



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

## **INSTITUTO TECNOLÓGICO** de Tuxtepec

**"OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE HIDROLIZADOS  
PROTEICOS DE SEMILLAS DE QUELITE BLANCO  
(*Amaranthus hybridus*) Y AMARANTO (*Amaranthus  
hypochondriacus*) COMO COMPONENTES BIOACTIVOS"**

### **TESIS**

Para Obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**I.B.Q. DHORLE GARDENIA DOMINGUEZ DELFIN**

DIRECTOR:

**DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO**

CO-DIRECTORA:

**DRA. ROSELIS CARMONA GARCÍA**

MCA-2019/01

TUXTEPEC, OAXACA, ENERO 2019

# COMITÉ TUTORIAL

DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

DRA. ROSELIS CARMONA GARCIA

MC. ERNESTINA PAZ GAMBOA

DRA. IVET GALLEGOS MARIN



S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC



“Obtención y evaluación de hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como componentes bioactivos”

**TESIS**

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

**PRESENTA:**

IBQ. DHORLE GARDENIA DOMÍNGUEZ DELFÍN

**DIRECTOR:**

Dr. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

**CO-DIRECTORA:**

Dra. ROSELIS CARMONA GARCÍA

TUXTEPEC, OAX., ENERO DE 2019



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

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

Tuxtepec, Oaxaca **28/ENERO/2019**  
OFICIO: No. 5769

**I.B.Q. DHORLE GARDENIA DOMÍNGUEZ DELFÍN**  
**EGRESADA DE LA MAestría EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
**CON NÚMERO DE CONTROL M10350022**  
**PRESENTE.**

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE LA COMISIÓN REVISORA INTEGRADA POR LOS C.C. DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, DRA. ROSELIS CARMONA GARCÍA, M.C. ERNESTINA PAZ GAMBOA Y DRA. IVET GALLEGOS MARIN, REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE SEMILLAS DE QUELITE BLANCO (*Amaranthus hybridus*) Y AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus*) COMO COMPONENTES BIOACTIVOS" 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®

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

C.c.p.-Coord. de titulación  
MMHC/has



REGISTRO SGC  
Código: ITTUX-EG-PO-001-06  
Revisión: 2  
Fecha de Autorización: 28/Abril/2018



Av. Dr. Victor Bravo Ahuja S/N, Col. 5 de Mayo CP. 68350, Tuxtepec, Oax. México.

Tel. 01 (287) 8751044, Ext. 117 e-mail: it\_tuxtepec@tecnm.mx

www.tecnm.mx | www.ittux.edu.mx



ISSC  
SINCO  
RECERTIFICACIÓN 2018.07.30  
TERMINO 2021.07.30

**“Obtención y evaluación de hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como componentes bioactivos”**

Por:

IBQ. Dhorle Gardenia Domínguez Delfín

Tesis propuesta al:

Instituto Tecnológico de Tuxtepec

Como requerimiento parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Alimentos.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección y supervisión del Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, a quien expreso mi total agradecimiento y admiración por apoyo, tiempo y conocimientos compartidos, para la realización exitosa de esta investigación. Muchas gracias por su apoyo.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Roselis Carmona García, M.C. Ernestina Paza Gamboa y el Dra. Ivet Gallegos Marin, por tomar parte de su tiempo en la revisión y corrección de este trabajo de investigación.

Al Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, a la Coordinación de Posgrado e Investigación, así como a los Profesores Investigadores que integran la planta docente de la Maestría en Ciencias en Alimentos del Instituto Tecnológico de Tuxtepec, por haberme brindado sus conocimientos y consejos para guiarme en mi formación como Maestra en Ciencias.

A la señora Edith Cordova Romero secretaria de Posgrado, quien siempre se distingue por su amabilidad, gracias por todo el apoyo y atenciones brindadas.

A la Universidad del Papaloapan (UNPA) en especial a la Dra. Jaqueline Capataz Tafur y el Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo, por el apoyo y facilidades brindadas en dicha universidad, para la realización de una parte experimental del presente proyecto. Muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la Beca Nacional de Manutención con número de registro de becario 606844 y lograr con ello mis estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos en esta Institución.

A mis compañeras(os) de laboratorio: Josué, Sol, Nicol, Mariana, Mayra y Armando por compartir esta experiencia de la vida conmigo y por la amistad incondicional que me brindaron.

## **DEDICATORIA**

Primeramente agradezco, a Dios por la vida y fortaleza que me brinda para superar cada obstáculo en la vida.

A mi madre, no me equivoco si digo que eres la mejor mamá que dios pudo haberme dado, gracias por ser todo para mí, gracias por ser mi mejor amiga, mi fortaleza y mi mejor ejemplo, por forjar mi fe y no darte nunca por vencida porque mientras tú siempre te has mantenido firme y con esperanza me has dado una gran lección de perseverancia.

A mi hermano Jorge, aunque hayas partido siempre te llevo presente, y recuerdo con mucho cariño cada momento que compartimos.

A mis abuelos Juana y Marcelo, gracias por su apoyo y cariño.

A Joshua, mi niño gracias por ser siempre tan lindo y por todo tu cariño, eres mi primito favorito.

A mi familia “Delfin Mesinas”, gracias porque a pesar de todo me enseñan cada dia el valor de la familia, el amor y apoyo incondicional.

## RESUMEN

Domínguez Delfin, Dhorle Gardenia. Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. **“Obtención y evaluación de hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como componentes bioactivos”**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-directora: Dra. Roselis Carmona García.

Los radicales libres se producen constantemente en los seres vivos, los cuales pueden generar daños en proteínas, lípidos o ADN. Este daño oxidativo ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades y con el envejecimiento (Gallegos-Tintoré et al., 2013). Por otro lado, enfermedades del tipo cardiovascular tales como la trombosis venosa profunda e hipercolesterolemia, se sitúan entre las principales causas de muertes en el país. Debido a ello, la Ciencia de los Alimentos busca alternativas en el tratamiento de dichos padecimientos, entre estas alternativas se encuentran los péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas. Es por lo que en el presente estudio se obtuvieron hidrolizados proteicos a partir de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriacus*) empleando enzimas comerciales, y se evaluó su efecto sobre la solubilidad micelar de colesterol, así como su efecto sobre la agregación plaquetaria y su capacidad antioxidante. Para ello se obtuvieron harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (SQB) y de amaranto (SA), a las cuales se le realizó la caracterización químico proximal y el análisis de color. Posterior a ello, se realizaron las cinéticas de hidrólisis individual para las enzimas pepsina y alcalasa, y se determinó el grado de hidrólisis por el método de ortoftaldehído. Además, se determinaron las actividades biológicas (*in vitro*): actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH, antitrombótica (usando un método turbidimétrico para determinar la concentración que inhibe el 50% de la agregación plaquetaria) y la actividad anti-colesterolémica (método de la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol) tanto en los concentrados como en los hidrolizados proteicos de ambas semillas. El contenido de proteína de la harina de SQB fue de 18.83% y la harina de SA fue de 19.29%, mientras que en los concentrados proteicos de la SQB fue de 73.15% y de la SA fue de 70.37%. Los parámetros de color mostraron una harina de amaranto con mayor

luminosidad ( $L^* = 85.01$ ) en comparación con el concentrado proteico con una  $L^* = 55.60$ , mientras que la harina y concentrado proteico de la SQB fue de 61.88 y 59.88, respectivamente. Las cinéticas de hidrólisis de los concentrados proteicos de la SA-pepsina, SQB-pepsina, SA-alcalasa, SQB-alcalasa presentaron valores de 32.08, 32.76, 36.45 y 34.38%, a los 90 min de reacción, respectivamente. Se obtuvieron como mejores tratamientos antioxidantes en concentrado proteico SA (ABTS  $IC_{50} = 29.72$  mg/mL) y SQB (DPPH con un valor de  $IC_{50} = 32.38$  mg/mL), y en hidrolizados proteicos por el método DPPH el mejor tratamiento fue alcalasa-SQB a 90 min  $IC_{50} = 3.79$  mg/mL, mientras que por el método ABTS el hidrolizado SQB-alcalasa 60 min obtuvo un  $IC_{50} = 1.19$  mg/mL. El concentrado proteico SQB presentó mayor actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria con un 15.96 % de actividad en concentraciones de 2.5 mg, sin embargo el SA mostró un  $IC_{50}$  menor = 13.04 mg/mL. El hidrolizado con mayor porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria fue SQB-alcalasa a 45 min pues se alcanzó un 49 % de inhibición en concentraciones de 2.5 mg, teniendo un  $IC_{50} = 3.74$  mg/mL. Con respecto a la capacidad anticolesterolemica el concentrado proteico de la SQB mostró mayor inhibición de la solubilidad micelar de colesterol con 83% , mientras que en los hidrolizados, el hidrolizado proteico SQB-pepsina a 60 min de reacción obtuvo 49.80% de inhibición. siendo este el mayor porcentaje de inhibición obtenido en este estudio.

## ABSTRACT

Domínguez-Delfín, D. G. Master of Science in Food. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. January, 2019. **"Obtaining and evaluation of protein hydrolysates of seeds of white quelite (*Amaranthus hybridus*) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as bioactive components"**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-director: Dra. Roselis Carmona García.

Antioxidant compounds are constantly produced in living beings, which can cause damage to proteins, lipids or DNA. This oxidative damage has been related to the development of various diseases and to aging (Gallegos-Tintoré et al., 2013). On the other hand, cardiovascular diseases such as deep venous thrombosis and hypercholesterolemia are among the leading causes of death in the country. Because of this, the science of food seeks alternatives in the treatment of these conditions, among these alternatives are the bioactive peptides. That is why the present study seeks to "obtain protein hydrolysates from seeds of white kelp (*A. hybridus*) and amaranth (*A. hypochondriacus*) using commercial enzymes, evaluate their effect on micellar cholesterol solubility, as well as their effect on platelet aggregation and its antioxidant capacity ".To do this, flour and protein concentrates were obtained from white chelid (SQB) and amaranth seeds, to which the proximal chemical characterization and color analysis were made. After that, the individual hydrolysis kinetics for the pepsin and alcalase enzymes were carried out, and the degree of hydrolysis was determined by the orthophthaldehyde method. In addition, the biological activities of antioxidant activity were determined by the ABTS and DPPH methods), antithrombotic (using a turbidimetric method to determine the concentration that inhibits 50% of platelet aggregation) and antiocholesterolemic (method of inhibiting the micellar solubility of the cholesterol) in both concentrates and protein hydrolysates. The protein content of the SQB meal was 18.83% and the SA meal was 19.29%, while in the protein concentrates of the SQB it was 73.15% and of the SA it was 70.37%. The color parameters showed an amaranth flour with higher luminosity ( $L^* = 85.01$ ) compared to its protein concentrate with an  $L^* = 55.60$ , while the flour and protein concentrate of the SQB was 61.88 and 59.88, respectively. The

kinetics of hydrolysis of the protein concentrates of SA-pepsin, SQB-pepsin, SA-alcalase, SQB-alcalase showed values of 32.08, 32.76, 36.45 and 34.38%, at 90 min of reaction, respectively. The best antioxidant treatments were obtained in protein concentrate SA (ABTS  $IC_{50}$  = 29.72 mg / mL) and SQB (DPPH with an  $IC_{50}$  value = 32.38 mg / mL), and in protein hydrolysates by the DPPH method the best treatment was alkaline-SQB at 90 min  $IC_{50}$  = 3.79 mg / mL, while by the ABTS method the SQB-alcalase hydrolyzate 60 min obtained an  $IC_{50}$  = 1.19 mg / mL. The SQB protein concentrate had a higher inhibitory activity of platelet aggregation with a 15.96% activity in concentrations of 2.5 mg, however the SA showed a lower  $IC_{50}$  = 13.04 mg / mL.

The hydrolyzate with the highest percentage of inhibition of platelet gradation was SQB-alcalase at 45 min, since 49% inhibition was achieved at concentrations of 2.5 mg, with an  $IC_{50}$  = 3.74 mg / mL. With regard to the anti-cholesterolemic capacity, the SQB protein concentrate showed greater inhibition of micellar solubility with 83%, whereas in the hydrolysates, the SQB-pepsin protein hydrolyzate at 60% reaction was obtained, with 49.80% inhibition. percentage of inhibition obtained in this study.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	_____	III
<b>DEDICATORIA</b>	_____	IV
<b>RESUMEN</b>	_____	V
<b>ABSTRACT</b>	_____	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	_____	XII
<b>LISTA DE TABLAS</b>	_____	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	_____	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	_____	3
2.1 Estrés oxidativo y radicales libres	_____	3
2.2 Enfermedades cardiovasculares	_____	4
2.3 Hipercolesterolemia	_____	5
2.3.1 Tratamiento farmacológico	_____	5
2.4 Trombosis venosa profunda	_____	6
2.4.1 Tratamiento farmacológico antitrombótico	_____	8
2.3 Péptidos bioactivos	_____	9
2.3.1 Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática	_____	11
2.3.2 Biodisponibilidad de los péptidos bioactivos	_____	16
2.3.3 Actividad biológica de los péptidos	_____	17
2.3.4 Péptidos antioxidantes	_____	18
2.3.5 Péptidos antitrombóticos	_____	19
2.3.6 Péptidos anticolesterolémicos	_____	20
2.3.5 Fuentes de obtención de péptidos bioactivos	_____	21
2.4 Amaranto	_____	22
2.4.1 Valor nutricional del amaranto	_____	23
2.4.2 variedades de amarantos	_____	24
2.4.3 Quelite blanco ( <i>A. hybridus</i> )	_____	25
2.4.4 Amaranto ( <i>A. hypochondriaccus</i> )	_____	25

<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>26</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos	32
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
6.1 Obtención de la materia prima	33
6.2 Obtención de las harinas de semillas de quelite blanco ( <i>A. hybridus</i> ) y amaranto ( <i>A. hypochondriaccus</i> )	33
6.3 Desengrasado de la harina por ultrasonificación	33
6.4 Obtención de los concentrados proteicos de las semillas de quelite blanco ( <i>A. hybridus</i> ) y amaranto ( <i>A. hypochondriaccus</i> )	34
6.5 Composición química proximal de las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco y amaranto.	34
6.5 Determinación de color de la harina y concentrado proteínico	39
6.6 Hidrólisis del concentrado proteico	39
6.7 Determinación del grado de hidrólisis	40
6.8 Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades biológicas de los hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco y amaranto.	40
6.8.1 Capacidad antioxidante	41
6.8.1.1 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)	41
6.8.1.2 Método 2,2,azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS•+	42
6.8.2 Inhibición “ <i>in vitro</i> ” de la agregación plaquetaria	43
6.8.3 inhibición “ <i>in vitro</i> ” de la solubilidad micelar del colesterol	44
6.10 Análisis estadístico	46
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
7.1 Caracterización químico proximal y aporte energético de las harinas y concentrados proteicos de la semilla de quelite blanco y amaranto.	47

7.2 Color de las harinas y concentrados proteicos de <i>A. hybridus</i> y <i>A. hyponchondriacus</i>	49
7.3 Hidrólisis de los concentrados proteicos de semillas de quelite blanco ( <i>A. hybridus</i> ) y amaranto ( <i>A. hypochondriacus</i> )	51
7.4 Capacidad antioxidante de los concentrados e hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.	54
7.4.1 Método DPPH	54
7.4.2 MÉTODO ABTS•	58
7.5 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA	62
7.5 Actividad antiolesterolémica (inhibición de la solubilidad micelar) de los concentrados e hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.	71
VIII. CONCLUSIONES	76
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

## LISTA DE FIGURAS

<i>figura 1. Trombo formado en una vena. Fuente: MD.SAUDE®. <a href="https://www.mdsaude.com/2013/12/trombose-venosa.html">https://www.mdsaude.com/2013/12/trombose-venosa.html</a></i>	7
<i>figura 2. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica (Torruco-Uco et al., 2008).</i>	13
<i>figura 3. Hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de la SQB y SA, con la enzima Pepsina®.</i>	52
<i>figura 4. Hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de la SQB y SA, con la enzima Alcalasa®.</i>	53
<i>figura 5. Actividad antioxidante (método DPPH) “in vitro” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA.</i>	55
<i>figura 6. Actividad antioxidante (método DPPH) de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina®.</i>	56
<i>figura 7. Actividad antioxidante (método DPPH) de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Alcalasa®.</i>	57
<i>figura 8. Actividad antioxidante ABTS•. De los concentrados proteicos de semillas de quelite (CPSQB) y amaranto (CPA).</i>	59
<i>figura 9. Actividad antioxidante (método ABTS) de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina®.</i>	60
<i>figura 10. Actividad antioxidante ABTS de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con la enzima alcalasa®.</i>	61
<i>figura 11. % de inhibición de la agregación plaquetaria de los concentrados proteicos de SQB y SA.</i>	63
<i>figura 12. Porcentaje de inhibición “in vitro” de los hidrolizados SQB y SA con pepsina®.</i>	65
<i>figura 13. Porcentaje de inhibición “in vitro” de los hidrolizados de SQB y SA con alcalasa®.</i>	66
<i>figura 14. Actividad antitrombótica “in vitro” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA.</i>	68
<i>figura 15. Actividad antitrombótica “in vitro” de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con pepsina®.</i>	69
<i>figura 16. Actividad antitrombótica “in vitro” de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con Alcalasa®.</i>	70
<i>figura 17. Inhibición de la solubilidad micelar “in vitro” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA a diferentes concentraciones.</i>	72
<i>figura 18. Inhibición de la solubilidad micelar “in vitro” de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con Pepsina®.</i>	73
<i>figura 19. Porcentaje de inhibición “in vitro” de los hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con alcalasa®.</i>	75

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Principales enzimas comerciales utilizadas en la obtención de péptidos con diferentes actividades biológicas.</i>	14
<i>Tabla 2. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo</i>	17
<i>Tabla 3. Contenido de proteína del amaranto comparada a los principales cereales (g/100 g pasta comestible).</i>	23

<i>Tabla 4. Composición químico proximal y valor energético de las harinas y concentrados proteico de semillas de quelite blanco (A. hybridus) y amaranto (A. hypochondriaccus).</i>	48
<i>Tabla 5. Color de las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (A. hybridus) y amaranto (A. hypochondriaccus)</i>	49

## I. INTRODUCCIÓN

El sedentarismo, el estrés del día a día y los hábitos alimenticios poco saludables, producen una serie de enfermedades que aquejan a la sociedad de hoy en día, un ejemplo de ello, es el envejecimiento celular y las enfermedades del tipo crónico degenerativas, entre las cuales se encuentran la trombosis venosa profunda (TVP) y la hipercolesterolemia. Por otro lado, las especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres producen daño oxidativo al ADN, proteínas y otras macromoléculas tales como lípidos. En la medida en que las especies de oxígeno reactivo están implicadas en la etiología de muchas enfermedades multifactoriales degenerativas como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y, en general, el envejecimiento por lo que el interés en la investigación sobre el uso de antioxidantes naturales para su prevención y tratamiento ha ido en aumento (Ames et al., 1993).

Por otro lado, las enfermedades del tipo cardiovascular son la principal causa de decesos en la población mundial, de la cual México no es la excepción, ya que, de acuerdo con datos reportados por el INEGI (2010), la hipercolesterolemia y la TVP profunda se encuentran entre los principales padecimientos que afectan a la población teniendo una incidencia de 46 y 28% respectivamente, dichas cifras son verdaderamente alarmantes pues, estos padecimientos son precursores de infartos, lo que genera un incremento en las incidencias de estos.

La hipercolesterolemia es el aumento de los niveles de colesterol total en la sangre por encima de los niveles estimados deseables para la población general (200 mg/dL); a partir de un valor de 250 mg/dL se considera patológico y un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Agirrezabala et al., 2015). El tratamiento farmacológico para la regulación de los niveles de colesterol en sangre tiene como base estatinas, las cuales se encargan de inhibir en el hígado a la enzima HMG-CoA [3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A] reductasa, la cual es la responsable de la síntesis del colesterol. La Atorvastatina<sup>®</sup> es uno de los medicamentos más populares en el control de la hipercolesterolemia, sin embargo, su costo es elevado, además de que su uso prolongado trae como consecuencias diversos padecimientos, destacando los problemas de hígado graso (Ensanut, 2012).

La 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), el tratamiento sugerido para el control de la TVP consta de un anticoagulante, el cual, inhibe la formación de coágulos además de impedir que los coágulos ya presentes incrementen su tamaño. Algunos de los fármacos sugeridos para la trombosis son la Heparina<sup>®</sup> y Warfarina<sup>®</sup>, los cuales con su ingesta excesiva y uso constante pueden ocasionar hematomas, hemorragias, sangrados en la nariz o encías, hipersensibilidad, fiebre y comezón (Cadeza-Baglietto, 2016).

Es por ello que se han buscado coadyuvantes en fuentes naturales, los cuales, contribuyan en el control de las enfermedades anteriormente mencionadas, una de dichas fuentes podría ser el uso de péptidos bioactivos, los cuales al ser de origen natural, disminuyen la presencia de reacciones secundarias, y/o susceptibilidad de alergias a medicamentos por el uso prolongado de estos y a 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. En los últimos años, el estudio de los péptidos bioactivos presentes en las secuencias de las proteínas de los alimentos, ha recibido una gran atención desde el punto de vista funcional debido a que presentan diversas actividades biológicas, tales como, antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores. Tales péptidos son inactivos dentro de las proteínas precursoras y pueden ser liberados por proteólisis enzimática (Vioque et al., 2000).

Por todo lo anterior en el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto antioxidante, anticolesterolémico y antitrombótico *in vitro* de los hidrolizados proteicos obtenidos de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Estrés oxidativo y radicales libres

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), con los electrones que forman el enlace ( $\sigma$ ), antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo, por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente, expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee (Fridowich, 1978) El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Ames et al., 1993)

Por otra parte, desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (Cheesman, 1998). Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células

endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Expósito et al., 2000).

## **2.2 Enfermedades cardiovasculares**

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).

De acuerdo con la Secretaría de Salud (SSA, 2017), la trombosis coronaria representa una de las primeras causas de mortalidad en México, sin embargo, se desconocen las cifras exactas del número de casos 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.

## **2.3 Hipercolesterolemia**

La hipercolesterolemia es el aumento de los niveles de colesterol total en la sangre por encima de los niveles estimados deseables para la población general (200 mg/dL); a partir de un valor de 250 mg/dL se considera patológico y un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y enfermedad coronaria (Lu et al., 2001). Este padecimiento afecta a gran parte de la población mundial, el tratamiento contra este padecimiento involucra una dieta libre de grasas de origen animal, así como tratamiento farmacológico, sin embargo, al usar estos medicamentos durante tiempos prolongados genera otros padecimientos, tales como problemas hepáticos. Al incluir fracciones peptídicas con alguna actividad biológica específica podría ayudar a mejorar la calidad de vida de quienes padecen esta enfermedad. De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS, 2007) en México el 28% de la población presentan problemas de hipercolesterolemia.

### **2.3.1 Tratamiento farmacológico**

De acuerdo con la SSA, (2016) el tratamiento para coadyuvar la hipercolesterolemia, consta de control nutricional, terapia psicológica, y tratamiento farmacológico, el cual está basado en el empleo de estatinas. Las estatinas son los medicamentos más eficaces y mejor tolerados para el tratamiento de las dislipidemias. Estos fármacos son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) que cataliza un paso temprano en la síntesis de colesterol, además es la enzima que limita la velocidad de la síntesis de colesterol.

