. Los tiempos de retención del péptido en la columna cromatográfica decrecen cuando se incrementa la temperatura, mejorando la resolución del péptido. Aumentar la temperatura previene posibles agregados del péptido y lo hace más soluble, lo que facilita su elución, especialmente si el péptido a purificar es altamente hidrofóbico. Una desventaja del incremento de la temperatura es que reduce el tiempo de vida de la columna. Combinaciones entre las cromatografías antes descritas, pueden ofrecer una purificación más eficiente (Lira, 2007).

2.10.5 Filtración en gel

Los geles son los soportes más usados debido a la igual distribución de los grupos funcionales a través de la red polimérica altamente solvatada e inerte, la cual es ideal para el ensamblaje de los péptidos. La red polimérica es flexible y la resina puede expandirse para acomodar a la molécula creciente dentro del gel. Para la síntesis de péptidos se han desarrollado 4 tipos de resinas de gel:

1. La resina hidrofóbica de poliestireno, que fue la desarrollada por Merrifield. Originalmente era una resina con un 2% de entrecruzamiento por la incorporación de divinilbenceno clorometilado (fue modificada a un 1% de entrecruzamiento debido a los problemas que presentaba para la síntesis de péptidos más complejos), esta resina es muy estable en todo el rango de pH y a la temperatura. El tamaño de las perlas de esta resina es de 10 a 200 μm , la solvatación de estas perlas no es muy eficiente, y los péptidos solvatados pueden cambiar las propiedades de hinchamiento de la resina, esto sumado al carácter frágil de la resina a lo largo de la síntesis, la hacen inútil para un flujo continuo.

2. Las resinas de poliacrilamida desarrolladas por Sheppard como una alternativa hidrofílica para las resinas de poliestireno, son obtenidas mediante el entrecruzamiento de poly-N,N-dimetilacrilamida con 5% de bis-N,N'-acriloletilendiamina y como grupos funcionales N-acrilolsarcosina metil éster. Es una resina mucho más flexible que la anterior, por lo que permite un mayor entrecruzamiento. Las resinas de poliacilamida se hinchan mejor con solventes polares y tiene mejores propiedades que las de poliestireno bajo condiciones polares de síntesis. Su carácter frágil no las hace adecuadas para un flujo continuo (Lira, 2007).

3. Las resinas con polietilenglicol (PEG) incrustado fueron desarrolladas para la obtención de una resina más estable. Estas resinas también mejoran la síntesis de péptidos difíciles. Se obtienen por la reacción de oligoxietilenos con perlas de poliestireno aminometilado. Estas perlas ahora tienen la propiedad de hincharse con solventes no polares y polares, exceptuando el agua, por lo que pueden utilizarse indistintamente Boc-aminoácidos o Fmoc aminoácidos. Su grado de

hinchazón no cambia durante toda la síntesis, lo que las hace más estables al flujo.

4. Las resinas basadas en PEG, las cuales están compuestas exclusivamente de una red de Polietilenglicol/polipropilenglicol (PPG) o por una combinación de PEG con una pequeña cantidad de poliamida o poliestireno. Estas resinas confieren propiedades óptimas para el soporte, debido a los arreglos presentados por los enlaces entre en carbono y el oxígeno a lo largo de la cadena asumiendo tres tipos de estructuras helicoidales. *La primera* esconde los átomos de oxígeno, convirtiéndola en una estructura hidrofóbica, *la segunda* de polaridad intermedia, y *la tercera* con los átomos de oxígeno expuestos por lo que es una estructura hidrofílica. Lo anterior permite que este tipo de resina sea compatible con solventes tanto polares como no polares. Las moléculas de PEG son altamente dinámicas, lo que permite que las reacciones de acoplamiento se lleven a cabo rápidamente. El carácter anfipático del PEG también impide que los péptidos se agreguen (Lira, 2007).

2.11 Péptidos antihipertensivos

Los péptidos antihipertensivos son los péptidos bioactivos más estudiados de los alimentos, ya que éstos muestran actividad por la inhibición de la ECA (Wang y González de Mejía, 2005). Estos péptidos han sido identificados a partir de una gama de diferentes proteínas de los alimentos tanto en fuentes animales y vegetales (Silva y Malcata, 2005). Entre las que destacan las proteínas de la leche, como la β -caseína, es la fuente principal de estudio para la obtención de péptidos, le prosigue la caseína, con actividad inhibidora en la ECA. Los tripéptidos Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) y Valina-Prolina-Prolina (VPP), de manera combinada son conocidos como lactotripéptidos (LTP), son eficaces inhibidores de la ECA que pueden reducir la presión arterial en forma espontánea. Estos LTP se han aislado de hidrolizados de la caseína de la leche. Además de haberse tomado en cuenta para ser introducido a algún alimento, dándole importancia a su uso como alimento funcional ayudando así con el control de la presión arterial.

Otros tripéptidos y algunos péptidos de cadena más larga, incluyendo YQEP, VPKVK, PLPLL, HLPLP, y YQEPVLGP de β -Caseína, RPK y RPKHPIKH de S1-caseína, así como PPEIN de caseína. También se encuentra en las proteínas del suero, en particular β -lactoglobulina y β -Lactoalbúmina. Varios péptidos derivados de la β -Lactoglobulina y β -lactoalbumina han demostrado ser potenciales inhibidores de la ECA. Los péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la ECA son producidos durante la hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche con diversas proteasas tales como pepsina, pancreatina, Alcalasa®, y Flavourzyme®, durante la fermentación microbiana de la leche o en algunos casos por el uso combinado de enzimas y microorganismos. El tipo de enzimas utilizadas durante la producción de péptidos en gran medida influye en el patrón de rompimiento de los péptidos de la proteína, que determina la actividad inhibidora resultante de los péptidos contra la ECA (Perez *et al.*, 2011).

2.12 Péptidos antitrombóticos.

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y está mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gli-Asp (AGD) del fibrinógeno. Es concebible, por lo tanto, que los péptidos que contienen la secuencia AGD puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación de plaquetas (Silva y Malcata, 2005).

En la secuencia AGD, una unidad catiónica en este caso, el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido carboxílico del Asp, es requerida para la actividad inhibitoria. Además, la distancia entre estos grupos funcionales catiónicos y aniónicos son un factor importante para potencializar la actividad inhibitoria. El fibrinógeno enlaza sitios de la GPIIb/IIIa, la cual tiene un número de residuos de Asp, y a causa de esto el grupo guanidino de la Arg, en el caso de

compuesto tipo-AGD, se piensa que puede estar involucrado en la ligadura iónica con el grupo carboxilato del Asp en la GPIIb/IIIa57 (Erdmann *et al.*, 2007).

Por lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a la GPIIb/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos. Los principales péptidos aislados con actividad antitrombótica se encuentran presentes en la leche. A nivel molecular, la coagulación de la sangre y de la leche muestra gran similitud. En la leche, el mecanismo de coagulación es definido por la interacción de la k-caseína con quimosina, y el proceso de coagulación de la sangre es definido por la interacción del fibrinógeno con trombina (Korhonen y Pihlanto, 2005).

2.13 Entomofagia

Los insectos han jugado un papel trascendental tanto en las sociedades primitivas, como en las industriales por las funciones importantes que realizan. Los insectos son uno de los grupos animales que más tiempo llevan en el medio terrestre. Desde hace varios cientos de millones de años se han convertido en algunos de los organismos dominantes, en número de individuos, especies y biomasas, de los ecosistemas terrestres y dulceacuícolas del planeta (Cerrito *et al.*, 2008).

La entomofagia se refiere al consumo de insectos, práctica que en nuestro país se remonta en la época prehispánica y que en la actualidad el índice de consumo diario presenta mayor interés en la población (Rumpold y Schlüter, 2013). El total de especies contabilizadas hasta hoy son 504 especies de insectos comestibles por ejemplo las chinches, pulgones, libélulas, gusanos de maguey, escarabajos, hormigas, abejas, chapulines, jumiles. Además, han otorgado a los seres humanos múltiples beneficios con respecto a su uso como por ejemplo en la utilización como en alimentos, ropa, medicina, transformación de desechos orgánicos, etc., sin contar con su papel en la polinización de las cosechas (Ramos *et al.*, 2012).

Los insectos contienen sales minerales, algunos son muy ricos en calcio, albergan vitaminas del grupo B y son una fuente importante de magnesio; además, en estado de larva, proporcionan calorías de gran calidad, ya que están

conformadas por ácidos grasos poliinsaturados que no hacen daño al hombre. Una de las principales aportaciones de los insectos es la alimentación ya que son una fuente importante de las proteínas, pudiendo ser una buena opción de esta para el consumo humano y marcando variedad con respecto a los productos de origen animal de mayor consumo como el, pollo, la res, cerdo o mariscos, así como derivados de estos (Lahteenmaki y Grmelova, 2016). Siendo más específicos en lo que al consumo de insectos respecta, la ingesta del chapulín presenta uno de los primeros lugares en nuestro país, mostrando dentro de su valor nutrimental cantidades relativamente altas en comparación con la de otras fuentes animales, por ejemplo, en 100 g de carne de res, el contenido de proteína va de un 54 a 57%, mientras que en 100 g de chapulín su contenido proteínico varía de entre 62 a 72% (Ramos *et al.*, 2012). Pudiendo ser una buena fuente de obtención de péptidos no convencional para diferentes bioactividades.

2.14 Chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.)

Sphenarium purpurascens Charpentier, nombre científico dado al saltamontes o también llamado chapulín de milpa, ya que es abundante en agroecosistemas donde se cultiva maíz, perteneciente a la familia *Pyrgomorphidea* del orden *Orthoptera* y suborden *Caelifera* donde provienen 4 tipos de especies las cual una de ellas corresponde a la *Sphenarium purpurascens* (Figura 3), descrita en 1842 por Charpentier al cual se le atribuyó su nombre (Barrientos y Almaguer, 2009).

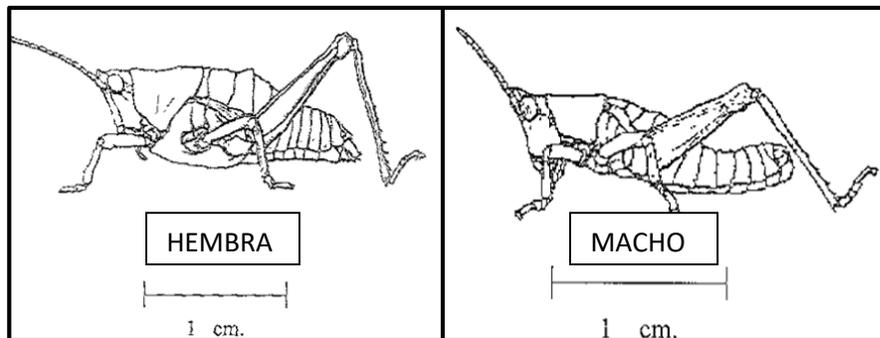


Figura 3. *Sphenarium purpurascens* Ch. hembra y macho. Fuente: Barrientos y Almaguer (2009)

En México es el ortóptero más abundante y presenta una distribución geográfica muy amplia que comprende el Centro, Sur y Occidente en Estados como Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Veracruz, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Distrito Federal, Estado de México, Chiapas y Tabasco (Castellanos *et al.*, 2015). Las opciones culinarias para el uso de los chapulines son diversas, en el Estado de Oaxaca se consumen en tostadas, tacos, salsas con chiles, o simplemente agregándoles mojo de ajo y limón; estos llevan una preparación previa, dejándolos vivos para purgarlos, y hervirlos en agua con sal, posteriormente se enfrían o tuestan para poder consumirlo. En cuanto al valor nutrimental de los chapulines han mostrado que en su composición predomina el grupo de las proteínas, mostrando el contenido de aminoácidos en la Tabla 3. En un análisis químico proximal realizado por Ramos *et al.* (2012) menciona que el *Sphenarium purpurascens* proveniente del estado de Oaxaca muestra que por cada 100 g de muestra contiene un total de 58.3 g de proteínas, 7.4 g de grasas, 16.5 g de cenizas, 8.64 g de fibra cruda, 9.11 de carbohidratos y un aporte calórico de 12.8 kcal.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos del *Sphenarium purpurascens* Ch. (g/100 g proteína).

Aminoácido	Larva y adulto
Aminoácidos esenciales	
Isoleucina	4.2
Leucina	8.9
Lisina	5.7
Metionina	2.5
Cisteína	1.8
Total de aminoácidos sulfuros	4.3
Fenilalanina	10.3
Tirosina	6.3
Total de aminoácidos aromáticos	16.6
Treonina	3.1
Triptofano	0.7
Valina	5.7
Histidina	2.2

Total de aminoácidos esenciales	51.3
Aminoácidos no esenciales	
Ác. Aspartico	8.7
Serina	4.8
Ac. Glutamico	10.7
Prolina	6.2
Glicina	6.8
Alanina	6.4
Arginina	6.0
Puntuación de calidad de proteína*	64.0

*Puntuación de calidad de la proteína acorde a los valores estándar de WHO/FAO/UNU 1985.

Fuente: Ramos *et al.* (2012).

Cabe mencionar, que el alto valor proteico de esta especie de Orthopera es importante, pudiendo ser una especie no convencional para la obtención de péptidos bioactivos que pudieran presentar diversas propiedades biológicas.

3. ANTECEDENTES

Vercruyse et al. (2005). Evaluaron la actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados enzimáticos de proteínas de insectos. Estudiaron 4 insectos de diferentes órdenes como: *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera) o rosquilla negra, *Bombyx mori* (Lepidoptera) llamado gusano de seda, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) con su nombre común langosta del desierto y el abejorro, *Bombus terrestris* (Hymenoptera). Se utilizaron varias enzimas para realizar la hidrólisis de las proteínas de los insectos, las cuales fueron proteasas gastrointestinales, Alcalasa® y Termolisina las cuales son utilizadas por primera vez en este tipo de estudios. La actividad inhibitoria de la ECA fue medida por dos métodos diferentes, un método espectrofotométrico usando FAPG (2-furonacrilóil-fenilalanil-glicil-glicina) como sustrato y el método de HPLC usando dansiltriglicina (DTG) como sustrato. La hidrólisis de las proteínas de los insectos dio como resultado un aumento de la actividad inhibitoria de la ECA. Encontrándose una mayor actividad en aquellos hidrolizados obtenidos después de la digestión gastrointestinal. Estos resultados sugieren el potencial de las proteínas de insectos como componente antihipertensivo en alimentos funcionales y nutraceuticos. Sin embargo, la actividad inhibitoria de la ECA difiere de acuerdo al método usado, por lo que es necesario estandarizar las metodologías para evaluar la actividad de la ECA.

