

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA Y ANTICARIOGÉNICA DE
FRACCIONES PEPTÍDICAS DEL FRIJOL X´PELON (*Vigna
unquiculata*).”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

L.N. MARIBEL GERÓNIMO ALONSO

ASESORES:

DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

DR. DAVID BETANCUR ANCONA

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

05 DE FEBRERO 2015



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-020/2015

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN


MÉRIDA, YUCATÁN A 21 DE ENERO DE 2015

C. MARIBEL GERÓNIMO ALONSO
PASANTE DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE
LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T E.


De acuerdo al fallo emitido por sus asesores la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez y el Dr. David Abram Betancur Ancona, y la comisión revisora integrada por el Dr. Jorge Carlos Ruiz Ruiz, el Dr. Víctor Manuel Toledo López, y el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

“ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA Y ANTICARIOGÉNICA DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DEL FRIJOL X'PELON
(Vigna unguiculata)”,

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES


M. C. MIRIAM H. SÁNCHEZ MONROY
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
MHSM/fjaa


S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis: **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez y Dr. David Abram Betancur Ancona**, por el invaluable apoyo brindado tanto de manera profesional como personal. Mi más sincero y profundo agradecimiento por la dedicación, el tiempo, espacio, los consejos y la amistad otorgado durante este tiempo.

Al comité revisor de tesis: **Dr. Jorge Carlos Ruiz Ruiz, Dr. Víctor Manuel Toledo López, Dr. Luis Fernando Cuevas Glory** por su valiosa contribución al enriquecimiento a esta tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca de estudios de la Maestría con clave 15312-Ciencia Básica y el apoyo económico recibido para la realización de la tesis “Actividad antitrombótica y anticariogénica de fracciones peptídicas del frijol x’pelon (*vigna unguiculata*)” en el proyecto “Actividad biológica de fracciones pépticas derivadas de la hidrólisis enzimática de proteínica de frijoles lima (*Phaseolus lunatus*) y Caupí (*Vigna unguiculata*).

Al **laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química, campus de ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad Autónoma de Yucatán**, por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido llegar a realizar mi sueño, por todo el amor con el que me rodea y porque nunca me abandona.

A mis tíos (Eduardo Félix y Antonia Gerónimo) por haberme ayudado en mi educación y desarrollo como persona, por haberme apoyado en todo momento. Mil gracias, Dios los recompensara.

A todos mis amigos pero en especial a Thalía López y Mariana Delgadillo; mil gracias por sus críticas constructivas, por todos los momentos que hemos pasado juntas y porque han estado conmigo siempre aunque sea solo para dar lata☺.

A todos mis profesores del posgrado y también aquellos de toda la vida, por su paciencia y firmeza en la enseñanza, porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

Índice

Resumen

I.-Introducción.....	3
II.-Antecedentes.....	5
II.1.-Composición química del <i>Vigna unguiculata</i>	5
II.2.-Fuentes para la obtención de concentrados proteínicos.....	6
II.3.-Hidrolizados proteínicos.....	7
II.4.-Hidrólisis enzimática.....	10
II.5.-Alimentos funcionales.....	12
II.6.-Actividades biológicas.....	13
II.6.1.-Actividad Antitrombótica.....	14
II.6.2.-Actividad anticariogénica.....	18
III.-Objetivos.....	21
IV.-Materiales y métodos.....	22
IV.1.-Obtención de la materia prima.....	22
IV.2.-Obtención de la harina del <i>Vigna unguiculata</i>	23
IV.3.-Obtención del concentrado proteínico.....	23
IV.4.-Composición proximal del concentrado proteínico	24
IV.5.-Biocatalisis.....	24
IV.5.1.-Sistema Alcalase® -Flavourzyme®.....	25

IV5.2.-Sistema Pepsina-Pancreatina.....	25
IV.6.-Grado de hidrólisis (GH).....	26
IV.7.-Fraccionamiento por ultrafiltración.....	27
IV.8.-Bioactividades <i>in vitro</i>	29
IV.8.1.-Actividad antitrombótica.....	29
IV.8.2.-Actividad anticariogénica.....	30
IV.9.-Determinación del perfil de aminoácidos.....	31
IV.10.-Análisis estadístico.....	32
V.-Resultados.....	33
V.1.-Composición química de harina y concentrado del <i>V. unguiculata</i>	33
V.2.-Hidrólisis del concentrado proteínico y Grado de Hidrólisis (GH).....	34
V.3.-Fracciones peptídicas y determinación proteica.....	35
V.4.-Bioactividades antitrombótica y anticariogénica.....	37
V.5.-Perfil de aminoácidos.....	41
V.6.-Conclusiones.....	42
V.7.-Referencias.....	44

Índice de figuras

Figura 2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas.....	10
Figura 2.2. Esquema de actividad catalítica de proteasas.....	11
Figura 4.1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.....	22
Figura 4.2. Proceso de ultrafiltración de los hidrolizados proteínicos de <i>V. unguiculata</i>	28
Figura 5.1. Grado de hidrólisis para Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme® de las proteínas <i>V. unguiculata</i>	34
Figura 5.2. Porcentaje de proteínas de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de los sistemas Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme®.....	36
Figura 5.3. Inhibición sobre la agregación plaquetaria del <i>V. unguiculata</i>	37
Figura 5.4. Porcentaje de la inhibición de la desmineralización de calcio y fósforo con el sistema Pepsina-Pancreatina del hidrolizado <i>V. unguiculata</i>	39
Figura 5.5. Porcentaje de la inhibición de la desmineralización de calcio y fósforo con el sistema Alcalase®-Flavourzyme® del hidrolizado del <i>V. unguiculata</i>	40

Índice de tablas

Tabla 2.1. Composición química de la harina del <i>Vigna unguiculata</i> (% base seca).....	5
Tabla 2.2. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo (Millán y Vioque, 2002; Iwaniak y Minkiewicz, 2007).....	14
Tabla 4.1. Diluciones de la curva estándar de L-serina.....	26
Tabla 5.1. Composición química de la harina y del concentrado del <i>V. unguiculata</i> (% b.s.).....	33
Tabla 5.2. Perfil de aminoácidos del hidrolizado de <i>V. unguiculata</i> en los sistemas Alcalase®-Flavourzyme® y Pepsina Pancreatina (g/100g de proteína).....	41

Resumen

Los biopéptidos 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. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad biológica antitrombótica y anticariogénica *in vitro* a los hidrolizados y fracciones proteínicas de la leguminosa *Vigna unguiculata* obtenidas por hidrólisis proteica *in vitro*. Se obtuvieron hidrolizados proteínicos a partir del concentrado del frijol x'pelon por acción de sistemas enzimáticos con Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme®. Se determinó la composición proximal, así como el grado de hidrólisis de las fracciones peptídicas, las cuales se ultrafiltraron y posteriormente se les evaluó la actividad biológica. Los resultados indicaron que el concentrado tuvo 68.29% de proteína en base seca, 5.72% de cenizas, 0.08% de fibra cruda, 2.97% grasa y 22.94% de extracto libre de nitrógeno. La hidrólisis enzimática con el sistema de Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme® fue extensiva con 34.94% y 81.43%, respectivamente. En cuanto a la actividad antitrombótica, presentaron mayor actividad biológica las fracciones peptídicas obtenidas con Alcalase®-Flavourzyme® con 100% de inhibición plaquetaria mientras que con Pepsina- Pancreatina fue 77.41%. La mayor actividad anticariogénica se obtuvo con el sistema Pepsina- Pancreatina con 61.55% y 56.07% de la desmineralización de calcio y fósforo, respectivamente. Considerando la inhibición de la agregación plaquetaria y la protección al esmalte de los dientes de ambos sistemas, el hidrolizado proteico de la leguminosa *V. unguiculata* podría ser utilizado como fuente de péptidos bioactivos y su posterior utilización para desarrollar alimentos con efectos beneficiosos a la salud.

Abstract

Biopeptides may play an important role in metabolic regulation and modulation, suggesting potential use as nutraceuticals and functional food ingredients for health promotion and disease risk reduction. The objective of this work was to evaluate the antithrombotic and anti-cariogenic bioactivity *in vitro*, from both protein hydrolysates and their fractions of x'pelon bean (*Vigna unguiculata*), obtained by biocatalysis. Protein hydrolysates were obtained from the concentrate x'pelon bean enzyme systems by action of Pepsin-Pancreatin® and Alcalase-Flavourzyme®. Proximate composition and the hydrolysis degree of peptide fractions were determined, which were subjected to ultrafiltration and then were evaluated for bioactivity. The results indicated that the concentrate was 68.29 % protein on a dry basis, 5.72 % ash, 0.08 % crude fiber, 2.97% fat, and 22.94 % nitrogen free extract. Enzymatic hydrolysis with Pepsin-Pancreatin® and Alcalase-Flavourzyme® systems were extensive with 34.94 % and 81.43 % respectively. As for the antithrombotic activity, fractions obtained with Alcalase-Flavourzyme® showed higher bioactivity peptide with 100% platelet inhibition whereas Pepsin-Pancreatin® was 77.41 %. Most anti-cariogenic activity was obtained with the Pepsin-Pancreatin® system, 61.55 % and 56.07 % of demineralization of calcium and phosphorus, respectively. Considering inhibition of platelet aggregation and protection tooth enamel of both systems, x'pelon bean hydrolysates could be used as a source of bioactive peptides and its subsequent use to develop foods with beneficial health effects.

I. Introducción

Las leguminosas al igual que los cereales y los alimentos de origen animal, son fuentes importantes de nutrientes en la dieta humana, suministrando energía, proteínas alto valor biológico, vitaminas esenciales y minerales. Estos alimentos, han sido objeto de estudios en los últimos años ya que se han reconocido que contienen componentes que pueden afectar la salud; ha motivado a científicos a buscar clarificar el papel de los componentes alimenticios en el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades. En este sentido, se han reportado las propiedades de actividades biológicas de un número importante de componentes que contienen proteínas específicas, péptidos y ácidos grasos que poseen actividad biológica.

Los péptidos bioactivos o biopéptidos han sido definidos como fragmentos específicos de proteínas, ya sean de animal o vegetal, que tienen un impacto positivo sobre funciones del cuerpo humano y pueden influir definitivamente en la salud y vas más allá de la nutrición normal y adecuada. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los péptidos, es la afección que tendrá en los principales sistemas del organismo: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune.

Hasta el momento, los péptidos que han sido descritos tienen propiedades estructurales en común, cadena corta de aminoácidos (de 2 a 9 aminoácidos), residuos aminoácidos hidrófobos en adición de grupos prolina, lisina o arginina, y resistencia de peptidasas digestivas.

La finalidad de conocer que fragmento de una proteína específica tiene actividad biológica es para buscar alternativas a los medicamentos, que tengan la misma función pero que no conlleve un efecto secundario; ya existe la creciente preocupación por parte de la población con respecto a los efectos negativos de algunos ingredientes químicos sintéticos y el aumento en la preferencia por compuestos naturales.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad biológica antitrombótica y anticariogénica *in vitro* a los hidrolizados y fracciones proteínicas de la leguminosa *Vigna unguiculata* obtenidas por hidrólisis proteica *in vitro*

II. Antecedentes

II.1. Composición química del *Vigna unguiculata*

La composición química del *Vigna unguiculata* se puede observar en la tabla 1, como se ha mencionado, las variaciones en los diferentes componentes se deben a las prácticas agronómicas que van desde la siembra hasta el almacenamiento de los granos. Una porción de frijol cocido es de 86g y aporta 114 Kcal, tiene 7.6 g de proteínas, 0.5 g de lípidos, 20.4 g de hidratos de carbono, 7.5 g de fibra dietética; que es 50-65% de hidratos de carbono, 20-29 % de proteínas, 16-20% de fibra, 3-10% de cenizas y 1-3% de lípidos. Las vitaminas que contiene en su mayoría son del complejo B (Tiamina [B1], Riboflavina [B2], Niacina [B3], Folacina [B9]), entre los minerales se encuentran el potasio, fósforo, magnesio, zinc, hierro y calcio; y los fitoquímicos que se encuentran son isoflavonas, saponinas, lectinas, polifenoles (Pérez et al., 2008, Casanova, 2002).