Las estatinas se han convertido en uno de los grupos farmacológicos más prescritos en todo el mundo desde los años 80's. Son utilizadas como el hipolipemiante de elección en la reducción del riesgo cardiovascular en pacientes de alto riesgo por sus beneficios demostrados en la disminución de la mortalidad y morbilidad cardiovascular (Vergara, 2015).

En general, las estatinas son bien toleradas, sin embargo, al ser utilizadas por periodos de tiempo prolongados traen consigo efectos secundarios severos sobre la salud de quien los consume. Entre los principales efectos adversos se encuentran; presencia de diarreas, hígado graso, y en ocasiones aumentan las enzimas hepáticas y ocasionan trastornos del musculo

esquelético (mialgias, miopatías y rabdomiólisis). La rabdomiolisis es un síndrome ocasionado por la lesión del músculo esquelético, que desencadena la liberación de la enzima creatina-cinasa (entre otras sustancias) hacia la circulación sanguínea (Baxter, 2009). Además de la elevación en las concentraciones de creatina-cinasa, los signos y síntomas de la rabdomiólisis comprende dolor muscular y debilidad, así como orina de color pardo rojizo (mioglobinuria).

## **2.4 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 (González, 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 1 ). 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).

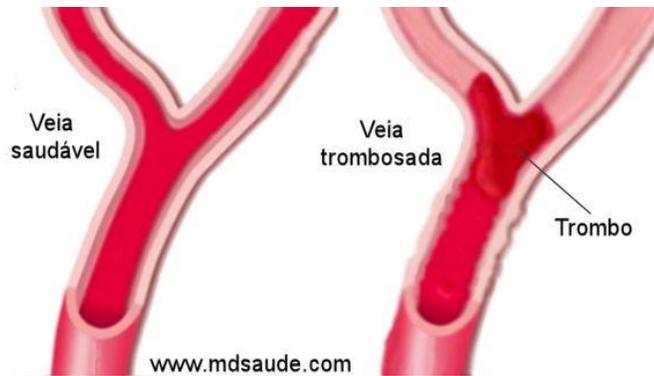


figura 1. Trombo formado en una vena. Fuente: MD.SAUDÉ®.  
<https://www.mdsauade.com/2013/12/trombose-venosa.html>

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 post-operatorios. 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 tromboticos (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 (González, 2006).

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

#### **2.4.1 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).

El tromboembolismo venoso (TEV) comprende dos condiciones relacionadas: la trombosis venosa profunda (TVP) y la tromboembolia pulmonar (TEP), la gravedad de esta última entidad está dada por las alteraciones que se presentan en el pulmón. La muerte súbita sucede en una cuarta parte de los pacientes con TEP; para los médicos clínicos esto es de gran preocupación, debido a que el tiempo para elaborar un diagnóstico y para iniciar una terapia es insuficiente (Heit, 2003). La incidencia anual de TEV es de 1 por cada 1,000 personas y se incrementa con la edad (Silverstein et al., 1998). La incidencia es menor de un caso por millón en menores de 15 años de edad, mientras que en adultos mayores de 85 años el riesgo es de 1 entre 100 habitantes (Cogo et al., 1994; Heit, 2003). Esta alta incidencia es constante desde 1980 y no se ha podido disminuir a pesar de que se conocen mejor los riesgos que la ocasionan (Heit et al., 2001). En el TEV la presentación clínica característica, como el dolor de piernas, la inflamación y el dolor torácico al respirar, está ausente en más de la mitad de los individuos afectados, incluyendo a aquellos que murieron por TEP. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con TEV importante no se reconocen ni reciben tratamiento (Gama-Hernández & Morales-Blanhir, 2008). Con respecto al riesgo según el género de la persona, se ha observado una mayor incidencia de TEV en hombres y éstos en edad avanzada, así como en mujeres obesas. El peso sugiere una alta incidencia en mujeres durante sus años de maternidad (Silverstein et al., 1998). Otros factores de riesgo independientes para TEV son: cirugía, trauma, estar hospitalizado o en un asilo, neoplasia maligna con o sin tratamiento con quimioterapia, catéter venoso central, trombosis venosa superficial previa y venas varicosas. Al menos 90% de los casos de TEP son resultado de trombosis venosa en las piernas. De esta manera la TVP y la TEP son expresiones clínicas de la misma enfermedad (Lee et al., 1999).

### **2.3 Péptidos bioactivos**

Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos que nutricionalmente proporcionan aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo humano. Desde el punto de vista funcional, estos afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, así como también, muchas proteínas de la dieta pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo humano (Korhonen et al., 1998).

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

En años recientes la Ciencia de los Alimentos y Nutrición se ha interesado en los péptidos biológicamente activos presentes en las proteínas de los alimentos. Tales péptidos son inactivos dentro de la proteína precursora y pueden ser liberados por proteólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal, durante el procesado de alimentos o mediante hidrólisis química o enzimática (Mulero-Cánovas et al., 2011). Los hidrolizados proteínicos se pueden elaborar mediante procesos químicos, ya sea con ácidos o álcalis, o mediante procesos biológicos empleando enzimas. El método enzimático es el más recomendado si los productos serán utilizados en el campo de los alimentos (Vioque et al., 2001). Los péptidos liberados actúan como componentes reguladores similares a las hormonas, dentro del cuerpo humano. Los péptidos bioactivos son secuencias aminoacídicas que tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, ayudando a prevenir y/o tratar diferentes desordenes en la salud, que favorecen al estado de bienestar de los humanos (Hernández-Ledesma et al., 2013; Segura-Campos et al., 2013a).

La función de los péptidos bioactivos está basada en su composición aminoacídica y su secuencia, además algunos péptidos pueden poseer propiedades multifuncionales (Korhonen & Pihlanto, 2006). Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de entre 2 y 20

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

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

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

La hidrólisis de proteínas en los alimentos se lleva a cabo buscando el mejoramiento de las características nutrimentales, el retardo del deterioro, el aumento de la solubilidad, el incremento de la formación de espuma, de las propiedades de coagulación y de la capacidad emulsificante, así como la remoción de sabores y olores desagradables y de sustancias tóxicas o inhibitorias (Lahl & Braun, 1994). En la hidrólisis de proteínas, la escisión de los enlaces peptídicos puede ser llevado a cabo por procesos enzimáticos o químicos. Los procesos químicos que incluyen la hidrólisis ácida o alcalina, tienden a ser difíciles de controlar, y el producto sufre una alta modificación de aminoácidos. Las condiciones de hidrólisis ácida

convencional para la determinación de aminoácidos, usa HCl 6 M a 110 °C por más de 24 h, puede destruir al aminoácido triptófano, mientras que la hidrólisis alcalina puede reducir el contenido de los aminoácidos cisteína, arginina, treonina, isoleucina, serina y lisina. Por otra parte, la hidrólisis enzimática requiere de condiciones no agresivas, evitando así las condiciones extremas para los tratamientos químicos, además de que no se disminuye el valor nutricional de la proteína (Tavano, 2013).

En la hidrólisis enzimática de las proteínas hasta obtener péptidos o aminoácidos libres, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Benítez et al., 2008). Las proteasas o enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad, lo cual permite desarrollar hidrolizados proteínicos con características químicas y nutricionales bien definidas (Badui, 2006; Tavano, 2013). Generalmente, las proteasas que se utilizan son mezclas enzimáticas de grado comercial, se venden en estado líquido o sólido y se clasifican de varias formas. Según su origen pueden ser de animales, vegetales, o microorganismos (bacterias y hongos) (Guadix et al., 2000). Durante la hidrólisis, la fuente de proteína, el tipo de enzima, la actividad biológica y las condiciones del proceso influyen en la composición de péptidos en el hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades funcionales (Van der Ven et al., 2002; Mulero-Cánovas et al., 2011).

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

su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico (Benítez et al., 2008).

En base a su actividad catalítica, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos: endopéptidasas, si hidrolizan enlaces internos de las cadenas peptídicas y exopéptidasas si hidrolizan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (Guadix et al., 2000). Estas últimas pueden dividirse a su vez en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal, como se aprecia en la figura 2.

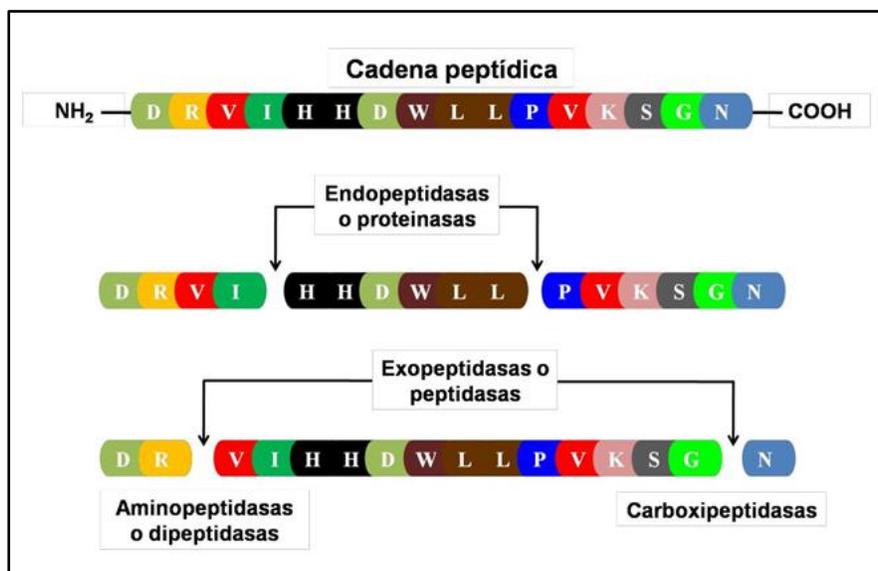


figura 2. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica (Torruco-Uco et al., 2008).

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

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

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

<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>					
<b>Preparaciones enzimáticas</b>					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima	Fruto de la papaya	Papaína cruda		5-9	Amplia especificidad
Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa	Páncreas (bovino y porcino)	Pancreatina	30-80	7-9	Muy amplia especificidad
Mezcla de serin-, aspartato y metalo-proteasas.	<i>Aspergillus oryzae</i>	Veron P, Sumicina LP, Biocina A	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
Mezcla de endo- y exoproteasas, actividad en pH alcalino y neutro.	<i>Streptomyces griseus</i>	Pronasa		7-9	Muy amplia especificidad

Fuente: Benítez et al. (2008).

Por otra parte, el grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez et al., 2008). Dependiendo del grado de hidrólisis (GH), los productos proteínicos pueden ser clasificados en hidrolizados parciales (GH < 10%) y extensivos (GH > 10%), cada uno de ellos presenta propiedades específicas que afectan a su utilización siendo los hidrolizados

extensivos una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos del organismo (Vioque et al., 2006).

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

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

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

Las proteínas ingeridas son primeramente hidrolizadas por varias proteinasas en el tracto gastrointestinal para producir oligopéptidos, algunos de los cuales pueden ser biológicamente activos, sin embargo algunas proteínas resisten la hidrólisis de las proteinasas permaneciendo intactas en el tracto. Algunos de los oligopéptidos formados durante la hidrólisis por peptidasas son de tamaño pequeño (di y tri-péptidos), los cuales son digeridos por peptidasas que se encuentran en el borde de la superficie de las células epiteliales para producir aminoácidos, no obstante algunos de éstos permanecen sin ser hidrolizados (Shimizu, 2004). Los di y tri-péptidos pueden ser absorbidos en forma intacta, atravesando la membrana intestinal, con ayuda de un sistema de transportadores peptídicos específicos. El

transportador peptídico PepT1 emplea un gradiente electroquímico transmembranal de protones como fuerza de transporte y con amplia especificidad (Yang et al., 1999). Algunos de los aminoácidos presentes en la célula son utilizados como fuente energética, otros sufren transformaciones metabólicas (transaminación de aminoácidos dicarboxílicos) antes de pasar a la sangre. A su llegada al hígado, una parte de los aminoácidos es captada y utilizada por este órgano, el resto entra en la circulación sistémica y son utilizados por los tejidos periféricos (Martínez-Augustin & Martínez de Victoria, 2006).

### 2.3.3 Actividad biológica de los péptidos

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

Las secuencias aminoacídicas de los péptidos tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, como se observa en la tabla 2, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización; también pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, memoria, dolor, apetito y los efectos de las vías de estrés del sistema nervioso central, ejerciendo sus efectos a nivel local o en diversos órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Ruiz-Ruiz et al., 2013a).

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

Péptidos	Efecto en el organismo
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares

Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

---

Fuente: Iwaniak & Minkiewicz (2007).

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

#### **2.3.4 Péptidos antioxidantes**

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que disminuye las concentraciones, retrasa o previene la oxidación de un sustrato de manera significativa (Hernández, 2003). Los antioxidantes actúan a distintos niveles: pueden disminuir las concentraciones de oxígeno en compartimentos localizados, prevenir el inicio de la reacción en cadena de especies de oxígeno reactivo (EOR), descomponer a los peróxidos y convertirlos en alcoholes e interrumpir la reacción en cadena al interceptar radicales hidroxilo o alcoxilo (Aruoma, 1996).

Existen muchas evidencias de que la oxidación de moléculas biológicas, membranas y tejidos, inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, se relaciona con un aumento en la incidencia de las principales enfermedades digestivas de los seres humanos. Por otro lado, también se ha acumulado abundante información sobre la capacidad de algunos componentes de los alimentos para disminuir o prevenir los procesos de oxidación celular (Murillo, 2006). Estudios epidemiológicos indican que las dietas ricas en frutas, vegetales y granos están asociadas con disminución de riesgo de varias enfermedades degenerativas tales como el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Esta asociación es a menudo atribuida a

diferentes componentes antioxidantes tales como la vitamina C, vitamina E, carotenoides, licopenos, polifenoles y otros fitoquímicos (Amin et al., 2006). Murillo (2006) menciona que el metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Esas especies con oxígenos activos incluyen el radical superóxido ( $O_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical óxido nítrico (NO). Cabe mencionar, que permanentemente estamos expuestos a radiaciones electromagnéticas que rompen el agua generando radicales OH. Por lo que, especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres producen daño oxidativo en el DNA, proteínas y otras macromoléculas tales como los lípidos (Dávalos et al., 2004).

Proteínas, hidrolizados de proteínas, péptidos individuales y aminoácidos han mostrado un significativo poder antioxidante. Algunos aminoácidos han sido encontrados por poseer una actividad antioxidante fuerte en ácido linoleico y sistemas linoleato de metilo. Las proteínas de una variedad de plantas, animales y fuentes microbianas, como el gluten, albúmina de huevo, caseína, proteína de soya y proteína de levadura han exhibido actividad antioxidante. En muchos casos, las fracciones peptídicas o los hidrolizados de proteínas han mostrado una mayor actividad antioxidante que las proteínas intactas o mezclas de aminoácidos, sugiriendo que los péptidos juegan un mayor papel en la actividad antioxidante de las proteínas.

### **2.3.5 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).

### **2.3.6 Péptidos anticolesterolémicos**

La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Los niveles de colesterol plasmático están influenciados por distintos factores como son la dieta, su biosíntesis, absorción y secreción. Para su absorción intestinal, necesita ser solubilizado en forma de micelas constituidas por ácidos biliares y otros lípidos, por lo que aquellos mecanismos o sustancias que reduzcan la absorción intestinal del colesterol son considerados beneficiosos para la salud. Se ha observado que las proteínas de la dieta pueden afectar la concentración de colesterol sérico (Nagaoka et al., 2001) Las proteínas más estudiadas han sido las de soja y las de la leche, siendo las proteínas de la soja más hipocolesterolémicas que la caseína. El efecto hipocolesterolemia de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones de los mismos:

- Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol.

- Algunos péptidos pueden incrementar la concentración o el número de los receptores LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta (Nagaoka et al., 1999).

Debido al hecho que el colesterol necesita ser primero solubilizado en forma de micelas constituidas por ácidos biliares y otros lípidos para su absorción intestinal, se ha sugerido que los péptidos con actividad hipocolesterolémica pueden competir con el colesterol por un sitio en dichas micelas reduciendo de esta forma la solubilidad del colesterol, su absorción intestinal y por ende los niveles de colesterol plasmático.

Pocos péptidos con actividad hipocolesterolémica han sido secuenciados y su relación estructura-actividad bien definida. Sin embargo, por su naturaleza anfifílica, la hipótesis más aceptada en el mecanismo de acción de dichos péptidos es la de competir con el colesterol en las micelas que lo contienen y que son absorbidas en el yeyuno. Así, los péptidos IIAEK, LPYP y WGAPSL han sido aislados del hidrolizado tróptico de leche bovina (Nagaoka et al., 2001), de la glicina de soya (Kwon et al., 2002) y de hidrolizados con alcalasa de soya (Zhong et al., 2007), respectivamente.

### **2.3.5 Fuentes de obtención de péptidos bioactivos**

Toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos bioactivos, siendo los más estudiados los péptidos aislados de la leche humana y de vaca, además se han aislados péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas muy diversas: sardina, maíz, soya, gelatina (Baró et al., 2001). Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes alimenticias como: proteína miofibrilar de porcino (Saiga et al., 2003), yema de huevo (Yoshii et al., 2001; Miguel et al., 2006), del músculo y esqueleto de pescado (Neves et al., 2004; Je et al., 2004), de la proteína de la leche (caseínas) y suero de la leche (Warner et al., 2001; Sipola, 2002; Hosono et al., 2002; Gobbetti et al., 2004).

Como las proteínas animales, tradicionalmente empleadas por su gran valor nutritivo y propiedades funcionales, son difíciles de adquirir debido a su elevado costo de producción,

ha sido necesario buscar alternativas de menor costo, de fuentes regionales y con la viabilidad de reducir los riesgos de enfermedades crónicas, siendo las proteínas vegetales la mejor alternativa (Córdova-Lizama et al., 2013). En países desarrollados, las proteínas vegetales son consideradas tanto como ingredientes funcionales versátiles, y como componentes biológicamente activos, más que como nutrientes (Adebowale et al., 2005). Recientemente se ha encontrado que las fuentes de origen vegetal presentan un contenido elevado de proteínas, el cual es importante para ser explotadas en la obtención de ciertos componentes bioactivos como son: péptidos, fracciones peptídicas y aminoácidos libres, que pueden tener cierta actividad benéfica al organismo (Clemente et al., 1999). Recientemente se ha encontrado que las fuentes de origen vegetal presentan un contenido elevado de proteínas, el cual es importante para ser explotadas en la obtención de ciertos componentes bioactivos como son: péptidos, fracciones peptídicas y aminoácidos libres, que pueden tener cierta actividad benéfica al organismo (Clemente et al., 1999). Es por ello, que la Ciencia de los Alimentos, ha mostrado interés por el uso de los pseudocereales, entre los cuales se encuentran los amarantos, estos además de ser ricos en proteína, son a la vez de buena calidad, ya que, son ricas en aminoácidos esenciales.

#### **2.4 Amaranto**

El amaranto es cultivado en América, su cultivo se remonta a más de siete mil años. Se produce en países tradicionales como México, Perú, Bolivia, otros como China, Estados Unidos y la India. Esta semilla es una fuente importante de proteínas ya que el contenido proteico de este grano oscila entre el 13.2 y el 18.2% de su peso, conteniendo el doble de proteína que el maíz y el arroz, y 60 a 80 % más comparado con el trigo (Gorinstein et al., 2010). Así mismo es fuente de ácido fólico, niacina, calcio, hierro, fósforo y vitaminas como A, B, C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> siendo también un alimento con gran cantidad de aminoácidos como la lisina (Chatuverdi et al., 1993).

El consumo de amaranto estaba muy arraigado entre los Aztecas. Era considerado un alimento ritual, que se utilizaba en la elaboración de diversos alimentos tales como atoles, tamales, pinole y tortillas, y sus hojas se consumían también como verdura. Las zonas de

producción y cultivo de amaranto son las mismas de la época precolombina. El Estado de Puebla es el mayor productor de amaranto en México con el 51% de la producción total nacional. Le sigue Morelos, Tlaxcala, el Distrito Federal, el Estado de México y Guanajuato con el 22, 18, 9, 6 y 2% respectivamente (INEGI, 2007).

Las semillas de amaranto presentan un interesante contenido de proteínas (12-18%) y mayores niveles de lisina que los cereales (Barba de la Rosa et al., 1992). El contenido de proteínas se incrementa hasta el 20% en las harinas desgrasadas y hasta el 75% en los aislados proteicos de amaranto. Asimismo, el contenido lipídico de las semillas de amaranto presenta un atractivo balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados junto con elevados niveles de escualeno (Berganza et al., 2003). Entre sus acciones benéficas destacan que las pequeñas semillas contienen niveles considerables de proteínas de alta calidad y bajos niveles de ácidos grasos saturados en la fracción de aceite. Además de su alto valor nutritivo, el grano de amaranto tiene un importante efecto hipocolesterolémico en roedores (Berger et al., 2003).

#### 2.4.1 Valor nutricional del amaranto

El amaranto es un pseudocereal con un muy alto valor nutritivo por su alto contenido de proteínas (Tabla 3 ), aminoácidos y minerales; en los últimos años se ha comprobado, por medio de técnicas analíticas modernas, la alta calidad y cantidad de proteínas que contiene el amaranto, lo que llama la atención de los especialistas en alimentos (García et al., 2010). El amaranto posee entre 14 y 18 g de proteína, valor superior al de todos los cereales (trigo: 10 a 15 g; arroz: 5 a 8 g); las extraordinarias propiedades nutricionales y fisicoquímicas de la proteína están bien documentadas; su importancia no radica en la cantidad sino en la calidad de la misma con un excelente balance de aminoácidos (ante todo los esenciales).

**Tabla 3.** Contenido de proteína del amaranto comparada a los principales cereales (g/100 g pasta comestible).

CULTIVO	PROTEÍNA
Amaranto	13.6-18.0

<b>Cebada</b>	9.5-17.0
<b>Maíz</b>	9.4-14.2
<b>Arroz</b>	7.5
<b>Trigo</b>	14.0-17.0
<b>Centeno</b>	9.4-14.0

Fuente: National Academy of Sciences (1975).

El amaranto se destaca por un contenido importante de lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana, que comúnmente es más limitante en otros cereales. Según la FAO y la OMS, sobre un valor proteico ideal de 100%, el amaranto posee 75%, la leche vacuna 72%, la soja 68%, el trigo 60 %y el maíz 44%. Cuando se realizan mezclas de harina de amaranto con harina de maíz, la combinación resulta excelente, llegando a índices cercanos del 100%, porque el aminoácido que es deficiente en uno abunda en el otro. Además, la digestibilidad de su grano es del 93%.

Actualmente, diversas investigaciones se centran en el estudio de las proteínas, no sólo como componentes nutricionales, o por sus propiedades funcionales, sino como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos, ya que todas las fuentes de proteínas alimentarias, aportan péptidos funcionales.