Chen et al. (2008). Investigaron la actividad inhibidora de hidrolizados sobre la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), con el fin de desarrollar una nueva funcionalidad en alimentos que brinden un método simple y eficaz para la prevención de hipertensión. Fue llevado a cabo mediante la hidrólisis de huesos de pollo con diferentes enzimas como la Alcalasa®, Pepsina® y Tripsina durante 12 h. Los hidrolizados se liofilizaron y se almacenaron a una temperatura de -80 °C y posteriormente fueron probados experimentalmente cada 2 h para evaluar el valor de pH, el contenido de péptido, el grado de hidrólisis (GH) y la actividad inhibitoria de la ECA. Como resultados mostraron que los hidrolizados con Alcalasa® presentaron un mayor grado de hidrólisis y contenido de péptidos. Por

electroforesis se observó que los componentes de 66 kDa desaparecieron en los hidrolizados con Alcalasa® y Tripsina después de 2 h de hidrólisis. Los hidrolizados con Alcalasa® presentaron una mayor actividad inhibitoria de la ECA, especialmente en los hidrolizados a 4 y 8 h y también mostraron valores muy bajos de IC_{50} de 1960 mg/mL a 4 h y 0.945 mg/mL a 8 h. De acuerdo a los resultados obtenidos de GH y electroforesis se puede asumir que la mayor actividad de la ECA es debido a la obtención de péptidos de bajo peso molecular en la hidrólisis de Alcalasa®. Por lo que, concluyeron que el hueso de pierna de pollo puede ser utilizado para desarrollar péptidos inhibidores de la ECA que puedan ser utilizados como ingrediente funcional en alimentos, en un intento de aliviar la hipertensión.

Shimizu *et al.* (2009). Evaluaron los péptidos de la carne de cerdo cruda desgrasada con el objetivo de encontrar actividad antitrombótica. La carne de puerco fue hidrolizada con la enzima papaína, utilizando nuevos métodos de obtención de péptidos, los cuales fueron las pruebas de trombosis por cizalla inducida *in vitro* usando sangre de rata no tratadas con anticoagulantes y un test de láser de helio-neon inducido en la arteria carótida del ratón *in vivo*. Los aminoácidos encontrados en la carne de cerdo fueron Ácido Aspártico (Asp), Treonina (Thr), Serina (Ser), Glutamina (Glu), Prolina (Pro), Glicina (Gly), Alanina (Ala), Cisteina (Cys), Valina (Val), Metionina (Met), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Histidina (His), Lisina (Lys) y Arginina (Arg); de los cuales Ile-Leu-Phe prueban que posiblemente tienen mayor actividad antitrombótica *in vivo*. Demostrando que los péptidos de carne de cerdo purificados probablemente inhiben la trombosis si son administrados en cantidades de 70 mg/kg de peso, equivalente a las cantidades de ingesta recomendada de la aspirina (50 mg/kg), medicamento que en uso excesivo y constante trae consigo problemas gastrointestinales e inducción al asma, por lo que concluyen que el consumo diario de los péptidos purificados de la carne de cerdo podría ser una buena opción antitrombótica en humanos en comparación con el uso de medicamentos como la aspirina. Cabe mencionar que la secuencia

de aminoácidos hidrolizados por papaína no se determinó en el presente estudio. Sin embargo, mencionaron que se necesitan más estudios para identificar el o los componentes activos para aclarar el mecanismo del efecto antitrombótico de los hidrolizados de péptidos con papaína.

Staljanssens et al. (2011). Investigaron la actividad inhibitoria de la ECA *in vitro* y el efecto antihipertensivo *in vivo* en los extractos de las células de insectos. Evaluaron la máxima concentración inhibitoria media (IC_{50}) de tres líneas celulares de insectos diferentes: S2 (embrión de *Drosophila melanogaster*, mosca de vinagre), Sf21 (ovario de *Spodoptera frugiperda* y palomilla de maíz) y BM5 (ovario, *Bombyx mori* mariposa o gusano de seda). Los resultados más interesantes obtenidos fueron que los valores de IC_{50} oscilaron entre 0.4 y 0.9 mg/mL, y que una hidrólisis adicional con enzimas gastrointestinales no aumentó la actividad inhibitoria de la ECA visiblemente. Finalmente, una única administración oral con una sonda gástrica de extracto de células 150 mg/kg de peso corporal en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la presión arterial sistólica (PAS), en un 5 - 6% (9 - 12 mm Hg) en comparación con los controles a las 6 horas después de la administración. Los resultados confirmaron el potencial de las células de insectos, las cuales pueden ser cultivadas fácilmente en bioreactores industriales, con la finalidad de obtener cantidades mayores de biomasa y usarlas, así como una fuente de péptidos bioactivos que pudieran ser utilizados en la preparación de alimentos funcionales o neutraceuticos que presenten actividad antihipertensiva.

Kong et al. (2012). Purificaron y caracterizaron un nuevo péptido antitrombótico obtenido a partir *Scolopendra subspinipes mutilans*. Fue utilizado el ciempiés debido a que, en Corea, China y otros países asiáticos del Lejano Oriente es prescrito como tratamiento de enfermedades cardiovasculares. El nuevo péptido antitrombótico fue aislado usando una combinación de ultrafiltración, columna Sephadex G-50, columna de intercambio aniónico 15 Q y una columna de C18 de RP-HPLC. El péptido purificado presentó una masa molecular de 346 kDa medido

por electro spray (ESI-MS). La estructura primaria del péptido fue de Ser-Gln-Leu (SQL) el cual inhibió la agregación plaquetaria y presentó una actividad prolongada del tiempo de tromboplastina (aPTT). Los resultados ayudaron a comprender el mecanismo de la actividad antitrombótica del ciempiés el cual puede ser un tratamiento efectivo contra las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la información proporcionada por la Secretaría de Salud del año 2010 a la fecha sobre las altas estadísticas de enfermedades cardiovasculares las cuales incluyen dos de las principales causas de muerte en México, como lo son la Hipertensión arterial y la Trombosis Venosa, se han buscado fuentes alternativas en sustitución al uso de medicamentos para cada una de las enfermedades mencionadas anteriormente, disminuyendo así reacciones secundarias, costos monetarios, y/o susceptibilidad de alergias a medicamentos por el uso prolongado de estos. Es por ello, que se han llevado un sin fin de estudios en las actividades biológicas inhibitorias de la ECA y la actividad plaquetaria, de las cuales la actividad antihipertensiva ha sido una de la más estudiadas en extracción de diversas fuentes, tanto animal como vegetal y otras no convencionales tales como los insectos. Sin embargo, en lo que respecta a la actividad antitrombótica, no se cuentan con estudios relacionados de alguna otra fuente que no sean los productos de origen animal y vegetal. Para ambas actividades el uso de una nueva fuente de proteína como lo es el chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch) puede ser una excelente opción para la obtención de péptidos bioactivos debido a su alto contenido proteico. Tomando en cuenta su alto consumo presente en la zona centro sur de nuestro país y como lo es en la región de Oaxaca, por lo que se le sugiere dar un uso positivo explotando esta materia prima. Es por eso que se propone evaluar las actividades biológicas de los hidrolizados proteicos de una fuente no convencional como lo es el chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch) con el fin de encontrar específicamente fracciones peptídicas con actividad antitrombótica y antihipertensiva.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la actividad biológica (antitrombótica y antihipertensiva *in vitro*) de los hidrolizados proteínicos obtenidos del Chapulín (*Sphenarium Purpurascens* Ch.)

5.2 Objetivo Específicos

1. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.).
2. Evaluar las cinéticas de hidrólisis extensiva de la harina de chapulín *S. purpurascens* Ch. a diferentes tiempos de reacción mediante la aplicación de tratamientos enzimáticos.
3. Determinar el patrón electroforético de los hidrolizados proteicos obtenidos del *S. purpurascens* Ch.
4. Evaluar la actividad inhibitoria "*in vitro*" de los hidrolizados proteínicos obtenidos del *S. purpurascens* sobre la agregación plaquetaria y la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Los chapulines (*Sphenarium purpurascens* Ch.) se obtuvieron en el Mercado Público 20 de Noviembre de la Cd. de Oaxaca, Oax.

Todos los reactivos que se utilizaron en esta investigación fueron de las marcas registradas como Sigma, J. T. Baker (Phillisburg, NJ, USA). Las enzimas Pepsina® y Alcalasa®, fueron adquiridas de los laboratorios Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de la harina de chapulín *Sphenarium purpurascens* Ch.

Los chapulines fueron sometidos a ahogamiento y secados al sol, posteriormente fueron seleccionados únicamente los de tamaño mediano y limpiados manualmente. Fueron secados en una Estufa Binder mod. ED 115, Germany a una temperatura de entre 40 a 50 °C durante 6 h siendo agitados manualmente cada hora para tener un secado homogéneo y obtener un contenido de humedad menor a 12%, evitando pérdidas en sus propiedades nutrimentales. Una vez secado los chapulines se les realizó una molienda en un molino de café Krups acero inoxidable modelo GX410011V, hasta obtener una harina capaz de pasar a través de una malla de No. 40 (0.420 mm). Una vez conseguida la harina se almacenó en botes de plástico a una temperatura de 4 °C para su posterior utilización.

6.2.2 Determinación de la composición proximal de la harina del *Sphenarium purpurascens* Ch.

Se realizó un análisis químico proximal a la harina del chapulín, por triplicado según los métodos de la AOAC (2012): humedad (925.09), cenizas (923.03), proteínas (960.59), grasas (920.39), fibra cruda (962.09) y el contenido de los carbohidratos totales por diferencia.

a) Humedad (Método 925.09):

Se determinó por la pérdida de peso después de secar la muestra en una estufa a 105 °C por 4 h. Se colocaron 3 g de muestra en una charola de aluminio. Posteriormente se pesaron las muestras, y se colocaron en una estufa a una temperatura de 105 °C por 4 h hasta obtener un peso constante. La pérdida de humedad fue determinada después de secar la muestra a través de la siguiente ecuación:

Ecuación 1:

$$\%H = \frac{PI - PF}{PI - PC} * 100$$

Dónde:

%H = Porcentaje de humedad.

PI = Peso de charola con muestra fresca (g).

PF = Peso de charola con muestra seca (g).

PC = Peso de charola sin muestra (g).

b) Proteína cruda (Método 954.01):

Se determinó por el método Kjeldahl, empleando digestión ácida y destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Se pesaron 0.04 g de la muestra en un tubo microKjeldahl, adicionando 2 g de catalizador y 3 mL de ácido sulfúrico, se puso a digerir la muestra en el equipo de digestión de microKjeldahl hasta que clarificara manteniendo la temperatura durante un tiempo de 1.5 - 2 h y posteriormente se dejó enfriar. El residuo se disolvió en 10 mL de agua destilada. En un matraz Erlenmeyer se colocó 250 mL de solución de ácido bórico al 5% con dos gotas de indicador de Wesslow, el cual se colocó en la terminal del condensador, cuidando que quedará dentro de la solución. El tubo con muestra fue colocado en el destilador y se le adicionó la solución de hidróxido de sodio al 60% con tiosulfato de sodio al 5%.

Posteriormente se inició la destilación por arrastre de vapor recolectando aproximadamente de 75 a 100 mL del destilado. Esta solución se tituló con ácido clorhídrico al 0.01 N hasta que cambió el color del indicador de verde a violeta. Posteriormente se determinó el contenido de proteína con base a la ecuación 2.

Ecuación 2:

$$\%N = \left(\frac{(V2 - V1)(eqN)(N)}{M} \times 100 \right) (F)$$

Dónde:

%N = Porcentaje de nitrógeno total

V1 = Volumen de HCl gastado en titular el blanco (mL)

V2 = Volumen de HCl gastado en titular la muestra (mL)

eqN = 14.007

N = normalidad de HCl (0.01)

M = Peso de la muestra (mg)

F = Factor de conversión a proteína (6.25)

c) Grasa cruda (Método 920.39):

Se determinó por el Método 920.39 con algunas modificaciones. La grasa cruda fue cuantificada después de la extracción de la muestra durante 1 h con hexano en un sistema Soxhlet. En un matraz a peso constante se pesaron 4 g de muestra deshidratada en un papel filtro de poro mediano, el cual fue doblado perfectamente para formar un cartucho de tal forma que la muestra quedara segura y fue colocado en el aparato de extracción Soxhlet, utilizando un matraz de fondo plano previamente pesado a peso constante. El hexano se extrajo a reflujo durante 1 h (en algunos casos se requirió de más tiempo), a una velocidad de condensación de 2 a 3 gotas por segundo; al término de la extracción se realizó la recuperación del solvente dentro del mismo equipo, al cual se le retiró el cartucho. El matraz se llevó a peso constante a una temperatura de 90 °C y se dejó enfriar en un desecador para después ser pesado.

NOTA: debe cuidarse que la muestra se encuentre seca para evitar la formación de un azeótropo éter-agua que disuelve compuestos polares principalmente carbohidratos solubles que alteran la determinación de extracto etéreo. El contenido total de grasas se determinó de acuerdo a la ecuación 3.

Ecuación 3:

$$\%EE = \frac{B - A}{M} \times 100 \quad \text{ó} \quad \%EE = \frac{CA - CB}{M} \times 100$$

Dónde:

%EE = Porcentaje de extracto etéreo

A = Matraz a peso constante (g)

B = Matraz con extracto etéreo (g)

CA = Cartucho con muestra antes de la extracción (g)

CB = Cartucho con muestra después de la extracción (g)

M = Peso de la muestra (g)

d) Fibra cruda (Método 962.09):

Se calculó después de su digestión ácida y alcalina. El peso de la muestra fue de 2 a 3 g de la muestra desengrasada y seca. Posteriormente se colocó en un matraz y se le adicionaron 200 mL de solución de ácido sulfúrico 0.255 N en ebullición. En el condensador se colocó y se llevó a ebullición en un tiempo de 1 min, de ser necesario se le adicionó antiespumante (alcohol octil o silicona). Posteriormente se dejó ebullición por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Se instaló el embudo Buchner con el papel filtro y se precalentó con agua en ebullición. Simultáneamente y al término del tiempo de ebullición, el matraz fue retirado para dejarlo reposar por 1 min y se filtró cuidadosamente usando succión; la filtración se realizó en menos de 10 min. Posteriormente se lavó el papel filtro con agua hirviendo. El residuo se transfirió al matraz con ayuda de una pizeta conteniendo 200 mL de solución de NaOH y se dejó en ebullición por 30 min manteniendo un volumen constante con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Se deberá precalentar el crisol de filtración con agua hirviendo y se filtrará cuidadosamente después de dejar reposar la muestra por 1 min. El residuo con agua hirviendo, se lavó con la solución de HCl y nuevamente

con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con agua en punto de ebullición. Posteriormente se colocará el crisol en el horno a 105 °C por 12 h y se dejará enfriar en el desecador. Al término del enfriamiento los crisoles con el residuo deberán ser pesados de manera rápida. La expresión de resultados se determinará bajo las condiciones de la ecuación 4.

Ecuación 4:

$$\text{Contenido de fibra cruda (\%)} = 100 \left(\frac{A - B}{C} \right)$$

Dónde:

A = Peso del crisol con el residuo seco (g)

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

e) Cenizas (Método 923.03):

Se calculará con el peso remanente después de calcinar la muestra en una mufla a 550 °C durante 4 h. En un crisol a peso constante se pesarán 2 g de muestra, las cuales serán calcinadas con la ayuda de una placa de calentamiento, hasta que ya no se desprendan humos, evitando que se proyecten fuera del crisol. El crisol será introducido en una mufla y se incinerarán a una temperatura de 550 °C durante 4 h, una vez transcurrido este tiempo se apagará la mufla y se dejará enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se sacarán los crisoles y se colocarán en un desecador. De manera cuidadosa se deberá pesar nuevamente el crisol. El total de cenizas será calculado con la siguiente ecuación:

Ecuación 5:

$$\%C = \frac{B - A}{M} * 100$$

Dónde:

%C = Porcentaje de cenizas

A = Peso del crisol vacío (g)

B = Peso del crisol con cenizas (g)

M = Peso de la muestra (g)

f) Carbohidratos Totales (ELN): Los carbohidratos totales serán estimados por diferencia al 100% como el extracto libre de nitrógeno (ELN).