Tabla 2.1. Composición química de la harina del *Vigna unguiculata* (% base seca)

Componente	Casanova 2002	Polanco 2001	Sánchez 2013	Sosa 2008
Proteína cruda (g)	24.20	24.22	29.27	27.85
Fibra cruda (g)	6.30	3.49	3.14	1.10
Grasa cruda (g)	1.20	2.18	1.45	1.26
Cenizas (g)	3.50	3.32	4.32	1.58
Extracto libre de nitrógeno (g)	54.40	66.79	61.82	68.21

Las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y al complementarse con los cereales la complementación aminoacídica es equivalente al de origen animal (Bourges, 1987; Potter y Hotchkiss, 1999).

II.2. Fuentes para la obtención de concentrados proteínicos

Existen varios métodos para la precipitación de las proteínas, tales como disminución de la solubilidad (precipitación isoelectrica), desnaturalización selectiva o afinidad. En esta investigación se utilizó la precipitación isoelectrica el cual consiste en el fraccionamiento en húmedo, método reportado por Betancurt *et al.*, (2004); y consiste en suspender la harina en agua destilada, hacer un ajuste de pH alcalino para la solubilización de las proteínas y posteriormente se ajusta al pH ácido para la precipitación de las proteínas a punto isoelectrico, obteniendo como producto final el concentrado de proteínas puro. Las ventajas del método es que la operación se adapta a fácilmente a gran escala, se utilizan equipos sencillos, se puede realizar de forma continua y se dispone de diversos agentes precipitantes.

Las fuentes proteicas son diversas, las de origen animal son consideradas de alto valor biológico por contener proporciones de aminoácidos esenciales que cubren las necesidades humanas; sin embargo, la disponibilidad y el costo son factores claves en la elección de la fuente proteínica a utilizar y es por esa razón que se han buscado materias primas alternas. Una de esas opciones es el usar proteínas de origen vegetal y la principal fuente son las leguminosas ya que presentan mayor contenido de proteínas que los cereales (6-10%) así como desechos generados en las industria extractivas, por ejemplo la industria extractiva de aceite.

(Dávila *et al.*, 2003; Martínez, 1998). En 1997 Fernández-Quintela *et al.*, concentraron proteínas de guisante, haba y soya de los cuales obtuvieron contenidos mayores al 80%; de igual forma se han obtenido concentrados de las leguminosas *Phaseolus lunatus* y *Mucuna pruriens* (Torruco, 2009; Tovar, 2011).

Los concentrados proteínicos, son productos que contienen en mayor porcentaje proteínas que el material de partida, aproximadamente un 70% en base seca ya que durante el proceso de elaboración se eliminan, grasas, carbohidratos y otros componentes (Badui, 2006; Shallo *et al.*, 2001). Los concentrados proteínicos tienen diversas aplicaciones dependiendo de su grado de hidrólisis; la mayor parte de la aplicación tiene lugar en los alimentos tradicionales, para tener éxito es necesario que el concentrado mantenga la calidad, es decir, que mantenga un color, sabor, aroma, textura, composición química y nutricional similar a los tradicionales; estas características marcan la pauta para el grado de sustitución. Los concentrados proteínicos pueden ser modificados químicamente, como por ejemplo mediante acilación para mejorar propiedades como la solubilidad o mediante desamidación ácida para mejorar otras propiedades funcionales (Chau *et al.*, 1997).

Para mejorar la nutrición es el uso principal que se les da a los concentrados proteínicos; formulas infantiles, suplementos y complementos alimenticios para adultos.

A partir de los concentrados proteínicos se pueden obtener los hidrolizados proteicos por reducción de la longitud de las cadenas de aminoácidos que conforman las proteínas.

II.3. Hidrolizados proteínicos

Los hidrolizados proteínicos han sido empleados para reducir la alergenicidad a ciertas proteínas nativas, para suministrar requerimientos nutrimentales, para producir péptidos con actividades biológicas específicas como por ejemplo la antitrombótica, anticariógena, antioxidante y antihipertensiva. Así mismo pueden potenciar características funcionales como cambios de solubilidad, viscosidad, sabor, propiedades de formación de espuma y emulsión, entre otros (Janitha *et al.*, 2002; Van der Ven *et al.*, 2002b). Otra aplicación ampliamente utilizada de los hidrolizados

proteínicos es el usarlos como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales destinadas a la alimentación infantil o adultos enfermos; el diseño de este tipo de dietas entéricas es para que se puedan absorber en el intestino sin una digestión previa en el estómago, este tipo de dietas son esenciales en el tratamiento de pacientes con desordenes estomacales, así como en lactantes con síndromes de malabsorción – nutrición (Lebenthal et al., 1983).

Los hidrolizados proteínicos no solamente son usados en la industria alimentaria, sino también como fuente de fermentación para el crecimiento de microorganismos como es el caso de las proteínas hidrolizadas derivadas de levaduras o caseína; otro uso es en cosmética para el tratamiento del cabello y así mismo pueden ser usados como fertilizantes vegetales (Vioque y Millán, 2001).

La esencia de la hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño e incluso aminoácidos libres. La ruptura de los enlaces peptídicos puede llevarse a cabo por diferentes métodos los cuales poder ser químicos o biológicos (Vioque y Millán, 2001). El proceso más recomendado para la hidrólisis es el biológico sobre todo cuando los productos serán utilizados en el campo de la nutrición, pues se sabe que los procesos químicos pueden generar compuestos indeseables (Were *et al.*, 1997; Chan y Ma, 1999). En cuanto a la hidrólisis química, ésta puede destruir la forma L de los aminoácidos y producir la forma D de los mismos, así también forma sustancias toxicas como la lisinoalanina que reduce la biodisponibilidad de los aminoácidos (Lahl y Braun, 1994).

Ahora bien, para definir el uso que tendrá el hidrolizado es necesario saber y conocer su grado de hidrólisis (GH); el grado de hidrólisis es el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El GH se determina por las condiciones utilizadas tales como la concentración de sustrato, relación de enzima-sustrato, el tiempo de incubación, pH y temperatura (Vioque y Millán, 2001). El GH se clasifica en tres grupos: a) hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (1-10%), son

usados para mejorar las propiedades funcionales tales como la solubilidad, el poder emulsificante, la capacidad espumante y la absorción de agua y aceite; son hidrolizados ideales para la elaboración de productos de panadería, helados, mayonesas y derivados de la carne (Vioque *et al.*, 2006); b) hidrolizados con un grado de hidrólisis variable, generalmente alto y son usados como “flavorizantes” porque aportan sabor y aroma; en este caso el “flavor” va en función del sustrato usado y las condiciones de la hidrólisis y pueden aportar sabor y olor a los alimentos que se añaden. El “flavor” va a depender de la cantidad y del tipo de péptido liberado; quizás el factor principal en la determinación del “flavor” sea la interacción de estos aminoácidos con otros componentes tales como azúcares o lípidos. Esta interacción puede producirse mediante las reacciones de Millard, generando así compuestos secundarios volátiles responsables del olor y sabor en el producto el cual se utiliza para realzar el sabor. Este tipo de hidrolizado es usado en sopas, comidas precocidas, productos de carne y salsa (Vioque *et al.*, 2006); c) hidrolizados con alto grado de hidrólisis (mayor al 10%) también llamados hidrolizados extensivos y son utilizados en la alimentación especializada (Vioque *et al.*, 2006). Algunas fórmulas en las que se usan los hidrolizados extensivos son: fórmulas infantiles hipo-alérgicas, fórmulas destinadas a nutrición clínica en pacientes con enfermedades gastrointestinales, renales y hepáticas y suplemento proteínico (Mahmoud, 1994; Clemente *et al.*, 1999; Vioque *et al.*, 2006).

Otro uso que se le da a los hidrolizados proteínicos es en el desarrollo de productos promotores de la salud conocido globalmente como alimentos funcionales; el alimento funcional es un alimento convencional o similar en apariencia, que se consume como parte de la dieta normal y que tiene un efecto fisiológico beneficioso y/o reduce el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas (López, 2007). Un producto nutracéutico a diferencia de los alimentos funcionales, es un bioactivo aislado o purificado a partir de un alimento que se suministra en una matriz no alimentaria (píldoras, capsulas o ampollas) y que se usa para mejorar la salud, en dosis que exceden aquellas que pueden ser obtenidas

a partir del alimento natural. De esta manera es como han surgido al mercado alimentos con elevado contenido de diferentes componentes bioactivos cómo: ácidos grasos, péptidos bioactivos, antioxidantes, carbohidratos prebióticos, vitaminas o minerales y bacterias prebióticas, entre otros (Juárez, 2007).

II.4. Hidrólisis enzimática

La generación de hidrolizados proteínicos por vía enzimática consiste en involucrar enzimas que catalicen la ruptura de enlaces peptídicos (Figura 1), generando así péptidos de menor tamaño y en ocasiones aminoácidos libres (Manninem, 2004; Vioque y Millán, 2001).

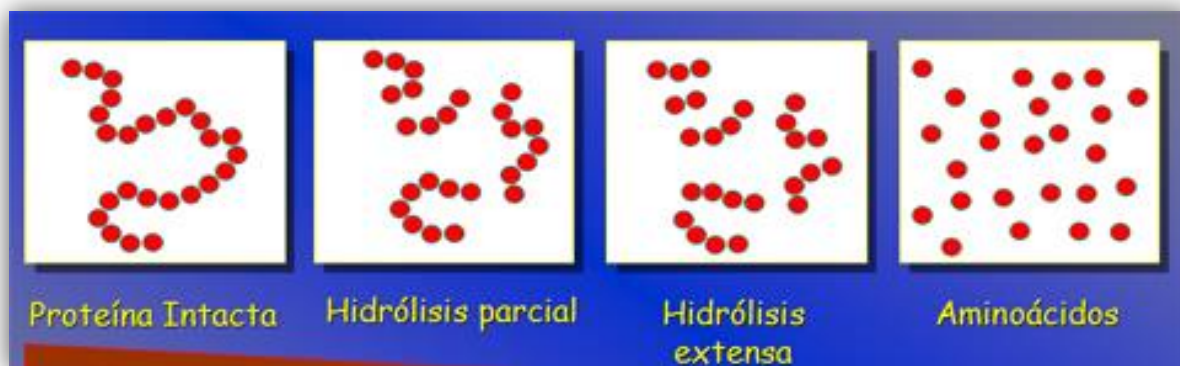


Figura 2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas.

Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Existen tanto de origen vegetal, animal y microbiano. La acción que pueden presentar puede ser endopeptidasa [endo] o exopeptidasa [exo] (Figura 2). Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos a lo largo de la cadena mientras que las exopeptidasas, si remueven el ultimo aminoácido del extremo carboxilo son carboxipeptidasas y si remueven el ultimo aminoácido del extremo amino son aminopeptidasas (Badui, 2006).

Las proteasas son fundamentales para la recuperación de proteínas presentes en materiales de desperdicio (material de desecho de las industrias), las cuales al ser hidrolizadas eliminan las características de olor, color y sabor de la proteína original (López-Munguía, 1986).

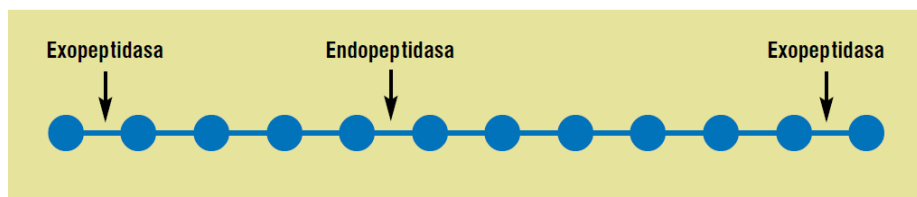


Figura 2.2. Esquema de actividad catalítica de proteasas

Las proteasas específicas para la obtención de hidrolizados proteínicos son a) la Alcalase®, utilizada para la obtención de hidrolizados proteicos de diferentes grados de hidrólisis; esta enzima se obtiene del *Bacillus licheniformis*, la parte activa es la Subtilisina A, tiene un rango de pH de 6.5 a 8.5 y una temperatura óptima de 55 a 70°C. Sus principales blancos son las uniones peptídicas de aminoácidos hidrofóbicos terminales Leu, Tyr y Val, el sabor amargo de los hidrolizados disminuye debido al tipo de ruptura; b) Flavourzyme® es un complejo enzimático ya que presenta corte endo y exo, ésta enzima está diseñada para hidrolizar proteínas en condiciones alcalinas, neutras o ligeramente ácidas; puede utilizarse para eliminar el sabor amargo en hidrolizados parciales y así mismo se pueden obtener -con esta enzima- hidrolizados exhaustivos mediante la acción secuencial con endoproteasas. Flavourzyme® es una proteasa de origen microbiano y se obtiene de la cepa del *Aspergillus oryzae* y tiene un rango de acción óptimo a pH 5.0 – 7.0 con un rango de temperatura de 70 a 80°C de igual forma que la Alcalase®, se caracteriza por Hidrolizar los enlaces que unen a los péptidos con los aminoácidos hidrofóbicos terminales (Clemente *et al.*, 1999; Kristinsson *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001);

c) La pepsina es la principal enzima gástrica que degrada las proteínas en el estómago durante la digestión, tiene actividad endopeptidasa, hidrolizando preferentemente por el extremo C-terminal de los residuos aromáticos Fen, Tir, Trp. Es secretada en el estómago como pepsinogeno, que es el precursor inactivo que se convierte en su forma activa a pH 1.5 con una temperatura de 37°C y se desactiva permanentemente con un pH superior a 6. Su acción rompe largas cadenas de polipéptidos en cadenas más cortas, es decir que su acción genera algunos aminoácidos libre pero la mayoría son oligopéptidos (Megías et al., 2004). d) Por su parte la pancreatina incluye proteasas como la tripsina, quimotripsina, elastasa, y carboxipeptidasas, así como enzimas amilasa y lipasa pancreática y nucleasas. La tripsina, quimotripsina y elastasa son serinoproteasas, con actividad endopeptidasa. Tiene un pH óptimo de 7 a una temperatura de 37°C; la hidrólisis con pancreatina resulta ser una mezcla de pequeños oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libre (30-40%) que son absorbidos a lo largo del intestino delgado (Sewlad y Jakubke, 2002).