#### **2.4.2 variedades de amarantos**

El *Amaranthus sp* como cultivo es originario de América. *A cruentus*, *A caudatus* y *A hypochondriacus* son las tres especies domesticadas para utilizar su grano, y probablemente descienden de las tres especies silvestres; *A powelli*, *A quitensis* y *A hybridus*, respectivamente, todas de origen americano; aunque se sostiene que *A quitensis* es sinónimo de *A hybridus* y que solamente esta última podría ser la antecesora de las tres cultivadas.

La familia Amaranáceas se compone de 60 géneros y alrededor de 800 especies, 60 de estas especies son cosmopolitas y crecen particularmente en sitios perturbados en donde se les considera como malezas.

Existe una amplia variabilidad en las diferentes especies del género. Solo tres de ellas son cultivadas: *Amaranthus hypochondriacus*, originario de México, *Amaranthus cruentus*, originario de Guatemala y el sureste de México y *Amaranthus caudatus*, cuyo origen es América del Sur. Asociadas a éstas existen tres especies de malezas: *A. powelli*, *A. hybridus* y *A. quitensis*.

#### **2.4.3 Quelite blanco (*A. hybridus*)**

El quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) es una especie anual de origen sudamericano que se reproduce por semillas. Pertenece a la familia de las Amarantáceas, que comprende más de 60 especies entre las que se encuentran algunas comestibles, difundidas en las regiones cálidas y templadas (Burkart 1978).

#### **2.4.4 Amaranto (*A. hypochondriacus*)**

Sauer (1950; 1967) indica que *Amaranthus hypochondriacus* es otra importante especie para la producción de grano y es originaria de México, ya que aquí se le cultivaba desde el tiempo de los Aztecas, actualmente se sigue cultivando y se encuentra ampliamente distribuida en México; también se cultiva en los Himalayas en Nepal y en el sur de la India donde se han formado centros secundarios de diversificación.

### III. ANTECEDENTES

En la actualidad, diversas investigaciones se centran en la obtención de componentes bioactivos que posean diferentes actividades.

Rajapakse et al. (2005), evaluaron la actividad antitrombótica de hidrolizados proteínicos obtenidos del pez limanda (*Limanda aspera*), usando siete enzimas diferentes: alcalasa, neutrasa, pepsina, papaína,  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina y la enzima cruda del ciego pilórico del atún (TPCCE, por sus siglas en inglés). Determinaron la actividad anticoagulante de los hidrolizados mediante las pruebas de coagulación de tiempo parcial de tromboplastina activado (APTT, por sus siglas en inglés), tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés) y tiempo de trombina (TT). Los resultados mostraron que todos los hidrolizados después de 4 h de reacción, prolongaron APTT, pero no PT y TT, sin embargo, la mayor prolongación de APTT se presentó en el hidrolizado de  $\alpha$ -quimiotripsina ( $68.4 \pm 0.5$  s), por lo que, este hidrolizado fue fraccionado secuencialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), identificaron el peso molecular de la fracción purificada en 12.01 kDa. La secuencia aminoacídica (TDGSELYGILEIDSR) fue determinada por un secuenciador de proteínas automatizado acoplado a un sistema HPLC. Determinaron la especificidad de la actividad sobre los factores de coagulación activados, usando una prueba de coagulación modificada de APTT, con lo que identificaron que la fracción inhibió el factor FXIIa y fue nombrada YAP, por su acrónimo en inglés *yellowfin sole anticoagulant protein* (Proteína anticoagulante del pez *Limanda*). Se determinó la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria mediada por adenosín difosfato (ADP), trombina y colágeno. Los resultados mostraron que la inhibición de la agregación mediada por la trombina fue mayor que la mediada por ADP en todas las concentraciones de YAP evaluadas, no obstante, la agregación fue completamente inhibida en concentraciones de 600 y 660  $\mu$ M, respectivamente. Lo anterior, indicaron estos autores se debió a que YAP es un potente inhibidor del receptor de

superficie celular glicoproteínico GPIIb/IIIa. A pesar de lo anterior, YAP no inhibió la adhesión plaquetaria mediada por el colágeno vía glicoproteína GPIa/IIa. Se concluyó, que los hidrolizados de proteína del pez limanda son moléculas bioactivas potentes.

Zhang et al. (2008), evaluaron la actividad antioxidante y antitrombótica de péptidos y fracciones peptídicas obtenidos por extracción enzimática acuosa a partir de semillas de colza (*Brassica napus*). La extracción de los péptidos (CRPs) y sus fracciones (RP25 y RP55) fue realizada con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa y tuvieron un peso molecular  $\leq$  600 Da. El ensayo de la actividad antitrombótica se llevó a cabo evaluando la capacidad para inhibir la coagulación del fibrinógeno catalizada con trombina. Los resultados mostraron que los péptidos de *Brassica napus* poseen una marcada actividad antitrombótica. Para CRPs, el efecto inhibitorio fue de 90% a concentraciones de 30 y 40 mg/mL, aunque el efecto inhibitorio no fue dependiente de la dosis. El efecto inhibitorio de RP25 y RP55 fue de 90% en concentraciones de 50 mg/mL, sin embargo, estas dos fracciones peptídicas exhibieron que a menor concentración, disminuyó la actividad antitrombótica. Estos resultados fueron comparados con la actividad antitrombótica de la heparina, un fármaco común para el tratamiento de la trombosis, que mostró tener un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, con una dosis media efectiva ( $ED_{50}$ ) de 0.07 mg/mL. Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad antioxidante, indicaron que RP55 y CRPs mostraron mayor poder reductor del radical DPPH<sup>+</sup> que RP25 con un  $ED_{50}$  72, 41 y 499  $\mu$ g/mL, respectivamente. Estos autores concluyeron que las proteínas y péptidos de *Brassica napus* podrían ser usados para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, además de que las actividades antioxidante y antitrombótica son nuevas características funcionales que presentaron los péptidos de la semilla de colza, expandiendo sus aplicaciones como ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales.

Kongo et al. (2011), evaluaron la actividad anticolesterolemica *in vitro* en hidrolizado proteínico de maíz obtenidos por hidrólisis enzimática con Flavorzyme<sup>®</sup> para la producción de hidrolizados con actividad hipocolesterolemica, para su posible aplicación en alimentos funcionales para ello, utilizaron aislado proteico de maíz el cual se preparó en un medio alcalino. En el hidrolizado obtenido evaluaron la actividad hipocolesterolemica mediante dos

método, el primero fue la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol, y el segundo fue la capacidad de unión con los ácidos biliares. Los ácidos biliares utilizados fueron: glicocolato de sodio, colato de sodio y desoxicolato de sodio. Como resultados obtuvieron que los hidrolizados obtenidos a 90 min con Flavourzyme® mostraban un GH de 12.25%. Además de tener una actividad hipocolesterolemica eficaz de 67.42, 19.01, 9.99 y 86.90% de la inhibición del colesterol micelar solubilidad, glicocolato de sodio, colato de sodio y desoxicolato de sodio, respectivamente.

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

actividad antitrombótica mediante la unión de estas al fibrinógeno o mediante la inhibición de la actividad de la trombina.

Estos estudios, son algunos de los cuales demuestran el potencial de los hidrolizados proteicos, a partir de materias primas alimenticias, como componentes bioactivos. Mostrando que las amarantáceas poseen diversas actividades biológicas, entre las cuales resaltan la antioxidante, antitrombótica y anticolesterolémica. Con base en esto, se sugiere el estudio de dichas matrices alimentarias, como coadyuvantes en el tratamiento de algunas enfermedades tales como hipercolesterolemia y trombosis, así como su posible uso en la formulación de alimentos funcionales.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Si bien el O<sub>2</sub> es vital en múltiples funciones fisiológicas, al generarse ciertas reacciones químicas y bioquímicas en el organismo se producen sustancias prooxidantes, generando el estrés oxidativo. Considerando el estilo de vida agitado, y los hábitos alimenticios inadecuados, los cuales, promueven el incremento en la producción de dichas sustancias, así como a la generación de radicales libres, los cuales pueden afectar de diferentes maneras al ser humano, causando diversos padecimientos. Por otra parte, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causa de defunción a nivel mundial. En México anualmente mueren alrededor de 227,978 personas a causa de una enfermedad cardiovascular, de acuerdo con el Instituto Mexicano de Salud Cardiovascular (2010), teniendo mayor incidencia en el padecimiento de trombosis venosa, pues aproximadamente el 28% de la población mexicana, padece dicha enfermedad (SSA, 2015). Entre los principales precursores de las enfermedades del tipo cardiovascular se encuentra la hipercolesterolemia, esta afección ocurre cuando el nivel de colesterol sérico total se encuentra por encima de los 200 mg/dL (en sangre) generando su acumulación en las paredes de los vasos sanguíneos y arterias. Aunque actualmente se cuenta con tratamiento farmacológico tanto para tratar la trombosis venosa, como para reducir los niveles de colesterol total, el uso prolongado de dichos fármacos trae como consecuencia diversas afecciones (formación de hematomas, hemorragias, trombocitopenias, toxicidad hepática, problemas de hígado graso, cirrosis no alcohólica) sobre la salud de quien los consume. Es por ello que desde hace algunas décadas se han buscado alternativas que ayuden a disminuir el desarrollo de dichas enfermedades; una de las alternativas propuestas es el uso de péptidos bioactivos, los cuales se pueden obtener de la hidrólisis de las proteínas de fuente tanto animal como vegetal, dentro de las fuentes vegetales se han obtenido de algunos pseudos cereales como el amaranto el cual presenta un alto contenido de proteínas de buena calidad, ya que son ricas en aminoácidos esenciales, y este puede ser de uso potencial para la obtención de compuestos bioactivos con actividades antioxidantes, antitrombótica y anticolesterolemica, por lo que en este trabajo se propone utilizar las variedades *A. hibrydus* y *A. hypochondriaccus* como fuente de proteínas para ser sometidas a hidrólisis enzimática

empleando enzimas comerciales, esto con el fin de obtener de péptidos bioactivos que ayuden en el tratamiento de dichos padecimientos.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Obtener hidrolizados proteicos a partir de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*) empleando enzimas comerciales, evaluar su efecto sobre la solubilidad micelar de colesterol, así como su efecto sobre la agregación plaquetaria y su capacidad antioxidante.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Obtener y caracterizar física y químicamente las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*) y calcular el valor energético.
- b) Evaluar las cinéticas de hidrólisis extensiva de los concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*) a diferentes tiempos de reacción al emplear las enzimas comerciales pepsina<sup>®</sup> y alcalasa<sup>®</sup> de manera individual.
- c) Evaluar de manera “*in vitro*” la capacidad antioxidante de los concentrados e hidrolizados proteicos de semillas quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*).
- d) Evaluar la actividad inhibidora sobre la agregación plaquetaria “*in vitro*” tanto en los concentrados como en los hidrolizados proteicos de semillas quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*).
- e) Evaluar de manera “*in vitro*” la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol de los concentrados e hidrolizados proteicos de semillas quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de la materia prima

Las semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) se obtuvieron de la comunidad Sección Los Bibiano de San Felipe Jalapa de Díaz, Oaxaca, México, la cual se localiza a una altitud de 137 msnm

El amaranto (*A. hypochondriaccus*) (cultivado en el Municipio de San Salvador el Verde, Puebla, México a una altitud de 2,320 msnm) se adquirió en el mercado local de Tuxtepec, Oaxaca.

Todos los reactivos empleados en esta investigación fueron de las marcas reconocidas tales 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 Obtención de las harinas de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*)

Los granos de amaranto y de quelite blanco fueron secados en una estufa Binder mod. ED 115, Germany a una temperatura de 55 °C durante 3 h, estos eran agitados cada hora con el fin de obtener un secado homogéneo, reducir las pérdidas de las propiedades nutrimentales y que el contenido de humedad posterior al secado fuera menor a 12%. Posterior al secado se realizó la molienda de cada uno de los granos, para ello se utilizó un molino para café marca Krups® acero inoxidable modelo GX410011V, hasta obtener un tamaño de partícula capaz de pasar a través de una malla de No. 80 (0.177 mm). Una vez obtenidas las harinas estas fueron almacenadas en botes de plástico a temperatura ambiente hasta su utilización.

### 6.3 Desengrasado de la harina por ultrasonicación

Las harinas obtenidas tanto de amaranto como de semillas de quelite blanco, fueron sometidas a ultrasonicación, para reducir el contenido de grasa de las mismas, para ello se

utilizó un baño ultrasonico Misonix 3000 en el cual se introdujeron frascos de cristal con tapas metálicas los cuales contenían 15 g de harina y 250 mL de hexano. Las harinas se sonicaron durante 20 min a una temperatura de 50 °C a una frecuencia de 60 Hz, posteriormente fueron filtradas en papel whatman n° 1 para recuperar las harinas ya desengrasadas.

#### **6.4 Obtención de los concentrados proteicos de las semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*)**

Los concentrados proteicos se obtuvieron de acuerdo a la técnica descrita por Guerra-Almonacid et al. (2015) con algunas modificaciones. La harina desengrasada se suspendió en una relación 1:10 (p/v) (para la harina de semillas de quelite blanco) y 1:20 (p/v) (para la harina de amaranto) en NaOH pH 11. Se mantuvo en agitación con un agitador mecánico durante 90 min a 400 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó en una centrifuga refrigerada (Hettich zentrifugen, Rotina 380 R, Alemania) a 4500 rpm por 34 min a 10 °C, se recuperó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en NaOH pH 11 (2 veces más). Una vez obtenido el sobrenadante se ajustó el pH con HCl 1 N, a 4.32 para las semillas de quelite blanco y pH 4.5 para amaranto (punto isoeléctrico). Una vez ajustado el pH se dejó precipitar la proteína durante 24 h a una temperatura de 16 °C, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 34 min a 10 °C. Se recuperó el precipitado y se realizaron 5 lavados con agua desionizada. El precipitado fue secado en una liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.5 Liter, Estados Unidos de América) a -47 °C y  $13 \times 10^{-3}$  mbar.

#### **6.5 Composición química proximal de las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco y amaranto.**

Se realizó en análisis químico proximal a las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco y amaranto, por triplicado de acuerdo con los métodos de la AOAC (2012); humedad (925.09), cenizas (923.03), proteínas (960.59), grasas (920.39), fibra cruda (962.09) y el extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia.

**a) Humedad (925.09):**

La humedad fue determinada por pérdida de peso de la muestra después de ser secada 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

$$\%H = \frac{(PI - PF)}{(PI - PC)} \times 100$$

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) Cenizas (923.03):**

Las cenizas se calcularon como el peso remanente después de calcinar la muestra en una mufla a 550°C durante 4 h. En un crisol a peso constante se pesaron 2 g de muestra, los cuales se calcinaron en una placa de calentamiento, hasta que ya no se desprendieron humo, cuidando que se proyectaran fuera del crisol. El crisol se introdujo en una mufla a una temperatura de 550 °C durante 4 h, una vez transcurrido este tiempo se apagó la mufla y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se sacaron los crisoles y se colocaron en un desecador. De manera cuidadosa se pesó nuevamente el crisol con la muestra incinerada. El total de cenizas se calculó con la siguiente ecuación:

Ecuación 2  $\%C = \frac{B-A}{M} \times 100$

Dónde:

%C = Porcentaje de cenizas

A = Peso del crisol vacío (g)

B = Peso del crisol con cenizas (g)

M = Peso de la muestra (g)

**c) Proteína cruda (960.59):**

El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl, calculando el contenido de proteína como nitrógeno x 6.25 (factor de conversión de nitrógeno a proteína). Se pesaron 40 mg de la muestra en un tubo microKjeldahl, se adicionaron 2 g de catalizador y 3 mL de HSO<sub>4</sub>, se puso a digerir la muestra en el equipo de digestión de microKjeldahl hasta que clarificara manteniendo la temperatura durante un tiempo de 2 – 2.5 h y posteriormente se dejó enfriar. El residuo se disolvió en 10 mL de agua destilada. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 50 mL de solución de ácido bórico al 5% con 3 gotas de indicador de shiro tashiro, dicho matraz se colocó en la terminal del condensador. El tubo con muestra fue colocado en el destilador y se le adicionaron 10 mL de una solución de hidróxido de sodio al 60% con tiosulfato de sodio al 5%.

Posteriormente se inició la destilación por arrastre de vapor recolectando entre 75 a 100 mL del destilado. Esta solución se tituló con HCl al 0.01 N hasta que viró el indicador de verde a violeta. El contenido de proteína se determinó de acuerdo a la ecuación 3:

Ecuación 3

$$\%N = \left( \frac{(V_2 - V_1)(eqN)(N)}{M} \times 100 \right) (F)$$

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)

**d) Grasa cruda (920.39):**

La grasa cruda se cuantificó después de la extracción de la muestra durante 6 h con hexano en un sistema Soxhlet. Se pesaron 2 g de muestra deshidratada en un papel whatman n° 1, el cual fue doblado perfectamente para formar un cartucho de tal forma que la muestra quedara segura, una vez formado el cartucho se colocó en el aparato de extracción Soxhlet, utilizando un matraz de fondo plano previamente tarado (a peso constante) se colocaron 200 mL de hexano. El hexano se extrajo a reflujo durante 6 h, a una velocidad de condensación de 3 a 5 gotas por segundo; al término de la extracción se realizó la recuperación del solvente dentro del mismo equipo, para ello se retiró el cartucho que contenía la muestra ya desgrasada. El matraz se llevó a peso constante a una temperatura de 90 °C y se dejó enfriar en un desecador para después ser pesado. El contenido total de grasa se determinó de acuerdo con la ecuación 4:

Ecuación 4

$$\%EE = \frac{B - A}{M} \times 100$$

Dónde:

%EE = Porcentaje de extracto etéreo

A = Matraz a peso constante (g)

B = Matraz con extracto etéreo (g)

**e) Fibra cruda (962.09):**

Se realizó mediante una digestión acido-alcalina. Para ello se pesaron 2 g de muestra previamente desengrasada y seca, 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. 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. Enseguida 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 3 lavados con agua en punto de ebullición. Posteriormente se colocó el crisol en el horno a 105 °C por 12 h y se dejó enfriar en el desecador. Al término del enfriamiento los crisoles con el residuo se pesaron de manera rápida. La expresión de resultados se determinó bajo las condiciones de la ecuación 5:

Ecuación 5

$$\%FC = 100\left(\frac{A - B}{C}\right)$$

Donde:

%FC= contenido de fibra cruda (%)

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

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

#### **f) Carbohidratos totales (ELN):**

Los carbohidratos totales se estimaron por diferencia al 100% como el extracto libre de nitrógeno (ELN), una vez obtenidos los valores de los otros componentes.

#### **g) Aporte energético**

El aporte total de energía se calculó en KJ/100 g, para ello se consideraron los porcentajes obtenidos en el Análisis químico proximal, multiplicando cada valor por el aporte energético de cada componente.

## 6.5 Determinación de color de la harina y concentrado proteínico

El color de la harina y del aislado proteínico se determinó mediante un colorímetro (HunterLab, UltraScan® Vis, Estados Unidos de América). Se obtuvieron los valores L\* (Luminosidad), a\* (grado de color desde –verde a +rojo) y b\*(grado de color desde –azul a +amarillo). El equipo instrumental fue calibrado con un estándar blanco. Los valores de L\*, a\* y b\* del estándar blanco fueron 99.54, -0.13 y 0.05 respectivamente, donde L\* = 100 se asocia con el blanco y L\* = 0 con el negro (Wani et al., 2013). La diferencia de color total  $\Delta E$  fue calculada usando la ecuación No. 6:

Ecuación 6

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

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

## 6.6 Hidrólisis del concentrado proteico

Para la hidrólisis de los concentrados proteicos se utilizó el método empleado por Vercruyse 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 y como variable de respuesta el grado de hidrólisis. Cada enzima se evaluó de manera individual. Por lo que, el proceso de digestión se realizó bajo las siguientes condiciones: para la Pepsina® el pH se ajustó a 2 con HCl 1 N y se incubó por 90 min a una temperatura de 37 °C con una relación 1/1 (enzima/sustrato). 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, el cual fue equipado con un agitador magnético, termómetro y un electrodo para mantener un control sobre la temperatura y pH de la reacción. En ambos casos se tomaron muestras a los 5, 15, 30, 45, 60 y 90 min de reacción. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 85 °C por 15 min a baño maría. Todas las muestras se centrifugaron en una centrifuga (Hettich zentrifugen, Rotina 380 R, Alemania) a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se filtró y se secó en liofilizadora (Labconco, FreeZone 4.5 Liter, Estados Unidos de América) a -47 °C y 13 x 10<sup>-3</sup> mbar. Posteriormente se almacenaron a -10 °C hasta su utilización.

### **6.7 Determinación del grado de hidrólisis**

El porcentaje del grado de hidrólisis (% GH) se determinó por el método de ortoftaldehído (OPA, por sus siglas en inglés). Este método se basa en la reacción entre los grupos amino y el OPA en presencia de un grupo tiol, formando un compuesto colorido detectable a 340 nm. Para la obtención del grado de hidrólisis se aplicó la ecuación No. 7:

Ecuación 7

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

Donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h<sub>tot</sub> es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína, dependiente de la composición aminoacídica de la materia prima (Nielsen et al., 2001).

### **6.8 Evaluación *in vitro* de las actividades biológicas de los hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco y amaranto.**

Se evaluaron “*in vitro*” las actividades biológicas antitrombótica mediante la medición de la inhibición de la agregación plaquetaria, anticolesterolemica por la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol, y la capacidad antioxidante mediante los métodos DPPH\*

y ABTS\*, en los hidrolizados a los diferentes tiempos de hidrólisis y se compararon con los concentrados proteicos.

### 6.8.1 Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante en los concentrados e hidrolizados proteicos por los métodos 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS.

#### 6.8.1.1 Método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•)

El DPPH es un radical estable de color violeta, cuya absorbancia disminuye al ser reducido por un antioxidante, la capacidad antioxidante una muestra, se cuantifica midiendo el porcentaje de decoloración de una disolución metanólica del radical DPPH.

Para la determinación de la capacidad antioxidante a partir del radical DPPH, se siguió lo establecido por Braca et al. (2002). Para ello se pesaron 2.4 mg del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y se aforó a 100 mL con metanol. Se prepararon las muestras tomando como inicio 10000 ppm en 1000 µL de metanol; se hicieron diluciones a 5000, 2500, 1000, 500, 250, 50 y 25 ppm. Posteriormente los microtubos fueron forrados con aluminio y se adicionaron 975 µL de DPPH• y 25 µL de muestra; los cuales se dejaron reposar durante 15 min en total oscuridad. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 515 nm. La capacidad antiradicalaria fue calculada utilizando la ecuación 8. La actividad antiradicalaria fue graficada, a partir de ella se obtuvo la ecuación de la recta de la cual se tomaron los valores de  $m$  para calcular el  $IC_{50}$ , el cual es la concentración inhibidora máxima media, dicho en otros términos, es la concentración mínima requerida de una sustancia para lograr el 50% de la actividad biológica en cuestión, para calcular el  $IC_{50}$  se utilizó la ecuación 9:

Ecuación 8

$$\%DPPH = \frac{Ac - Am}{Ac} \times 100$$

Donde:

%DPPH: Actividad antiradicalaria

Ac: absorbancia control

Am: absorbancia de la muestra

Ecuación 9

$$IC_{50} = \frac{ms - mc}{mc} \times 100$$

Donde ms es la pendiente de cada concentración y mc es la pendiente del control.