6.2.3 Determinación de los parámetros de color.

El color de la harina y del aislado proteínico se determinó mediante un colorímetro UltraScan® Vis (HunterLab, Hunter Associates Laboratory Inc., 11491 Sunset Hills Road, Reston, Virginia U.S.A). 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. La diferencia total de color ΔE fue calculado por la siguiente ecuación:

Ecuación 6:

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

Donde ΔL es la diferencia entre el valor L^* del estándar y la muestra, Δa es la diferencia entre el valor de a^* del estándar y la muestra, Δb es la diferencia entre el valor b^* del estándar y la muestra (Wani *et al.*, 2013).

6.2.4 Hidrólisis enzimática de los concentrados proteínicos del *Sphenarium purpurascens* Ch.

Para la hidrólisis del concentrado proteínico se utilizó el método empleado por Vercruysse *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Para el cual se empleó un diseño de bloques aleatorios, donde los bloques fueron las enzimas comerciales Pepsina y Alcalasa®, con el tiempo de reacción como factor a evaluar a 90 min y como variable de respuesta el grado de hidrólisis. Cada enzima se evaluó individualmente. Por consiguiente, se hizo el proceso de digestión bajo las

siguientes condiciones: el pH de la pepsina se ajustó a 2 con HCl 4 M y se incubó por 90 min a una temperatura de 37 °C con una relación enzima/sustrato (1/250 p/v). Por otra parte, el pH de la Alcalasa® se ajustó a 8 con NaOH (4 M) y se incubó durante 90 min a una temperatura de 55 °C. La hidrólisis se realizó en un vaso de precipitado de 1000 mL, equipado con un agitador magnético, termómetro y un electrodo para medir el pH. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 85 °C por 15 min. Todas las muestras se centrifugaron en una centrifuga (Hettich Rotina 380R) a 10,000 x g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se filtró y se liofilizó en un liofilizador Labconco freeZone 4.5 para ser almacenado a -10 °C para su posterior utilización.

6.2.5 Determinación del grado de hidrólisis

El porcentaje del grado de hidrólisis (% GH) se determinó por el método de ácido tricloacético reportado por Torruco (2009) con algunas modificaciones.

Se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión del hidrolizado proteico según la fórmula.

Ecuación 7:

$$\%GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100$$

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomaron 10 mL del hidrolizado y se mezclaron con 10 mL de TCA al 10%. Esta mezcla se centrifugó a 5000 rpm a una temperatura de 10°C por 15 min y el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 2012). El nitrógeno total se midió tomando 10 mL de una suspensión de proteína preparada de forma similar a la utilizada para desarrollar la hidrólisis enzimática, pero sin la presencia de enzima y se le determinó el contenido por el método Kjeldahl (AOAC, 2012). En las determinaciones se utilizó un destilador automático Kjeldahl y el método 954.01 de la AOAC (2012).

6.2.6 Determinar el patrón electroforético de los hidrolizados con mayor actividad inhibidora de la ECA y agregación plaquetaria.

Para la electroforesis se ocuparon geles de dodecil sulfato de sodio y policrialamida (SDS-PAGE) los cuales se prepararon según el método de Laemmli, (1970) con algunas modificaciones. Las muestras de los hidrolizados proteínicos obtenidos en los diferentes tiempos de reacción se mezclaron en una relación 1:2 (v/v) con una dilución buffer: SDS al 20%, glicerol al 2.5%, β -mercaptoetanol al 1%, azul bromofenol al 0.02% y agua desionizada. El sistema de geles consistió en SDS al 0.21%, acrilamida al 20% a pH 8.8 para el gel separador y acrilamida al 5% (pH 6.8) para el gel concentrador. Las bandas de proteínas se tiñeron por inmersión de azul brillante de Coomassie (Bio-Rad, Cat: 161-0400) en una solución que contenía metanol al 40%, ácido acético al 7% y agua desionizada. Se utilizó un marcador de proteína de amplio rango de peso molecular como estándar (Bio-Rad, Cat: 161-0303). Las imágenes de los geles se obtuvieron mediante el uso de un Sistema de Análisis de Imágenes (Gel Doc 1000, Bio-Rad, Richmond, California, USA) y analizadas con el paquete computacional analista molecular (Bio-Rad).

6.2.7 Evaluación “*in vitro*” de las actividades biológicas de los hidrolizados proteínicos.

6.2.8 Inhibición “*in vitro*” de la agregación plaquetaria.

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 se obtuvo de voluntarios que no presentaran cuadros de enfermedad inflamatoria, tromboembolia o alguna hemorragia y que no hayan ingerido alcohol o algún medicamento (aspirina u otro agente anti-inflamatorio) por al menos 2 semanas antes de la toma de muestra, permitiéndose únicamente el uso de

paracetamol, además que debieran permanecer en ayuno durante 12 h previas a la toma de muestra sanguínea. A la sangre colectada se le hizo un conteo normal de plaquetas y tiempo de coagulación y estos deberían estar dentro de los límites normales (Brito *et al.*, 2010; Rull *et al.*, 2015).

La sangre colectada, se colocó inmediatamente después de la extracción 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 mantenerse a una temperatura ambiente para después ser usada en un lapso posterior a 3 h máximo. Posteriormente se centrifugaron a una temperatura de 10°C a 3500 rpm durante 5 min para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) como sobrenadante. La fase residual se centrifugó de nuevo a 37 °C por 15 min y a 3400 rpm para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El PRP (900 µL) se incubó a 37 °C durante 5 min, con 50 µL de la solución del hidrolizado en concentraciones 1.5, 2.5 y 5 mg/mL disuelto en NaCl al 0.9%. La agregación plaquetaria se indujo por adición de 50 µL de ADP (100 µM) disuelto en NaCl al 0.9% durante 5 min, a 37 °C y agitación a 1000 rpm. Una vez pasado los 5 min, la agregación plaquetaria se midió como la disminución en la transmitancia a 660 nm a través del PRP, mediante un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis. Llevando un control en la solución de NaCl al 0.9% sin la muestra de prueba. El 100% de transmitancia se ajustó con el PPP. La agregación plaquetaria se expresó como el cambio porcentual en la transmitancia del PRP con respecto al PPP. La inhibición de la agregación plaquetaria se calculó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 8:

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

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 se graficó contra la concentración de la muestra usada para posteriormente ocupar la ecuación de la recta y calcular el IC_{50} con la siguiente ecuación:

Ecuación 9:

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

Donde b es la intersección y m es la pendiente.

6.2.9 Actividad inhibitoria *in vitro* de la ECA.

La actividad inhibitoria de la ECA "*in vitro*" se determinó en los hidrolizados obtenidos por las enzimas Pepsina y Alcalasa® en los diferentes tiempos de reacción. El método empleado fue el reportado por Hayakari *et al.* (1978) con algunas modificaciones. Los hidrolizados proteínicos que contienen los inhibidores de la ECA con el HHL (hipuril-L histidil-L-leucina) producen ácido hupúrico e his-leu. Este método se basa en la reacción calorimétrica del ácido hipúrico con 2, 4, 6 triclora-s-trasina (TT). Cada mezcla de 0.5 mL se evaluó con 40 μ mol de buffer de fosfato de potasio a un pH de 8.3, 300 μ mol de cloruro de sodio (pH 8.3), HHL al 3% en buffer de fosforo de potasio (pH 8.3) y 100 mU/mL de la ECA. La mezcla se incubó a 37 °C por 45 min y la reacción se detuvo por la adición de 1.5 mL de TT (3% p/v) en dioxano y 3 mL de buffer de fosfato de potasio (0.2 M) a pH 8.3. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min a 25 °C. El sobrenadante se midió por absorbancia a una longitud de onda (λ) de 382 nm. La actividad inhibitoria de la ECA se determinó por el análisis de regresión del porcentaje (%) de inhibición de la ECA contra la concentración de péptidos presentes en los hidrolizados, definiéndola como el valor de IC_{50} el cual es la concentración de péptidos en 1 mg de proteína/mL requerido para producir el 50% de la inhibición de la ECA en condiciones descritas anteriormente.

6.2.10 Análisis Estadístico

Todos los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar), los datos obtenidos en hidrólisis enzimática, actividad antihipertensiva y antitrombótica, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía y en todos los casos se realizó una comparación de medias por el método de mínima diferencia significativa (LSD, por su acrónimo en inglés *Least Significant Difference*) para establecer las diferencias entre los tratamientos. Todos estos resultados se analizaron mediante el paquete computacional Minitab® 17 (Montgomery, 2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis químico proximal de la harina de chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.)

El análisis químico proximal de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) se puede observar en la Tabla 4. El contenido de proteína de la harina de chapulín fue de 77.92%, resultado que puede ser comparado con lo obtenido por Melo *et al.* (2011) quienes reportaron un contenido de proteína de 71.5% en *Sphenarium purpurascens* Ch. recolectados en diferentes zonas del país, a partir del mes de mayo a enero. Por otro lado, Ramos *et al.* (2012) analizaron insectos encontrados en los municipios de San Juan Teotihuacan y Otumba Estado de México con valores que van desde 43.1 a 77.1% de proteína cruda en chapulines y mencionan que este contenido depende de la zona geográfica y al tipo de alimentación de estos insectos. Otros autores como, Paul *et al.* (2016) encontraron contenidos de proteínas en el chapulín (*S. purpurascens* Ch.) entre un 52.5 a un 77%. Rumpold y Schlüter (2013) justifican que estos contenidos de proteínas es debido a la alimentación que llevan los chapulines, tal y como mencionan Castellanos y Vargas (2001), en un estudio realizado en la Reserva del Pedregal de San Angel, al sur del Valle de la Cd. De México, sobre la evolución conductual y evolutiva de estos insectos ya que, presentan una conducta de forrajeo altamente selectiva sobre la vegetación, permitiéndose así alimentarse con una selección de al menos 43 distintas especies de plantas, motivo por el cual su contenido proteico puede presentar una alta variabilidad.

En lo que respecta, al contenido de grasa cruda de la harina de chapulín encontrado en este estudio fue de 11.68%, siendo similar los resultados reportados por Ramos-Elorduy *et al.* (1997) en el *Sphenarium purpurascens* Ch. con un 11%, mientras que Rumpold y Schlüter (2013), indicaron cifras que van desde el 7 al 11% para la misma especie de chapulín, además existen datos que demuestran que los insectos presentan una amplia composición de ácidos grasos, ya que Van (2013) identificó que el chapulín puede contener ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénicos.

Tabla 4. Composición químico proximal de la harina de chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.)

Componentes (g/100 g)	Valores
Humedad	5.32 ± 0.07
Ceniza	1.64 ± 0.04
Grasa	11.68 ± 0.04
Fibra	6.40 ± 0.02
Proteína ¹	77.92 ± 0.04
ELN	2.36 ± 0.03

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar y expresados en base seca con excepción de la humedad. ¹El factor de conversión utilizado fue de 6.25. ELN = extracto libre de nitrógeno.

Cabe mencionar que el contenido de grasa cruda de los insectos es relativamente alta, si se compara con la carne fresca (a excepción de la carne de cerdo), pero si se hace una comparación del chapulín con otros insectos, este es baja, como lo indica Ramos *et al.* (2012), con el gusano rojo de maguey y el escamol, que presentan valores de 24.57 y 20.59% respectivamente, mientras que Pino y Ramos (2006) reportaron cifras bastante altas para el gusano de maguey (*C. redtenbacheri*), con un 60.01%, los cuales fueron recolectados en Otumba, Estado de México y 58.95% para los obtenidos en el Estado de Hidalgo; sin embargo, es importante destacar que los insectos que se encuentran en estado larval o en huevecillos son los que presentan mayor cantidad de este componente, que a su vez, presentan una desventaja debido a su alto contenido en ácidos grasos. Cabe mencionar que los insectos deben de ser congelarse para su almacenamiento, evitando la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturado (Melo *et al.*, 2011).

El contenido de fibra cruda de la harina de chapulín encontrado en esta investigación fue de 6.40%, siendo este resultado similar al encontrado por Cuj (2016), en el *Sphenarium purpurascens* Ch. quién informó un contenido de 6.22%. Sin embargo, Pacheco (2010), menciona en su estudio que el bajo contenido de fibra cruda en estos insectos, favorece la digestibilidad de la proteína encontrada

en el chapulín, y que esta no influye sobre los parámetros de proteína. Ndiritu *et al.* (2017) reportó un 7.8% en el concentrado de grillo (*Acheta domesticus*), el cual concluye que el tipo de fibra que presentan estos insectos es principalmente quitina. El contenido de humedad, fue de 5.32%, el cual se cree que se deba a las condiciones del método y equipo de secado utilizado, sin embargo, se puede decir, que el valor fue menor a lo permitido para harinas, de acuerdo a la NOM-247-SSA1-2008, en donde refiere que los valores máximos para harinas son de un 15%, obteniéndose así, un producto con niveles adecuados de humedad para su posible utilización en la industria alimentaria.

Por otra parte, el contenido del Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) de la harina del *S. purpurascens* Ch. en este estudio fue de 2.36%; ciertamente este componente representan una parte minoritaria del total de este insecto, por lo cual no es elemento importante para este tipo de alimento; sin embargo esta cifra es justificada por el tipo de alimentos consumidos por el chapulín ya que Vásquez *et al.* (2016), indicaron que estos insectos además de alimentarse de forraje exclusivo de diversas plantas, también lo pueden hacer de diferentes granos, aunque en menor cantidad; tales como: trigo, maíz, amaranto, hasta de frutas. En lo que al contenido de cenizas respecta, según, Rumpold y Schlüter (2013), los porcentajes van de 0.34% a 6.28% para la especie a la que pertenece este insecto, pero en esta investigación se obtuvo 1.64%, a lo que se le atribuye nuevamente el tipo de alimentación que ha llevado el chapulín. Además, es importante decir, que este porcentaje a pesar de ser bajo si cubre con la ingesta recomendada para minerales en humanos, complementando así una la alimentación equilibrada.

El análisis químico proximal mencionado anteriormente reportado, justifica sus resultados en la variabilidad de la alimentación de este insecto, orígenes, factor en la que puede intervenir el tipo de clima, la temperatura vegetación, suelo, luz, sexo, estado de evolución del *Sphenarium purpurascens* Ch. y temporada en la que fueron capturados; así como en los métodos de medición utilizados para los diferentes análisis químicos. Los insectos son una comida tradicional optada ya

por todo el mundo, y nutricionalmente hablando son buena fuente de proteínas y lípidos, así como de energía, por lo que representa ser un alimento potencial, siendo así que Ramos (1987), analizó la digestibilidad proteica de algunos insectos comestibles en México, encontrando porcentajes elevados para el chapulín. Ello está en relación con la baja cantidad de fibra cruda y la elevada cantidad de proteínas que estos insectos albergan, las cuales a su vez alojan una proporción adecuada de sus aminoácidos tal y como indica Melo (2012) y Ramos-Elorduy *et al.* (1997).