II.5. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan un efecto beneficioso para la salud independientemente del aporte de nutrientes; no constituyen en el sentido estricto, un grupo de alimentos como tal, más bien son resultados de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes a los alimentos usuales. Los alimentos funcionales no solo se refiere a productos elaborados, también lo hace hacia alimentos tradicionales como aceite de oliva, tomate, legumbres entre otros que contienen componentes con propiedades beneficiosas para la salud (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria [SENC], 2005). Los alimentos funcionales complementan la función nutritiva y la prevención de enfermedades; las cantidades ingeridas deben ser las normales consumidas en la dieta; así mismo la presentación de un alimento funcional tiene que ser simple, es decir sin modificar sus características, nunca presentarse en capsulas o comprimidos (SENC, 2005).

Como ya se ha mencionado anteriormente, un alimento funcional es el que contiene un componente benéfico para la salud; una alternativa podría ser la adición de péptidos bioactivos a los alimentos que no los contienen. Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora y ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante la hidrólisis química o enzimática (Meisel, 1998). Generalmente son péptidos pequeños, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud (Pihlanto-Leppälä, 2000; Shaidi y Zhong, 2008); tras la administración, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso (FitzGerald, 2000; Korhonen y Pihlanto, 2003). Se evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer así funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Robert y Zaloga, 1994).

II.6. Actividades biológicas

En la secuencia primaria de una proteína hay determinadas regiones que una vez liberadas y activadas mediante hidrólisis por acción de enzimas específicas o durante los procesos de elaboración de un producto, pueden presentar actividades biológicas y funcionales que pueden ser regulatorias en el cuerpo humano y las cuales son adecuadas para la nutrición (Vioque y Millán, 2001). A continuación se presenta en el Tabla 2 diferentes tipos de péptidos bioactivos y sus efectos sobre la salud.

Tabla 2.2. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo (Millán y Vioque, 2002; Iwaniak y Minkiewicz, 2007).

Péptidos bioactivos	Efecto benéfico
Opioides	Regulan el tránsito intestinal y mejoran la digestión y adsorción
Inmunomoduladores	Estimula la respuesta inmune
Transportadores de minerales	Mejoran la absorción de minerales y metales
Antitrombóticos (anticoagulantes)	Reducen los riesgos de padecer trombosis arterial o venosa.
Antihipertensiva (inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I)	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y de envejecimiento
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Reguladores del tránsito intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos

II.6.1. Actividad antitrombótica

Cada año las enfermedades no transmisibles (ENT) causan la muerte a más de 36 millones de personas y las enfermedades cardiovasculares constituyen el 48%; el 80% de las defunciones por ENT se originan en países de ingresos bajos y medios. Entre los factores de riesgos se encuentran el consumo de tabaco, inactividad física, uso nocivo del alcohol y hábitos dietéticos no saludables (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2013).

En 1930, las enfermedades cardiovasculares ocupaban el 10° lugar, para 1980 se posicionó en el 4° lugar y para el año 2012 obtuvo el 1er lugar (DEAE/DIE/SS, 2013).

Un coágulo y un trombo se forman de la misma forma; sin embargo, la formación del coágulo es una respuesta homeostática de alto valor biológico y el cual tiene por objetivo evitar la muerte por hemorragia, mientras tanto la formación de un trombo es un estado patológico. La diferencia radica en que después de una lesión vascular, el coágulo homeostático se forma sin ocluir el vaso ni se extiende a lo largo del lumen, ocurre y se mantiene en el sitio y tiempo necesario para ser luego reemplazado por tejido conectivo. Así, el inicio, crecimiento y mantenimiento del coágulo están regulados en el tiempo y en el espacio (Lobato-Mendizabál y Majluf-Cruz, 2000).

El proceso de coagulación está formado por la hemostasia y la fibrinólisis, depende del vaso sanguíneo, las células hemáticas circulantes, la hemostasia y sus reguladores (Majluf, 2007). La hemostasia es un proceso fisiológico que mantiene la sangre en estado líquido, así también induce la formación de un tapón hemostático en los sitios donde hay lesión vascular; una alteración en este proceso hemostático llevará a la formación de trombosis. Los trombos se clasifican en: trombos arteriales y cardiacos, los venosos y los desarrollados sobre las válvulas cardiacas (Kumar et al., 2008; Majluf, 2007; Schunke, Schulte y Schumacher, 2006).

La trombosis es la obstrucción local del flujo de sangre por una masa en algún vaso arterial o venoso, los tejidos irrigados por el vaso obstruido sufren isquemia (Kumar et al., 2008; Fattorusso y Ritter, 2001). La formación del trombo está influenciada por la triada de Virchow, la cual consiste en a) lesión endotelial, b) la estasis o turbulencia del flujo sanguíneo y c) la hipercoagulabilidad de la sangre. La lesión endotelial se da porque hay pérdida física del endotelio local lo cual produce exposición de la matriz extracelular subendotelial entonces hay adhesión de plaquetas, liberación de factor tisular y la depleción local de prostaglandina tipo 2 [PGI₂] y plasminógeno [PA] (Braunwald *et al.*, 1998; Kumar et al., 2008; Majluf, 2007; Tamayo y Corella, 2007).

Por su parte, la turbulencia causa lesión o disfunción endotelial; al alterar el flujo laminar la plaquetas se acercan al contacto con el endotelio, evitan la dilución de los factores de coagulación activados por la sangre, retrasan el flujo de inhibidores de factores de coagulación y permiten la formación de trombos favoreciendo así la actividad celular endotelial predisponiendo a trombosis local (Majiluf, 2007). La hipercoagulabilidad es la alteración en las vías de la coagulación de los que predisponen a la trombosis. Las causas primarias son: mutaciones del Factor II, mutación del gen de Metiltetrahidrofolato y deficiencia de la proteína C; las causas secundarias pueden deberse a la inmovilización prolongada, infarto de miocardio, fibrilación auricular y dolor tisular, entre otros. Por otro lado, la hipercoagulabilidad puede ser adquirida como el uso de anticonceptivos orales y el estado hiperestrogénico del embarazo, los cuales pueden estar parcialmente causados por aumento de la síntesis hepática de factores de coagulación y una reducida síntesis de antitrombina III. En los cánceres diseminados la liberación de productos tumorales pro-coagulantes predisponen a trombosis y en la edad avanzada el aumento de la susceptibilidad a la agregación plaquetaria y una reducida liberación de PGI por el endotelio predispone a la hipercoagulabilidad (Braunwald, 1998; Fattorusso y Ritter, 2001).

La coagulación se puede llevar a cabo por dos vías: intrínsecas y extrínsecas. Se llama coagulación extrínseca cuando la cascada de coagulación es provocada por algún factor externo a los componentes sanguíneos.

La trombosis en sí, implica cuatro pasos fundamentales: **1)** la activación de la glucoproteína GP IIb/IIIa (complejo receptor) por medio de agonistas como el ADP, trombina y colágeno; **2)** la adhesión de las plaquetas, al haber lesión endotelial las plaquetas son capaces de pegarse a las proteínas del colágeno expuestas que contienen factor von Willenbrand; una vez adheridas las plaquetas liberarán difosfato de adenosin (ADP), serotonina y tromboxano A_2 , estos últimos estimulan la vasoconstricción y ayudan a disminuir el flujo sanguíneo al vaso dañado. La liberación de ADP y tromboxano A_2 vuelven “pegajosas” a otras plaquetas (Ira Fox,

2003). **3)** y se lleva a cabo la agregación plaquetaria mediada por el fibrinógeno y su receptor la GP IIb/IIIa mediante la secuencia tripeptídica Arg-Gli-Asp localizada en una de las cadenas del fibrinógeno, y **4)** la coagulación (Majiluf y Espinosa, 2007; Miyashita et al., 1999). Toda la cascada de coagulación requiere Ca^{2+} y fosfolípidos que son proporcionados por las plaquetas.

Como se ha mencionado anteriormente, el trombo puede ocluir vasos sanguíneos e interrumpir el flujo normal de sangre. Para que esto no suceda se emplean medicamentos que ayudan a inhibir el mecanismo de agregación plaquetaria; algunos de ellos son: aspirina, inhibe la formación de prostaglandina; la cumarina inhibe la acción de la vitamina K; la heparina inhibe la actividad de la trombina; el citrato se combina con el Ca^{2+} (Ira Fox, 2003). En general, los fármacos antitrombóticos actúan mediante tres mecanismos a) inhiben el funcionalismo plaquetario, b) inhiben el proceso de coagulación plasmática y c) aceleran la lisis del coágulo ya formado. Sin embargo, el uso prolongado de estos fármacos puede provocar efectos adversos gastrointestinales y alergias y otros como la ticlopidina puede causar una severa neutropenia (Aranza, 2004; Llanos, 2001).

Debido a los efectos secundarios se ha favorecido la nueva búsqueda de otros agentes para prevenir o tratar la trombosis. Los péptidos bioactivos con capacidad antitrombótica pueden inhibir el funcionalismo plaquetario ya que actúan como antagonistas del fibrinógeno y se unen a la GP IIb/IIIa. Se han aislado péptidos con efecto antitrombóticos a partir de la proteína k-caseína procedente de la leche de vaca. Chim (2011) reportó péptidos antitrombóticos aislados del pepino de mar; Tovar (2011) reportó péptidos antitrombóticos del frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*) y Córdoba (2013) reportó actividad antitrombótica a partir del frijol lima (*Phaseolus lunatus*).

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 (RGD) del fibrinógeno. Es concebible por lo tanto, que los péptidos que contienen la secuencia RGD puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa, resultando en la inhibición de la agregación de plaquetas.

En la secuencia RGD, una unidad catiónica, en este caso el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido β -carboxílico de la Asp, es requerida para la actividad inhibitoria. Además, la distancia entre estos grupos funcionales catiónicos y aniónicos es un factor importante en potencia. 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-RGD, se piensa que puede estar involucrado en la ligadura iónica con el grupo carboxilato del Asp en la GPIIb/IIIa. Con base en lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIa/IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento post-angioplastia o post-trombolíticos (Miyashita et al., 1999).

II.6.2. Actividad anticariogénica

La caries dental es una enfermedad destructiva de las estructuras de los dientes y es también de las más frecuentes. Es una enfermedad multifactorial, que precisa para su desarrollo la interacción de factores como la resistencia del huésped, las relaciones microbianas, las características de la saliva y del sustrato, así como el tiempo para actuar (García *et al.*, 2008). Actualmente se reconoce que una cavidad es la última manifestación de una infección bacteriana. Las bacterias presentes en la boca forman una comunidad compleja que se adhiere a la superficie del diente en forma de una biopelícula, comúnmente denominada placa dental (Kidd and Fejerskov, 2003).

Los ácidos que producen las bacterias cariogénicas contribuyen a la disminución del pH el cual afecta el esmalte causando la pérdida de mineral de la estructura dental (Kidd and Fejerskov, 2003).