### 6.8.1.2 Método 2,2-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) o ABTS•+

Se empleó el ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS•+. Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS•+, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS•+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 415 ó 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS•+ con persulfato de potasio.

Con algunas modificaciones se empleó el método descrito por Re et al. (1999); para ello se pesaron 77.6 mg de reactivo ABTS•+ y se colocaron en un frasco ámbar, al cual, se adicionaron 20 mL de agua destilada para obtener una concentración de 7 mM en solución acuosa. Posteriormente se pesaron 13.2 mg de persulfato de potasio (2.45 mM) y se hicieron reaccionar con la solución de ABTS•+. Se homogenizaron y se incubó entre 12-16 h a temperatura ambiente y en total oscuridad, ya que, el radical permanece estable hasta por 2 días cuando se cuidan estas condiciones. La solución ABTS•+ se diluyó en etanol absoluto hasta obtener una absorbancia inicial de  $0.7 \pm 0.02$  a 732 nm. Por otra parte se preparó la muestra teniendo como inicio 10000 ppm y se mezclaron con 1000  $\mu$ L etanol, se realizaron diluciones a 5000, 2500, 1000, 500, 250, 50 y 25 ppm. Posteriormente, en tubos eppendorf se colocaron 950  $\mu$ L de ABTS•+ y 50  $\mu$ L de muestra, se dejaron reposar durante 60 min. Paso el tiempo de reposo, en un espectrofotómetro se leyó en la absorbancia a 732 nm. La capacidad antiradicalaria fue calculada utilizando la ecuación 10. La actividad antiradicalaria fue graficada, a partir de ella se obtuvo la ecuación de la recta de la cual se tomaron los valores de b y m para calcular el  $IC_{50}$  por la ecuación 9:

Ecuación 10

$$\%ABTS = \frac{Ac - Am}{Ac} \times 100$$

Donde:

%ABTS•: Actividad antiradicalaria

Ac: absorbancia control

Am: absorbancia de la muestra

### 6.8.2 Inhibición “*in vitro*” de la agregación plaquetaria

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

La sangre colectada, se colocó de inmediato en tubos Vacutainer (4.5 mL) con citrato de sodio al 3.2% (relación anticoagulante/sangre 1:9 v/v) para evitar la coagulación y se mantuvo a temperatura ambiente para ser usada dentro de las siguientes 3 h. Posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 10 °C para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) como sobrenadante. La fase residual se centrifugó de nuevo a 3400 rpm durante 20 min a 10 °C para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El conteo de plaquetas en el PRP no fue ajustado a un intervalo determinado (Sakariassen et al., 2012). El PRP (900 µL) fue incubado a 37 °C durante 5 min, con 50 µL de la solución del hidrolizado o fracción peptídica (concentraciones 0.5, 1.5, 2.5 mg/mL) disuelto en NaCl al 0.9%. La agregación plaquetaria fue inducida por adición de 50 µL de ADP (100 µM) disuelto en NaCl al 0.9% durante 5 min, a 37 °C y agitación a 1000 rpm. Transcurrido este tiempo, la agregación

plaquetaria fue medida como la disminución en la transmitancia a 660 nm a través del PRP, mediante un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis, Estados Unidos de América). El control fue llevado a cabo con la solución de NaCl al 0.9% sin la muestra de prueba. El 100% de transmitancia fue ajustado con el PPP. La agregación plaquetaria fue expresada como el cambio porcentual en la transmitancia del PRP con respecto al PPP. La inhibición de la agregación plaquetaria fue calculada mediante la ecuación No. 11:

Ecuación 11

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

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 fue graficada contra la concentración de la muestra usada y se obtuvo la ecuación de la recta para calcular el  $IC_{50}$  con la ecuación No. 12

Ecuación 12

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m} \times 100$$

Donde

b es la intersección y m es la pendiente.

### 6.8.3 inhibición “*in vitro*” de la solubilidad micelar del colesterol

La actividad anticolesterolemica se evaluó utilizando la técnica propuesta por Bangoura et al., 2009. Primeramente se prepararon las micelas de colesterol según el método de Kirana et al., 2005, con algunas modificaciones menores. Para ello, se preparó una solución micelar (concentraciones finales en buffer acuoso: 0.5 mmol de colesterol, 1 mmol de oleico Ácido y 2,4 mmol de fosfatidilcolina) se disolvieron en metanol y posteriormente se secaron con nitrógeno. La mezcla de lípidos secos se combinó con 15 mmol de buffer de fosfato sódico que contenga 6,6 mmol Taurocolato y 132 mmol de NaCl a pH 7,4 (cuidar el orden para

formar las micelas). La suspensión se sonicó dos veces por 1 min respectivamente a temperatura ambiente usando un baño ultrasónico Misonix 3000. Posteriormente la solución micelar se incubó durante una noche a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a añadir las muestras en concentraciones de 10, 5, 2.5, 1 y 0,5 mg a cada tubo que contenían 1 mL de solución micelar. La mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y las concentraciones de colesterol se determinaron usando un kit de colesterol oxidasa (ELITechGroup), midiendo la absorbancia a 505 nm con un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis, Estados Unidos de América). Las concentraciones de colesterol se determinaron a partir de curvas estándar utilizando calibración de colesterol normal. Las concentraciones de colesterol y la capacidad de inhibición fueron calculados utilizando las ecuaciones 13 y 14 respectivamente.

Ecuación 13

$$[\text{colesterol}] = \frac{ODs}{ODc} \times [\text{calibrador}]$$

Donde

[Colesterol]: concentración de colesterol en mmol

ODc: es la absorbancia del calibrador

ODs: es la Absorbancia de la muestra

[Calibrador]: concentración del calibrador en mmol

Ecuación 14

$$\text{capacidad de inhibición (\%)} = \frac{Co - Cs}{Co} \times 100$$

Donde

Co: es la concentración de colesterol de las micelas originales

Cs: es la concentración de colesterol de micelas con hidrolizados

## **6.10 Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar), todos los datos obtenidos en este estudio, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos vías con un nivel de significancia del 95% y en todos los casos se realizó una comparación de medias por el método de mínima diferencia significativa (LSD, por su acrónimo en inglés) para establecer las diferencias entre los tratamientos empleando una prueba de Fisher. Todos estos análisis se efectuaron utilizando el paquete computacional Minitab® 17 (Montgomery, 2007).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización químico proximal y aporte energético de las harinas y concentrados proteicos de la semilla de quelite blanco y amaranto.

La caracterización químico proximal y aporte energético de las harinas y concentrados proteicos en ambas variedades se presentan en la Tabla 4. En ella se puede observar que el contenido de humedad son inferiores al 11% en todos los materiales evaluados. Estos resultados son comparados con lo obtenido por Dyner et al. (2016) en harinas de trigo, maíz y sorgo integral, obteniendo contenidos de humedad de 11.9, 8.1 y 11.0% respectivamente, quienes obtuvieron resultados similares, a lo obtenido en el presente estudio. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en las harinas tanto de la SQB y la SA son menores al 11%, lo que, podría garantizar una vida de almacén de 5 años aproximadamente, siempre que sean almacenadas en condiciones óptimas (Hardenburg *et al.*, 1986). En el caso del contenido de humedad obtenido en los concentrados proteicos fueron de 7.37% para la SQB y 8.85 para la SA, ambos resultados son similares a lo reportado por Callisaya y Alvarado (2009) con 7.59% en un aislado proteico de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Este bajo contenido de humedad, en ambos casos es debido al proceso de liofilización al que fueron sometidos los concentrados, ya que dicho proceso, al ser un secado a muy bajas temperaturas, elimina en mayor cantidad la humedad contenida en una muestra dada.

En lo que respecta a contenido de proteína, éste fue de 18.83 y 19.29%, para la harina de la SQB y la SA, respectivamente. Estos resultados fueron superiores a los valores reportado por Salcedo-Chavez et al. (2002) quienes evaluaron el contenido de proteína de la variedad *A. cruentus* reportando un 15.0% de éste componente, mientras que Gorinstein et al. (2001) reportaron un 16% en harina de *A. caudatus*, Scilingo et al., (2002) informaron un contenido proteico de 18.7% para *A. hypochondriacus*. Estas diferencias podría deberse, a las características geográficas y climatológicas donde son cultivadas cada una de las variedades.

Por otra parte, al realizar el concentrado proteico, el contenido de proteína incrementó a 73.14 y 70.35% en la SQB y la SA respectivamente. Estos valores encontrados en este estudio son similares a los por Castel (2010) quién reportó un contenido de 73.10% de proteína en un concentrado proteico de amaranto (*A. mantegazzianus*).

**Tabla 4.** Composición químico proximal y valor energético de las harinas y concentrados proteico de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*).

Componentes (%)	Harinas		Concentrados proteicos	
	SQB	SA	SQB	SA
<b>Humedad</b>	10.87 ± 0.08 <sup>a</sup>	7.94 ± 0.19 <sup>c</sup>	7.37 ± 0.34 <sup>d</sup>	8.85 ± 0.18 <sup>b</sup>
<b>Proteína</b>	18.83 ± 0.09 <sup>d</sup>	19.29 ± 0.98 <sup>c</sup>	73.14 ± 0.26 <sup>a</sup>	70.35 ± 0.75 <sup>b</sup>
<b>Grasa</b>	8.68 ± 0.33 <sup>a</sup>	5.95 ± 0.48 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.40 <sup>c</sup>	1.37 ± 0.23 <sup>c</sup>
<b>Fibra</b>	14.89 ± 0.56 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>c</sup>
<b>Cenizas</b>	2.37 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.30 ± 0.14 <sup>b</sup>
<b>ELN</b>	44.38 ± 0.62 <sup>b</sup>	62.13 ± 0.67 <sup>a</sup>	10.55 ± 0.97 <sup>d</sup>	17.36 ± 0.39 <sup>c</sup>
<b>Energía total (kJ/100 g)</b>	1386.84 ± 2.67 <sup>d</sup>	1607.23 ± 3.00 <sup>a</sup>	1555.65 ± 0.71 <sup>b</sup>	1526.97 ± 0.80 <sup>c</sup>

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± su desviación estándar. <sup>a-d</sup>Letras diferentes indican diferencia significativa entre variedades ( $p < 0.05$ ). SQB = semillas de quelite blanco, SA = semillas de amaranto, ELN = extracto libre de nitrógeno.

Las harinas presentaron un contenido de grasa de 8.68% para la SQB y 5.95% para la SA, porcentajes mayores al 5% por lo que se realizó un desgrasado de las harinas previo a la obtencion de los concentrados proteicos, en los cuales, estos valores fueron de 1.40 y 1.37% respectivamente. El contenido de cenizas fue de 2.37% en ambas harinas evaluadas y de 0.66 y 1.30% para los concentrados proteicos de la SQB y de la SA, respectivamente. Dichos resultados (grasas y cenizas) son comparados con lo obtenido por Carrillo-Terán et al. (2015)<sup>a</sup> los cuales reportan un intervalo de 6.1-8.1% en grasa y 3.0% para cenizas en amaranto (*Amaranthus caudatus*) los cuales son similares a lo obtenido en este estudio, mientras que en otras fuentes como la harina de quinoa (*Chenopodium quinoa*) han obtenido contenidos de 4.7% de grasa y 2.8% de cenizas (Carrillo-Terán et al., 2015<sup>b</sup>) lo que podría tener relación, con el tratamiento empleado para la obtención de la harina (método de secado y almacenamiento).

En lo que respecta al aporte energético las harinas presentaron valores de 1386.84 KJ/100 g para la SQB y 1607.23 KJ/100 g en la SA, mientras que los concentrados proteicos mostraron valores de 1555.65 KJ/100 g para la SQB y 1526.97 KJ/100 g para la SA. Estos resultados son comparados con lo reportado por Akubugwo et al. (2007) quien reportó un aporte energético de 1125.16 KJ/100 g en *A. hybridus*. Con base en los resultados obtenidos, se sustenta la observación general, la cual indica que los vegetales poseen bajos valores energéticos (Lintas, 1992).

## 7.2 Color de las harinas y concentrados proteicos de *A. hybridus* y *A. hypochondriaccus*

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos en el análisis de color tanto de las harinas como de los concentrados proteicos, puede apreciarse que hubo diferencias estadísticas en algunos de los parámetros determinados ( $p < 0.05$ ) ( $b^*$ ,  $C^*$  y  $\Delta E$ ) entre la harina y el concentrado proteico. La luminosidad ( $L^*$ ) obtenida fue de 61.65 y 59.88 para la harina de SQB y el concentrado proteico respectivo, mientras que se obtuvo una  $L^*$  de 85.01 y 55.60 en el caso de la harina y concentrado proteico de la SA. En el parámetro  $a^*$  (rojo+ a verde-) se obtuvo una tendencia al enrojecimiento (harina SQB con 3.79 y 4.83 para el concentrado proteico respectivo), mientras que en la harina y concentrado proteico de amaranto no se observaron diferencias significativas en este parámetro, mostrando de la misma forma una tendencia hacia el enrojecimiento. Mientras que el parámetro  $b^*$  (amarillo+ a azul-) la afinidad fue hacia el amarillamiento teniendo como resultado 18.91 y 15.36 para la harina SQB y de la SA respectivamente, por otra parte los concentrados proteicos indicaron 24.72 para la SQB y 7.78 para la SA mostrando en ambos casos y al igual que en las harinas una tendencia al amarillamiento.

**Tabla 5.** Color de las harinas y concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*)

muestras		Parámetros				
		L*	a*	b*	°h	ΔE
<b>Estándar blanco</b>		99.54 ± 0.32	-0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.02	ND	ND
<b>Harinas</b>	SQB	61.65 ± 4.66 <sup>b</sup>	3.79 ± 0.95 <sup>b</sup>	18.91 ± 1.68 <sup>b</sup>	78.77 ± 1.81 <sup>b</sup>	8.37 ± 0.12 <sup>a</sup>
	SA	85.01 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.14 <sup>c</sup>	15.36 ± 0.11 <sup>c</sup>	83.39 ± 0.57 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>d</sup>
<b>Concentrados proteicos</b>	SQB	59.88 ± 5.28 <sup>c</sup>	4.83 ± 0.46 <sup>a</sup>	24.72 ± 2.40 <sup>a</sup>	78.96 ± 0.02 <sup>b</sup>	7.44 ± 0.23 <sup>b</sup>
	AMARANTO	55.60 ± 1.22 <sup>d</sup>	1.78 ± 0.14 <sup>c</sup>	7.78 ± 0.28 <sup>d</sup>	35.75 ± 0.25 <sup>c</sup>	1.95 ± 0.42 <sup>c</sup>

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

Los resultados obtenidos en los parámetros de color para las harinas son comparados a los reportados por Rodríguez (2009) en harina de trigo y sorgo, presentando estas últimas mayor luminosidad ( $L^*$ ), menor cromaticidad ( $C^*$ ) que las obtenidas tanto en las harinas como en los concentrados proteicos de este estudio. Esto podría estar relacionado con las características propias de las materias primas utilizadas. Es importante mencionar que la formación de un color oscuro es indeseable en algunos alimentos debido a que afecta adversamente la comerciabilidad, calidad sensorial e incluso el valor nutricional del producto final. Adebowale et al. (2007), obtuvo un color más aceptable, usando ácido ascórbico al 0.5% o sulfito de sodio al 0.25% como medio de extracción durante la obtención del concentrado proteico, debido a que inhiben el oscurecimiento enzimático por reacción con los grupos carbonilos intermediarios impidiendo la reacción de oscurecimiento. El ácido ascórbico ha sido usado para inhibir el oscurecimiento en frutas frescas y congeladas. Sin embargo, estos autores, reportaron que el mejor rendimiento de proteína fue hallado usando el medio alcalino producido con NaOH, haciendo más accesible a las proteínas de estas variedades de frijol a la digestión enzimática debido a que son parcialmente desnaturalizadas. Además de esto, los constituyentes nitrogenados del frijol, al igual que otras leguminosas, son altamente solubles en NaOH. En este caso al igual que los autores anteriormente mencionados se empleó NaOH en la obtención de ambos concentrados, esto podría afectar la luminosidad de estos, sin embargo, el uso de este medio para la suspensión de la

harina y posterior obtención de los concentrados proteicos permitió que estos obtuvieran un contenido proteico por encima del 70%.

### **7.3 Hidrólisis de los concentrados proteicos de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) y amaranto (*A. hypochondriaccus*)**

La esencia de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La hidrólisis enzimática se ha usado para modificar las propiedades funcionales y nutricionales de la proteína alimentaria dando como resultado péptidos de menor tamaño, más solubles, menos alergénicos y sobre todo con diversas acciones farmacológicas que requieren ser evaluadas. La hidrólisis enzimática para ambas variedades se realizó empleando dos enzimas Pepsina® y Alcalasa® de manera individual, la cinética de dichos procesos se muestran en las Figura 3 y 4, respectivamente. Cabe mencionar que el % de grado de hidrólisis (%GH) es una medida de la magnitud de la degradación hidrolítica de una proteína, el cuál se evaluó mediante el método de ortoftaldehído (OPA, por sus siglas en inglés), el cual se basa en la reacción específica entre el reactivo OPA y grupos amino primarios, en presencia de ditiotreitól (DTT), formando un compuesto coloreado detectable a 340 nm (Nielsen et al., 2001; Spellman et al., 2003; Torruco-Uco, 2009; Quist et al., 2009; Gómez-Gómez, 2014). En el presente estudio, se obtuvieron valores de GH altos a partir de los 5 min de reacción, donde el concentrado proteico de la SQB-Pepsina® tuvo un GH = 21.34%, la SA-Pepsina® un GH = 22.75%, mientras que, el concentrado de la SQB-Alcalasa® tuvo un GH = 22.11% y la SA-Alcalasa un valor de GH = 22.60%. Estos GH incrementaron conforme pasó el tiempo, ya que, a los 90 min de reacción se obtuvieron valores de GH de 32.08, 32.76, 34.38 y 36.45%, respectivamente..

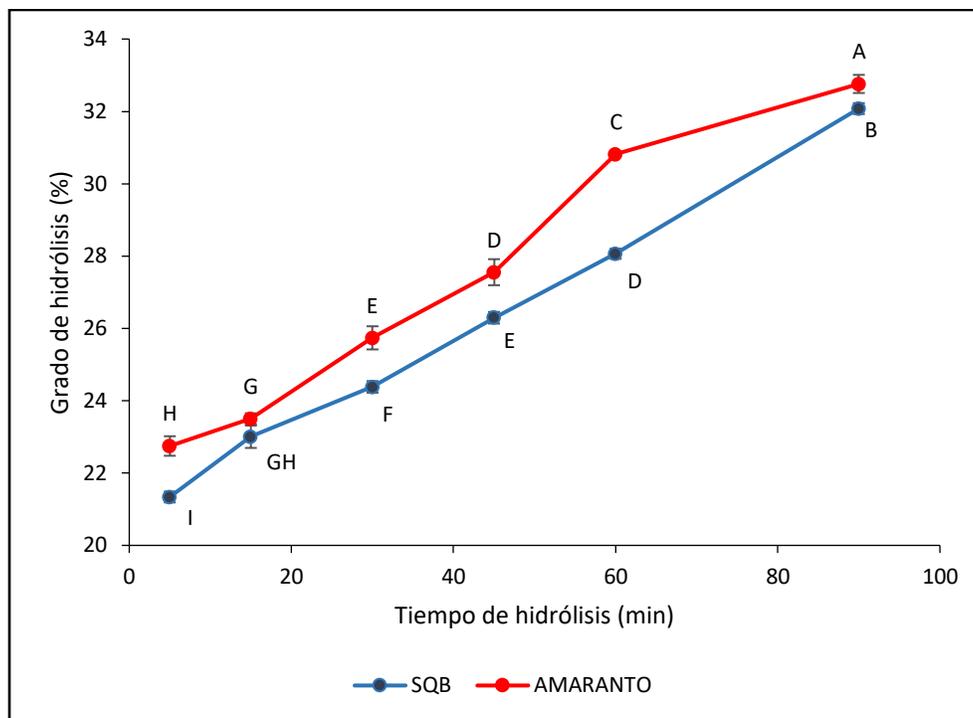


figura 3. Hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de la SQB y SA, con la enzima Pepsina®.

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

En todos los casos el GH tuvo rápido incremento, manteniéndose así durante todos, los tiempos de la cinética y mostrando una tendencia de crecimiento. Los resultados obtenidos son superiores a lo reportado por Cadeza-Baglietto (2016) quien obtuvo un GH de 12.92% a 60 min con pepsina en un concentrado proteico de *Mucuna pruriens*; Megías et al. (2004), reportaron un GH de 13% después de 180 min de reacción con pepsina, a partir de harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Por otro lado, Guerra-Almonacid et al. (2015) obtuvieron GH de 40.81% a 60 min con Alcalasa en *Vigna radiata* el cual fue mayor a lo obtenido en este estudio. Mientras que, Mata-Ramírez (2018), realizó la hidrólisis individual de una harina rica en proteína de chapulin (*Sphenarium purpurascens* Ch.) empleando las mismas enzimas que en este estudio, con tiempos de 5 a 90 min, obteniendo los mayores GH a los 90 min de reacción, los cuales fueron de 26.5% con Alcalasa y 21.2%, con Pepsina. Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas estructuras primarias de las proteínas utilizadas como sustrato.

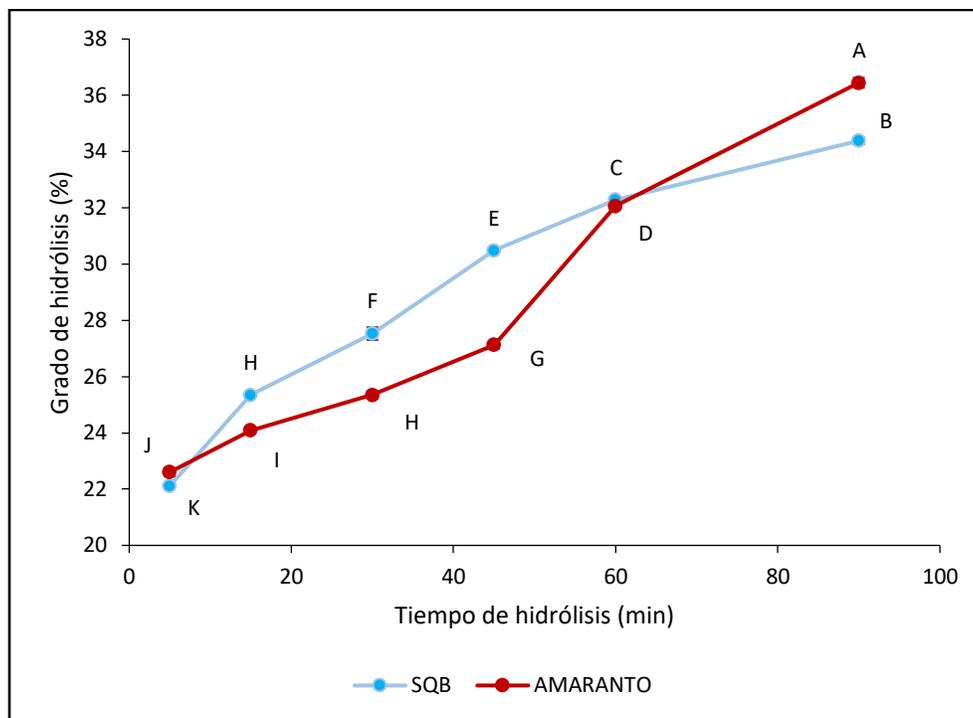


figura 4. Hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de la SQB y SA, con la enzima Alcalasa<sup>®</sup>.