7.2 Análisis de color de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.)

Los parámetros de color de la harina de chapulín se presentan en la Tabla 5. Los resultados del parámetro de luminosidad L^* (que va de oscuro a claro) fue de 48.21, dato similar a lo reportado por Kim *et al.* (2016) en la harina de la larva de harina (*Tenebrio molitor*) con una luminosidad de 45.66 y menos oscura que en la harina de gusano de seda (*Bombyx mori*) con 42.95. Cuj (2017) reportó una harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) ligeramente más oscura que la reportada en este trabajo con un valor de 50.02. El valor de a^* (tonalidad de rojo [+ a^*] a verde [- a^*]) fue de 7.49, una tonalidad no tan roja como los datos de Cuj (2017) con 9.42 pero similar a lo reportada nuevamente por Kim *et al.* (2016) con 7.06 para la harina de la larva de harina y para la harina de gusano de seda obtuvo 6.62. En lo que al parámetro b^* respecta (tonalidad amarilla [+ b^*] a azul [- b^*]) la harina tuvo tendencia hacia el amarillo con 10.49 contra 11.23 de Cuj (2017).

Tabla 5. Color de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.)

Muestra	Parámetros					
	L^*	a^*	b^*	C^*	$^{\circ}h$	ΔE^*
Harina chapulín	48.21 ± 0.51	7.49 ± 0.19	10.49 ± 0.37	12.89 ± 0.40	54.46 ± 0.53	53.34 ± 0.42

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. ΔE = Diferencia total de color.

En el parámetro C^* (saturación), en donde los colores tienden a ser en el centro apagados o sucios (grises), y según se orientan a la periferia, van cambiando a ser más vivos o limpios, la harina de chapulín evaluado fue no tan saturado con un valor de 12.89 vs 14.65 cifra comparada con los datos de Cuj (2017). Por otro lado, la harina mostró valores de $^{\circ}h = 54.46$ siendo este un rojo intenso, mostrando muy poca diferencia con otros resultados que muestran valores de 50.00 en el *Sphenarium purpurascens* Ch., reportado en la investigación de Cuj (2017) y por último se observa un $\Delta E^* = 53.34$ contra 51.54 encontrado por Cuj (2017). Estas diferencias pueden deberse al método empleado para la obtención de la harina de chapulín, en especial el método de secado, ya que las temperaturas y el tiempo de secado pueden provocar una disminución en la pigmentación de la harina de chapulín y por lo tanto variar los valores (Cuj, 2017). Según Wittkopp y Beldade (2009), las melaninas son el principal pigmento encontrados en los insectos, al cual se le atribuye su coloración negra, marrón y amarillo; pigmento derivado del aminoácido tirosina (Tyr) el cual predomina mayormente en la composición del *S. purpurascens* Ch., Rumpold y Schlüter (2013), sin embargo, mencionan que esta melanina puede ser modificada según el tipo de tratamiento al cual fue sometida la harina del chapulín previo al análisis de color.

Otro motivo al cual se deba un cambio de color en la harina de chapulín es que exista algún tipo de carotenoide, que provoque un cambio en el color rojizo de este insecto, a causa del tipo de alimentación que haya llevado (forraje, plantas verdes o algunos granos) Fenemma (2010). Es sabido que los carotenoides pueden disminuir su presencia y por lo tanto su intensidad, debido a los procesos de oxidación provocada por tratamientos térmicos. Es por ello que se cree que al ser sometida la harina de chapulín a secado, su color cambió. El chapulín es rico en ácidos grasos poliinsaturados y esta enzima puede producir peróxidos que a su vez reaccionan fácilmente con los carotenoides y por lo tanto existe una pérdida de color en este.

7.3 Hidrólisis enzimática de la harina de Chapulín (*S. purpurascens* Ch.) rica en proteínas

Las cinéticas de hidrólisis de la harina de chapulín rica en proteínas hidrolizadas con las enzimas Alcalasa® y Pepsina se muestran en la Figura 4 y 5, respectivamente. Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa® tuvieron mayor grado de hidrólisis (GH) ya que a los 90 min de reacción se alcanzó un GH = 26.5%, y el menor GH fue de 1.85% a los 5 min de reacción.

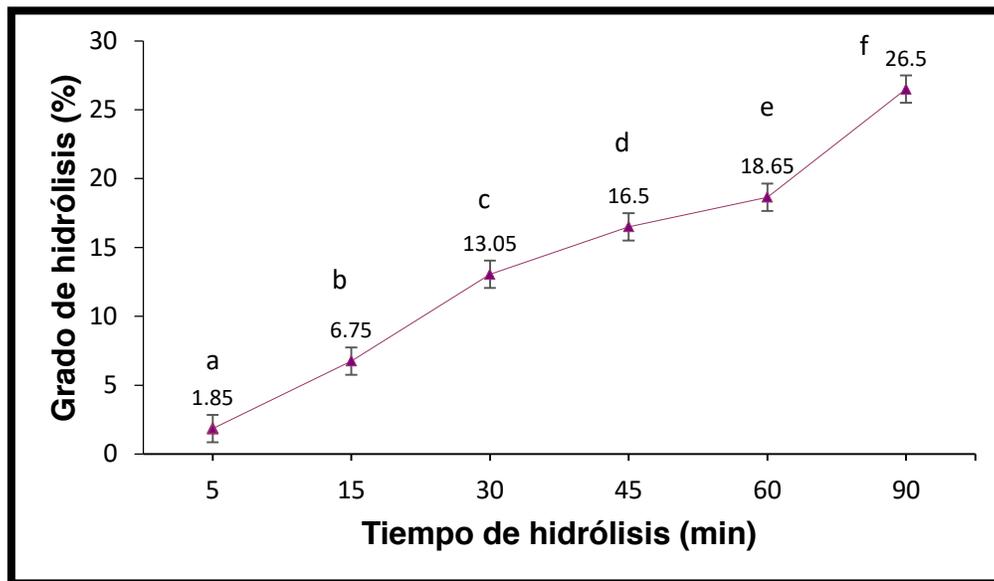


Figura 4. Hidrólisis enzimática de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) rica en proteínas con la enzima Alcalasa®. Valores promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, los hidrolizados obtenidos con la enzima Pepsina® (Figura 5) tuvieron GH menores que los obtenidos con la enzima Alcalasa®, ya que el intervalo encontrado fue de 0.8 a 21.2% conforme el tiempo de reacción fue incrementando de 5 a 90 min., cabe mencionar que el GH fue acrecentando según el tiempo de reacción de manera consecutiva para ambas enzimas.

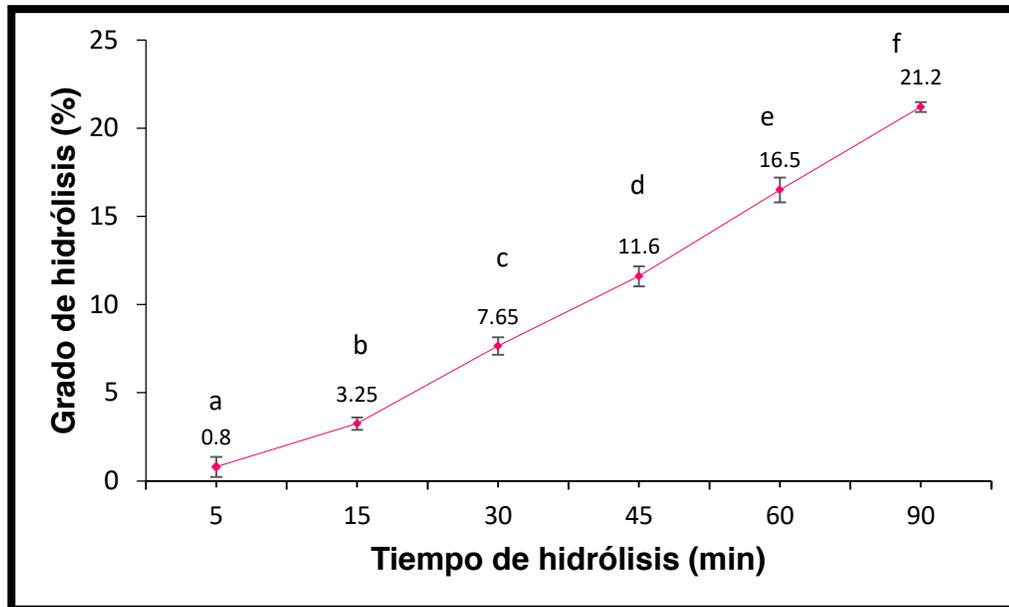


Figura 5. Hidrólisis enzimática de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) rica en proteínas con la enzima Pepsina®. Valores promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los hidrolizados obtenidos con la enzima Alcalasa® pueden ser comparados con lo reportado por Hall *et al.* (2017), quienes encontraron un GH de 26.1% a los 30 min de reacción en el hidrolizado de grillo rayado (*Grylloides sigillatus*) utilizando la misma relación de E/S que el usado en este estudio. Por otro lado, Chen *et al.* (2008) reportaron que al hidrolizar huesos de piernas de pollo durante 120 min con Alcalasa® los GH obtenidos fueron de 59.35% mientras que con Pepsina fue de 28.7%, considerando éste último fue similar al encontrado en esta investigación con los hidrolizados con pepsina, ya que se tuvo un GH de 21.2% a menor tiempo de reacción (90 min). Sin embargo, Chen *et al.* (2008) mencionan que los valores altos de GH pueden estar influenciados por la composición aminoacídica de la materia prima hidrolizada. Por ejemplo, Dai *et al.* (2010) hidrolizaron la proteína de mejillón con la enzima Alcalasa® durante 4 h y obtuvieron un GH de 85.77%. Los resultados obtenidos en este estudio fueron menores a los encontrados por Chalamaiah *et al.* (2014) en huevos de pescado donde reportan un GH de 43% para Alcalasa® a 180 min de reacción y un 31% GH con Pepsina, después de 180 min. Por otro lado, Chalamaiah *et al.* (2015), realizaron un estudio con los huevos

de carpa (*Cyprinus carpio*), encontrando una mejor respuesta por parte de la enzima Pepsina que la Alcalasa® ya que, a los 15 min reportaron GH de 7% siendo éste valor comparable con el 6.75% obtenido en este estudio con la enzima Alcalasa. Estos mismos autores reportaron GH de 16.8 y 23.1% con la enzima Pepsina a 60 y 90 min de reacción, los cuales fueron similares a los encontrados en la harina del *S. purpurascens* Ch. con un 16.5 y 21.2% a los mismos tiempos de reacción y con la misma enzima. Esta similitud podría deberse a que los huevos de carpa presentan una composición aminoacídica parecida a la del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.).

Otros autores como Bernardi *et al.* (2016) reportaron GH similares al de este trabajo, utilizando la enzima Alcalasa® y como materiales cabezas y escamas de Tilapia del Nilo encontrando valores de 19.5% a los 40 min y 26.13% a los 200 min, comparado con la harina del chapulín con un GH de 18.65% a los 60 min y 26.5% a menor tiempo de reacción (90 min); cabe mencionar que esta variación pudo deberse al procesamiento utilizado para la recuperación y concentración de proteínas de Tilapia, con el de harina de Chapulín, además de una posible diferencia en la secuencia de aminoácidos presente en ambas materias primas.

Cabe mencionar que la Alcalasa® es una enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* y el principal componente es Subtilisima A (*Subtilisima Carlsberg*) (Figueroa *et al.*, 2016). Además de ser una endopeptidasa que rompe enlaces dentro de la cadena polipeptídica, produciendo principalmente péptidos pequeños y medianos (Liu *et al.*, 2010), presenta amplia especificidad para hidrolizar enlaces peptídicos a partir del extremo C-terminal, liberando péptidos que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos como: Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), Leu (L), Ile (I), Val (V) y Met (M) (Markland y Smith, 1971), aminoácidos que se encuentran principalmente en el *S. purpurascens* Ch., además que presenta una alta efectividad para hidrolizar material con quitina (Hall *et al.*, 2017), un componente principal hallado en chapulín evaluado en esta investigación; aunado a esto el uso de la Alcalasa® es apropiado para la producción de péptidos que inhiben la actividad de la ECA-I,

tal como lo menciona Torruco (2009), y esa misma actividad se espera encontrar en los hidrolizados proteicos obtenidos en este estudio.

Por otro lado, 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 Phe (F), Tyr (Y), Trp (W) y Leu (L), y en menor grado Glu (E), 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 (Cadeza, 2016).

Si bien la hidrólisis controlada usando una enzima comercial es fundamental para la funcionalidad y obtención de un péptido, las características importantes, como GH, pueden verse afectadas por la elección de la enzima y la concentración de la misma, la temperatura, el pH y el tiempo de hidrólisis (Chalamaiah *et al.*, 2014). Además, que no hay que descartar que el comportamiento de las hidrólisis dadas en esta investigación, son consistentes con los principios básicos de la cinética enzimática. La rápida hidrólisis en la fase inicial indicó que existió una gran cantidad de enlaces peptídicos, después de la fase inicial rápida, las curvas llegaron a un estado estacionario, fase debida a la falta de moléculas de sustrato para que las enzimas reaccionen (Hall *et al.*, 2017). La forma de la curva de las cinéticas de hidrólisis en este trabajo fue de forma ascendente, una más que la otra, que puede ser atribuible a la diferencia en la preferencia de sitios de escisión por las enzimas utilizadas (Chalamaiah *et al.*, 2015). Si bien, el mayor GH de los hidrolizados fue con Alcalasa®, no hay que descartar el buen funcionamiento por parte de la Pepsina ya que esto es atribuible a las divisiones aleatorias de aminoácidos hidrofóbicos presente en el *S. purpurascens* Ch.

7.4 Electroforesis (SDS-PAGE)

El patrón electroforético SDS-PAGE de los hidrolizados de harina de chapulín se muestran en la Figura 14 y 15 respectivamente. En el carril 1 se encuentra el

marcador estándar de proteínas utilizado, en el cual se notan bandas de proteínas que van desde los 10 a 250 kDa para ambos geles de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa® y con Pepsina a diferentes tiempos de reacción.

Para el hidrolizado con la enzima Alcalasa® se expresan bandas con mayor peso molecular en un intervalo de entre 100 a 150 kDa para todos los tiempos; sin embargo, las bandas proteicas de los hidrolizados a 5 y 15 min fueron muy similares con un peso aproximado de 125 kDa, mientras que las bandas proteicas entre 150 y 250 kDa fueron menos tenues. También se pueden apreciar bandas más decoloradas entre los 10 y 20 kDa tal y como lo menciona Gu *et al.* (2011) cuanto menor sea el peso molecular mayor será la posibilidad de atravesar la barrera intestinal y por lo tanto ejercer su función, mientras que los hidrolizados obtenidos a 30, 60 y 90 min se obtuvieron bandas bien coloridas con peso molecular de 120 kDa. También se presenta una decoloración de bandas proteicas entre los 80 a 35 kDa, por lo que se puede decir que los hidrolizados obtenidos con esta enzima generó una hidrólisis extensiva >10% lo que sugiere la formación de péptidos de bajo peso molecular. Este resultado es similar al encontrado por Choi *et al.* (2016) donde pesos moleculares encontrados en la proteína del mosquito trompetero o común, hidrolizando con Alcalasa® fueron de 35 a 54 kDa y Chen *et al.* (2008) muestran de 66 a 6.5 kDa de peso molecular en los hidrolizados de proteína del hueso de pierna de pollo, igualmente con el uso de la enzima Alcalasa®.