La caries dental involucra la desmineralización del esmalte dental (solubilización de calcio y fósforo); esta desmineralización es ocasionada por la acción de ácidos que provienen de manera directa de los alimentos consumidos o indirectamente como resultado de la fermentación por la placa bacteriana de los residuos de alimentos que quedan entre los dientes o adheridos a estos. Después de la desmineralización se crean pequeñas cavidades donde se alojan las bacterias que al metabolizar azúcares de los restos de los alimentos producen ácidos creando un ambiente acidúrico. En la cavidad bucal se encuentra millones de bacterias y el *Streptococcus mutans* es el más frecuente, el más crítico y es el que más se asocia con el problema de la caries (Canseco, 2001; García *et al.*, 2008). Ésta bacteria puede fermentar los hidratos de carbono para formar ácido láctico, los ciclos repetitivos de la generación ácida puede dar lugar a la disolución microscópica de minerales del esmalte del diente y a la formación de una mancha blanca o marrón opaca en la superficie del diente.

Los mecanismos naturales para evitar la desmineralización son: la saliva como amortiguador de pH natural, la deglución, la higiene que permite la formación de una capa/película de materia orgánica la cual protege el esmalte y se forma por la precipitación de diversos componentes de la saliva; esta película resulta ser muy benéfica ya que además de proteger el esmalte, reduce la fricción entre los dientes y proporciona una matriz para la remineralización del órgano dentario afectado (Canseco, 2001). Un método que posiblemente sería efectivo para reducir la formación de ácidos podría ser el evitar consumir alimentos ricos en azúcar y ácidos. Otras propuestas están basadas en la formación de una barrera física por la adsorción de algún péptido bioactivo, de igual forma podrían actuar como amortiguador de pH para la neutralización de los ácidos con los péptidos bioactivos (Warner *et al.*, 2001).

Warner *et al.*, (2001) reportó que el caseinofosfopéptido tiene una reducción de pérdida de calcio de 80.2%, el suero lácteo de elaboración de queso cottage tiene 44% de reducción de pérdida de calcio y el suero lácteo ácido un 48.5%; en cuanto a la reducción de la pérdida del fósforo fue de 81.8%, 18.2% y 39.4% respectivamente.

Por su parte Córdova (2013), obtuvo que el concentrado proteínico del *Phaseolus lunatus* presentó una reducción en la disociación de calcio del 77.3% y en cuanto a fósforo del 76.9%.

Se están desarrollando productos para la prevención de la caries que contengan mayor concentración de calcio y fósforo, que son los principales componentes del esmalte dental. Los productos lácteos, como la leche y el queso pueden prevenir la caries dental ya que se han demostrado las distintas investigaciones que el efecto se debe a la caseína. Las enzimas de la cavidad bucal producen péptidos a partir de la proteína láctea; los fosfopeptidos caseicos estabilizan el calcio y el fosfato, conservándolos en una forma amorfa que no precipita. De esta forma, el calcio y el fosfato del esmalte, habitualmente insoluble, en presencia de los fosfopéptidos permanecen solubles y biológicamente disponibles (Marcantoni, 2009).

Los péptidos con capacidad anticariogénica (péptido, calcio y fosfato) son incorporados a productos y llegan a la cavidad bucal en forma de chicles, pastas dentífricas; los péptidos se ligan a la superficie de los dientes a la biopelícula, a las bacterias, a los tejidos blando y dentina proporcionando un depósito de calcio y fosfato biodisponibles y solubles en la saliva y en las superficies dentarias. El fosfato de calcio amorfo se libera del complejo de fosfopéptidos caseicos cuando el pH desciende. Así se previene la desmineralización y se promueve la remineralización del esmalte (Marcantoni, 2009).

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad biológica antitrombótica y anticariogénica *in vitro* a los hidrolizados y fracciones proteínicas de la leguminosa *Vigna unguiculata* obtenidas por hidrólisis proteica *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Obtener hidrolizados proteínicos a partir del concentrado proteínico de la leguminosa *Vigna unguiculata* empleando los sistemas enzimáticos Alcalase-Flavourzyme® y Pepsina-Pancreatina.
2. Separar por ultrafiltración las fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática.
3. Determinar las actividades antitrombótica y anticariogénica *in vitro* a los hidrolizados y las fracciones peptídicas.
4. Determinar el perfil de aminoácidos a las fracciones con mayor actividad biológica.

IV. Materiales y métodos

A continuación se muestra de manera general la metodología desarrollada mediante el siguiente diagrama (Figura 3).

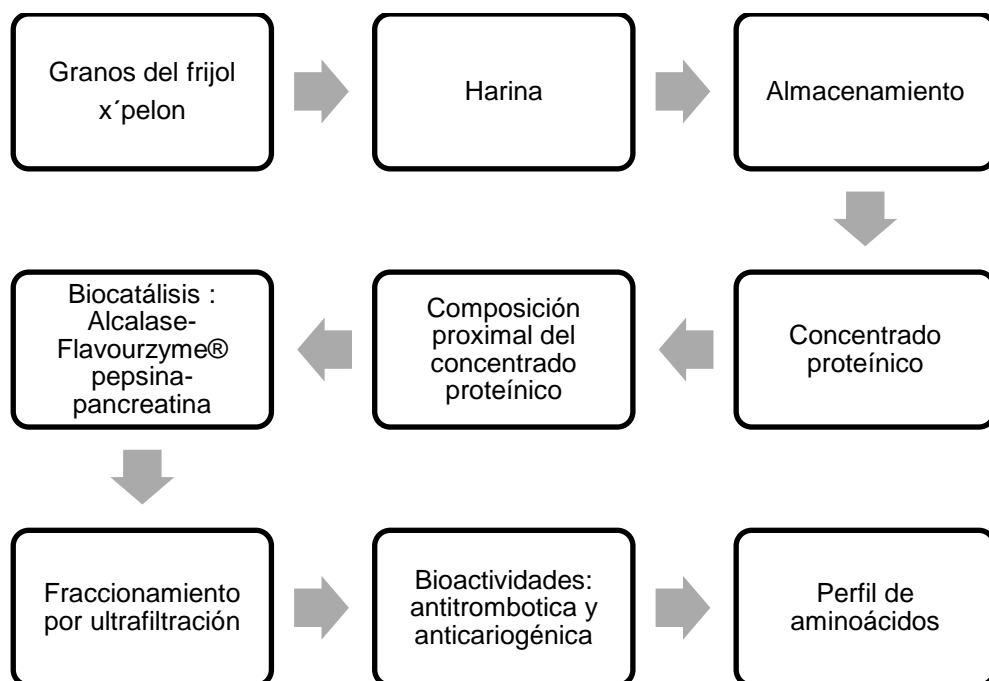


Figura 4.1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.

IV.1. Obtención de la materia prima

Los granos del frijol x'pelón se adquirieron en el mercado público de la ciudad de Mérida Yucatán México; de la cosecha de Mayo del 2013. Fueron trasladados al Laboratorio de Ciencias de los Alimentos en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán donde se procesaron.

IV.2. Obtención de la harina del *Vigna unguiculata*

Para la obtención de la harina, primeramente los granos se limpiaron manualmente, se secaron en estufa a 60°C por 3 horas para facilitar el desprendimiento de la cascarilla y seguidamente se molieron en un molino mecánico de discos, esto para triturar los granos y separar por fricción la cascarilla. Una vez libre de cascarilla, los granos se molieron en un molino Cyclotec 1093 (Tecator Swenden) para disponer de una harina fina con un tamaño de partícula capaz de atravesar el tamiz de malla 80 y 100.

IV.3. Obtención del concentrado proteínico

Para obtener el concentrado proteínico se utilizó el método reportado por Betancur et al. (2004) con algunas modificaciones; el cual consistió en un fraccionamiento en húmedo de los componentes de la harina por solubilización alcalina y precipitación al punto isoeléctrico. El proceso se llevó a cabo por lotes de 1 Kg harina que fueron suspendidos en agua destilada (1:6 p/v); se ajustó el pH a 11 con solución NaOH 1 N y se homogenizó por una hora con un agitador mecánico (Caframo RZ-1) a 400 rpm. Se tamizó en mallas 60 y 100, el bagazo se lavó cinco veces con 200 mL de agua destilada y luego -el residuo fibroso- fue desechado. El líquido se dejó reposar por 90 minutos aproximadamente y posteriormente se sifoneó el sobrenadante cuidando de no remover el precipitado. El precipitado se lavó con 1.5 L de agua destilada por cada lote y se dejó reposar 45 minutos, se sifoneó por segunda y nuevamente el precipitado se lavó con agua, se dejó reposar y por tercera vez se sifoneó. Ya que se recolectó todo el sobrenadante se ajustó el pH a 4.5 y se centrifugó (Heraeus megafuge 16R) a $1\ 317 \times g$ por 20 minutos. Se guardó el precipitado que corresponde al concentrado proteínico y el sobrenadante fue desechado. Al concentrado proteínico se le determinó el porcentaje de proteína y porcentaje de humedad, con estos valores se calculó, se pesó y congeló a -20 °C, la cantidad

necesaria del concentrado proteínico húmedo para preparar 1 litro de dispersión al 4% de proteína para su posterior hidrólisis.

IV.4. Composición proximal del concentrado proteínico

La composición proximal del concentrado proteínico fue determinada por los métodos de la AOAC 1997. Humedad (método 925.09) por secado en estufa a 105 °C por 4 horas. Cenizas (método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550 °C hasta la pérdida total de la materia orgánica (3 horas). Grasa cruda (método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano en un sistema soxhlet. Proteína cruda (método 954.01), por el método de Kjeldahl, por una digestión ácida de la muestra y luego una destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (método 962.09), residuo orgánico combustible e insolubles que se obtiene después de que la muestra fue sometida a una digestión ácida y luego alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN) se obtuvo por diferencia al 100% del resto de los constituyentes.

IV.5. Biocatálisis

Para ambos sistemas se utilizó una suspensión de concentrado proteínico al 4% del *V. unguiculata* en 1 L de agua destilada. La digestión enzimática tuvo 90 minutos de duración durante los cuales se agitó mecánicamente a 300 rpm colocado en baño de agua, con un termómetro y un electrodo determinó los cambios de temperatura y pH. La reacción se detuvo por calentamiento a 80°C por 20 minutos. Después, el hidrolizado se centrifugó (ultracentrífuga LE-80K Beckman) a 16 211xg (12 000 rpm) por 30 minutos, la porción soluble se reservó para posteriormente hacer la ultrafiltración.

IV.5.1. Sistema Alcalase®-Flavourzyme®

La primera parte de la digestión tuvo lugar con la enzima Alcalase® la cual duró 45 minutos. La concentración que se usó de sustrato fue de 4%, una relación de enzima/sustrato de 1:10 v/v (0.3 UAG^{-1} de Alcalase®); la temperatura de reacción fue de 50 °C con un pH de 8. Al terminar la primera catálisis con Alcalase® se ajustó a pH 7 con NaOH 1 N y se agregó la segunda enzima, Flavourzyme®. Para la segunda enzima se usó la misma concentración de sustrato y una relación de enzima/sustrato 1:10 v/v (50 ULAPg^{-1}), la temperatura fue la misma. Para desactivar a las enzimas por calentamiento, a 80 °C por 20 minutos. Se dejó enfriar el hidrolizado y se procedió a centrifuga, el sobrenadante se guardó en congelación para posteriormente ultrafiltrarlo.

IV.5.2. Sistema Pepsina-Pancreatina

Al igual que el sistema anterior, la reacción consistió en dos tiempos; la primera reacción se llevó a cabo con la pepsina, se usó una concentración de sustrato al 4%, una relación de enzima/sustrato de 1/10 v/v; la temperatura de la reacción fue de 37°C a pH 2. La segunda reacción se llevó a cabo con la pancreatina para la cual el pH fue de 7.5, se ajustó con HCl 1 N; la concentración de enzima/sustrato fue la misma. Una vez terminada la reacción de catálisis se desactivaron las enzimas por calentamiento a una temperatura de 80 °C por 20 minutos. Al igual que el sistema Alcalase®-Flavourzyme® se dejó enfriar el hidrolizado y se procedió a centrifugarse, el sobrenadante se guardó en congelación para posteriormente ultrafiltrarlo.

IV.6. Grado de hidrólisis (GH)

El porcentaje de grado de hidrólisis se determinó empleando la técnica del Ortofenilftaldialdehido (OPA) propuesta por Nielsen et al. (2001); la técnica está basada en la determinación de grupos aminos libres.