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

Se logró obtener hidrolizados proteicos con GH  $>10\%$ , indicando que se alcanzó una hidrólisis extensiva, lo que pudiera estarse generando péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas. Cabe mencionar que la Pepsina<sup>®</sup> es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión, tiene actividad endopeptidasa, hidroliza aminoácidos hidrofóbicos, preferentemente aromáticos, hidrolizando por el extremo C-terminal de los residuos fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina, y en menor grado ácido glutámico, por lo que, su acción rompe las cadenas de polipéptidos en secciones más cortas, es decir, que mediante su acción se producen aminoácidos libres, pero la mayoría de los productos son oligopéptidos (Benítez et al., 2008; Bojórquez-Balam et al., 2013; Luna-Vital et al., 2014, Cadeza-Baglietto, 2016). Por otra parte la Alcalasa<sup>®</sup> (serin-endopeptidasa), de origen bacteriano, actúa como nucleófilo y escinde enlaces peptídicos con su átomo de oxígeno parcialmente negativo, ésta enzima ha sido utilizada en la obtención de diferentes

compuesto bioactivos tales como, antihipertensivos, antirombóticos y antioxidantes (Deber, 2006), siendo estos dos últimos de interés para este estudio.

#### **7.4 Capacidad antioxidante de los concentrados e hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.**

Es conocido que los péptidos antioxidantes, pueden limitar el daño oxidativo, tanto en alimentos preparados (usándolos como antioxidantes naturales), así como al proteger de la oxidación a las células del organismo cuando éstos sean ingeridos en la dieta (Gallego-Tintoré et al., 2011). Dicha actividad de los péptidos bioactivos puede ser atribuida a su capacidad para la eliminación de radicales libres, la inhibición de la peroxidación lipídica y a las propiedades quelantes de iones metálicos (Samaranayaka & Li-chan, 2011). Por ello, se evaluó la capacidad antioxidante empleando dos métodos los cuales son, el método DPPH y ABTS•, los cuales, se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. El método ABTS• evalúa la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS• el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS• (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)). Por otro lado, el radical DPPH, es uno de los pocos radicales orgánicos estable, este método contrario al ABTS•, mide la capacidad de un antioxidante para estabilizar dicho radical. A continuación se muestran los resultados obtenidos de ambos métodos en los concentrados e hidrolizados proteicos.

##### **7.4.1 Método DPPH**

En la figura 5 se muestran los resultados de la actividad antirradicalaria por el método DPPH. Se puede observar que el concentrado proteico de la SA posee mayor capacidad de captación de radicales libres ya que tuvo un valor de  $IC_{50} = 29.72$  mg/mL. Mientras que el concentrado proteico de la SQB tuvo un valor de  $IC_{50} = 30.61$  mg/mL el cual fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) con el concentrado de la SA. Estos resultados son comparados con lo

reportado por Intiquilla-Quispe (2015) en un concentrado proteico de purujo (*Erytharina edulis*) donde obtuvo un valor de  $IC_{50} = 55.04$  mg/mL, esta diferencia puede atribuirse a la estructura, composición y secuenciación de aminoácidos de las proteínas de dichos concentrados. Sin embargo, el conocer la capacidad antioxidante de los concentrados proteicos, permite determinar la potencialización de estos al ser hidrolizados, además de establecer cual enzima ofrece mejores resultados, para la actividad deseada.

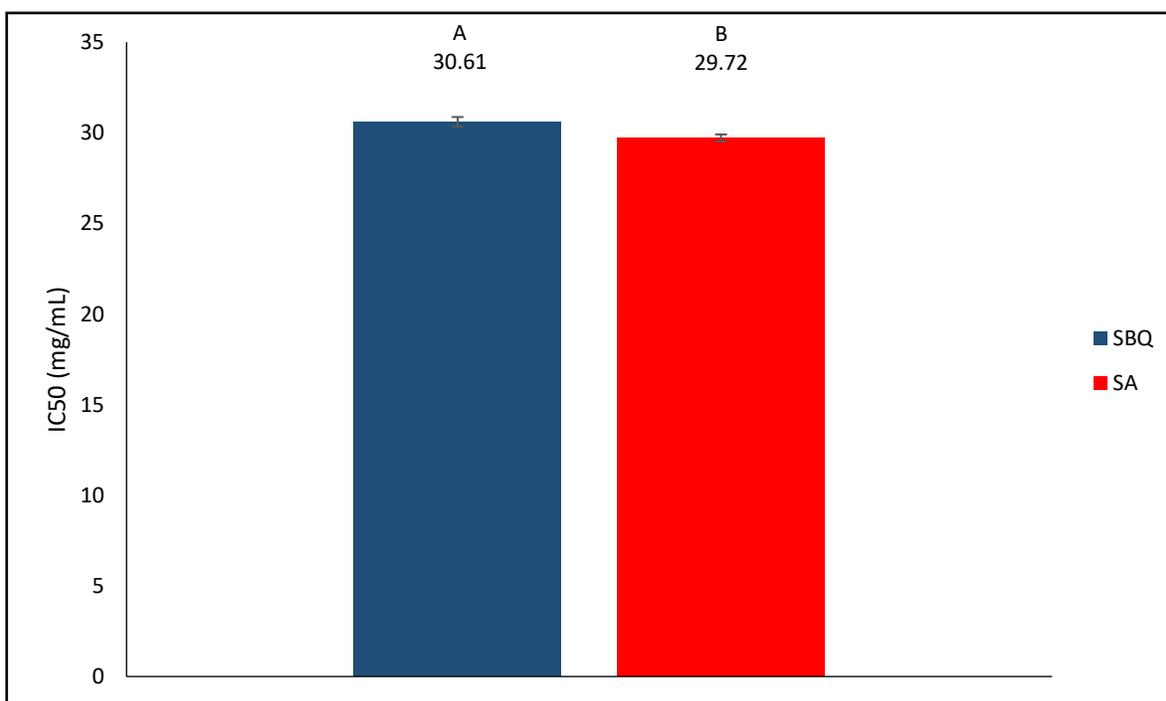


figura 5. Actividad antioxidante (método DPPH) “*in vitro*” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA.

Valores ~~p~~ promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-B</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

La hidrólisis con enzimas comerciales se ha utilizado ampliamente en la producción de péptidos antioxidantes a partir de proteínas alimentarias (Sarmadi & Ismail, 2010). Por lo que, los concentrados proteicos obtenidos en este estudio fueron hidrolizados con las enzimas Pepsina® y Alcalasa® y a los hidrolizados obtenidos se les evaluó la capacidad antioxidante por el método DPPH. En la figura 6, se puede observar los hidrolizados de ambas variedades

(SQB y SA) con la enzima Pepsina. Los valores de  $IC_{50}$  indicaron que los hidrolizados de las dos variedades evaluadas con mejor capacidad antioxidante fue a los 45 min de reacción con valores de  $IC_{50}$  de 1.53 mg/mL para la SQB y 1.61 mg/mL para la SA, ya que no mostraron diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, al emplear la enzima alcalasa (Figura 7) la mejor capacidad antioxidante la tuvo el hidrolizado proteico de la SQB a los 90 min de reacción con un  $IC_{50} = 1.19$  mg/mL. Mientras que el hidrolizado con alcalasa-SA la mejor capacidad antioxidante se presentó a los 60 min de reacción con un  $IC_{50} = 1.86$  mg/mL. Se puede observar que estos resultados fueron mejores que los obtenidos en la capacidad antioxidante de los concentrados proteicos, esto debido al empleo de enzimas proteolíticas que lograron la liberación de péptidos bioactivos con esta actividad.

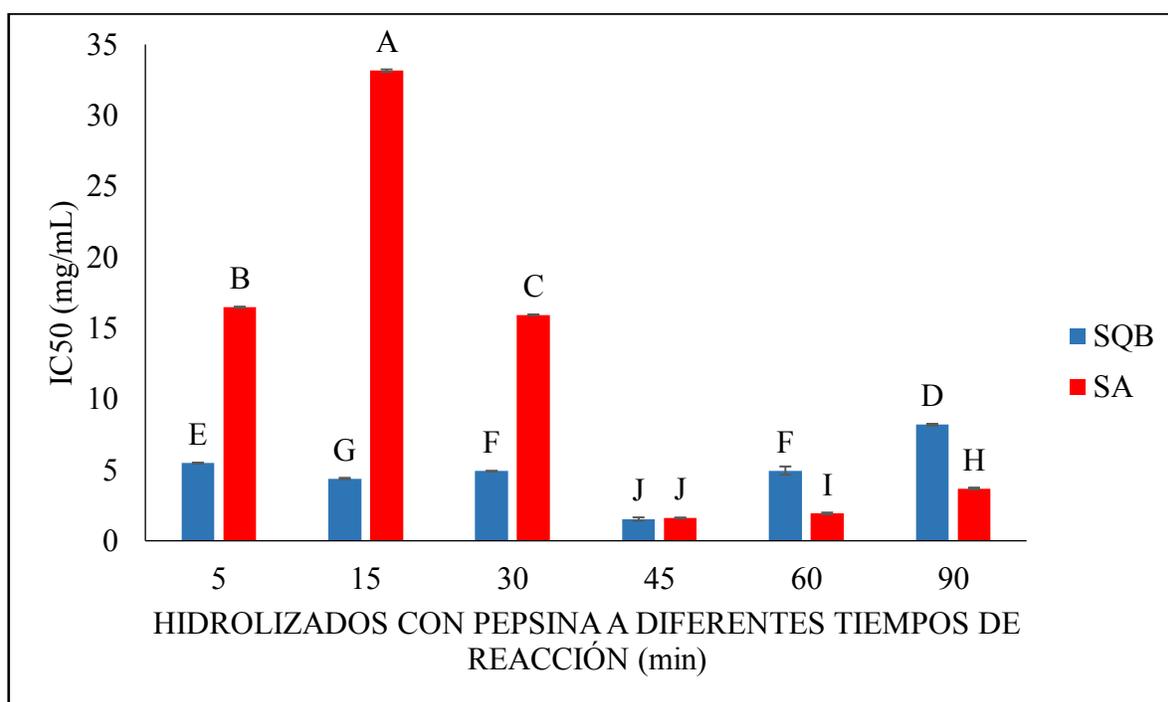


figura 6. Actividad antioxidante (método DPPH) de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina®.

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

Estos resultados son comparados con lo reportado por Intequilla-Quise (2015), quien obtuvo un  $IC_{50}$  de 37.72  $\mu$ g/mL en hidrolizado proteico de paruja (*Erithrina edulis*) con alcalasa tras

120 min de reacción, Guerra-Almonacid et al. (2016) obtuvieron  $IC_{50}$  de 67.62  $\mu\text{g/mL}$  en hidrolizado proteico de frijol mungo (*Vigna radiata*) con alcalasa a 60 min de reacción, cabe hacer mención que ambos autores utilizaron leguminosas como sustrato. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación pueden considerarse como buenos candidatos a péptidos antioxidantes según la clasificación de Ramos, A. et al. (2003) quienes consideran de alto potencial antioxidante a aquellos compuestos con un  $IC_{50}$  menores a 30  $\text{mg/mL}$ .

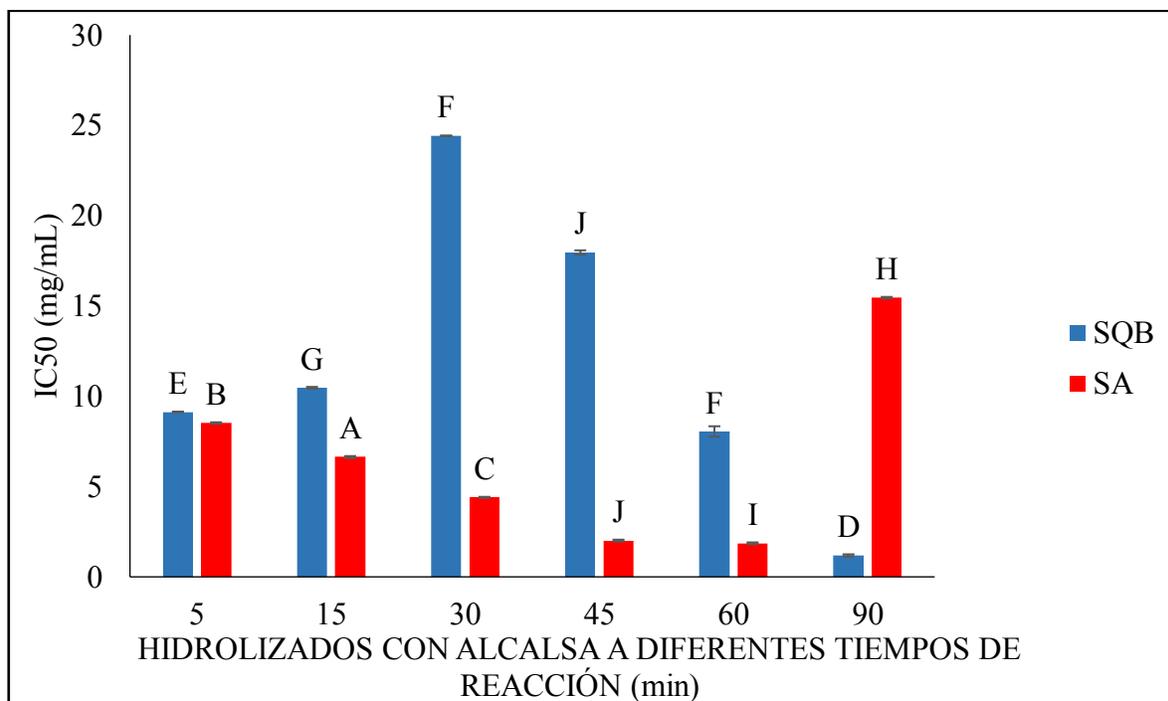


figura 7. Actividad antioxidante (método DPPH) de los hidrolizados proteicos de laSQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Alcalasa®.

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

Con base en el  $IC_{50}$  las concentraciones requeridas lograr el 50% de actividad antioxidante de acuerdo con el método DPPH, son menores con respecto los obtenido para los Concentrados proteicos, por lo que se puede establecer, que al realizar la hidrolisis enzimáticas de las proteínas tanto de amaranto (*A. hypochondriaccus*) como de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) se potencializa la actividad antioxidante que poseen dichas proteínas, siendo mayor el potencial en la relación amaranto-pepsina y SQB-alcalasa. Esto tiene relación, con la importancia de la presencia de residuos de aminoácidos específicos en las secuencias con acción antioxidante exitosa, ya que, la quelación de iones metálicos y

metales de transición, la captación de radicales prooxidantes, la reducción de hidroxiperoxidos y eliminación enzimática de oxidantes específicos son algunas de las propiedades antioxidantes de los péptidos (Elias et al., 2008; Østdal, Andersen & Davies, 1999; Rival, Boeriu & Wichers, 2001; Zhou & Decker, 1999). La mayoría de los péptidos antioxidantes obtenidos a partir de alimentos presentan pesos moleculares entre 500 y 1800 Da y con frecuencia incluyen residuos de aminoácidos como Val y Leu en el extremo N-terminal, y Pro, His, Tyr, Trp, Met, y Cys en sus secuencias (Cheng, Uchida & Kawakishi, 1992; Wu, Wang, Ma & Ren, 2009). Residuos hidrofóbicos de aminoácidos como Val o Leu son capaces de incrementar la presencia de péptidos en la interfase agua-lípido y por lo tanto facilitar el acceso a radicales libres que se generan en la fase lipídica (Ranathunga, Rajapakse & Kim, 2006), con base en esto y considerando que la pepsina tiene mayor afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos, es que se logra mayor capacidad de captación de radicales libres al hidrolizar con dicha enzima durante menores tiempos de hidrólisis enzimática.

#### 7.4.2 MÉTODO ABTS•

Para evitar los efectos negativos a las propiedades sensoriales de los alimentos se emplean antioxidantes, principalmente sintéticos, tales como el Butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroxianisol (BHA); sin embargo, actualmente se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales, destacando compuestos fenólicos, como tocoferol o vitamina E, carotenoides y catequinas, los cuales presentan algunas desventajas; la insolubilidad en agua (Gallegos Tintoré, Chel Guerrero & Martínez Ayala, 2013). En este sentido, los hidrolizados proteicos pueden emplearse como ingredientes funcionales en sistemas alimentarios, pues se ha demostrado su capacidad para prevenir la modificación oxidativa (Wang & Xiong, 2008)

La capacidad antioxidante por el método ABTS• se muestra en la Figura 8. Los valores de  $IC_{50}$  para ambos concentrados fueron de 32.38 mg/mL para el concentrado proteico de la SQB y 34.27 mg/mL para el concentrado de la SA, dichas concentraciones requeridas son altas para efectuar el 50% de actividad, sin embargo, al ser estos sometidos a hidrólisis enzimática, incrementan considerablemente su potencial antioxidante, dichos datos se

pueden apreciar en las fig. 9 y 10, en las cuales se observan los  $IC_{50}$  para los hidrolizados proteicos de SQB y amarando con pepsina y con alcalasa.

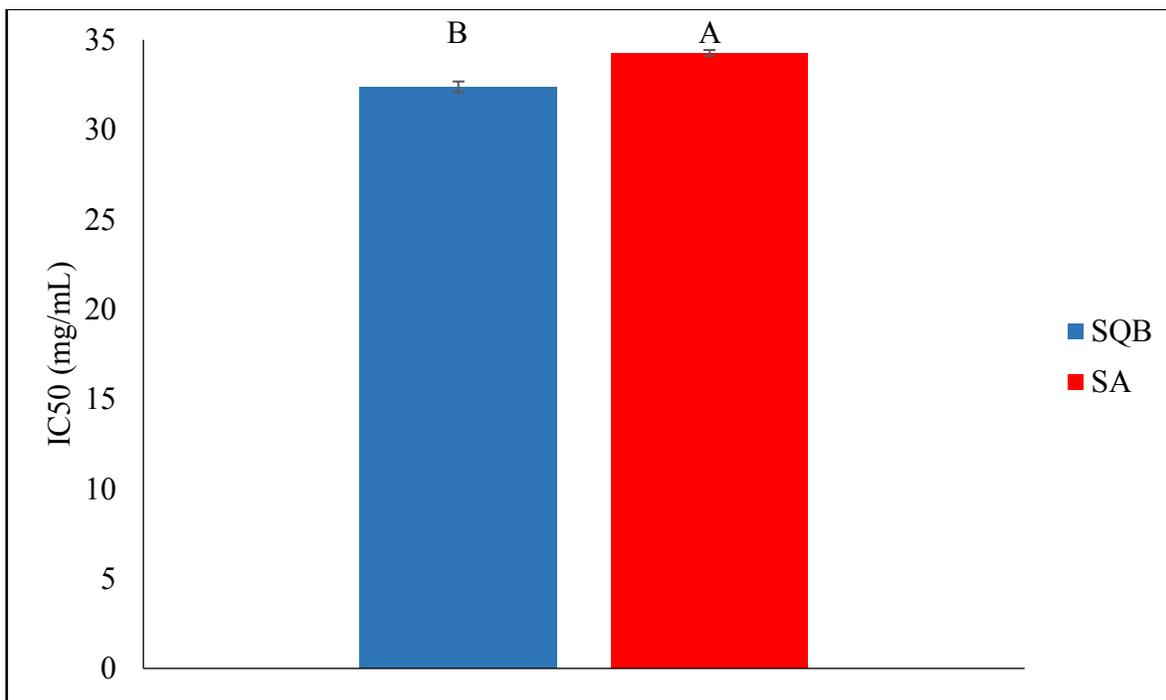


figura 8. Actividad antioxidante ABTS•. De los concentrados proteicos de semillas de quelite (CPSQB) y amaranto (CPA). Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-B</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

En la Figura 9 se muestra la actividad antioxidante por el método ABTS de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA obtenidos con Pepsina®. Se puede observar que existe diferencia significativa entre los hidrolizados ( $p < 0.05$ ) en las dos variedades evaluadas. El hidrolizado que tuvo mejor actividad antioxidante fue la SA a los 90 min de reacción con un valor de  $IC_{50}$  de 8.43 mg/mL, mientras que para el hidrolizado de la SQB fue en los hidrolizados a 45 y 60 min de reacción con un  $IC_{50} = 12.80$  y 12.30 mg/mL, respectivamente, ya que no mostraron diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

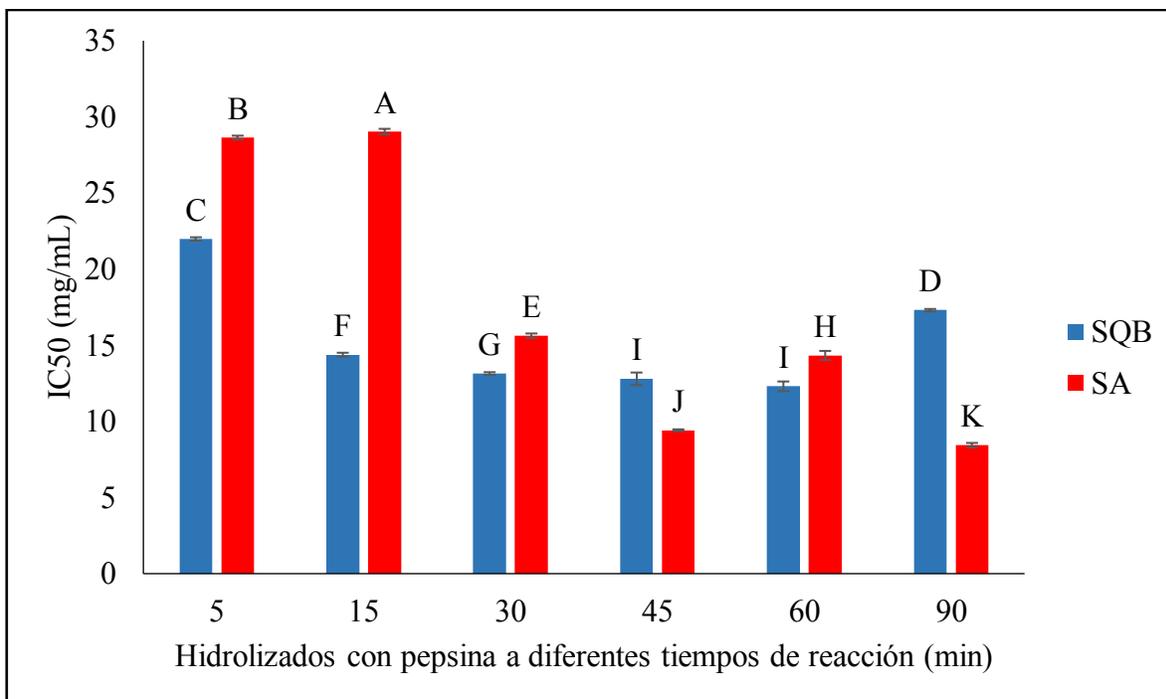


figura 9. Actividad antioxidante (método ABTS) de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con la enzima Pepsina®.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. A–K Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, los hidrolizados de la SQB obtenidos con Alcalasa®, presentaron valores de  $IC_{50}$  de 1.19 mg/mL a los 60 min de reacción, mientras que el hidrolizado de la SA el valor de  $IC_{50}$  fue de 12.44 mg/mL. Esto puede deberse a la composición, secuenciación e hidrofobicidad de los aminoácidos presentes en los hidrolizados proteicos. Aunque los 20 aminoácidos pueden interactuar con especies de nitrógeno y oxígeno, los más reactivos son los azufrados (MET, CIS, HIS) y los aromáticos (TRIP, TIR Y PHE) además de los que contienen anillo imidazol como la histidina (Elias et al., 2008; Loganayaki, Siddhuraju & Manian, 2011; Zhang et al., 2010); sin embargo, se ha encontrado que en su forma libre, generalmente los aminoácidos no son efectivos como antioxidantes, de hecho existe evidencia de que una hidrólisis extensiva de las proteínas resulta en un decremento de la AAO (Kong & Xiong, 2006; Salgado et al., 2011), lo cual se atribuye a las propiedades químicas y físicas que les confiere tanto la secuencia de aminoácidos, como la estabilidad del radical peptídico que se genera para no iniciar o propagar reacciones oxidativas posteriores (Elias, et al., 2008). Estos resultados son comparados con lo reportado en otras

investigaciones entre las cuales se encuentran Guerra-Almonacid et al. (2016), quienes obtuvieron  $IC_{50}$  de 0.054 mg/mL para hidrolizado proteico de frijol mungo (*Vigna radiata*), Intiquilla-Quispe (2016) reportó 0.037 mg/mL en hidrolizados proteicos de parujo (*Erythrina edulis*) quienes hidrolizaron con alcalasa durante 60 y 120 min respectivamente.