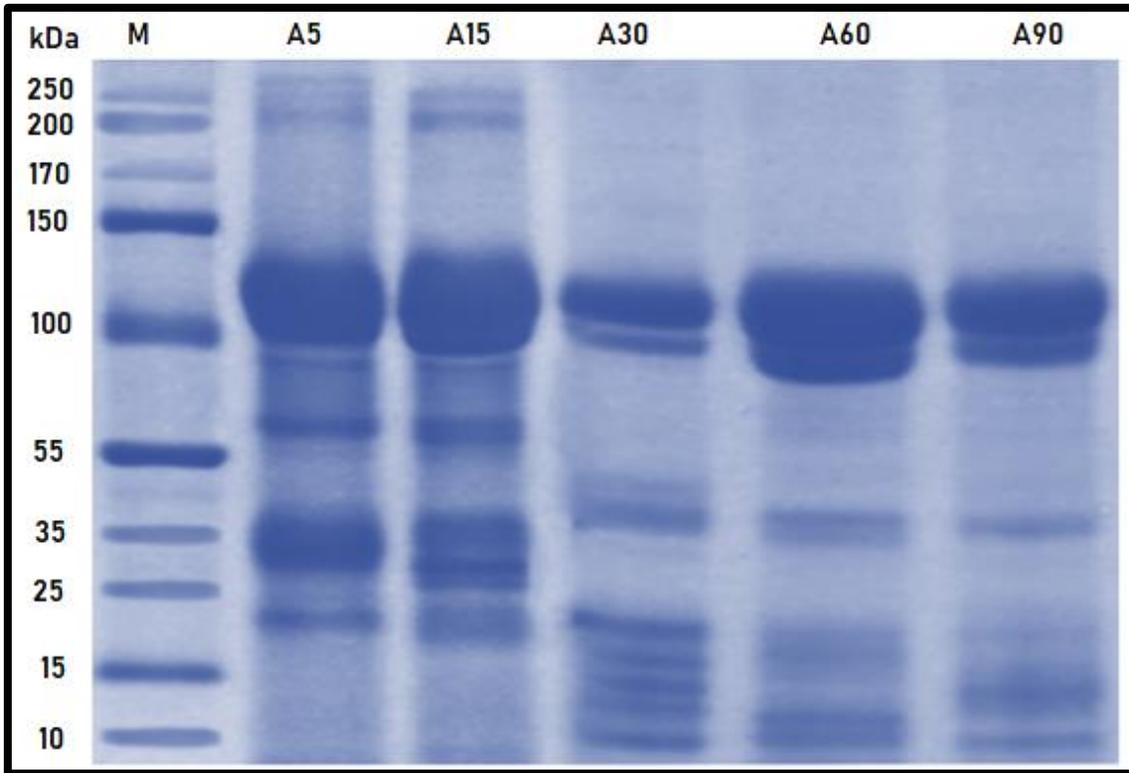


Figura 6. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de hidrolizados de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenidos a diferentes tiempos de reacción con la enzima Alcalasa®.

Dónde: kDa = KiloDaltones. M: Marcador estándar de proteínas.

El patrón electroforético SDS-PAGE del hidrolizado con Pepsina® muestra bandas de mayor peso molecular entre 100 y 140 kDa para los hidrolizados a 5 y 15 min. En los tiempos de 30 y 90 min son bandas muy similares, con bandas visibles que van de los 110 a 130 kDa, pero más tenues de 140 a 250 kDa. También existe semejanza entre las bandas de los hidrolizados de 45 y 60 min, con bandas más coloridas entre los 50 a 85 kDa, 25 a 35 kDa y entre 22 a 24 kDa, resultado similar al de Chen *et al.* (2008) en sus hidrolizados de hueso de pierna de pollo con Pepsina® ya que sus bandas van de 66 a 6.5 kDa. Por otro lado, las bandas de menor color se dan de los 17 a <10 kDa para todos los tiempos de hidrólisis. Siendo así que la Pepsina muestra bandas más visibles que el de la enzima Alcalasa®; esto significa que los hidrolizados con Pepsina® presentan mayor peso molecular.

La actividad Inhibidora de la ECA presentó mejor respuesta al hidrolizar con la enzima Alcalasa® mostrando un $IC_{50} = 0.01$ mg/mL y mejor Inhibición de la agregación plaquetaria con un $IC_{50} = 6.61$ mg/mL y esto es debido a que el hidrolizado presentó menos bandas con menor peso molecular que el del hidrolizado con Pepsina® y eso permite su mayor absorción en la pared intestinal, tal y como se había mencionado anteriormente (Gu *et al.* 2011). Sin embargo, ambos presentan el mismo intervalo de peso molecular y es por ello que el uso de ambas enzimas es recomendable para encontrar Inhibición de la agregación plaquetaria y de la ECA en los hidrolizados proteicos de harina de chapulín.

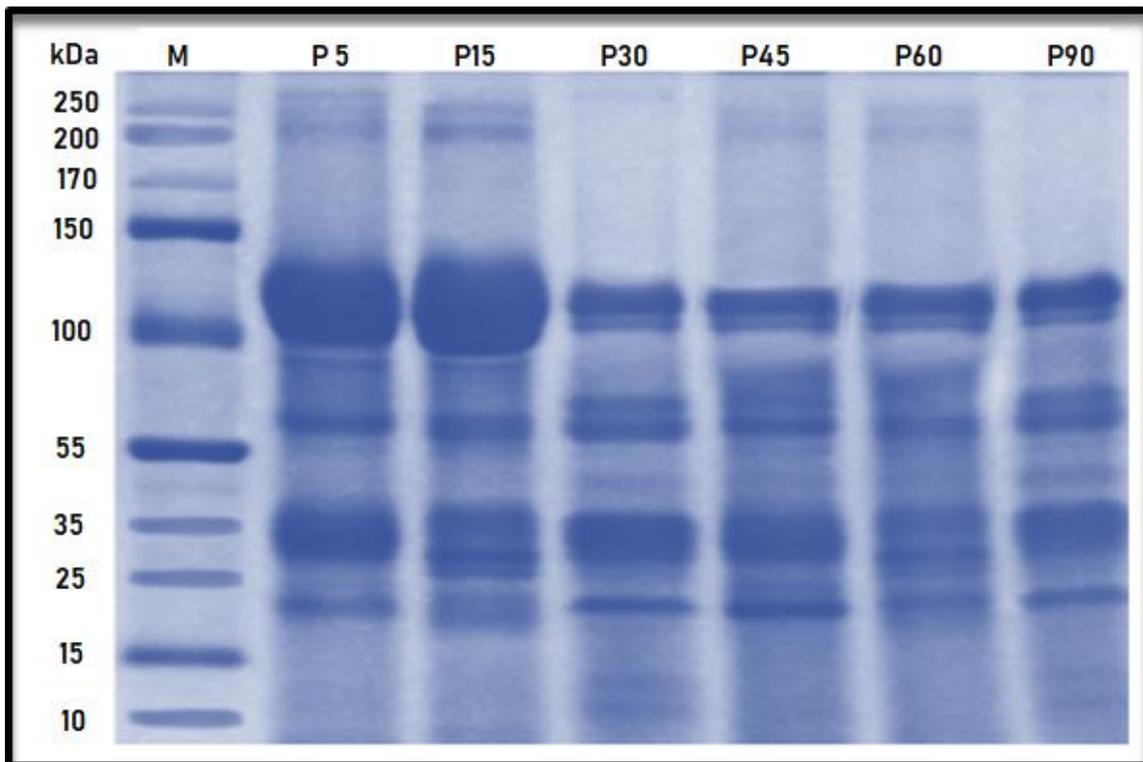


Figura 7. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de hidrolizados de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenidos a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina®.

Dónde: kDa = KiloDaltones. M. Marcador estándar de proteína

7.5 Actividad antitrombótica

En los siguientes apartados se analizó la actividad antitrombótica de los hidrolizados proteicos de la harina de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) por medio de la determinación del porcentaje (%) de inhibición de la agregación plaquetaria, la cual 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} (Concentración de inhibición media) los cuales fueron calculados para cada tiempo de hidrólisis y obteniendo así los mejores tratamientos.

7.5.1 Inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados proteicos obtenidos del chapulín (*S. purpurascens* Ch.)

Se obtuvieron diferentes porcentajes de Inhibición de la agregación plaquetaria a diferentes concentraciones 1.5, 2.5 y 5 mg/mL de los hidrolizados obtenidos con la enzima Alcalasa®. Los valores encontrados, no siguieron un patrón de actividad entre ellos, ya que los hidrolizados obtenidos a 45, 60 y 90 min tuvieron una disminución del % de Inhibición (Figura 8), mientras que el hidrolizado obtenido a los 5 min de reacción a una concentración de 2.5 mg/mL fue el que tuvo un mayor porcentaje inhibición plaquetaria con 23.59%. Seguido por el mismo hidrolizado de 5 min, pero a una concentración de 1.5 mg/mL con un valor de 20.74%. Cabe mencionar que la concentración de 5 mg/mL utilizada en todos los hidrolizados fue la que presentó el menor porcentaje de Inhibición ya que mostró un intervalo de inhibición de 4.02 a 16.87%.

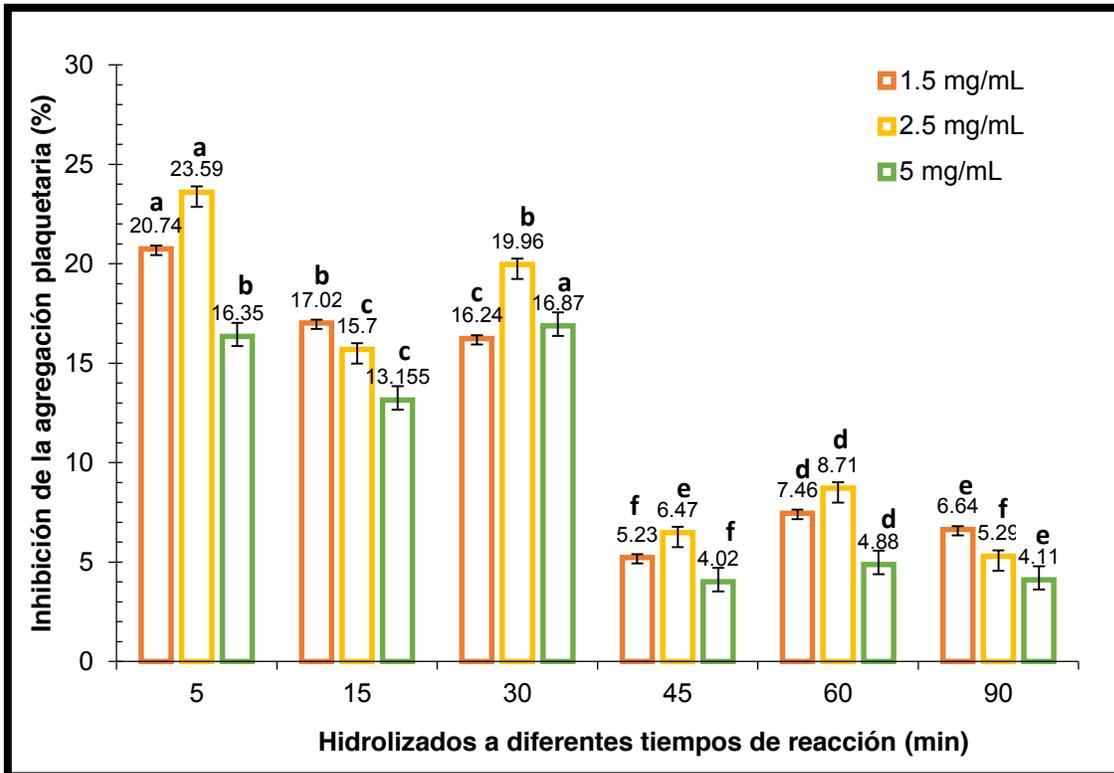


Figura 8. Inhibición de la agregación plaquetaria “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) con Alcalasa® obtenidos a diferentes tiempos (min) de reacción a concentraciones de 1.5, 2.5 y 5 mg/mL. Los valores son promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los mejores resultados de este análisis se pueden comparar con los mostrados por Ren *et al.* (2014) que al hidrolizar la proteína de escorpión obtuvieron un 23.65% de Inhibición plaquetaria a una concentración de 2.5 mg/mL. Por otro lado, Nasri *et al.* (2012), obtuvieron un resultado similar de 24.90% al hidrolizar el músculo de pez Gobi, pero a una concentración de 5 mg/mL. Ambos autores mencionan que los resultados mostrados se deben a una relación entre la selectividad de la enzima y el GH con la actividad antitrombótica. Primeramente, en que cada enzima presenta especificidad, como se viene mencionando con anterioridad y esta a su vez puede actuar en diferentes sitios de la proteína, dando con ellos péptidos que favorezcan la actividad buscada. Por otro lado, el GH puede conducir a un aumento o disminución del contenido de los péptidos bioactivos en el hidrolizado, lo cual puede

beneficiar a la actividad que se está evaluando. En este caso la concentración del hidrolizado con la enzima Alcalasa®, sí responde a un buen resultado en el porcentaje de la Inhibición plaquetaria, sin embargo, al ir aumentando la concentración y el tiempo de la hidrólisis, es probable que existiera una disminución en la velocidad de reacción, debido a la inhibición de la enzima formada por los productos del hidrolizado de chapulín con un alto grado de hidrólisis y estos productos a su vez actúan como efectivos sustratos competidores de las proteínas del hidrolizado no digerido o parcialmente digerido. Además, que estos autores, sugieren el uso de varias enzimas para evaluar la Inhibición plaquetaria y poder así encontrar, la que presente mejor efectividad para la actividad antitrombótica (Nasri *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2014).

En cuanto a los resultados obtenidos con los hidrolizados proteicos con Pepsina® a tres diferentes concentraciones (1.5, 2.5 y 5 mg/mL) y diferentes tiempos de hidrólisis (5, 15, 30, 45, 60 y 90 min) fueron mayores comparados con los obtenidos con la enzima Alcalasa®, tal y como se muestra en la Figura 9. En ambos hidrolizados evaluados coincidieron en que el mejor porcentaje de la actividad se dio a una concentración de 2.5 mg/mL, con un 26.35% en el hidrolizado a 15 min, resultado que se asemeja con el estudio realizado por Gen *et al.* (2007) en proteínas de huevo blanco, con un 23% de Inhibición usando una concentración de 85 mg/mL. Por otro lado, el valor más bajo fue en el hidrolizado a los 90 min con un % de Inhibición de 3.10% a una concentración de 1.5 mg/mL, sin embargo, al aumentar la concentración a 2.5 y 5 mg/mL, la actividad llegó a subir de un 6.07 a 23.94% de Inhibición, resultado similar reportado por Choi *et al.* (2016) quienes al evaluar la proteína del mosquito trompetero o común mostraron un 6.4% de inhibición de la agregación plaquetaria a una concentración de 3.3 mg/mL.