Primeramente se preparó una solución madre de L-serina en agua desionizada, para ello se pesaron 50.2 mg de L-serina en 50 mL de agua desionizada; de ésta solución se tomaron 150 μ L de L-serina y se le añadieron 1350 μ L de agua desionizada obteniendo así la solución estándar de L-serina 1:10 v/v. Ya obtenido la solución estándar se prosiguió a la preparación de la curva (Tabla 3), empleando como testigos diferentes volúmenes en μ L obtenidos de la dilución 1:10 de la solución del aminoácidos L-serina y a.5 mL del reactivo OPA.

Tabla 4.1. Diluciones de la curva estándar de L-serina

	H ₂ O (μ L)	L-serina (μ L)
Blanco	200	---
Testigo 1	150	50
Testigo 2	100	100
Testigo 3	50	150
Testigo 4	---	200

Se prosiguió a la preparación del reactivo OPA (Ortofenilftaldialdehido); para ello se hicieron 3 soluciones: solución 1: se pesó 1.27 g de tetraborato de sodio y 33.3 mg de dodecil sulfato de sodio y se disolvieron en 150 mL de agua desionizada. Solución 2: se pesó 26.6 mg de OPA y se diluyó en 0.66mL de etanol. Solución 3 (el eppendorf debe estar forrado con papel aluminio): se pesó 29.3 mg de DTT (treo-2,3-dihidroxi-1,4-butanoditiol) y se diluyó en 33.3 mL de agua desionizada. Finalmente se mezclaron las 3 soluciones anteriores.

Ya que se obtuvo el reactivo OPA se colocaron 1.5 mL del mismo a cada muestra y testigo, se agregó de uno en uno y se agitó por 5 segundos y luego se esperó 2 minutos para leer en el espectro a 340 nm.

A continuación se prepararon las muestras del hidrolizado; para Alcalase®-Flavourzyme® se utilizó 7.3233 mg de hidrolizado y para Pepsina-Pancreatina 6.8446 mg de hidrolizado para tener una concentración de proteína al 4%. A las alícuotas de hidrolizados de ambos sistemas se les agregó 2 ml de SDS al 1%. De la solución anterior se tomaron 100 µL y se diluyó en 900 µL de SDS al 1% obteniendo una solución y de ésta solución se tomaron 100 µL y se diluyeron en 100 µL de SDS al 1%, se les agregó 1.5 mL de OPA, se agitó durante 5 segundos, se esperó 2 minutos y se leyó a 340 nm.

Las absorbancias obtenidas fueron usadas para hallar las concentraciones de grupos aminos liberados por la hidrólisis. Para ello se usó la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración de L-serina para finalmente aplicar la siguiente fórmula y así hallar el porcentaje de %GH = $(h/h_{tot}) \times 100$. Donde

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas del *V. unguiculata*.

IV.7. Fraccionamiento por ultrafiltración

La porción soluble de los hidrolizados fue ultrafiltrada empleando el método de Cho et al., (2004); se obtuvieron cinco fracciones peptídicas de cada sistema; se utilizaron cuatro membranas con diferentes cortes de peso molecular: 1 kDa, 3 kDa, 5 kDa y 10 kDa (Figura 4). Para cada una de las fracciones se obtuvieron volúmenes de 450 mL.

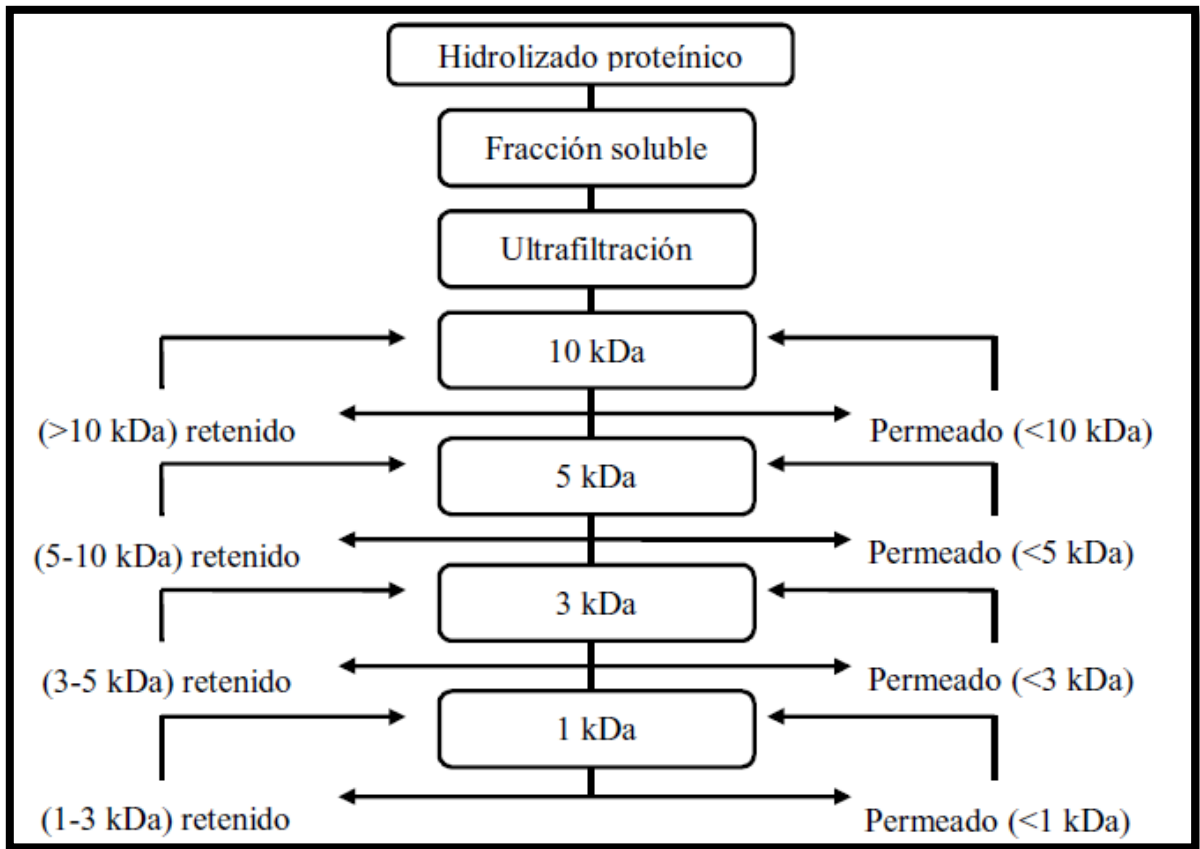


Figura 4.2. Proceso de ultrafiltración de los hidrolizados proteínicos de *V. unguiculata*.

Se lavó con agua destilada todo el equipo (Amicon M2000), y se desinfectó con alcohol al 10%; una vez lavado con agua destilada se armó el equipo y con la ayuda de un embudo de vidrio se agregó la muestra (1.4 L) en el interior del vaso y se cerró herméticamente; se conectó a la corriente eléctrica y se abrieron las válvulas que permiten el paso del nitrógeno a una presión entre 40 y 60 Psi a una velocidad de 5 en el M2000 control, el goteo fue constante, una gota por segundo y se dejó aproximadamente 6 horas para la permeación de la primera membrana. La ultrafiltración se inició con la membrana de 10 kDa colectando de manera separada el retenido y el permeado; el permeado se continuó ultrafiltrando por las membranas

restantes de mayor a menor kDa. Durante la semana de la ultrafiltración las muestras se guardaron en refrigeración a -9 °C. Una vez obtenidas las fracciones se reservó para secarse a -47°C y 133×10^{-3} mbar en una liofilizadora (Labconco Freezone 18 L).

IV.8. Bioactividades *in vitro*

A los hidrolizados y a las fracciones obtenidas de la ultrafiltración se les determinó la actividad antitrombótica y anticariogénica.

IV.8.1. Actividad antitrombótica

De acuerdo al método propuesto por Miyashita et al. (1999) y Chrono-Log Corporation (1979). Se empleó sangre humana fresca obtenida de voluntarios sanos, sin consumir medicamentos y en ayunas. Las muestras se colectaron en tubos vacutainer de 4.5 ml con citrato de sodio para evitar su coagulación. Seguidamente, se centrifugó (centrifuga J-600 SOLBAT®) la sangre a $564.42 \times g$ por 15 minutos, se recuperó el plasma rico en plaquetas y se midió en el citómetro hemático (Sysmex modelo Kx-21) el número de plaquetas y se ajustaron en caso de ser necesario, el número de plaquetas usadas para evaluar la bioactividad fue entre 300 y 400×10^3 / μ L. Mientras tanto, la fase residual de las muestras sanguíneas fueron centrifugadas por segunda vez a $2132.28 \times g$ por 15 minutos y así obtener el plasma pobre en plaquetas que sirvió como blanco.

Para el ajuste de las plaquetas se usó la siguiente formula: $V1C1=V2C2$

Dónde:

V1: volumen de plasma rico en plaquetas

C1: concentración de plaquetas iniciales

V2: volumen final que se requerirá del plasma ajustado

C2: concentración de plaquetas en el plasma ajustado

Una vez obtenido el plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas se continuó a la lectura. Se tomaron alícuotas de 450 μ L de plasma rico en plaquetas y se colocó en las celdas que contenían una barra magnética para la homogenización; de la misma forma se tomó 450 μ L del plasma pobre en plaquetas y se colocó en una celda sin barra magnética. Ambas celdas se colocaron el agregómetro (Crono-log), la celda del plasma pobre en plaquetas fue el blanco solamente se requirió una celda. A las celdas que contenían el plasma rico en plaquetas se les adicionó alícuotas de fracciones peptídicas a una concentración de 57.2 mg/ml, las fracciones fueron re-suspendidas en agua destilada a pH 7.2. Las celdas con el plasma y la alícuota de la fracción peptídica se incubaron a 37°C por 1 minuto para luego adicionarles 10 μ L de una solución acuosa de Difosfato de Adenosina (ADP) 10 μ M, se esperó 6 minutos para su medición. A la muestra testigo no se le adiciono fracción peptídica, solamente ADP para medir la agregación en condiciones basales.

La agregación de las plaquetas se determinó en el agregómetro como el incremento en la transmisión de luz del plasma rico en plaquetas, la intensidad fue recogida gráficamente con la ayuda del programa computacional Aggro/link. El porcentaje de inhibición plaquetaria se calculó restando el porcentaje de la agregación del plasma rico en plaquetas con la fracción peptídica al porcentaje de agregación del plasma rico en plaquetas en condiciones basales (testigo).

IV.8.2. Actividad anticariogénica

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Warner *et al.*, (2001), la cual consiste en usar hidroxiapatita para simular el esmalte dental. Se suspendió 20 mg de hidroxiapatita en 10 ml de búfer tris-HCl 1 N con pH 7 y se le añadió 4 ml de muestra (0.8 mg/mL), se agitó por 20 minutos. Seguidamente se le adicionó 10 mL

de acetato de sodio con pH 4.2 y 0.4 M para representar los ácidos orgánicos presentes en la boca, se agitó por 10 minutos y posteriormente se centrifugó (centrifuga Hermle) a 2 928 x g por 5 minutos; el sobrenadante se reservó para la determinación de fósforo y calcio. Para la determinación de fósforo se usó la metodología descrita en las normas NMX-AA-029-SCFI y NMEXY-100-SCFI- 2004; mientras que el calcio se determinó con titulación usando EDTA y azul de hidroxinaftol (Itoh y Ueno, 1970).

IV.9. Determinación del perfil de aminoácidos

A las muestras con las mayores bioactividades se les determinó el perfil de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (Alaiz *et al.*, 1992). La separación de los aminoácidos se llevó a cabo con una columna Nova Pack C18 4 µm de fase reversa (Waters) de 300 x 3.9 mm a una temperatura controlada de 18° C, usando un sistema de gradiente binario con acetato 25 mM, azida de sodio 0.02% pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como solventes. El flujo fue de 0.9 mL/min y el gradiente de elución usando: tiempo 0 – 3 min, gradiente línea desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3 - 13 min, elución con A:B (86:14) 30 – 35 min elución con A:B (69:31). Como patrón interno se utilizó ácido D, L –α-aminobutírico, calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de recetas de calibrado construidas para cada uno de ellos. Se pesaron 6 mg de muestra y se le agregaron 1.5 mL de HCl 6 N, se sellaron los viales que contenían las muestras bajo atmósfera de nitrógeno y se hidrolizó en estufa a 110°C por 20 horas. Después de la hidrólisis, las muestras se colocaron en estufa de vacío a 60°C par que se evapore el HCl. La derivatización se llevó a cabo durante 50 minutos a 50°C con etoximetilenmalonato de dietilo, se le agregó tampón de borato de sodio 1M pH 9 hasta alcanzar el volumen final de 1 mL. Para la curva de calibración, los aminoácidos estándares que usaron se sometieron a las mismas condiciones de preparación que las muestras para evitar los errores producidos por la pérdida de algunos aminoácidos durante la hidrolisis ácida.