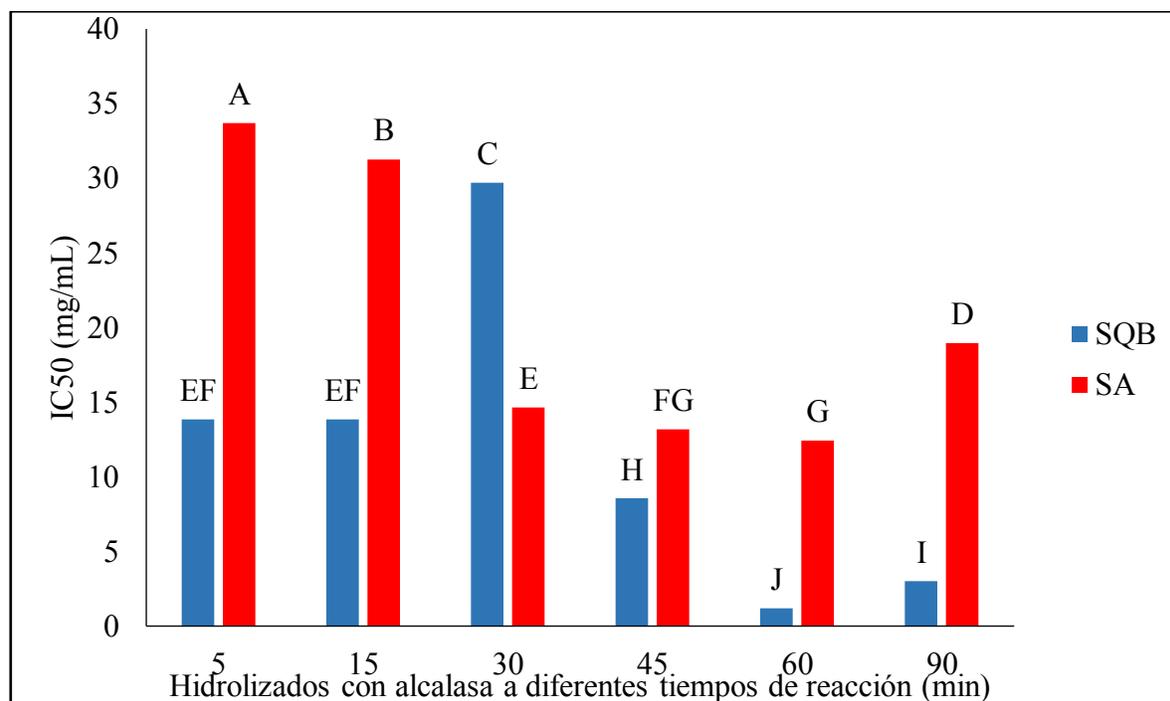


figura 10. Actividad antioxidante ABTS de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con la enzima alcalasa®. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-J</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

los valores obtenidos sobre la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos tanto de pepsina como de alcalasa, son aceptables como componente con alto potencial antioxidante, sin embargo, el  $IC_{50}$  de los hidrolizados con alcalasa son menores. Aunque la capacidad antioxidante se le confiere a los aminoácidos hidrofóbicos, Tang et al. (2009) indicaron que péptidos con hidrofobicidad intermedia, poseen mayor capacidad secuestrante del radical ABTS, además que emplear este método la capacidad antioxidante no es dependiente del peso molecular de los péptidos mientras que al emplear otros métodos, este si es un factor de importancia.

## 7.5 ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA

Las plaquetas son un componente crítico en la formación de trombos arteriales y la inhibición farmacológica efectiva de la agregación plaquetaria es el objetivo primario de la terapia antitrombótica (Marrufo-Estrada et al., 2013). La terapia antiplaquetaria que inhibe la función de las plaquetas es un enfoque prometedor en la prevención de la trombosis (Kong et al., 2014). De esta forma, la actividad antitrombótica se basa en inhibir la capacidad que tiene la sangre para formar trombos, principalmente por el agrupamiento de las plaquetas en el plasma sanguíneo (Córdova-Lizama et al., 2013).

En los siguientes apartados se analizó la actividad antitrombótica de los concentrados e hidrolizados proteicos de la SQB y la SA por medio de la determinación del porcentaje (%) de inhibición de la agregación plaquetaria, la cual se muestra en la sección 7.5.1, mientras que en la sección 7.5.2 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 Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.

La determinación de la actividad antitrombótica, se basa en inhibir la capacidad que tiene la sangre para formar trombos, principalmente por el agrupamiento de las plaquetas en el plasma sanguíneo. Los resultados expresados como porcentaje de reducción de la agregación plaquetaria (RAP), a diferentes concentraciones de concentrados e hidrolizados, se presentan en la Figura 11 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos en los concentrados proteicos a diferentes concentraciones (0.5 a 2.5 mg/mL), en donde el mayor porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria se logra en concentrado proteico SQB a diferentes concentraciones, siendo el mayor porcentaje de inhibición de 15.96 % a una concentración de 2.5 mg; sin embargo, en el SA aunque se logra un menor porcentaje de inhibición al

incrementar la concentración, tiene un mayor aumento en el porcentaje de inhibición siendo de 3.75, 6.58 y 11.17% para 0.5, 1.5 y 2.5 mg de muestra. Esto puede deberse a que las proteínas de SA tienen una mayor similitud estructural con la cadena del fibrinógeno (factor I de la coagulación), de forma que entra en competencia con los receptores plaquetarios y al estar en mayor concentración la capacidad de unión con las plaquetas (Vioque & Millar, 2010).

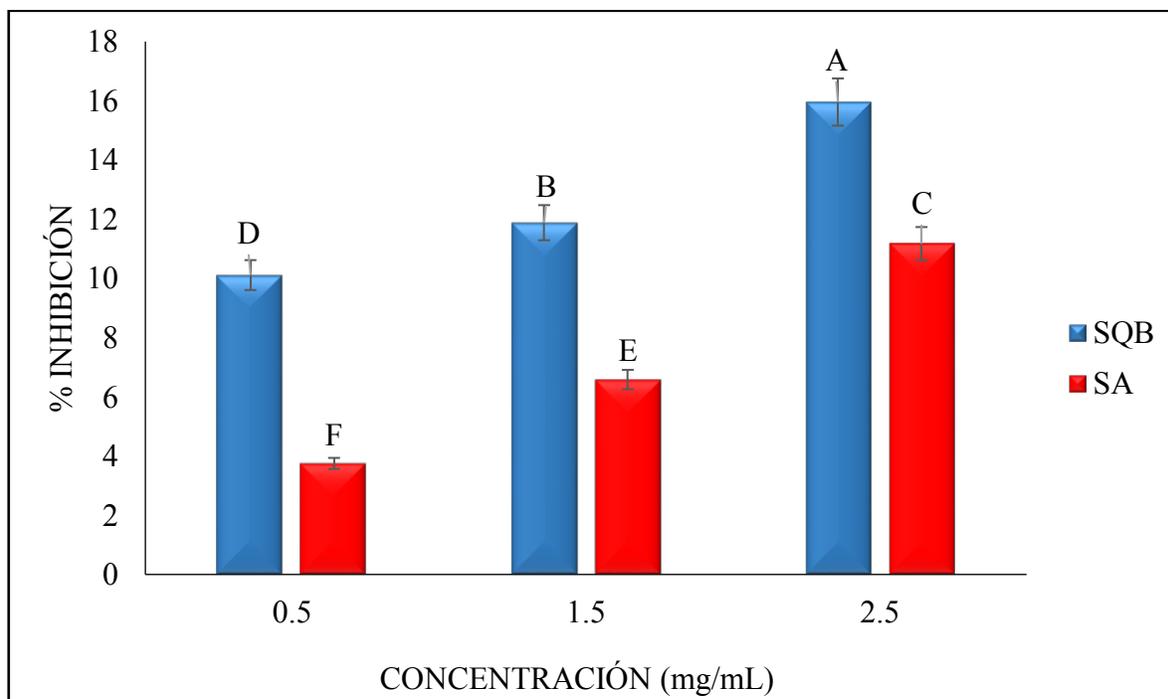


figura 11. % de inhibición de la agregación plaquetaria de los concentrados proteicos de SQB y SA.

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

Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria a diferentes concentraciones 0,5, 1.5 y 2.5 mg/mL, En la figura 12 y 13, se muestran los porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria para los hidrolizados de SQB y SA con pepsipa® y alcalasa®, respectivamente. en los hidrolizados obtenidos con la enzima pepsina con SQB durante los primeros 45 min de reacción sigue un patrón de compartamiento incrementándose el porcentaje de inhibición, sin embargo, a partir de los 60 min dicho porcentaje se ve

disminuído, mientras que en las SA con la misma enzima dicho patrón se logra hasta los 60 min, tiempo en el que se alcanza el mayor porcentaje de inhibición 21.58% en una concentración de 2.5 mg/mL, Este nivel de inhibición de la agregación plaquetaria es comparable con lo obtenido por Yu et al. (2016), quienes hallaron aproximadamente 15% de actividad en una concentración de 0.5 mg/mL para un hidrolizado con tripsina a partir de las fracciones proteínicas albúminas y glutelinas de cebada de montaña (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.) procedente del Noroeste de China, en un tiempo total de hidrólisis de 14 h. De igual forma Cian et al. (2015), encontraron una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria cercana a 18% cuando evaluaron 60 mg/mL de un hidrolizado con proteasa alcalina por 2 h (GH = 13.7%), a partir de una macro alga (*Pyropia columbina*) proveniente de Comodoro Rivadavia, Argentina. Mientras que Córdova-Lizama et al. (2013), hallaron un nivel de inhibición plaquetaria de 30% a una concentración de 2.5 mg/mL, a partir de un hidrolizado realizado con pepsina durante 10 min (GH = 12.4%) a partir de *Phaseolus lunatus* cosechado en Yucatán, México. Por otra parte, Rojas-Ronquillo et al. (2012), determinaron la actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina a partir de la caseína bovina fermentada con *Lactobacillus casei* Shirota durante 42 h, encontrando una actividad antitrombótica aproximadamente de 20%, después de 15 h de fermentación, siendo este valor comparable a lo hallado para el hidrolizado de SA obtenido con pepsina en el presente estudio.

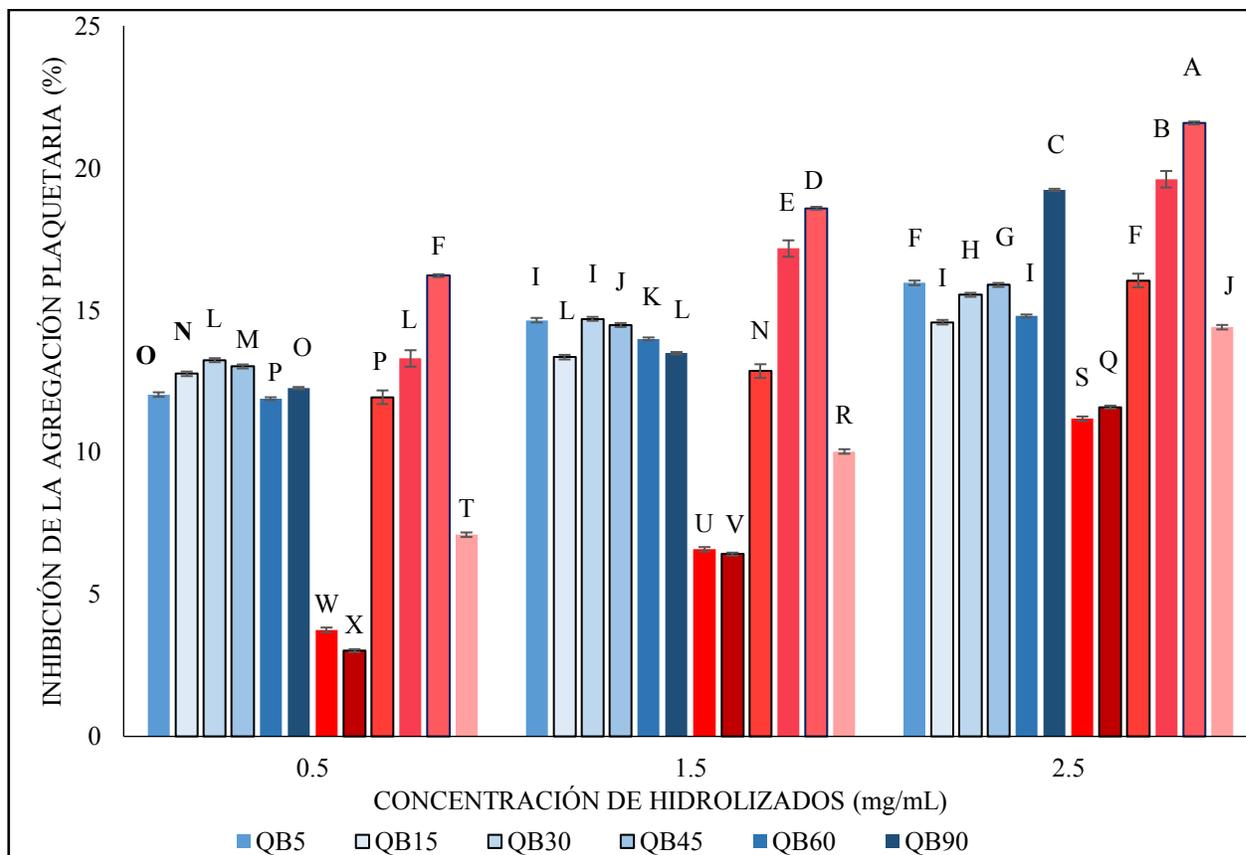


figura 12. Porcentaje de inhibición “*in vitro*” de los hidrolizados SQB y SA con pepsina®  
 Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>A-X</sup> letras diferentes indican diferencias significativa (p < 0.05).

Los hidrolizados obtenidos con alcalasa en la SQB, mostraron un patrón de comportamiento durante los 60 min de reacción, siendo el mayor porcentaje de inhibición de 40.98% a una concentración de 2.5 mg/mL a los 60 min de hidrolisis. Por otro lado, al emplear la misma enzima en la SA, los mayores porcentajes de inhibición de obtienen a los 60 y 90 min 37.60 y 34.99% respectivamente, a una concentración de 2.5 mg/mL. Zhang et al. (2008), reportaron una actividad antitrombótica aproximadamente de 10% para la inhibición de la coagulación del fibrinógeno a partir de la extracción enzimática acuosa con pectinasa, celulasa, beta-glucanasa y alcalasa por 4 h a partir de semillas de colza (*Brassica napus*) proveniente de China y evaluado en una concentración de 10 mg/mL. De igual forma, Sabbione et al. (2015), evaluaron la actividad antitrombótica de la fracción de albúminas de semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) cosechadas en La Pampa, Argentina,

que fue sujeta a la acción enzimática de alcalasa y tripsina por 40 min (GH = 15.7%), encontrando una inhibición de la formación de trombos (inhibición de la polimerización de fibrina catalizada por trombina) aproximadamente de 10% en una concentración del hidrolizado cercana a 2 mg/mL.

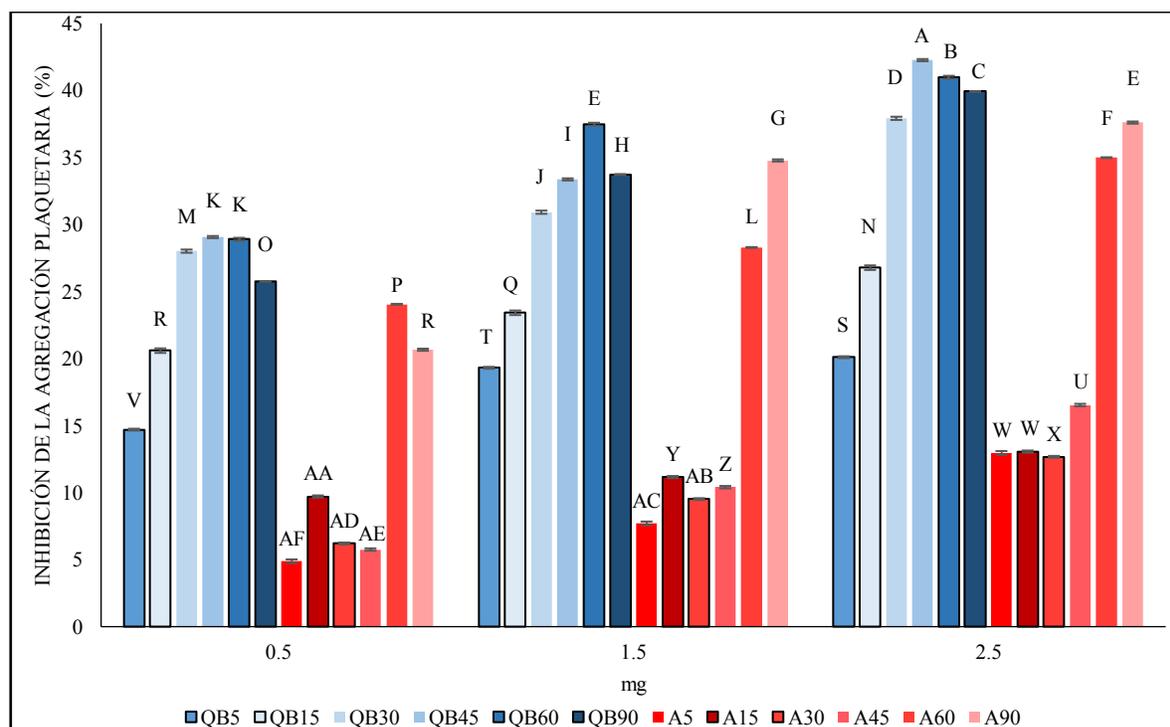


figura 13. Porcentaje de inhibición “*in vitro*” de los hidrolizados de SQB y SA con alcalasa®.

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. <sup>A-AF</sup> indican diferencias significativa (p<0.05).

Estos resultados sugieren que péptidos con actividad antiplaquetaria podrían haberse generado a partir de la modificación enzimática de las proteínas de la SQB. Los péptidos obtenidos de 30 a 60 min de reacción, posiblemente contengan un segmento RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en su secuencia ya que se ha demostrado que la arginina participa en la unión entre el fibrinógeno y la glicoproteína GPIIb/IIIa ubicada en la membrana de las

plaquetas. El grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg (catión) interacciona mediante un enlace iónico con la estructura de grupo carboxilo del Asp presente en el complejo GPIIb/IIIa (Córdova-Lizama et al., 2013). No obstante, también pueden estar presentes péptidos que asemejen este arreglo estructural para antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación plaquetaria (Mulero-Cánovas et al., 2011).

### **7.5.2 Inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.**

Se evaluó *in vitro* la actividad antiplaquetaria de los hidrolizados proteicos usando plasma sanguíneo humano rico en plaquetas inducido con ADP como agonista plaquetario. Para ello se consideró como los mejores tratamientos a aquellos que presentaron valores de  $IC_{50}$  con menor valor numérico, ya que con ello sabremos que se requiere de la más baja concentración para inhibir el 50% de la agregación plaquetaria.

Primeramente se evaluó la capacidad antitrombótica de los concentrados proteicos, esto con el fin de saber cuanto se potencializa, dicha capacidad al realizarse la hidrolisis enzimática, además de identificar que enzima ofrece mejores resultados. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos con base en el  $IC_{50}$  para los concentrados proteicos siendo de 14.28 y 13.04 mg/mL para la SQB y SA, respectivamente.

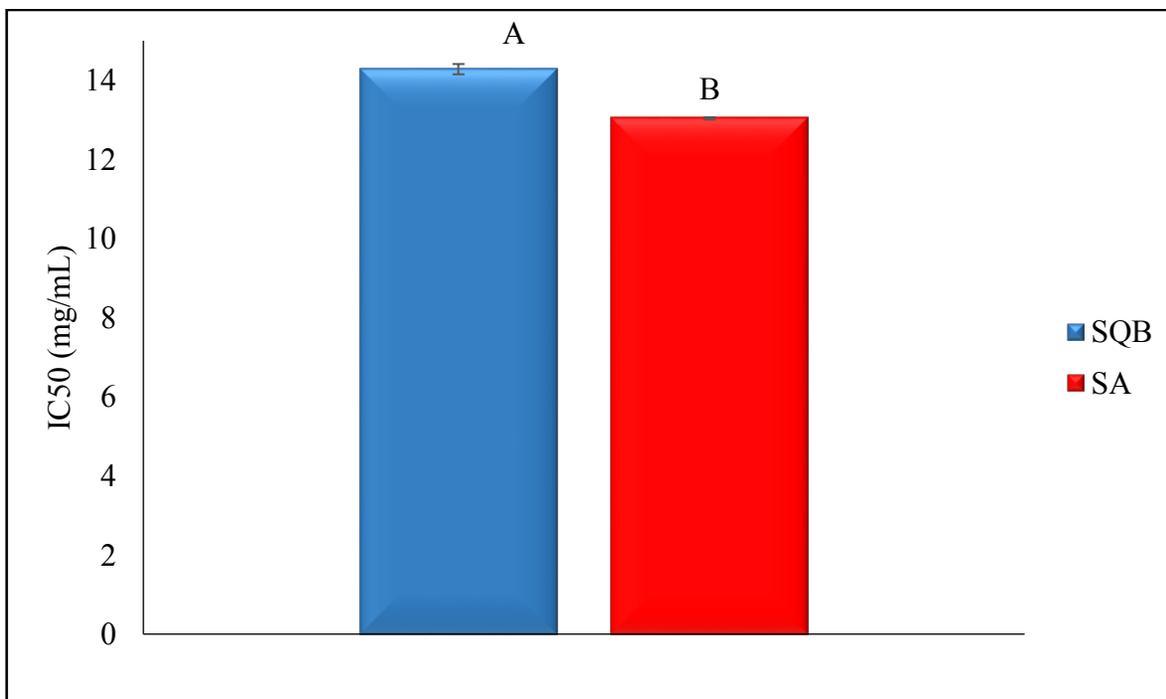


figura 14. Actividad antitrombótica “*in vitro*” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-B</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

En las Figuras 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos para los hidrolizados con Pepsina<sup>®</sup> y Alcalasa<sup>®</sup>, respectivamente. Al hidrolizar con la enzima pepsina la SQB se obtuvieron valores de 41.68 mg/mL en el hidrolizado a 15 min de reacción, siendo esta la concentración más alta requerida para inhibir el 50% de agregación plaquetaria y un valor de  $IC_{50}$  de 11.54 mg/mL a los 90 min de reacción, siendo esta la concentración más baja requerida para SQB al emplearse la hidrólisis con pepsina. Mientras que al realizar la hidrólisis de la SA con Pepsina<sup>®</sup> se obtuvieron valores que no mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a los 15, 45 y 90 min de reacción con valores de  $IC_{50}$  de 11.55, 12.07 y 12.31 mg /mL, respectivamente.