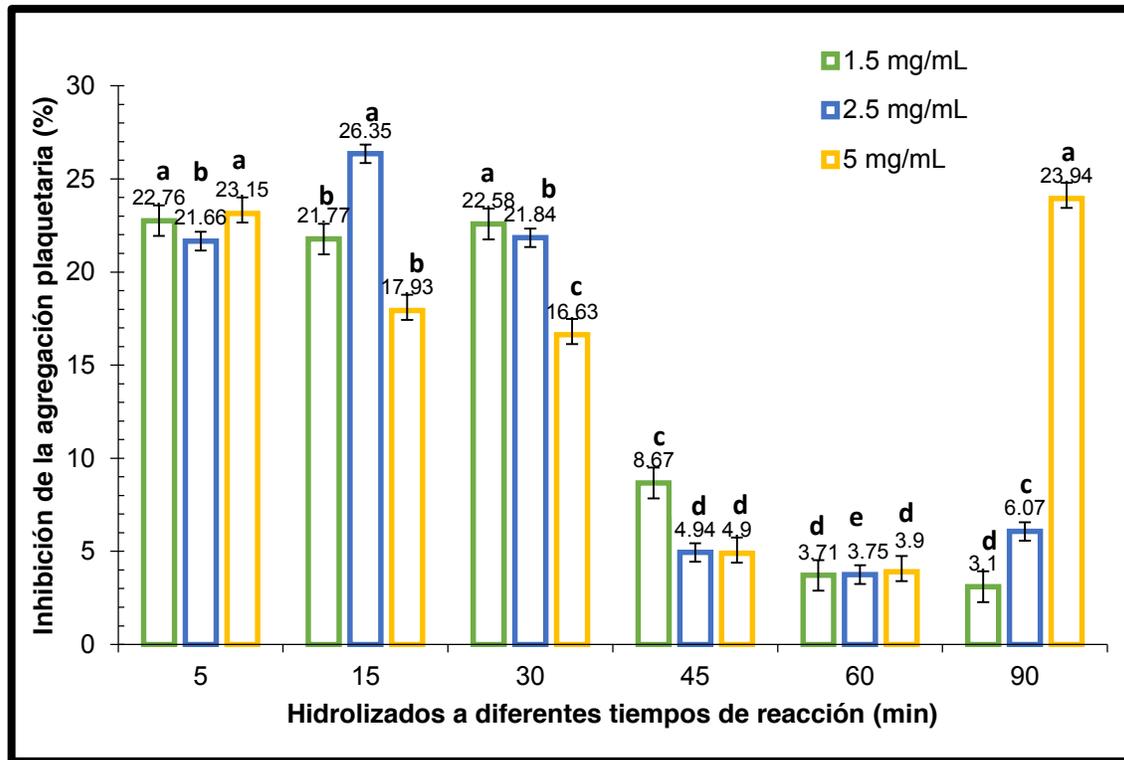


Figura 9. Inhibición de la agregación plaquetaria “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) con Pepsina® obtenidos a diferentes tiempos (min) de reacción a concentraciones de 1.5, 2.5 y 5 mg/mL. Valores promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los resultados mencionados anteriormente pueden deberse a la efectividad de la enzima Pepsina® para hidrolizar la harina de chapulín, ya que ésta presenta actividad como endopeptidasa y probablemente está formando cadenas peptídicas de diferentes tamaños, con actividad antitrombótica, la cual pudieron haberse generado en la hidrólisis enzimática de estas proteínas y probablemente los péptidos generados contengan residuos de aminoácidos de RGD (Arg-Gly-Asp) en su secuencia, ya que estos aminoácidos han demostrado que la Arg participa en la unión entre el fibrinógeno y la glicoproteína GPIIb/IIIa ubicada en la membrana de las plaquetas (Cadeza, 2016). Siendo curiosamente que los péptidos con el aminoácido Arginina (Arg) en la posición C-terminal, son considerados potenciales inhibidores de la agregación plaquetaria y otros factores involucrados en el proceso de coagulación (Choi *et al.*, 2016).

7.5.2 Actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria *in vitro*

La mejor actividad antitrombótica en ambos sistemas enzimáticos Alcalasa® y Pepsina® fue determinada con el valor de IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de la agregación plaquetaria) de cada una de las muestras a diferentes tiempos de hidrólisis. En la Figura 10 se muestran los valores de IC_{50} para la actividad antitrombótica de los hidrolizados con la enzima Alcalasa®. Donde el hidrolizado a 5 min tuvo la mayor actividad con un valor de $IC_{50}= 6.61$ mg/mL, mientras que el hidrolizado a 90 min fue el que tuvo menor actividad antitrombótica al obtener un $IC_{50} = 62.5$ mg/mL, sin embargo, este resultado se puede comparar con el reportado por Ren *et al.* (2014), con un $IC_{50}= 68.7$ mg/mL en hidrolizados de escorpión empleando la enzima Alcalasa durante 130 min.

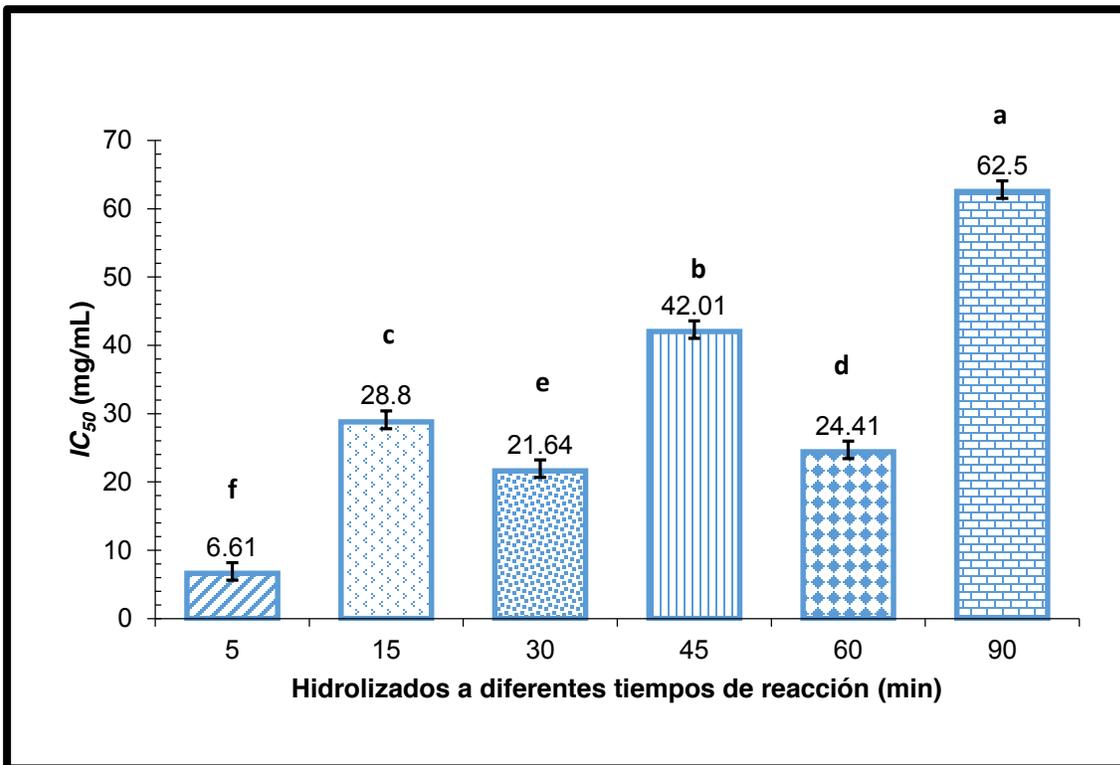


Figura 10. Actividad antitrombótica “*in vitro*” de los hidrolizado proteínico de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenido con Alcalasa® diferentes tiempos (min) de reacción. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Mientras que los resultados obtenidos en los hidrolizados con la enzima Pepsina®, (Figura 11). Los mejores hidrolizados que no mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) fueron los obtenidos a 15 y 90 min, ya que presentaron un $IC_{50} = 7.66$ y 9.3 mg/mL respectivamente. Sin embargo, el hidrolizado a 60 min fue el que tuvo menor actividad antitrombótica con un valor de $IC_{50} = 773.33$ mg/mL.

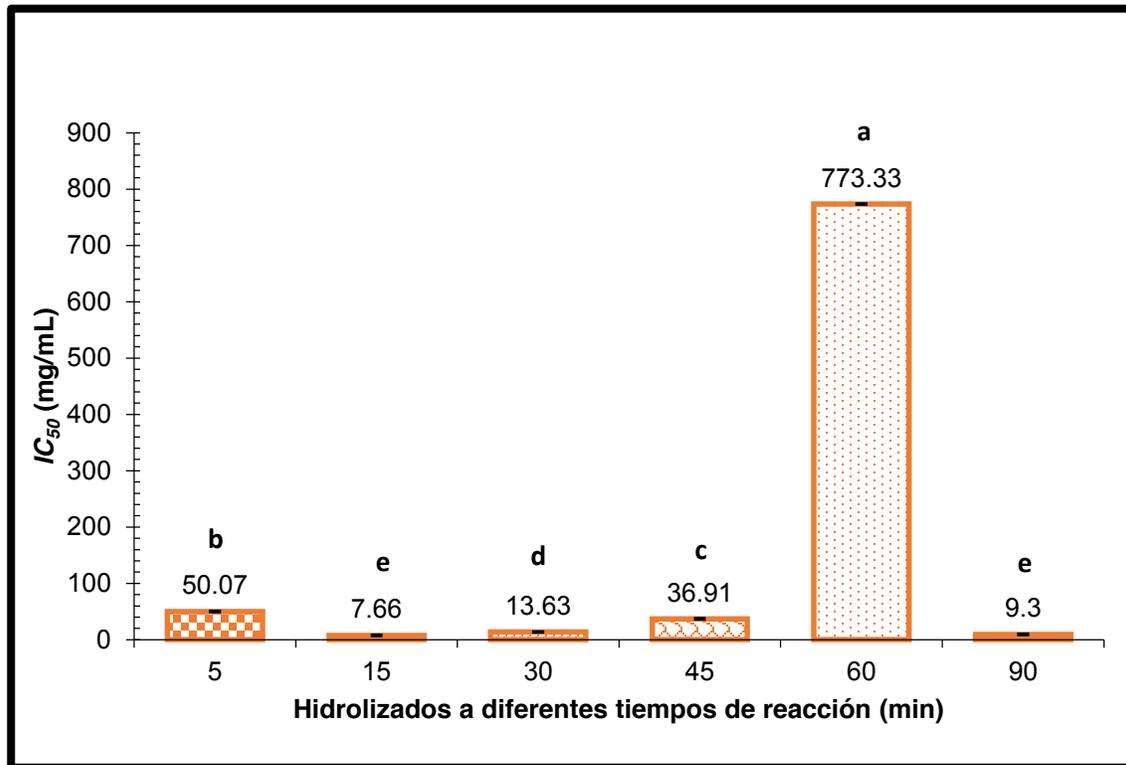


Figura 11. Actividad antitrombótica “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción. ^{a-e} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Estas diferencias en los hidrolizados obtenidos con ambas enzimas puede deberse que al hidrolizar con la enzima Alcalasa® esta pudo haber actuado sobre los aminoácidos con carga negativa o bien, que en la harina de chapulín se encuentren presentes abundantes aminoácidos hidrofóbicos con cadenas laterales aromáticas o ramificadas. Por lo que, la enzima Alcalasa® presentó mayor efectividad al cortar en sus sitios de acción, logrando contribuir sustancialmente a potencializar la actividad antitrombótica, proceso que con la enzima Pepsina no ocurrió tan efectivamente por su selectividad hacia la proteína que ésta presenta

(Ren *et al.*, 2014). Es por ello que se sugiere la modificación de proteínas derivadas de insectos con estas proteasas, y lograr la generación de hidrolizados con actividad antitrombótica, además puede tener un gran potencial de aplicación en alimentos y medicamentos anticoagulantes para ayudar a mantener la salud humana en relación a la Trombosis.

7.6 Actividad antihipertensiva

En los siguientes apartados 7.5.1 y 7.5.2 se describirán los resultados obtenidos del análisis realizado a los hidrolizados de la harina rica en proteínas del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.) sobre actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*, mediante la evaluación del porcentaje de Inhibición y el IC_{50} . (concentración que inhibe el 50% la actividad de la enzima convertidora de angiotensina).

7.6.1 Evaluación de la Inhibición de la ECA *in vitro*

Los valores obtenidos de los hidrolizados proteínicos obtenidos con las enzimas Alcalasa® y Pepsina® a diferentes concentraciones sobre la inhibición de la ECA *in vitro*, se muestran en la Figura 12 y 13 respectivamente. En la Figura 10 se puede observar que el mayor porcentaje de inhibición se dio en el hidrolizado obtenido a los 5 min de reacción a una concentración 2000 ppm con un valor de inhibición de 98.95%, el cual fue similar a lo reportado por Nasri *et al.* (2013) en hidrolizado de pez ballesta gris con un 99% de inhibición a su mayor concentración de 1500 ppm, de igual forma al hidrolizado de pez Gobi a una concentración de 1500 ppm con un porcentaje de Inhibición de 87.50%, resultado similar al obtenido en esta investigación a los 60 min con una concentración de 1000 ppm con un 87.55% de Inhibición de la ECA.

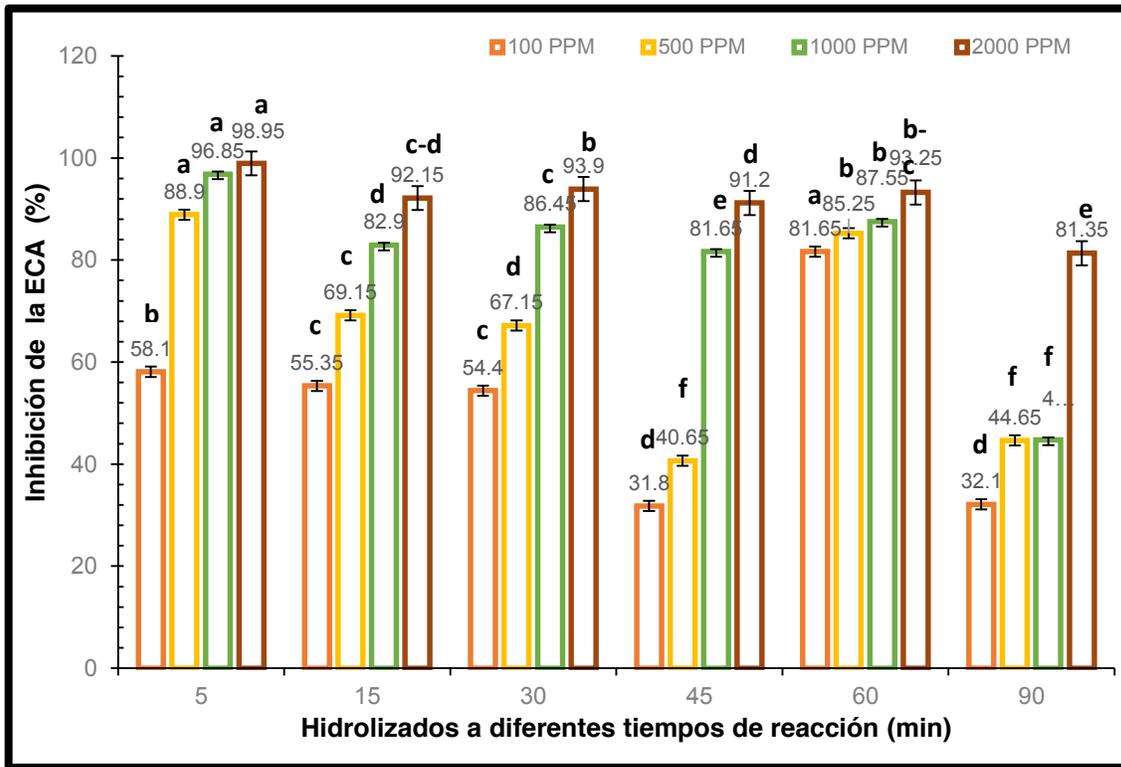


Figura 12. Inhibición de la ECA “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenido con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción y a concentraciones de 100, 500, 1000 y 2000 PPM. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-f} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En lo que respecta a los hidrolizados obtenidos con Pepsina® (Figura 13) se obtuvieron un menor porcentaje de inhibición en el hidrolizado a 5 min en las diferentes concentraciones evaluadas; sin embargo, en los hidrolizados obtenidos a los 45, 60 y 90 min se obtuvieron valores mayores de inhibición de la ECA por arriba del 94 al 97% en concentraciones de 1000 y 2000 ppm. Estos resultados pueden ser comparados con los valores encontrados por Vercruyse *et al.* (2008), ya que obtuvo un 94% de inhibición con la proteína del gusano de algodón a una concentración de 1500 ppm.