IV.10. Análisis estadístico

Los resultados proximales, grado de hidrólisis, bioactividades se les determinó medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). También se analizaron por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el paquete Statgraphics plus versión 5.0.

V. Resultados y discusión

V.1. Composición química de harina y concentrado del *V. unguiculata*

La composición proximal de la harina y del concentrado del *V. unguiculata* se muestra en la tabla 4.

Tabla 5.1. Composición química de la harina y del concentrado del *V. unguiculata* (% base seca)

Componente	Harina	Concentrado
Cenizas	4.16±0.04	5.72±0.18
Proteína cruda	22.92±0.62	68.29±0.73
Fibra cruda	1.77±0.10	0.08±0.00
Grasa cruda	1.16±0.07	2.97±0.18
ELN	69.99±0.50	22.94±0.21

ELN= extracto libre de nitrógeno

Como se puede observar en la tabla, el concentrado presenta mayor riqueza proteica en comparación con la harina sin embargo sigue conteniendo otros componentes como el extracto libre de nitrógeno que presenta resultado de un 22.94%. El resultado proteico del concentrado es similar a los reportes para otras variedades; *V. unguiculata* L. walp, Sánchez (2013) reportó 63.47%; *V. unguiculata*, Maldonado (2006) reportó 82.81%; en comparación con otras leguminosas se puede ver que es similar; *M. pruriens* presentó 56.30%, 65.98% (Tovar, 2011; Corzo et al., 2000, respectivamente), *P. lunatus* presentó 73.0% (Sosa, 2009). El proceso de obtención de concentrados proteicos supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos para conseguir un producto final hasta de un 90% (García et al., 2010). En la primera etapa del proceso se solubilizan las proteínas para separarlas del resto de los compuestos no solubles; el extracto obtenido contiene, además de las proteínas el resto de compuestos solubles del

concentrado proteico; las proteínas vegetales son solubles a pH próximos a la neutralidad sin embargo se extraen las proteínas a pH alcalinos para favorecer la solubilización de las proteínas desnaturalizadas durante la preparación de los concentrados. En la segunda etapa se concentran las proteínas por precipitación isoeléctrica y posteriormente mediante la centrifugación se separaron el restante de compuestos solubles (Betancurt et al., 2004).

V.2. Hidrólisis del concentrado proteínico y Grado de Hidrólisis (GH)

El hidrolizado obtenido a partir del concentrado proteínico del *V. unguiculata* con el sistema Pepsina-Pancreatina con el sistema Alcalase®-Flavourzyme® se muestra en la Figura 5.

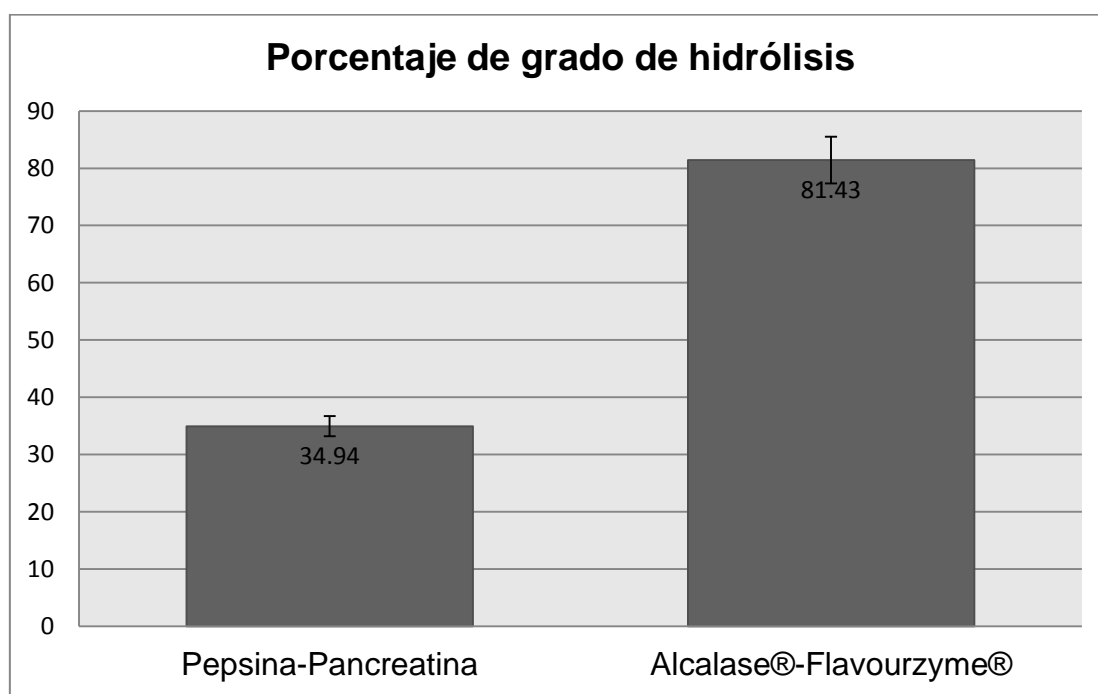


Figura 5.1. Grado de hidrólisis para Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme® de las proteínas de *V. unguiculata*.

El hidrolizado con el sistema Pepsina-Pancreatina alcanzó un grado de hidrólisis del 34.94% y el sistema de Alcalase®-Flavourzyme® alcanzó un grado de hidrólisis del 81.43%, estos valores indican que ambos hidrolizados son extensivos; de acuerdo a Pedroche et al., (2003) estos valores indican que los hidrolizados poseen propiedades funcionales.

El GH del sistema Pepsina-Pancreatina fue similar al reportado por Ruiz-Ruiz (2010) del 26.15% del frijol *P. vulgaris* L y Córdoba-Lizama (2013) reportó del *P. lunatus* un GH del 12.4 % con Pepsina 10 min. De la misma forma, el hidrolizado con el sistema Pepsina-Pancreatina quedó clasificado como hidrolizado extensivo (>10 %). Por otro lado, el GH del sistema Alcalase®-Flavourzyme® fue superior a los reportados por Ruiz-Ruiz (2010) que fue de 43.01% del *P. vulgaris*.

Diversas investigaciones han afirmado que el alto grado de hidrólisis obtenidos por el Alcalase®-Flavourzyme® puede atribuirse a la baja especificidad que presentan estas enzimas actuando sobre la mayoría de los enlaces peptídicos; la digestión con la endoproteasa Alcalase® aumenta el número de sitios activos para la acción de la endo/exonucleasa Flavourzyme®, de esta forma el sistema Alcalase®-Flavourzyme® puede hidrolizar una mayor cantidad de enlaces peptídicos durante un tiempo de reacción (90 minutos). De la misma manera, han afirmado autores que el sistema Pepsina-Pancreatina presenta un menor grado de hidrólisis en comparación con el sistema Alcalase®-Flavourzyme® debido a que la pepsina tiene actividad endopeptidasa e hidroliza preferentemente los enlaces C-terminal de los residuos de fenilalanina, triptófano y tirosina; por su parte la pancreatina hidroliza preferentemente los enlaces C-terminal de los residuos de metionina y leucina, generando así una mezcla de oligopéptidos y aminoácidos libres.

V.3. Fracciones peptídicas y determinación proteica

La porción soluble de los hidrolizados fueron fraccionadas por ultrafiltración, obteniéndose cinco fracciones peptídicas de diferentes cortes de peso molecular: <1, 3-1, 5-3, 10-5 y >10 kDa. Se les determinó proteínas a las fracciones al igual que a la porción soluble antes de ser fraccionada. En la tabla 6 se muestra los resultados.

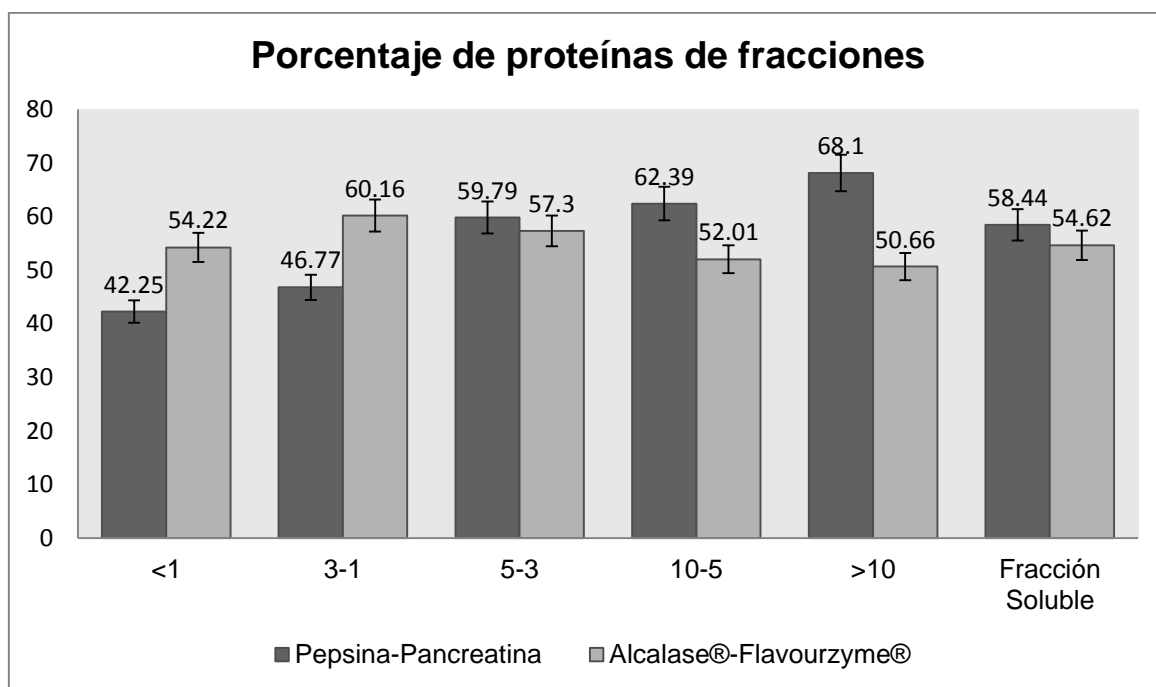


Figura 5.2. Porcentaje de proteínas de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de los sistemas Pepsina-Pancreatina y Alcalase®-Flavourzyme®.

Como se pueden observar los resultados, están en un rango de 42.25-68.10% ya que se trata de fracciones de concentrados proteicos.

V.4. Bioactividades antitrombótica y anticariogénica

En la figura 7 se pueden observar los valores de inhibición de agregación plaquetaria.

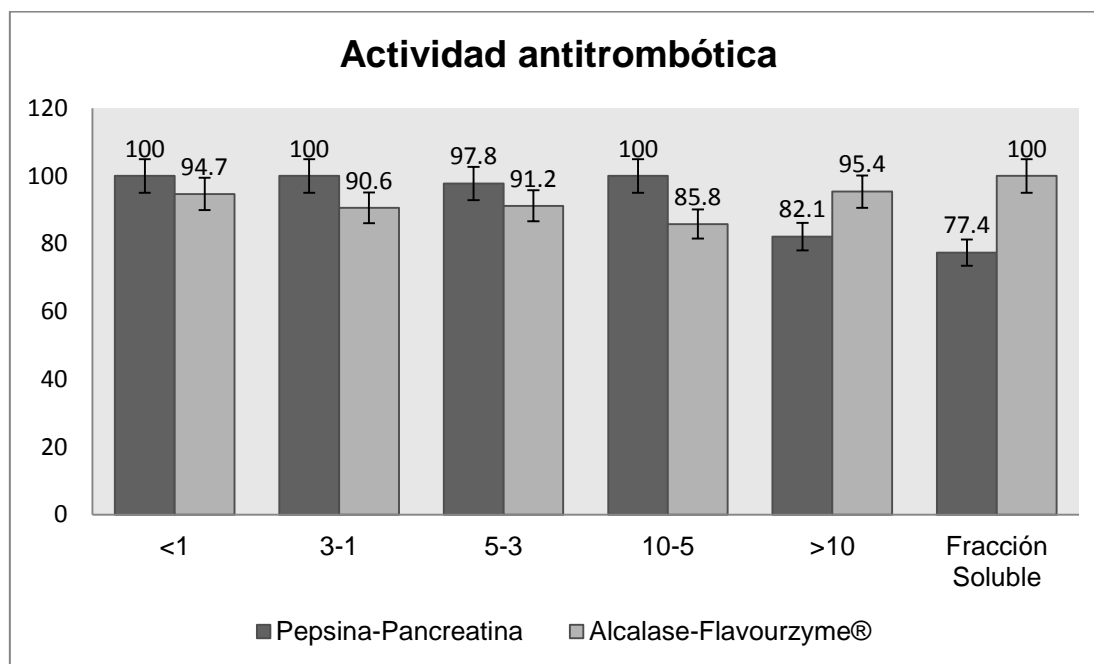


Figura 5.3. Inhibición sobre la agregación plaquetaria del *V. unguiculata*.