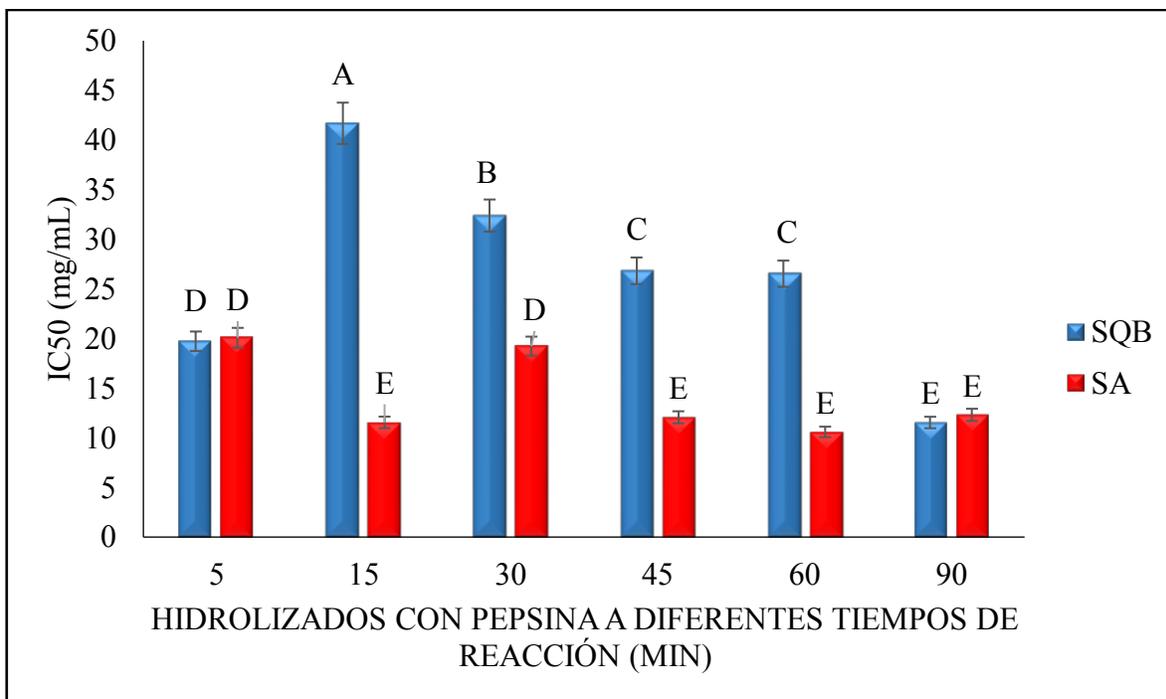


figura 15. Actividad antitrombótica “*in vitro*” de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con pepsina®. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-G</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, los hidrolizados con alcalasa, requiere concentraciones menores para efectuar el 50% de inhibición de la agregación plaquetaria, pues al emplear la SQB como sustrato se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de 12.41 mg/mL siendo esta la concentración más alta requerida, a los 5 min de reacción y esta fue mejorando conforme incrementó el tiempo de hidrólisis con valores de  $IC_{50}$  de 3.79, 3.85 y 3.88 mg/mL a los 45, 60 y 90 min de reacción, respectivamente, ya que no mostraron diferencia estadística ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los hidrolizados de la SA con Alcalasa® mostraron la misma tendencia que en la SQB a partir de los 15 min de reacción, ya que, conforme aumento el tiempo de hidrólisis la capacidad antitrombótica aumentó, ya que los valores de  $IC_{50}$  estuvieron en un intervalo de 24.61 a 3.74 mg/mL para 5 y 90 min de reacción, respectivamente. Con base a lo anterior se puede decir que los hidrolizados obtenidos con la enzima Alcalasa® mejoran la actividad antitrombótica en los materiales evaluados.

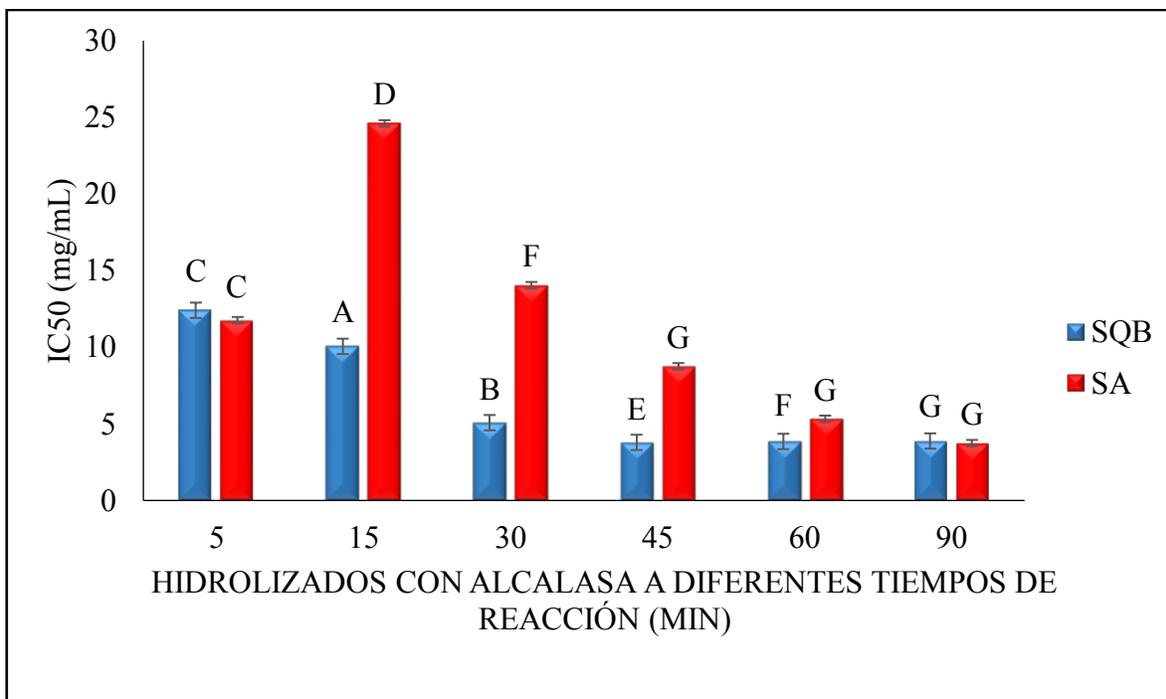


figura 16. Actividad antitrombótica “*in vitro*” de los hidrolizados de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con Alcalasa®. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-G</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en este estudio son comparados con lo obtenido por otros autores tales como, Lee & Kim (2005) quien obtuvo un valor de  $IC_{50}$  de 2 mg/mL de fracciones peptídicas obtenidas mediante la hidrólisis enzimática secuencial de aislados proteínicos de soya, por otro lado Sabbione et al. (2005) obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de 0.080 y 0.074 mg/mL en la fracción glutelina sin hidrolizar e hidrolizada de *Amaranthus mantegazzianus*. Por otro lado, Mata-Ramirez (2018), evaluó la actividad antitrombótica de hidrolizados de chapulin (*Sphenarium purpurascens* Ch.) con pepsina y alcalasa de manera individual, obteniendo valores de  $IC_{50}$  = 6.61 y 7.66 mg/mL para alcalasa (60 min de reacción) y pepsina (15 min de reacción), respectivamente. Los  $IC_{50}$  obtenidos en este estudio se encuentran dentro del rango de lo reportado por otros autores. Por otra parte, la baja actividad antitrombótica de los hidrolizados con pepsina, podría deberse a que esta enzima pudo haber actuado sobre los aminoácidos con carga negativa o bien, que en el concentrado proteico evaluado se encuentren presentes abundantes aminoácidos hidrofóbicos con cadenas laterales aromáticas o ramificadas, además de recordar, que la pepsina actúa principalmente sobre los enlaces

Phe(Tyr, Leu) o Trp(Phe, Tyr), los cuales son aminoácidos hidrofobicos, por otra parte, los residuos Ile, Lys y Asp parecen ser importantes en el efecto inhibitor que es debido a la competencia entre los péptidos, cabe hacer mención, que se logra mayor actividad antitrobótica en péptidos con mayor similitud estructural con la cadeba del fibrinógeno, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios (la cadena).

Con base en los resultados obtenidos se podría emplear el uso de pseudocereales como sustrado para la hidrólisis y posterior obtención de péptidos con actividad antitrombótica, para la posible implementación de estos en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de la trombosis, así como en alimentos funcionales, los cuales funjan como anticoagulantes naturales.

#### **7.5 Actividad anticolesterolemica (inhibición de la solubilidad micelar) de los concentrados e hidrolizados proteicos de la SQB y la SA.**

La capacidad inhibitoria de la solubilidad micelar se evaluó tanto en los concentrados proteicos como en los hidrolizados proteicos. En la Figura 14 se observan los porcentajes de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol que presentaron los concentrados proteicos a diferentes cocentraciones (10, 5 y 2.5 mg). El concentrado proteico de la SQB posee un mayor porcentaje de inhibición en las diferentes concentraciones teniendo un 19.81% de inhibición al emplear una concentración de 10 mg y 10.81% de inhbción a una concentración de 2.5 mg. Mientras que, el concentrado de la SA posee los menores porcentajes ya que a una concentración de 10 mg tuvo un 9.17% y a 2.5 mg 4.40% de inhibición. Esta variación podría atribuirse a la concentración de aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Leu, Met, Trp, Val, Ala y Pro) presentes en las proteínas de cada variedad, pues a dichos aminoácidos se les atribuye la capacidad de inhibición de la solubilidad micelar.

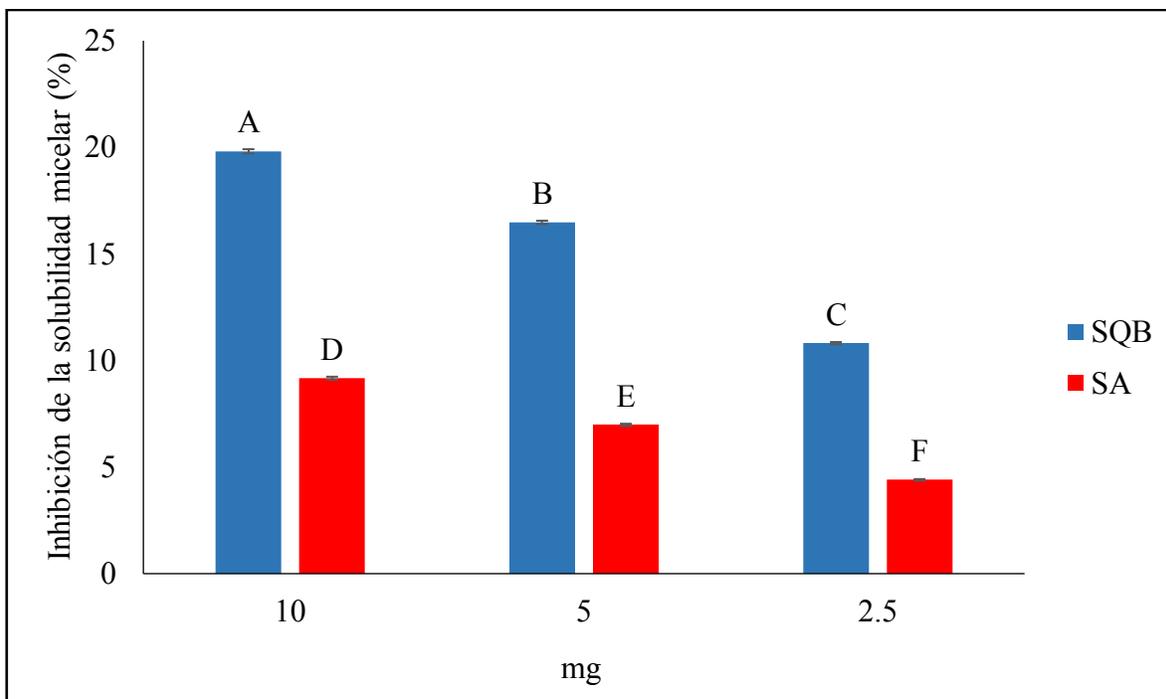


figura 17. Inhibición de la solubilidad micelar “*in vitro*” de los concentrados proteicos de la SQB y la SA a diferentes concentraciones.

Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. A-Q letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre variedades. a-p Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de reacción.

En la Figuras 15 y 16 se muestran los porcentajes de la solubilidad micelar para los hidrolizados proteicos con Pepsina<sup>®</sup> y Alcalasa<sup>®</sup>, respectivamente, a diferentes concentraciones. En los hidrolizados proteicos de la SQB con Pepsina<sup>®</sup> el mayor porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol se obtuvo en el hidrolizado proteico a 60 min de reacción con un 49.80% de inhibición. Mientras que, los hidrolizados obtenidos con la SA con Pepsina<sup>®</sup> el mayor porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol se logró a los 15 min de reacción a las diferentes concentraciones evaluadas con un intervalo de 26.42 a 35.67% de inhibición. En lo que respecta, a los hidrolizados de la SQB y la SA con la enzima Alcalasa<sup>®</sup> los porcentajes de inhibición fueron menores a los obtenidos con la enzima Pepsina<sup>®</sup>, ya que, en los hidrolizados de la SQB con Alcalasa<sup>®</sup> entre 15 a 90 min de reacción los valores más altos fueron entre 15.67 a 20.89% de inhibición. Mientras que en los hidrolizados de la SA con Alcalasa<sup>®</sup> los valores de inhibición oscilaron entre 4.93

y 13.68%. Se pudo observar que los mayores porcentajes de inhibición micelar del colesterol se lograron al realizar la hidrólisis enzimática con la enzima Pepsina<sup>®</sup>, esto es debido a que esta enzima actúa principalmente sobre enlaces peptídicos de naturaleza hidrofóbica (\*Phe [Tir o Leu], Trp [Phe o Tir]), pues estos están asociados con inhibición de la absorción del colesterol (Fang *et al.*,2007) , mientras que la Alcalasa<sup>®</sup> al ser una serinproteasa, endopeptidasa, se centra en el ataque nucleofílico en el enlace peptídico (amida) mediante un residuo de serina en su centro activo (Vioque, 2009).

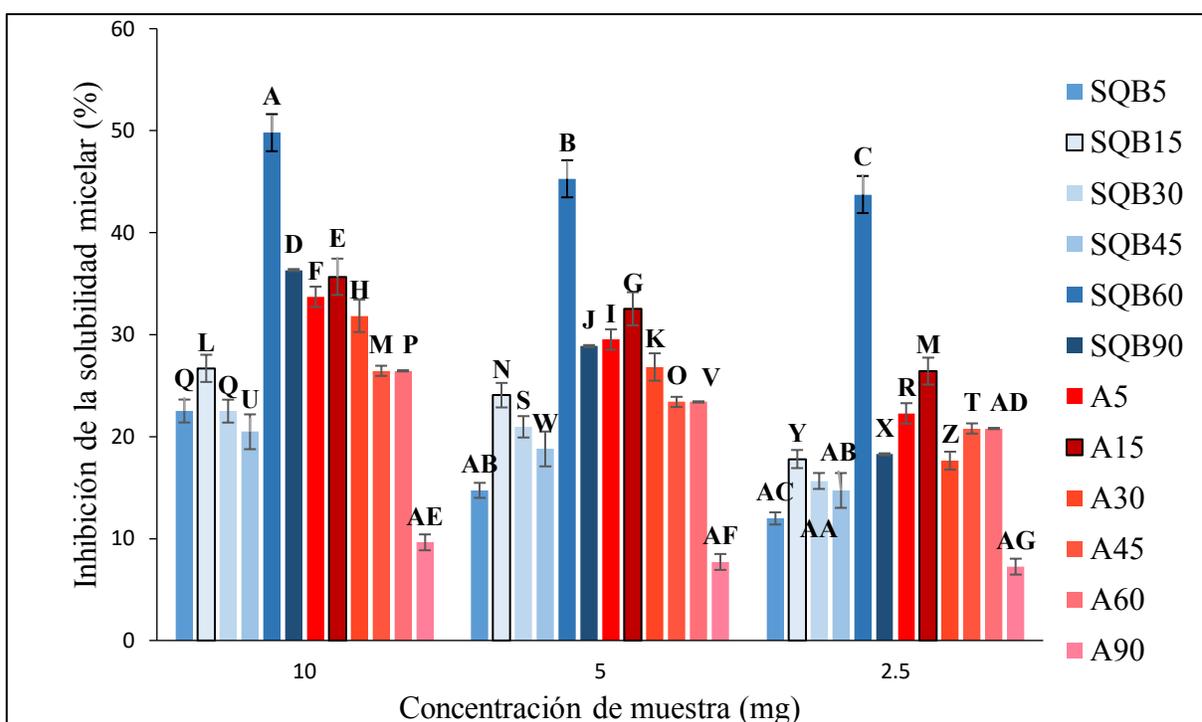


figura 18. Inhibición de la solubilidad micelar “*in vitro*” de los hidrolizados proteicos de la SQB y la SA a diferentes tiempos de reacción con Pepsina<sup>®</sup>. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-AG</sup> letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados son comparados con lo reportado por Nakagoa et al. (2001) quienes obtuvieron 9.50% de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol en hidrolizados de caseína con tripsina, por otro lado, Raederstorff (2003) reportaron una inhibición de la solubilidad micelar del colesterol de 16.6% al emplear 1% de galato de epigallocatequina en la dieta de ratas wistars, kirana et al. (2005) reportaron el 24% de inhibición en péptidos

derivado de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina. Zhong et al. (2007) obtuvieron un 87% de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol, en hidrolizados de proteína de soya con alcalasa; mientras que Kongo et al. (2011) reportaron un 67% de inhibición la solubilidad micelar, en hidrolizados de maíz obtenidos con Flavourzyme a 90 min de hidrólisis. Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran dentro de lo reportado en investigaciones anteriores, con diferentes materiales. Sin embargo, es importante mencionar, que la selección de la enzima a emplear, para obtener péptidos con esta actividad es de vital importancia, ya que con base en lo obtenido por diferentes autores, el empleo de endopeptidasas que actúen entre aminoácidos hidrofobicos, garantiza una mayor actividad anticolesterólemica, comprobando así el efecto hipocolesterolemico de las proteínas de las amarantáceas, teniendo mejores valores de inhibición las proteínas de la SQB (*A. hybridus*) esto podría ser atribuído a la composición y secuenciación de los aminoácidos hidrofobicos, presentes en estas proteínas, los cuales al estar en mayor concentración, confieren mayor capacidad de captación de colesterol y reduciendo la solubilidad micelar del mismo.

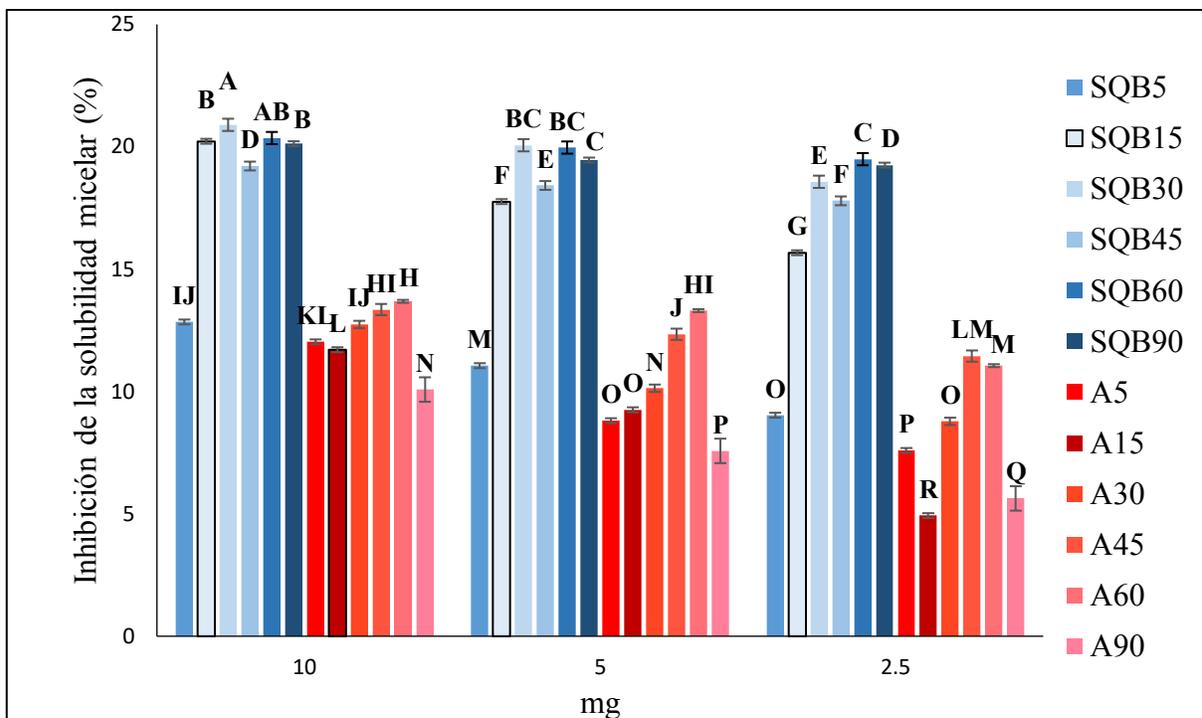


figura 19. Porcentaje de inhibición “in vitro” de los hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (SQB) y amaranto a diferentes tiempos de reacción con alcalasa®. Valores promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. <sup>A-R</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Para su absorción el colesterol es solubilizado en micelas formadas por ácido bÍlicos. Sin embargo, no se conoce con certeza cómo actúan estos péptidos, se cree que el efecto que ejercen los péptidos hipocolesterolémicos se debe a que disminuyen la solubilidad micelar del colesterol, es decir, reducen su absorción intestinal, así como la inducción de la transcripción genética de la enzima colesterol-7-hidroxilasa (responsable de metabolizar el colesterol) (Ricci-Cabello *et al.* 2012). Sin embargo, se requiere mayor cantidad de estudios en personas hipercolesterolemicas para evaluar los efectos totales así como los mecanismos de acción de dichos péptidos (Udenigwe y Aluko 2012).

## VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron concentrados proteicos contenidos de proteína superiores al 70% con el cual se puede realizar una hidrólisis extensiva, que permite evaluar diferentes actividades biológicas, además de porcentajes de humedad menores al 11% lo que garantiza una mayor vida de almacén.
- Con base en los parámetros de color tanto de las harinas como de los concentrados, ambos presentaron un ligero oscurecimiento al realizar el concentrado, pues el medio alcalino utilizado en este proceso propicia dicho oscurecimiento, sin embargo, considerando la coloración obtenida tanto las harinas como los concentrados podrían emplearse en la elaboración de suplementos ricos en proteína.
- En ambas variedades el mayor grado de hidrólisis se obtuvo con la enzima alcalasa obteniéndose valores de 36.76 para amaranto y 34.38 para SQB a 90 min de reacción, mientras que al mismo tiempo al emplearse la enzima pepsina los grados de hidrólisis obtenidos fueron de 32.08 para SQB y 32.76 para amaranto. Esto nos indica que la enzima alcalasa posee mayor selectividad por los enlaces peptídicos presentes en ambas variedades.
- La capacidad antioxidante se midió empleando 2 métodos, de los cuales se obtuvo que los hidrolizados con pepsina a 45 min de reacción con ambas variedades presentaron los valores de  $IC_{50}$  más bajos, siendo 1.53 y 1.61 mg/mL para SQB y amaranto, respectivamente, mientras que por el método ABTS el hidrolizado de alcalasa-SQB a 60 min de reacción presentaron un  $IC_{50}=1.19$  mg/mL, siendo estas las concentraciones más bajas, para obtener el 50% de actividad.
- Con base en el  $IC_{50}$  el hidrolizado proteico con mayor actividad antitrombótica el alcalasa-SQB a 60 min de reacción ya que para lograr el 50% de actividad se requieren 1.19 mg/mL de dicho hidrolizado.
- Los hidrolizados con pepsina-SQB a 60 min de reacción mostraron mayor porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar a diferentes concentraciones, obteniéndose 49.80% de actividad emplear 10 mg de hidrolizado, y 35.67 % de inhibición con pepsina-amaranto a 15 min de reacción. Los porcentajes de inhibición con alcalasa no fueron tan favorables ya que los porcentajes de inhibición mayores en cada variedad

fueron de 20.90% para alcalsa-SQB a 30 min de reacción, y de 13.68% para alcalsa-amaranto a 15 min de reacción.

- El CPSQB mostró mayor capacidad antitrombótica y anticolesterólemica, mientras que el CPA mostró mayor capacidad antioxidante al ser evaluado por dos métodos, ABTS y DPPH.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). *Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proceeding of National Academy of Science of the United State of America*, 90, 7915–7922. Crane, E. (1975)
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. e Itoh, T. (1998). *Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. J. Dairy Sci.*, 81, 3131-3138.
- Anderson JW, Johnstone BM y Cook-Newell ME. *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med* 1967; 333: 276-82.
- Ana P. Barba de la Rosa, Jacques. Gueguen, Octavio. Paredes-Lopez, Gerard. Viroben (1992). *Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40 (6), pp 931–936.
- Akubugwo, I. E., Obasi, N. A., Chinyere G. C. and Ugbogu A. E. (2007). *Nutritional and chemical value of Amaranthus hybridus L. leaves from Afipko, Nigeria African Journal of Biotechnology Vol. 6 (24), pp. 2833-2839*
- Bangoura, m., x. wenshui and z. jiali, (2009). *in vitro binding capacity of cholesterol and bile salts by partially depolymerized chitosans. am j. food technol. 4: 126-135.*
- Braca, A., Tommasi, N.D., Bari, L.D., et al. (2001) *Antioxidant Principles from Bauhinia Terapotensis. Journal of Natural Products*, 64, 892-895.  
<http://dx.doi.org/10.1021/np0100845>
- Berger, I. Monnard, F. Dionisib, D. Gumy, K.C. Hayesd, P. Lambelet (2003). *Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. Food chemistry*, 81- 119-124.
- Berganza B. F.; Morán A. W.; Rodríguez G.; Coto N. M.; Santa María M.; Bressani R. *Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content on amaranth. Plant Food for Human Nutrition* 58 (2003) 1-6.
- 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.*
- Czerwinski J, Bartnikowska E, Leontowicz H, Lange E, LeontowiczM, Katrich E,Trakhtenberg S, Gorinstein S. 2004. *Oat (Avena sativa L.) and amaranth(Amaranthus hypochondriacus) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. J Nutr Biochem* 15:622–9.

- Clemente A. *Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Sci Technol.* 1999;11(7):254–262.
- Chau, Ch-F.; Cheung, K. P. C., y Wong, Y-S. (1997). *Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2500-2503.
- Callisaya A. J.C., Alvarado K. J.A. (2009). *Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiaceas; quinua “chenopodium quinoa”, cañahua “chenopodium pallidicaule” por precipitación isoeléctrica. Revista boliviana de química*, 26(1), 12-20.
- Carrillo-Terán W. I., Vilcacundo R., Carpio C. (2015). *Bioactive components derived from amaranth and quinoa. Actualización en nutrición*, 16 (1), 18-22.
- Castel M. V. (2010). *Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto. Magíster en ciencia y tecnología de alimentos universidad del litoral.*
- Clemente, A., Vioque, J., & Millán, F. (1999). *Hidrolizados proteicos de origen vegetal. Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa.* 2(6), 25-32.
- Dergal, S. B. (2006). *Química de los alimentos cuarta edición. México: Pearson educación.*
- Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. *Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. J Agric Food Chem.* 2003; 51 (21):6300-6308.
- Escudero NL, Zirulnik F, Gomez NN, Mucciarelli SI, Gimenez MS. 2005. *Influence of a protein concentrate from Amaranthus cruentus seeds on lipid metabolism. Exp Biol Med* 231:50–9.
- Lahl, J., & Braun, J. (1994). *Enzymatic production of protein hydrolysates for food choice. Food Technology*, 10(1), 68-71.
- Cai, F., Shen, P., Morgan, M., & Reynolds, E. (2003). *Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. Australian Dental Journal*, 48(4), 240-243.
- Lajolo, F. M. (2002). *Functional foods: Latin American perspectives. British Journal of Nutrition*, 88(S2), S145-S150.
- Carew, L. B., & Gernat, A. G. (2006). *Use of velvet beans, Mucuna spp., as a feed ingredient for poultry: a review. World's Poultry Science Journal*, 62(1), 131–144.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J., . . . Dávila-Ortiz, G. (2012). *Antioxidant and metal chelating activities of*

- peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food chemistry*, 135(3), 1789-1795.
- Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Dávila-Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.
- Chertcoff, Felipe J, Emery, Nicholas C, Villagomez, Renzo, Veltri, Miguel A, Venditti, Julio, Young, Pablo, & Ubaldini, Jorge. (2009). Embolismo pulmonar tumoral: Reporte de dos casos. *Revista médica de Chile*, 137(12), 1613-1616. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009001200011>
- Lee, B. W., Hsu, S. I., & Stasior, D. S. (1999). *Medicina basada en la evidencia*. Marbán: Massachusetts General Hospital.
- Lee, K.-A., & Kim, S.-H. (2005). SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. *Food Chemistry*, 90(3), 389-393.
- Cian, R. E., Garzón, A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & Drago, S. R. (2015). Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 881-888.
- Cho, J., Unklesbay, N., Hsieh, F., & Clarke, D. (2004). Hydrophobicity of Bitter Peptides from Soy Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5895-5901.
- Cogo, A., Bernardi, E., Prandoni, P., Girolami, B., Noventa, F., Simioni, P., & Girolami, A. (1994). Acquired risk factors for deep-vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Archives of internal medicine*, 154(2), 164-168.
- Corzo-Ríos, L., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 15(1), 37-41.
- Cueto-Robledo, G., & Favila-Tello, M. I. (2008). Trombosis venosa profunda. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 41-60). México D. F.: Alfíl.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., Mejía, E. G., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
- Córdova-Lizama, A., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de firjol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona,

*Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (págs. 123-137). Barcelona: OmniaScience.*

- Adebowale, K., & Lawal, O. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, 37(4), 355-365.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, A., & Oshodi, A. A. (2005). Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*, 89(1), 37-48.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi, I. A., Oshodi, A. A., & Niranjan, K. (2007). Isolation, fractionation and characterisation of proteins from *Mucuna* bean. *Food Chemistry*, 104(1), 287-299.
- Agbede, J. O., & Aletor, V. A. (2005). Studies of the chemical composition and protein quality evaluation of differently processed *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* seed flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 89-103.
- Aimutis, W. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition*, 134(4), 989-985.
- AOAC International. (2012). *Official methods of analysis (19 ed.)*. Gaithersburg, MD: The Association.
- Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., & Heras, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(8), 2H-10H.
- Ashwell, M. (2001). Functional foods: A simple scheme for establishing the scientific basis for all claims. *Publication Health Nutrition*, 4(3), 859-863.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Mexico: Alhambra Mexicana.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), 1642-1649.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94-101.
- Baró, L., Jiménez, B., Martínez, A., & Bouza, J. (2001). Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from

- Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 128-137.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201.
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 2-8.
- Bojórquez-Balam, E., Ruiz Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (págs. 139-154). Barcelona: OmniaScience Monographs.
- Borgwardt, K., Bonifatius, S., & Gardemann, A. (2008). Acidic peptides enhanced genistein-dependent inhibition of human platelet aggregation: potential protective effect of digestible peptides plus genistein against atherosclerosis. *Nutrition research*, 28(8), 523-531.
- Brito, F. C., Kummerle, A. E., Lugnier, C., Fraga, C. A., Barreiro, E. J., & Miranda, A. L. (2010). Novel thienylacylhydrazones derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A2 synthesis inhibition. *European journal of pharmacology*, 638(1), 5-12.
- Brunner, B., Beaver, J., & Flores, L. (2011). *Mucuna*. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales Estación Experimental de Lajas, Lajas, Puerto Rico.
- Du, S. K., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 308-313.
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., & Świeca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food chemistry*, 141(3), 2177-2183.
- FitzGerald, R., & Meisel, H. (2000). Milk Protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(1), S33-S37.
- Gama-Hernández, E., & Morales-Blanhir, J. E. (2008). Factores de riesgo para tromboembolismo venoso. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 1-12). México, D. F.: Afil.
- Guerra A. C.M., Murillo W., Méndez A. J.J. Carlos M. Guerra A. (2016). Antioxidant potential use of bioactive peptides derived from mung bean hydrolysates (*Vigna Radiata*). *African*

*Journal of Food Science*. 11(3) pp. 67-73.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Grizzello, C. (2004). Angiotensin I-converting-enzymeinhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 173-188.

Gorinstein, S.; Delgado-Licon, E.; Pawelzik, E.; Heriyati Permady, H. y Trakhtenberg, S. (2001). "Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism, and Differential Scanning Calorimetry Measurements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 5595-5601.

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Guang, C., & Phillips, R. D. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5113-5120.

Gómez Gómez, A. L. (2014). Obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec.

Guzmán-Méndez, B., Jaramillo-Flores, M. E., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1859-1868.

Heit, J. A. (2003). Risk factors for venous thromboembolism. *Clinics in chest medicine*, 24(1), 1-12.

Heit, J. A., Melton, L. J., Lohse, C. M., Petterson, T. M., Silverstein, M. D., Mohr, D. N., & O'Fallon, W. M. (2001). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients vs community residents. *In Mayo Clinic Proceedings*, 76(11), 1102-1110.

Hernández-Ledesma, B., de Lumen, B., & Hsieh, C. (2013). 1997-2012: Fifteen Years of Research on Peptide Lunasin. En B. Hernández-Ledesma, & C. Hsieh, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* (págs. 3-22). Croatia: Publishing Process Manager.

Herrera-Chalé, F. G., Ruiz-Ruiz, J. C., Acevedo-Fernández, J. J., Betancur-Ancona, D. A., & Segura-Campos, M. R. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10), 1691-1698.

Hosono, A., Otani, H., Yasui, H., & Watanuki, M. (2002). Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. *Animal Science Journal*, 73(4), 241-256.

- Hwang, J. T., Ahn, C. W., Kim, H. J., Lee, K. A., Park, O. J., & Kwon, D. Y. (2011). Black soybean peptide mixture purified from *Rhynchosia volubilis* exerts antioxidant activity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and improves thrombosis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6477-6483.
- Hyun, K. W., Jeong, S. C., Lee, D. H., Park, J. S., & Lee, J. S. (2006). Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides*, 27(6), 1173-1178.
- Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 5-15.
- Je, J., Park, P., Kwon, J., & Kim, A. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7842-7845.
- Jollés, P., Levy, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., . . . Caen, J. (1986). Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from  $\epsilon$ -casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 158(2), 379-382.
- Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2009). Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chemistry*, 117(4), 687-692.
- Kala, B. K., & Mohan, V. (2010). Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Lesser Known Pulses of the Genus, *Mucuna*. *Advances in Bioresearch*, 1(2), 105-116.
- Kirana, c., rogers, pf., bennett, le., abeywardena, my. and patten gs (2005). naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives. *j. agric food chem.* 53: 4623-4627.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102(3), 759-763.
- Kong, Y., Xu, C., He, Z. L., Zhou, Q. M., Wang, J. B., Li, Z. Y., & Ming, X. (2014). A novel peptide inhibitor of platelet aggregation from stiff silkworm, *Bombyx batryticatus*. *Peptides*, 53, 70-78.
- Jauricque Ursulla Kongo-Dia-Moukala, John Nsor-Atindana and Hui Zhang, 2011. Hypocholesterolemic Activity and Characterization of Protein Hydrolysates from Defatted Corn Protein. *Asian Journal of Biochemistry*, 6: 439-449.  
[10.3923/ajb.2011.439.449](https://doi.org/10.3923/ajb.2011.439.449)
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79-88.

- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). *Bioactive peptides: production and functionality*. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto-Lepälä, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). *Impact of processing on bioactive proteins and peptides*. *Trends in Food Science and processing on bioactive proteins and peptides*, 9(8-9), 307-319.
- Kostidis, S., Stavrakoudis, A., Biris, N., Tsoukatos, D., Sakarellos, C., & Tsikaris, V. (2004). *The relative orientation of the Arg and Asp side chains defined by a pseudodihedral angle as a key criterion for evaluating the structure–activity relationship of RGD peptides*. *Journal of Peptide Science*, 10(8), 494-509.
- Kumaran, S., Palani, P., Nishanthi, R., & Kaviyarasan, V. (2011). *Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an isolate (VK12) of Ganoderma lucidum and evaluation of its antithrombotic activity*. *Medical mycology journal*, 52(2), 153-162.
- 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.
- Mata R. C. A. (2018). *Evaluación de las actividades antitrombótica y antihipertensiva de los hidrolizados proteicos del chapulín (Sphenarium purpurascens Ch.)*. Tesis Mestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec.
- Martínez-Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). *Proteínas y péptidos en nutrición enteral*. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2), 1-14.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2012). *Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1974-1981.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). *Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin*. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., . . . Vioque, J. (2004). *Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (Helianthus annuus L.) protein isolates*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1928-1932.
- Miguel, M., Alexandre, A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2006). *Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 726-731.

- Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishumura, K., Hayashi, Y., . . . Ueno, T. (1999). Structure activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1684-1690.
- Mohan, V. R., & Janardhanan, K. (1995). Chemical analysis and nutritional assessment of lesser known pulses of the genus, *Mucuna*. *Food Chemistry*, 52(3), 275-280.
- Montero-Granados, C., & Monge-Jiménez, T. (2010). Patología de la trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 68(591), 73-75.
- Montgomery, D. C. (2007). *Diseño y análisis de experimentos*. México, D.F.: Limusa S.A. de C.V.
- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá-Martínez, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227.
- NAAIS. Núcleo de Acopio y Análisis de Información en Salud. (2005). *Distribución geográfica y la salud de los mexicanos 2000 y 2005*. Obtenido de <http://sigsalud.insp.mx/naais/index.html>
- Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J Nutr*. 1999; 129: 1725-30.
- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk betalactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281: 11-7.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem*. 2011;124(4):1354–1362.
- Navarro-Reynoso, F. P. (2008). Anticoagulantes y fibrinolíticos en tromboembolia pulmonar. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 197-210). México, D. F.: Alfil.
- Neves, M., De Mira, M., & Marquez, L. (2004). Caracterização de Hidrolisados Enzimáticos de Pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(1), 101-108.
- Ngatchic, J. T., Sokeng, S. D., Njintang, N. Y., Maoundombaye, T., Oben, J., & Mbofung, C. M. (2013). Evaluation of some selected blood parameters and histopathology of liver and kidney of rats fed protein-substituted mucuna flour and derived protein rich product. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 46-53.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dammann, C. (2001). Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-648.

- Olvera-Novoa, M. A., & Olivera-Castillo, L. (2000). *Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. En R. Civera-Cerecedo, C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie, & L. E. Cruz-Suárez, Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (págs. 327-348). La Paz, B. C. S., México.*
- Pollina, E. (1996). *Design and Synthesis of RGD Mimetics as Potent Inhibitors of Platelet Aggregation. Journal of Undergraduate Sciences, 3, 119-126.*
- Qi, M., Hettiarachchy, N., & Kalapathy, U. (1997). *Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. Journal of Food Science, 62(6), 1110-1115.*
- Quist, E. E., Phillips, R. D., & Saalia, F. K. (2009). *The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (Arachis hypogaea L.) protein. LWT-Food Science and Technology, 42(10), 1717-1721.*
- Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2005). *A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. Life Sciences, 76(22), 2607-2619.*
- Re R<sup>1</sup>, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M Rice-Evans C.(1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9-10):1231-7.*
- Rodríguez U. A. R (2009). *Contenido nutricional de harinas de sorgo (Sorghum bicolor L. Moench) RCV y De Leche, harina de trigo (Triticum aestivum) y su uso en la elaboración de un muffin. (Licenciatura), Universidad de Zamorano, Honduras.*
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., & García-Garibay, M. (2012). *Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by Lactobacillus casei Shirota. International Dairy Journal, 26(2), 147-154.*
- 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.*
- Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013b). *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. Journal of Food Biochemistry, 37(1), 26-35.*
- Ruiz-Ruiz, J., Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013a). *Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutraceutico . En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero , & D. Betancur Ancona, Biactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (págs. 11-27). Barcelona: OmniaScience.*

- Salcedo-Chávez, B.; Osuna- Castro J. A.; Guevara- Lara F.; Domínguez- Domínguez J. y Paredes-López O. (2002). "Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 50, p. 6515-6520.
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 64(2), 237-243.
- Sabbione, A. C., Scilingo, A., & Añón, M. C. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 171-177.
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661-3667.
- Santos-Martínez, L. E., Bautista-Bautista, E., Pulido-Zamudio, T., Martínez-Guerra, M. L., & Sandoval-Zárate, J. (2008). Hallazgos clínicos y hemodinámicos en el tromboembolismo venoso. En F. P. Navarro-Reynoso, G. Cueto-Robledo, & R. Cicero-Sabido, *Clínica de tromboembolia pulmonar* (págs. 13-40). México, D. F.: Alfil.
- Segura-Campos, M. R., Chel Guerrero, L. A., & Betancur Ancona, D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2512-2518.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013b). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 723-731.
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013a). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience.
- Shimizu, M. (2004). Food-Derived Peptides and Intestinal Functions. *BioFactors*, 21(1-4), 43-47.
- Silverstein, M. D., Heit, J. A., Mohr, D. N., Petterson, T. M., O'Fallon, W. M., & Melton, L. J. (1998). Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine*, 158(6), 585-593.
- Silva, S.V., Malcata, F.X (2004) Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*, *Food Chem* 89, 19-26.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2005). Nutritional and antinutritional composition, in vitro amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed

- mucuna beans (Mucuna pruriens var. utilis): an under-utilised legume. Food Chemistry, 91(2), 275-286.*
- Siddhuraju, P., Becker, K., & Makkar, H. P. (2000). Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, Mucuna pruriens var. utilis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(12), 6048-6060.*
- Siddhuraju, P., Vijayakumari, K., & Janardhanan, K. (1996). Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (Mucuna pruriens (L.) DC.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(9), 2636-2641.*
- Sipola, M. (2002). Effects of milk products and milk protein-derived peptides on blood. Doctoral Thesis. Institute of Biomedicine Pharmacology. University of Helsinki.*
- Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. International Dairy Journal, 13(6), 447-453.*
- Stavarakoudis, A., Bizos, G., Eleftheriadis, D., Kouki, A., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., . . . Tsikaris, V. (2001). A three-residue cyclic scaffold of non-RGD containing peptide analogues as platelet aggregation inhibitors: design, synthesis, and structure-function relationships. Biopolymers, 56(1), 20-26.*
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90, 1-11.*
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2011). Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chemistry, 129(2), 485-490.*
- Torruco-Uco, J. G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (Phaseolus lunatus) y frijol jamapa (Phaseolus vulgaris). Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.*
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and Phaseolus vulgaris seeds. LWT-Food Science and Technology, 42(10), 1597-1604.*
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (Phaseolus vulgaris): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. LWT-Food Science and Technology, 46(1), 91-96.*

- Vadivel, V., & Janardhanan, K. (2000). Nutritional and anti-nutritional composition of velvet bean: an under-utilized food legume in south India. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(4), 279-287.
- Van der Plancken, I., Van Remoortere, M., Indrawati, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2003). Heat-Induced Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis: a Kinetic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3819-3823.
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, A., & Voragen, J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2938-2946.
- Vioque, J., Clemente, A., Bautista, J., & Millán, F. (2001). *Jornadas Internacionales sobre Proteínas Alimentarias*. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., . . . Millán, F. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology*, III JIPCA, 99-102.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51(5), 361-365.
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2014). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. *Food Research International*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Wani, A. A., & Gill, B. S. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 278-284.
- Warner, E., Kanekanian, A., & Andrews, A. (2001). Bioactivity of milk proteins: anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 151-153.
- WHO. World Health Organization. (1999). *International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension*. Guidelines Subcommittee. *Journal of Hypertension*, 17, 151-183.
- Yang, C., Dantzig, A., & Pidgeon, C. (1999). Intestinal Peptide Transport Systems and Oral Drug Availability. *Pharmaceutical Research*, 16(9), 1331-1343.
- Yang, W. G., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4), 449-451.

- Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H., & Itani, T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(1), 27-33.
- Yu, G., Wang, F., Zhang, B., & Fan, J. (2016). In vitro inhibition of platelet aggregation by peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), highland barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. f.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins. *Food Chemistry*, 194, 577-586.
- Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 521-527.
- Zhong F, Zhang X, Ma J, Shoemaker CF. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Res Int* 2007; 40: 756-62.