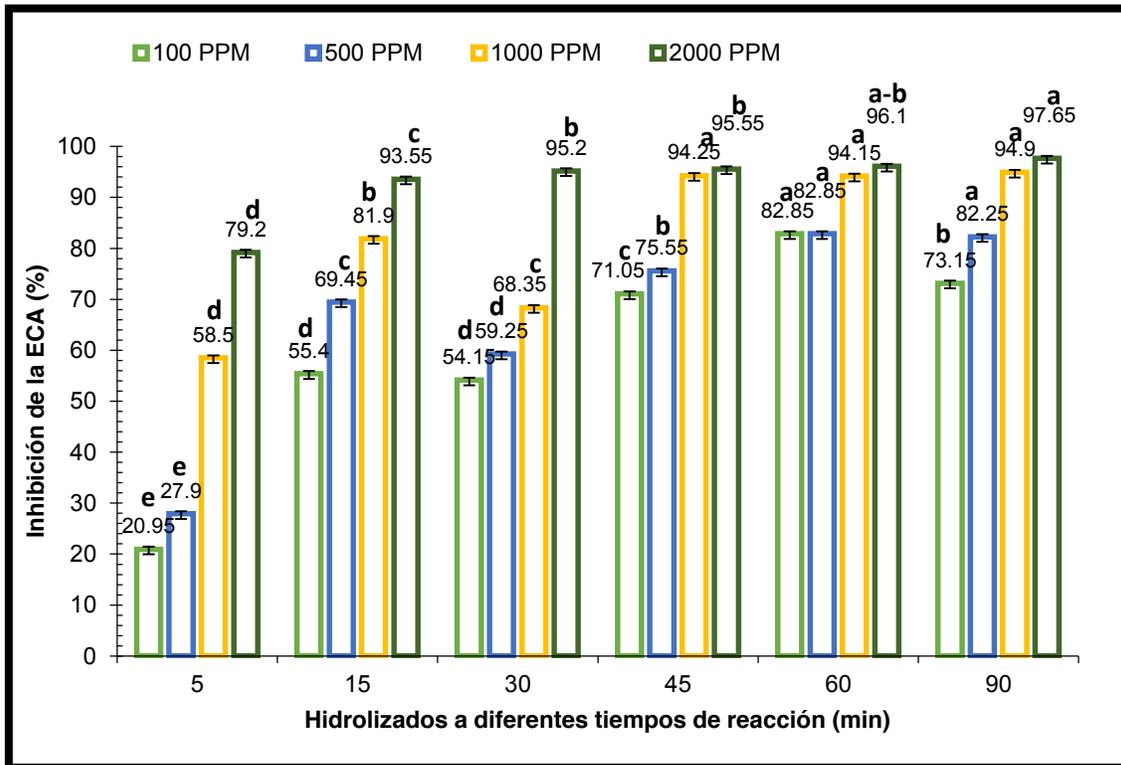


Figura 13. Inhibición de la ECA “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos de chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción y a concentraciones de 100, 500, 1000 y 2000 PPM. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los valores de inhibición de la ECA en los diferentes tiempos de reacción pueden deberse a que los péptidos Inhibidores de la ECA pudiesen estar encriptados dentro de las proteínas de chapulín y debido a la especificidad de la enzima Pepsina no se hayan liberado los aminoácidos necesarios como Leu (L), Asp (D), Glu (E), Phe (Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W) para producir la actividad. (Nasri *et al.*, 2013). Mientras que Verduyze *et al.*, (2008) mencionan que posiblemente el sustrato de la ECA no haya sido estable ante el HHL (hipuril-L-histidil-L-leucina) durante el proceso de prueba con el hidrolizado de chapulín y pueda no existir un compuesto en las fracciones de la harina que sean capaz de descomponer el HHL para liberar el HI y poder producir la Inhibición de la ECA.

7.6.2 Actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*

La actividad inhibidora de la ECA mostrada por los hidrolizados proteicos del chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.) obtenidos con las enzimas comerciales Alcalasa® y Pepsina® a diferentes tiempos de reacción se muestran en las Figuras 14 y 15 respectivamente. La actividad inhibitoria de la ECA de los hidrolizados con Alcalasa alcanzó un valor máximo a los 30 min de reacción con un $IC_{50} = 0.01$ mg/mL, mientras que los demás tiempos de reacción (5, 15, 45, 60 y 90) los valores de IC_{50} fueron 0.21, 0.39, 0.72, 5.19 y 0.81 mg/mL respectivamente. Por otro lado, los hidrolizados con Pepsina obtuvieron resultados similares a los de la Alcalasa®, siendo el mejor tratamiento el hidrolizado obtenidos a los 15 min con un $IC_{50} = 0.11$ mg/mL, seguido por el hidrolizado de 30 min con un $IC_{50} = 0.18$ mg/mL, mientras que el hidrolizado a 90 min presentó un $IC_{50} = 0.85$ mg/mL y para los hidrolizados de 5, 45 y 60 min los resultados fueron de un $IC_{50} = 1.09, 1.49$ y 4.10 mg/mL respectivamente. Los valores antes mencionados fueron similares a los reportados por Ono *et al.* (2006) en salmón de Atlántico (*Salmo salar* L.), ocupando la enzima Alcalasa® donde el valor de IC_{50} fue de 0.038 mg/mL. Otros investigadores como Nasri *et al.* (2013), evaluó la proteína de pez ballesta y sardina obteniendo valores de $IC_{50} = 0.73$ a 1.33 mg/mL respectivamente a un tiempo de hidrólisis 360 min y Bougatef *et al.* (2010), reportaron valores de IC_{50} de 0.85 a 3.55 mg/mL en hidrolizados de tiburón musola lisa (*Mustelus mustelus*) en un tiempo de 110 min. Por todo lo anterior, se sugiere que los valores encontrados en esta investigación se encuentran dentro de los intervalos de Inhibición reportados por diversos investigadores con especies de origen animal.

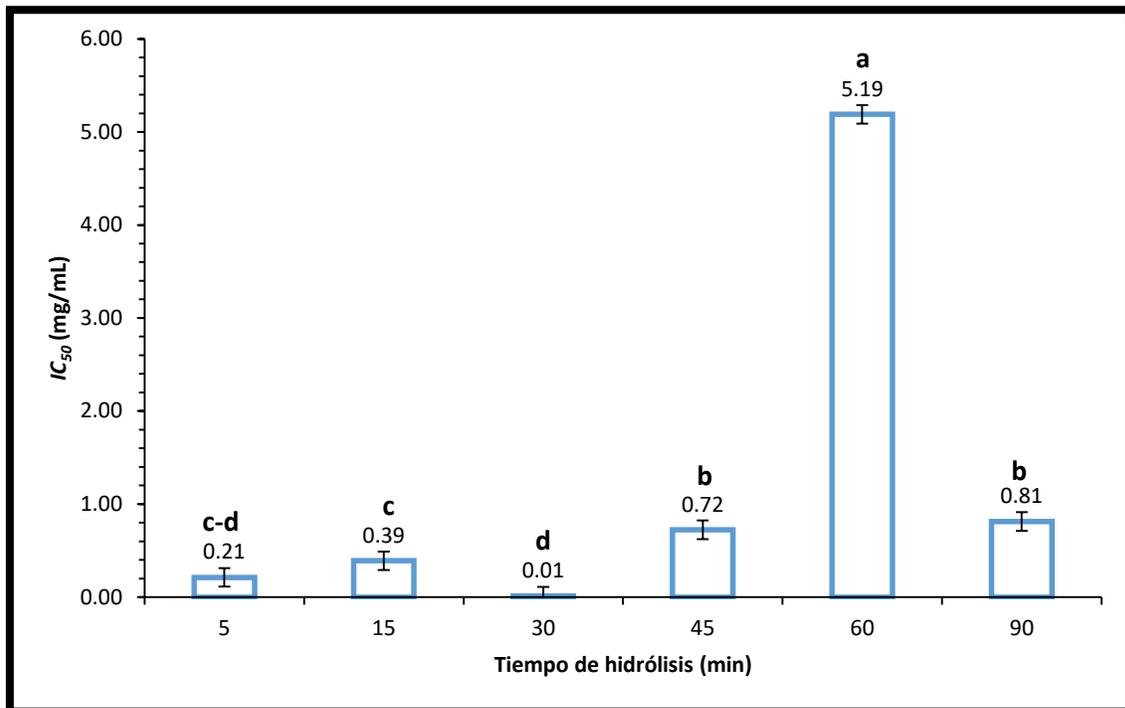


Figura 14. Actividad antihipertensiva “*in vitro*” de los hidrolizados proteínicos del chapulín (*S. purpurascens* Ch.) obtenido con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción. ^{a-d} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Cabe mencionar que investigadores como Gu *et al.* (2011) mencionan que los péptidos obtenidos con la enzima Alcalasa pueden presentar una alta actividad inhibitoria de la ECA, ya que posiblemente resisten a la digestión por proteasas gastrointestinales, además de que esta enzima puede lograr romper cadenas peptídicas muy pequeñas con pocos residuos de aminoácidos, y en cuanto menor sea el peso molecular menor será la posibilidad de atravesar la barrera intestinal y por lo tanto ejercer su función. Por lo que, estos hidrolizados obtenidos del chapulín (*S. purpurascens* Ch.) podrían favorecer su uso en alimentos funcionales, siendo benéficos para la salud humana y ayudar a minimizar la hipertensión arterial.

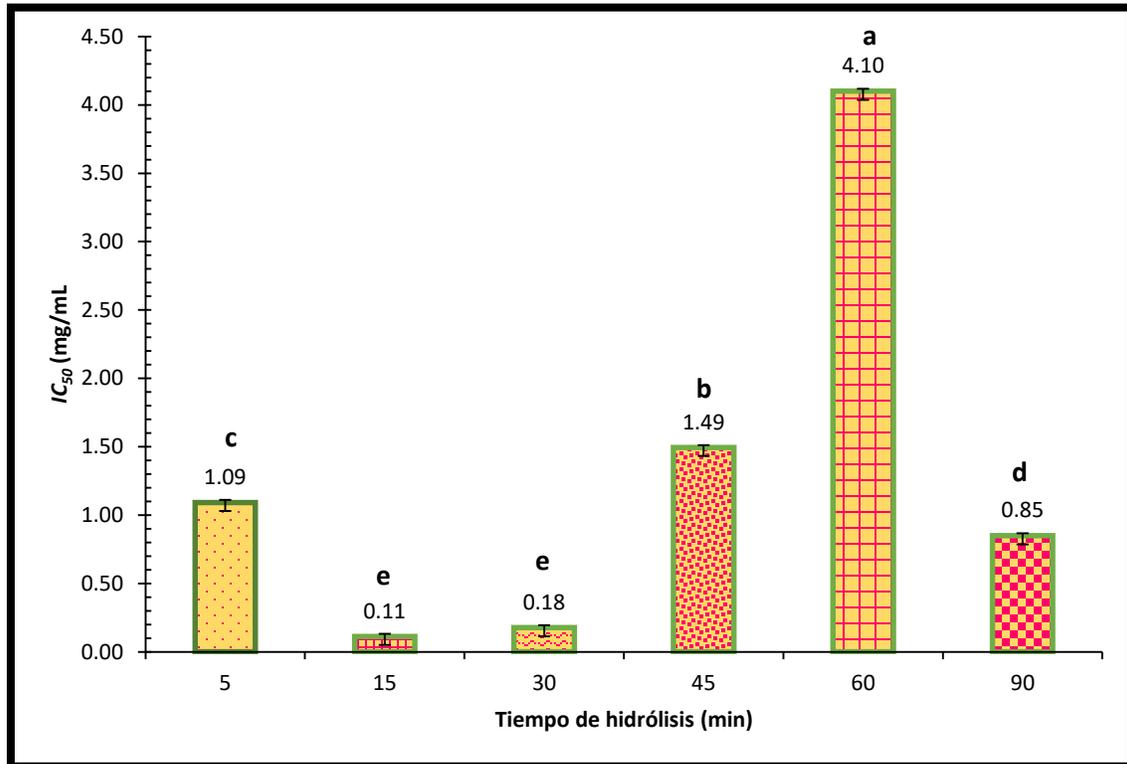


Figura 15. Actividad antihipertensiva “*in vitro*” del hidrolizado proteínico de *S. purpurascens* Ch. obtenido con Pepsina® a diferentes tiempos de reacción.
^{a-e} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

8. CONCLUSIONES

1. La composición química proximal de la harina de chapulín presentó un contenido de proteína de 77.92%, contenido suficiente para llevar a cabo hidrólisis extensivas y buscar diferentes actividades biológicas.
2. La harina rica en proteínas del chapulín presentó un color oscuro ($L^* = 48.21$), sin embargo, esta harina puede ser utilizada para que sea agregado a algún alimento funcional, donde su coloración no afecte su aspecto visible y pueda ser aceptado para su comercialización.
3. El mayor grado de hidrólisis (GH) se obtuvo con la enzima Alcalasa a los 90 min de reacción con 26.5%, en comparación con el hidrolizado obtenido con la enzima Pepsina donde se obtuvo un GH menor de 21.2% al mismo tiempo de reacción. Indicando que la Alcalasa tiene mayor selectividad por los enlaces peptídicos presentes en la proteína del chapulín.
4. El patrón electroforético SDS-PAGE de los hidrolizados proteicos de la harina de chapulín con Alcalasa mostraron menos bandas de mayor peso molecular que con Pepsina®. Sin embargo, ambas enzimas Alcalasa® y Pepsina® mostraron bandas <10 kDa para todos sus tiempos de hidrólisis.
5. La actividad inhibidora de la agregación plaquetaria mostró ser más eficiente con el hidrolizado obtenido con la enzima Alcalasa® con un valor de $IC_{50} = 6.61$ mg/mL a los 5 min de reacción, mientras que en el hidrolizado con la enzima Pepsina® el valor de $IC_{50} = 7.66$ mg/mL a los 15 min de reacción.
6. Los hidrolizados que presentaron mayor actividad inhibitoria de la ECA fue el obtenido con la enzima Alcalasa® a 30 min de reacción con un valor de $IC_{50} = 0.01$ mg/mL, mientras que en los hidrolizados con la enzima Pepsina® se dio en el hidrolizado a 15 min de reacción con un $IC_{50} = 0.11$ mg/mL.