Como se observa en la tabla, ambos sistemas tuvieron una inhibición de la agregación plaquetaria teniendo como el valor más bajo de 77.4% del sistema Pepsina-pancreatina, la concentración que se usó fue de 57.2 mg de proteína/mL. Se han reportado inhibiciones similares, utilizando pancreatina a 120 minutos y a una concentración de 170 mg de proteína/mL; Tovar (2011) reportó un 72% de inhibición de agregación plaquetaria en el hidrolizado de concentrado de *M. pruriens*. En el 2012, Córdova et al., reportaron 88% de inhibición de la agregación plaquetaria usando hidrolizado del concentrado proteínico del *P. lunatus* utilizando Pepsina-

Pancreatina secuencial y Chim en el 2011 reportó 72% de inhibición de la agregación plaquetaria usando Pepsina-Pancreatina secuencial.

El sistema Alcalase®-Flavourzyme® tuvo valores de inhibición plaquetarias de 82.1% hasta de 100% y se han reportado valores similares utilizando las mismas enzimas; Chim (2011) reportó un 79.5% de inhibición de la agregación plaquetaria con el sistema enzimático Alcalase®-Flavorzyme® para el hidrolizado del concentrado proteínico de pepino de mar (*Isostichopus badionotus*) a una concentración de 50 mg/mL.

Estos resultados indican que ambos sistemas generaron péptidos con actividad antitrombótica. Es posible que los sistemas hayan generado secuencias aminoacídicas de segmento RGD (Arg-Gly-Asp); el segmento RGD puede ser capaz de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la glicoproteína GPIIb/IIIa de la membrana de las plaquetas, ya que para la unión es necesario el reconocimiento. La unidad catiónica del grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido β -carboxilo de las Asp son requeridas para la actividad inhibitoria (Miyashita et al, 1999). El fibrinógeno enlaza sitios de la GPIIb/IIIa la cual tiene un numero de residuos de Asp y a causa de esto, el grupo guanidino de la Arg –en el caso del compuesto tipo-RGD- se piensa que puede estar involucrada en la ligadura iónica con el grupo carboxilo del Asp en la GPIIb/IIIa. Así pues, los péptidos que se unen a la GPIIb/IIIa son útiles para la prevención de la trombosis.

Hay otros segmentos que se han aislados de fuentes vegetales y animales; el segmento KRDS es un tetrapéptido que corresponde a la lactotransferrina que proviene de la leche que en 1998 se reportó (Ramesh et al.) con una inhibición del 45% de la agregación plaquetaria inducida con ADP a una concentración 750 μ M. como se puede observar los reportes de inhibición plaquetaria han sido similares a los que se ha obtenido en este trabajo, se puede concluir que los sistemas generaron fragmentos con actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria y que el *Vigna*

unguiculata es una fuente de péptidos bioactivos para desarrollar productos funcionales.

La capacidad anticariogénica del sistema Pepsina-Pancreatina se muestra en la figura 8. Como se puede observar la fracción soluble del concentrado del *V. unguiculata* presentó una reducción de la desmineralización de la hidroxiapatita de 61.55% para fósforo y 56.07 para calcio.

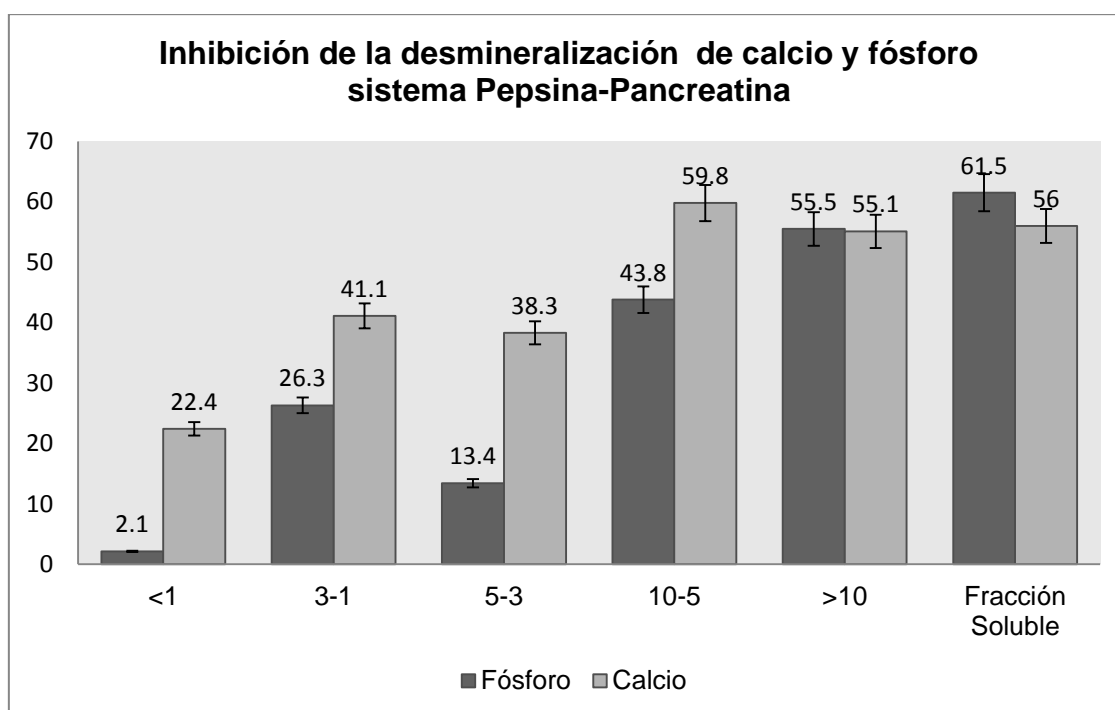


Figura 5.4. Porcentaje de la inhibición de la desmineralización de calcio y fósforo con el sistema Pepsina-Pancreatina del hidrolizado del *V. unguiculata*.

En el 2001 Warner *et al.*, reportó reducción de la desmineralización para calcio del 80.2%, 44.0% y 48.5% para caseinofosfopéptidos, suero lácteo de la elaboración de queso cottage y de suero lácteo ácido, respectivamente; de la misma manera reportó porcentajes de inhibición para el fósforo de 81.8%, 18.2% y 39.4% para las mismas

muestras. En 2013, Córdoba *et al.*, reportaron 68.2% y 71.9% de calcio y fósforo respectivamente del hidrolizado fosforilado con fosfato del *P. lunatus*, 73.3% y 76.9% para calcio y fósforo del hidrolizado fosforilado con pirofosfato del mismo frijol; la enzima empleada en la hidrólisis fue Pepsina.

En la figura 9 se puede observar la capacidad anticariogénica que presentó el sistema Alcalase®-Flavourzyme® que fue de 58.63% para fósforo y 51.40% para calcio de la fracción > 10kDa.

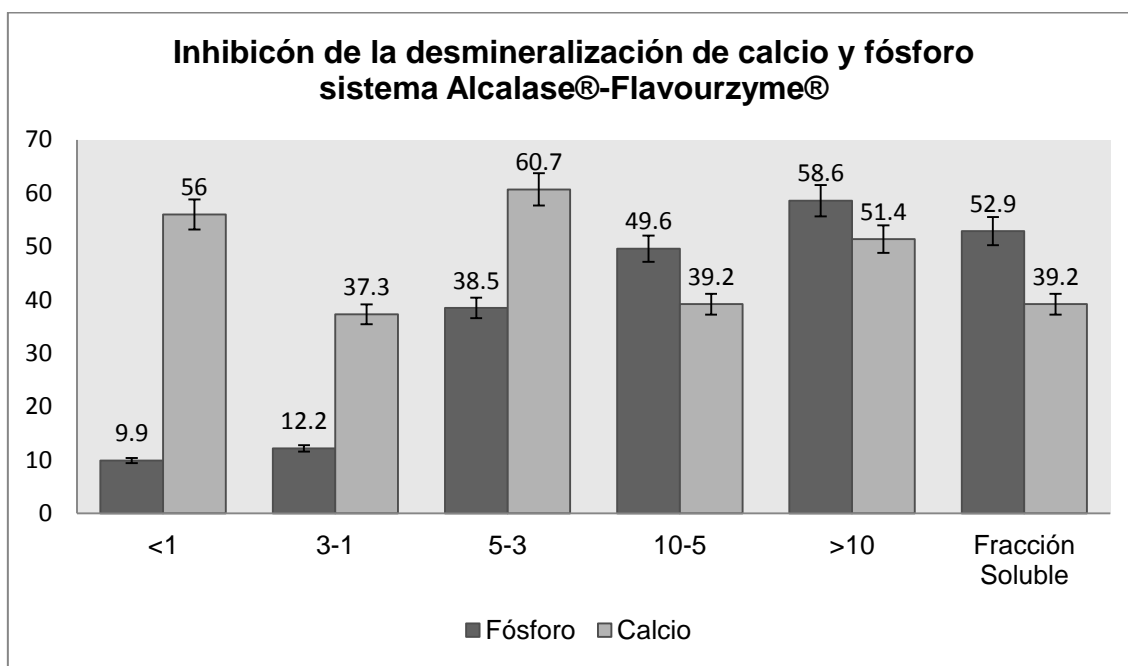


Figura 5.5. Porcentaje de la inhibición de la desmineralización de calcio y fósforo con el sistema Alcalase®-Flavourzyme® del hidrolizado *V. unguiculata*.

Los péptidos con capacidad anticariogénica (péptido, calcio y fosfato) son incorporados a productos y llegan a la cavidad bucal en forma de chicles, pastas dentífricas; los péptidos se ligan a la superficie de los dientes a la biopelícula, a las bacterias, a los tejidos blando y dentina proporcionando un depósito de calcio y fosfato biodisponibles y solubles en la saliva y en las superficies dentarias. El fosfato

de calcio amorfo se libera del complejo de fosfopéptidos caseicos cuando el pH desciende. Así se previene la desmineralización y se promueve la remineralización del esmalte (Marcantoni, 2009).

V.5. Perfil de aminoácidos

En la tabla 5 se puede observar el perfil de aminoácidos de las fracciones que presentaron mayor bioactividad. El sistema Alcalase®-Flavourzyme® un total de aminoácidos no polares de 48.13 g/100 de proteína y de aminoácidos polares de 51.86 g/100 de proteína; en comparación con el sistema Pepsina-Pancreatina 35.5 g/100 de proteína de aminoácidos no polares y 64.49 g/100 de proteína de aminoácidos polares.

Tabla 5.2. Perfil de aminoácidos del hidrolizado de *V. unguiculata* en los sistemas Alcalase®-Flavourzyme® y Pepsina Pancreatina (g/100g de proteína).