7. La harina de chapulín ha demostrado ser una buena alternativa para la obtención de hidrolizados proteicos con las actividades antitrombótica y antihipertensiva.

9. REFERENCIAS

1. Agilent Technologies. 2013. Claves para conseguir caracterizaciones de péptidos óptimas. **Disponible en:** <http://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5991-2348ES.pdf>
2. Alaíz, M., Navarro, J. L., Girón, J., Vioque, E. (1992). Ammino acid analysis by high performance liquid chromatography after dderivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *Journal of Cromatography*. 591: 181-186.
3. Alasino, N.M., Aringoli, E., Sánchez, H. (2011). Optimización de los niveles de los agentes oxidante/reductor en la panificación de harina de trigo. *Información Tecnológica*. 22 (6): 75- 86.
4. AOAC International. (2012). *Official methods of analysis* (19 ed.). Gaithersburg, MD: The Association.
5. Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., Heras. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Revista Española de Cardiología*. 6: 2-10.
6. Atlas, S. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy*. 13 (8): 1-12.
7. Baños, M., A., Rosado, A., Escalante, B. (2012). Sistema renina angiotensina y enfermedad isquémica del corazón. *Salud en Tabasco*. 18 (2): 64-70.
8. Barrientos, L., Almaguer, P. (2009). Manejo sustentable de chapulines (orthoptera: acridoidea) en México. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. 13 (2): 51-56.
9. Benavente, D., Chue, C., Ferro, C. (2010). Principales componentes del sistema renina-angiotensina aldosterona: historia, modulación farmacológica e impacto clínico. *Revista Médica Clínica*. 21 (4): 516-529.

10. Berl, T. (2009). Renal protection by inhibition of the renin angiotensin aldosterone system. *Journal of the Renin- Angiotensin- Aldosterone System*. 10 (1):1-8.
11. Bernardi, D., Paris, L., Dieterich, F., Silva, F., Boscolo, W., Sary, C., Signor, A., Bertol, T., Sgarbierei, C. (2016). Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 36 (4): 709-716.
12. Betancur-Ancona, D., Gallegos, S., & Chel, 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.
13. Bougatef, A., Balti, R., Nedjar, N., Ravallec, R., Yaba, E., Souissi, N., Lassoued, I., Guillochon, D. (2010). Evaluation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: identification of the most potent active peptide. *European Food Research and Technology*. 231 (1): 127-135.
14. 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
15. Cadeza, M. (2016). Efecto antitrombótico de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens* var. Utilis). Tesis Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
16. Castellanos y Vargas. 2001. Ecología de la oviposición de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) en la reserva del Pedregal de San Ángel, México, D.F. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
17. Castellanos, I., García, P., Cano, Z. (2015). Diversidad ortopterológica de la reserva territorial sureste de la Ciudad Universitaria (UNAM). *Acta Zoológica Mexicana*. 31 (1): 97-108.

18. Cerritos, R. Cano, S. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*. 27: 473-480.
19. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Prakash, V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Ramesh, R., Dinesh, B. (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition*. 31: 388-398.
20. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P., Kumar, U., Nimgulkar, C., Kumar, D. (2014). Immunomodulatory effects of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) egg (roe) in BALB/c mice. *Food Research International*. 62: 1054–1061.
21. Chen, J., Okada, T., Muramote, K., Suetsuna, K., Yang, S. (2003). Identification of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein. *Journal of Food Medicine*. 26: 543-554.
22. Chen, Y., Liu, Y., Yang, Y., Feng, H., Chang, C., Chen, C. (2002). Antihypertensive effect of an enzyme hydrolysate of chicken essence residues. *Food Science Technology Research*. 8 (2): 144-147.
23. Cheng, F., Liu, Y., Wan, T., Lin, L., Sakata, R. (2008). The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Animal Science Journal*. 79: 122-128.
24. Chertcoff, J., Sampó, E., Casey, M., Ceresetto, J., Boughen R., Veltri, M., Flores, L., Kenar, M., Suasnabal., De Francesca, S., Pérez, M., Perel, C., Álvarez, J. (2009). Consenso de enfermedad tromboembólica. *Revista Argentina de Cardiología*. 77 (5): 411-428.
25. Choi, J., Kim, S., Kim S. (2016). A novel anticoagulant protein with antithrombotic properties from the mosquito *Culex pipiens pallens*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 93:156-166.

26. Cuj, R. (2017). Obtención de una botana extrudida a base de maíz (*zea mays* L.) adicionada con harina de chapulín (*Sphenarium purpurascens* Ch.). Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
27. Dai, Z., Zhang, Y., Zhang H., Lu, Y. (2012). Preparation and characterization of mussel (*mytilus edulis*) protein hydrolysates with angiotensin-i-converting enzyme (ACE) inhibitory activity by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biochemistry*. 36: 66–74.
28. Das Neves, M., Campos, T., Márquez, L. (2006). Modulacao da Presao Arterial por hidrolisados Proteicos. *Brazilian Journal of Food Technology*. III: 81-86.
29. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012. Resultados Nacionales. **Disponible en línea:** <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
30. Erdmann, K., Cheung, B., Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19: 643-654.
31. Feldstein, C., Romero, C. (2007). El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión Arterial*. 2 (2): 49-58.
32. Fernández, A. (2013). Manejo de la Hipertensión Arterial. *Archivos de Medicina*. 9 (4):1-12.
33. Figueroa, O., Zapata, J., Sánchez. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de las proteínas de plasma de Bovino. *Información Tecnológica*. 27 (2): 39-52.
34. Gan, H. E., Karim, R., Muhammad, S. K. S., Bakar, J. A., Hashim, D. M., & Rahman, R. A. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 40 (4): 611-618.
35. Gen, W., Zhang, W., Ying, S. (2012)- A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*. 18 (4): 449-451

36. González, A. (2006). Aterosclerosis y Trombosis. *Ediciones Médicas Actualizadas*. 229-241.
37. Hall, F., Jones, O., O'Haire M., Liceaga, A. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Grylloides sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 224: 414-422.
38. Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R., Meng, Q. (2008). An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*. 51: 914–922.
39. Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food application. *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 163-169.
40. Hayakari, M., Konda, Y., Izumo, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*. 84: 361-359.
41. Hernández, B., Contreras, M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165 (1): 23-35.
42. Herrera, E. (2012). Adherencia al tratamiento a las personas con hipertensión arterial. *Avances en enfermería*. 30 (2): 67-75.
43. Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía. 2013. Estudio nacional de salud y envejecimiento en México. **Disponible en:** http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/hogares/especiales/enasem/doc/enasem2013_09.pdf
44. Karamac, M., Flaczyk, E., Janitha, P. K., Wanasundara, P.D., Amarowicz, R. (2005). Angiotensin i-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hydrolysates obtained from muscle food industry by-products—a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 55 (2): 133-138.
45. Kim, H., Setyabrata D., Jae, Y., Jones, O., Brand Y. (2016) Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 38: 116-123.

46. Kong, Y., Huang, S., Shao, Y., Li, S., Wei, J. (2013). Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Journal of Ethnopharmacology*.145: 182-186.
47. Korhonen, H., Pihlanto A. (2005). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945-960.
48. Lahteenmaki, A., Grmelova N. (2016). European law on insects in food and feed. *Insects Food and Feed*.1: 2-8.
49. Lira, E., (2007). Síntesis de péptidos. Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
50. Liu, Q., Kong, B., Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*. 118:403-410.
51. Llanos, B. (2001). Nuevas perspectivas en el tratamiento antitrombótico. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 25 (4): 93-104.
52. Majluf, A., Espinosa, F. (2007). Fisiopatología de la trombosis. *Revista Médica Mexicana*. 143 (1): 11-14.
53. Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K. (2013). Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Health Journal*. 34: 2159–2219.
54. Manninen, H.A. (2004). Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. *Journal of Sport Science and Medicine*. 3: 60-63.
55. Markland, F. S., y Smith, E. L. (1971). Subtilisins: Primary structure, chemical and physical properties. In: The enzyme. Edited by P.D. Boyer. New York, Academia Press. 561-608.
56. 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.
57. Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N. (1997). Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response

- to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *Journal of Investigation Clinic*. 101 (3): 52-531.
58. Megías, C., Yust, M., Pedroche, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1928-1932.
59. Melo, V., García, M., Sandoval, H., Jiménez, H., Calvo., C. (2010). Quality proteins from edible indigenous insect food of Latin America and Asia. *Emirates Journal of Food & Agriculture*. 23: 283-289
60. Montgomery, D.C. (2007). Diseño de análisis de experimentos. 2da Ed. Editorial Limusa S.A. de CV. México, D.F. pp 21-141.
61. Mulero, J., Rentero, P., Martínez A., Leal, M., Abellán, J. (2011). Péptidos Bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteroesclerosis*. 23 (5): 219-227.
62. Nasri, R., Ben, I., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Karra, M., Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 133: 835-841.
63. Nasri, R., Younes, I., Iridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nediari-Arroume, N., Dhulster P., Nasri, M., Karra, M. (2013) ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*. 54: 552-561.
64. Ndiritu, A., Kinyuru, J., Kenji, G., Gichuhi, P. (2017). Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties of edible crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11: 2013-2021.
65. Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., & Takahashi, K. (2006). Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(4): 383-386.
66. Organización Mundial de la Salud. 2013. Día Mundial de la Salud 2013: Mida su tensión arterial, reduzca su riesgo. **Disponible en:** http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/world_health_day_20130403/es/

67. Pacheco, A. (2010). Análisis comparativo del contenido proteínico entre dos órdenes de artrópodos del noreste de México (Orthoptera y Arachnida) y grupo cárnico (Artiodactyla) como alternativa de complemento alimenticio. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
68. Paul, A., Frederich, M., Uyttenbroeck, R., Hatt, S., Malik, P., Lebecque, S., Hamaidia, M., Miazek, K., Goffin, D., Willems, L., Deleu, M., Fauconnier, M., Riche, A., De Pauw, E., Blecker, C., Monty, A., Fransis, Frédéric., Haubruge, E., Danthine, S. (2016). Grasshoppers as a food source? A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. 20: 1-16.
69. Paul, M., Poyan A., Kreutz, R., (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, 86 (3): 747-803.
70. Pérez, P., Ferreira, N., Reis, J., Nelio, J., Souza, R., Alves, E. (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11: 187-204.
71. Pierre, M. (2009). Manual de Farmacología. 4ta Edición, Méndez Editores, p 289-319. México, D.F.
72. Pino, J. M., Ramos, J. (2006). Los insectos comestibles comercializados en los mercados de Cuautitlán de Romero Rubio, Estado de México, México. *Sitientibus Sér. Ciencias Biológicas*. 6: 56-64.
73. Ramos, B., Quintero, B., Ramos J., Pino, J. M., Campos, A., García, A., Barrera, D. (2012). Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el estado de México. *INTERCIENCIA*. 37: 214-215.
74. Ramos-Elorduy, J., Pino, J., Escamilla, E., Alvarado, M., Lagunez, J., Ladrón, O. (1997). Nutritional Value of Edible Insects from State the Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 142-157.
75. Ren, Y., Wu, H., Lai, F., Yang., Li, X., Tang. (2014). Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates

- of scorpion (*Buthus martensii* Karsch) protein. *Food Research International*. 64: 931-938.
76. 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.
77. Rumpold B., Schlüter, O. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 17: 1-11.
78. Rumpold B., Schlüter, O. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 17: 1-11.
79. Santeliz, H., Romano, E., González, A., Hernández H. (2008). El sistema renina-angiotensina y su papel más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*. 19 (1): 21-29.
80. Secretaría de Salud. 2001. Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial. **Disponible en línea:** http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/enf_cardiovasculares.pdf
81. Secretaría de Salud. 2015. Impuesto al refresco y bebidas con azúcares añadidas. Boletín Epidemiológico. **Disponible en línea:** <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem13.pdf>
82. Shavandi, A., Hu, Z., Teh, S., Zhao, J., Carne A., Bekhit, A., A-Bekhit, A. (2017). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. *Food Chemistry*. 227: 194-201.
83. Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y. (2009). Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*. 123: 753-757.

84. Silva, S., Malcata, F. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*. 15 (1): 1-15.
85. Staljanssens, D., Van, J., Herregods, G., Dhaenens, M., Deforce, D., Van, J., Smaghe, Guy. (2011). Antihypertensive effect of insect cell: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal Peptides*. 32: 526-530.
86. Torruco, J.G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Doctoral. Escuela de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
87. Ueno, K., Mizuno, S., Yamamoto, N. (2004). Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. *Letter in Applied Microbiology*. 39: 313-318.
88. Van A. (2013). Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*. 58: 563-583.
89. Vásquez, M., Aragón, A., Bibbins, M., Castillo, D., Nava, S., Pérez, B. (2016). Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.)*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7: 235-247.
90. Vercruysse, L., Smaghe, G., Herregoods G., Van, J. (2005). ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 5207-5211.
91. Vercruysse, L., Smaghe, G., Matsui, T., Van, J. (2008) Purification and identification of an angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the gastrointestinal hydrolysate of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Process Biochemistry*. 43 (8): 900-9004
92. Vidalón, A. (2010). Clínica de la hipertensión arterial, para el médico general. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 71 (4):237-246.

93. Viesca, F.C., Romero, A.T. (2009). La entomofagia en México: algunos aspectos culturales. *El Periplo Sustentable*. 16: 57-83.
94. Villa, R., Veiras O. (2009). Trombosis venosa profunda. *Asociación Mexicana de Farmacología*. 5 (1): 11-20.
95. Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Yust M., Millán, F. (2001 a). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Revista grasas y aceites*. 52 (2): 127-131.
96. Wagner-Grau, P. (2010). Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Archivos de Medicina*. 71 (4):225-234.
97. Walther, T., Menrad, A., Orzechowski, H.D., Siemeister, G., Paul, M., Schirner, M. (2003). Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17: 2061-2067.
98. Wanasundara, P., Ross, S., Amarowicz, R., Ambrose, J., Pegg, B., Shand, J. (2002). Peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6981-6988.
99. Wang, W., Gonzales de Mejía, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4: 63-78.
100. 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.
101. Wei, J. F., Li, T., Wei, X. L., Sun, Q. Y., Yang, F. M., Chen, Q. Y., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., He, S.H. (2006 a). Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A2 from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. *Journal Biochimie*. 88: 1331–1342.
102. Wei, J. F., Wei, X. L., Chen, Q. Y., Huang, T., Qiao, L. Y., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., He, S. H. (2006b). N49 phospholipase A2, a unique

- subgroup of snake venom group II phospholipase A2. *Biochimical et Biophysica Acta*. 1760: 462–471.
103. Wittkopp, P. J., Beldade, P. (2009). Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20: 719-727.
104. Wolf, J. W. (1970). Soybean proteins: their functional, chemical, and physical properties. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 18 (6): 969-976.
105. 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.