Aminoácidos	Sistema Alcalase®-Flavourzyme®		Sistema Pepsina-Pancreatina	
No polares				
	g/100g de proteína	Desviación estándar	g/100g de proteína	Desviación estándar
Alanina	2.58	±0.04	3.67	±0
Valina	4.63	±0.06	5.76	±0.05
Leucina	6.85	±0.09	8.79	±0.01
Isoleucina	3.62	±0.05	4.75	±0.04
Prolina	6.00	±1.25	3.69	±0.14
Fenilalanina	4.50	±0.05	6.25	±0.03
Triptófano	18.55	±0.36	1.32	±0.05

Metionina	1.35	±0.01	1.27	±0.07
Polares				
Ac aspártico	10.28	±0.12	12.05	±0.02
Ac glutámico	14.99	±0.23	17.77	±0.04
Lisina	4.84	±0.06	6.79	±0.01
Arginina	6.56	±0.09	8.88	±0.03
Histidina	1.82	±0.02	3.13	±0.02
Glicina	2.88	±0.03	4.07	±0.04
Serina	3.87	±0.09	4.58	±0.13
Treonina	2.42	±0.02	3.7	±0
Cisteína	1.51	±0.06	0.17	±0.07
Tirosina	2.64	±0.03	3.36	±0.01

En diversas investigaciones se ha comprobado que los aminoácidos que intervienen en la inhibición de la agregación plaquetaria son la Asparagina, la Glicina y el ácido aspártico; se puede observar en la tabla 5, el sistema Alcalase®-Flavourzyme® tuvo menor liberación de éstos aminoácidos en comparación con el sistema Pepsina Pancreatina, el cual tuvo mayor hidrólisis de los aminoácidos Asp, Gli y Asp.

Los aminoácidos Metionina y Cisteína son los azufrados de los cuales las leguminosas carecen, como se puede observar son los valores más bajos y es por eso que es necesario complementar la alimentación con cereales.

V. Conclusiones

El uso de los sistemas secuenciales compuestos por Alcalase®-Flavourzyme® y Pepsina- Pancreatina a 90 minutos aplicados al concentrado proteico del *Vigna unguiculata* generaron hidrolizados proteínicos extensivos con grados de hidrólisis mayores a 10 %. Estas hidrólisis producen péptidos con actividad antitrombótica que

alcanzan el 100% de inhibición plaquetaria y con una actividad anticariogénica medida como la inhibición de la desmineralización de la placa dental de 56.08% para calcio y 61.56% para fósforo.

El fraccionamiento del hidrolizado proteico permitió evaluar la bioactividad de cada fracción y saber con certeza que fracción tiene mayor actividad.

De acuerdo a la literatura revisada, los hidrolizados proteicos extensivos de *Vigna unguiculata* podrían ser usados en la alimentación especializada y de igual forma adicionarlos a productos de uso diario ya que presentan actividades similares a las reportadas del *P. lunatus* y *M. pruriens*. Algunos productos que ya están en el mercado son gomas de mascar (Xtra care de Trident, Recaldent), malteadas proteínicas (Biopure), pasta dental (MI Paste, GC Tooth Mousse).

VII. REFERENCIAS

- AOAC. (1997). Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists, 15th ed. William Horwitz Editor. Washington, D.C., USA.
- Aranza, P.J. 2004. Farmacología clínica para profesionales de la salud. 1ª España. Eunate. pp 127-129.
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1-2), 181–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613051>
- Ayad, M., Van, B.C., Minaguchi, K., Raubertas, R., Bedi, G., Billings, R., Bowen, W. & Tabak, L. (2000). The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *Journal of Dental Research*, 79(4):976-982.
- Badui, S. D., (2006). Química de los alimentos. Pearson. México. 4ª Edición.
- Braunwald Eugene et al, Harrison 2 (1998). Principios de Medicina Interna, 14 va edición, España, Mc-Graw Hill Interamericana; 1998; p 385,1599-1600.E medicine. Hematology articles.
- 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. doi:10.1002/jsfa.1804
- Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico Del Hospital Infantil Mexicano*, 58, 673–676.
- Casanova, N. (2002). Elaboración y caracterización fisicoquímica de productos extruidos a base de maíz y harina de vainas de x'pelón (*Vigna unguiculata*, L. Walp). Tesis de maestría. Facultad de ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México, 2-8.
- Córdova Lizama, A., Ruiz Ruiz, J., Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., y Chel Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de

- hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatos*). En M. Seguro Campos, L. Chel Guerrero y D. Bentacur Ancona (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 123-137). Barcelona: OmniaScience.
- Clemente, A., Vioque, J., y Millán, F. 1999. Hidrolizados proteicos de origen vegetal. *Revisiones*. 2 (6):289-296.
 - Chim, Y. (2011). Obtención de hidrolizados enzimáticos de pepino de mar (*Isostichopus badionotus*) y evaluación de su bioactividad. Facultad de Ingeniería Química, UADY. Tesis de maestría.
 - Corzo, R. L., Chel, G. L., y Betancur, A.D. 2000. Extracción de las Fracciones de Almidon y proteína del Grano de la Leguminosa *Mucuna Pruriens*. *Tecnología Ciencia y Educación*. 15:37-41.
 - Corzo, L. J., Betancur, D., & Chel, L. (2012). 5th International Congres 2012 Book of Proceedings. In *Rheological And Textural Propertiesof Native And Carboxymethylated Flamboyant(Delonixregia) Seed Gums* (p. FPAE 101–FPAE 105). Nuevo Vallarta, Nayarit, México: Food Science and food biotechnology. Retrieved from http://skums.ac.ir/dorsapax/Data/Sub_39/File/8537db06-7d6b-49d5-bbc5-d0975e10a6caetoolsfile1OHP-Vol9-2010-CD.pdf
 - Chau, C.F., Cheung, K.C.P., 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.
 - Chan, W.M., y Ma, C.Y. 1999. Modification of proteins from soymilk residue (*Okama*) by trypsin *Journal of Food Sciences*. 64(5): 781-786.
 - Cho, M.J., Unklesbay, N., Hsieh, F., Clarke, A.D. 2004. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(19): 5895-5901.
 - Chrono- Log Corporacion. 1979. Manual for testing platelet aggregation with the lumi-aggregometer model 400 for in-vitro diagnostic use. Pp 853-1130.

- Dávila, M.A., Sangronis, E., y Granito, M. 2003. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 53(4): 348-354.
- Espinosa, G. L. 2006. Hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata* para su incorporación en una bebida para personas de la tercera edad. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química- Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Fischer, M., Kofod, V.L., Schols, A.H., Piersma, R.S., Gruppen, H. y Voragen, J.G.A. 2001. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: Heat and humidity effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:4463-4469.
- FitzGerald, R., y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. British Journal of Nutrition. 84:33-37.
- Fernández-Quintela A., Macarulla M.T., del Barrio A.S., Martínez J.A. 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. Plant Food Hum. Nutr. 51: 331-342.
- Groenink, J., Ruissen, A., Lowies, D., Hof, W., Veerman, E. & Nieuw, A. (2003). Degradation of antimicrobial histatin-variant peptides in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Journal of Dental Research, 82(9): 753-757
- Hong, L.G., Wei, L.G., Liu, S.Y. 2005. Mung-Bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity. Food Science and Technology International, 11:281-287.
- Ira Fox, S. 2003. Fisiología humana. Mc Graw-Hill/Interamericana de España. D.F. México.
- Janitha, P.K., Ross, A.R.S., Amarowics, R., Ambrose, S.J., Pegg, R.B., y Shand, P.J. 2002. Peptides with angiotensin i-converging enzyme (ACE)

- inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(24): 6981-6988.
- Juárez, M. 2007. Presente y future de los alimentos funcionales, IV JIPCA. CI-18:32.
 - Kumar, R., Singh, S., and Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377-391.
 - Kidd EAM, Fejerskov, O. Prevention of dental caries and the control of disease progression: concepts of preventive non-operative treatment. En: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental caries. The disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. P. 295-302.
 - Kristinson, H.G. y Rasco, B.A. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 657-666.
 - Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605002426>
 - Llanos, B. 2001. Nuevas perspectivas en el tratamiento antitrombótico. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 25(4): 93-104.
 - Lahl, J.W., y Braun, J.S. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food choice. *Food Technology*. 48(10): 68-71.
 - López, M. C. 2007. Alimentos funcionales y declaraciones de salud, desarrollo y legislación a nivel mundial y en MERCOSUR, IV JIPCA. CI: 19:33.
 - Maldonado, H. C. M. (2006). Caracterización funcional y nutrimental de la fracción proteica de *Vigna unguiculata* (x'ipelon). Tesis de licenciatura. Facultad de ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

- Mahmoud, I.M., Malone, T.W. y Cordle, T. C. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on Antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science* 57:1223 – 1229.
- Manninem, A. 2004. Protein hydrolysates in sport and exercise. *Journal of Sport Science and Medicine*. 3:60-63.
- Martínez, K. 1998. Leguminosas, fuente natural de proteínas. *Tecnología Alimentaría* 33 (11): 22-24.
- Marrufo, D. (2008). *Evaluación de la actividad biológica de hidrolizados proteínicos de Jatropha curcas L.* Universidad Autónoma de Yucatán.
- Marcantoni, M. 2009. Caries dental: antimicrobianos y vacunas para su control en Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Cap 19. 2ª edición. Panamericana. Negromi, M.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón, J., Alainz, M., Millan, F., y Vioque, J. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide alters hydrolysis of sunflower (*Helianthus annus L.*) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(7): 1928-1932.
- Miyashita M, Akamatsu M, Ueno H, Nakagawa Y, Nishumura K, Hayashi Y, Sato Y. Ueno T. (1999). Structure activity relationships of RGD mimetics as fi - brinogen-receptor antagonists. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 63:1684-1690.
- Meisel, H., y Günther, S. 1998. Food proteins as precursors of peptides modulating human cell activity. *Nahrung*. 42:175-176.
- Majiluf, C.A., y Espinosa, L.F. 2007. Fisiología de la trombosis. *Gaceta Médica de México*. 143(1):11-14.
- Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishimura, K., Hayashi, Y., ... Ueno, T. (1999). Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(10), 1684—1690. doi:10.1271/bbb.63.1684

- NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Metodología de prueba.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646.
- Palomo, I., Torres, C., Moore-Carrasco, R. & Rodrigo, M. (2008). Mecanismos de acción de los principales antiagregantes plaquetarios. *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas*, 2(3):1-6.
- Pérez, L. B., Palacios, G. B., Castro, B. A. L. (2008). Sistema Mexicano de alimentos equivalentes. 3ª edición. México.
- Polanco-Lugo, E. M. A. (2001). Caracterización proximal y antinutricional de concentrados proteicos de vigna unguiculata (L) Walp obtenidos por tres métodos. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Yucatán. Mérida Yucatán México.
- Ruiz-Ruiz, J.C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A. (2010). Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. *Food Bioprocess and Technology*, 5:1531-1540.
- Sánchez, S. L. 2013. Determinación de la actividad antioxidante y antitrombótica atribuida a taninos y saponinas presentes en *Vigna unguiculata* y *Mucuna pruriens*. Tesis de maestría. Facultad de ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Sánchez, V. R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., y Millán, F. 1998. Neutral lipids of chickpea flour and isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75:851-855.
- Sallo, H. E., Rao, A., Ericson, A. P., y Thomas, R. L. 2001. Preparation of soy protein concentrate by ultrafiltration. *Journal of Food Sciences*. 66(2):242-246.
- Sewald, N. y Jakubke, H. D. 2002. *Petides: Chemistry and Biology*. Weinheim, Germany; Wiley-VCH, Verlag GmbH, 590 p.

- Sosa, O. M. (2008). Evaluación nutrimental de un producto extruido a base de una mezcla de harina de maíz (*zea mays L*) y frijol Vigna (*Vigna unguiculata L. Walp*). Tesis de maestría. Facultad de ingeniería química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Tovar, T. B. 2011. Tecnofuncionalidad y biofuncionalidad de hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*). Tesis de maestría. Facultad de ingeniería química. Universidad autónoma de Yucatán.
- Torruco, U.J. Dávila, o.g., Vioque, P.J., Chel, G.L., y Betancur, A.D. 2009. Actividad antioxidante de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración a partir de *P. vulgaris*. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. 21 al 26 de junio. Acapulco Guerrero.
- Van der Ven, C., Muresan, S., Gruppen, H., De Bont, D.B.A., y Voragen, A.G.J. 2002b. FTIR Spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(24):6943-6950.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Loari, H., Megias, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M. y Millán, F. 2006. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology* 99-102.
- Vioque, J., y Millán, F. 2001. Los hidrolizados proteicos en alimentación. Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. Instituto de la grasa: 2-8.
- Were, L., Hettiarachy, L., y Kalapathy, U. 1997. Modified soy proteins with improved foaming and water hidratação properties. *Journal of Food Sciences*. 62(4): 821-824.
- Warner, E. A., Kanekanian, A. D., & Andrews, A. T. (2001). Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 151–153. doi:10.1046/j.1364-727x.2001.00029.x