



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO de
Tuxtepec

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOLESTEROLÉMICA
Y ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE LA
HARINA DESENGRASADA DE SEMILLAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus*)”**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

IBQ. Arlette del Carmen Hernández Barillas

DIRECTOR:

Dr. Juan Gabriel Torruco Uco

CO-DIRECTOR INTERNO

Dr. Jesús Rodríguez Miranda

CO-DIRECTORA EXTERNA

Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz

TUXTEPEC, OAXACA., AGOSTO DE 2022.

HOJA DE AUTORIZACIÓN



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tuxtepec
Subdirección Académica

Autorización de Presentación Electrónica de Tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., 22/agosto/2022

No. de Oficio 3749

C. ARLETTE DEL CARMEN HERNÁNDEZ BARILLAS
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M15350048
P R E S E N T E

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO COMUNICARLE QUE EL COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR LOS CC. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA, FABIOLA ARACELI GUZMÁN ORTIZ, ERNESTINA PAZ GAMBOA Y BETSABÉ HERNÁNDEZ SANTOS, REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOLESTEROLÉMICA Y ANTIDIABÉTICA IN VITRO DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE LA HARINA DESENGRASADA DE SEMILLAS DE GIRASOL (HELIANTHUS ANNUUS)" PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE TESIS DE ACUERDO AL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS.

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

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Ciencia y Técnica Presentes al Futuro

JULIÁN KURI MAR
SUBDIRECTOR ACADÉMICO

ccp. Archivo



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

**SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA**



Av. Dr. Víctor Bravo Ahuja Num. 561, Col. Predio el Paraíso, C.P.68350 Tuxtepec, Oaxaca
Tel. (287) 8751044 y (287) 51880 e-mail: cyd_tuxtepec@tecnm.mx | tuxtepec.tecnm.mx



2022 Flores
Año de Magón
PRESENCIA DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS AUTORALES



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtepec

Carta de Cesión de Derechos Autorales

Tuxtepec, Oaxaca **21/Junio/2022**

Título de la Tesis	Evaluación de la actividad antiolesterolémica y antidiabética <i>in vitro</i> de fracciones peptídicas de la harina desengrasada de semillas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).
Autor principal	IBQ. Arlette del Carmen Hernández Barillas
Email de contacto	arlettebarillas14@gmail.com
No. de Control	M15350048
Director de Tesis	Dr. Juan Gabriel Torruco Uco
Registro ISBN / ISSN (Cuando aplique)	

Por este conducto manifiesto que es mi libre voluntad el ceder los derechos patrimoniales relativos a la obra literaria de la cual soy el autor, a favor del Tecnológico Nacional de México / Campus Tuxtepec; para que sea publicada, sin más límites que los establecidos en la Ley Federal del Derecho de Autor.

Extiendo la presente para los fines legales a que haya lugar.

Atentamente

Autor: IBQ. Arlette del Carmen Hernández Barillas

Firma

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTICOLESTEROLÉMICA Y ANTIDIABÉTICA *in vitro*
DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE LA HARINA
DESENGRASADA DE SEMILLAS DE GIRASOL
(*Helianthus annuus*)”**

Por:

IBQ. ARLETTE DEL CARMEN HERNÁNDEZ BARILLAS

Tesis propuesta al:

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

Como requerimiento parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Alimentos

AGOSTO, 2022

HOJA DE DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO



Similarity Report ID: oid:20755:160934255

PAPER NAME

TesisMCA-Arlette Coregida2 11Ago2022
.docx

AUTHOR

Arlette del Carmen Hernández Barillas

WORD COUNT

28125 Words

CHARACTER COUNT

159314 Characters

PAGE COUNT

105 Pages

FILE SIZE

9.1MB

SUBMISSION DATE

Aug 11, 2022 7:50 PM CDT

REPORT DATE

Aug 11, 2022 8:01 PM CDT

● 18% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

- 17% Internet database
- 5% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 9% Submitted Works database

● Excluded from Similarity Report

- Bibliographic material
- Quoted material
- Cited material
- Small Matches (Less than 8 words)
- Manually excluded sources

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 su apoyo, tiempo y conocimientos compartidos, para la realización exitosa de esta investigación. Muchas gracias.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Jesús Rodríguez Miranda, Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz, M.C. Ernestina Paz Gamboa y la Dra. Betsabé Hernández Santos, 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.

Muchas gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la Beca Nacional de Manutención con número de registro de becario 1035311 y lograr con ello mis estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos en esta Institución.

A mis compañeras(os) de laboratorio: Arely, Mariana, Fernando, Guadalupe, Karla, Nancy, Diego, Aridaí y Luis Enrique por compartir esta experiencia que nos dejó muchas enseñanzas y por la amistad incondicional brindada en todo momento.

DEDICATORIA

A Dios quien en su infinita misericordia me concedió la vida y me guía por buen camino, quien siempre está allí en todos mis momentos, dándome las fuerzas para alcanzar lo que queda por delante y esperando con brazos abiertos para una gran bendición.

A mi madre, María del Carmen Hernández Barillas, mi ángel personal; por ser mi motor y enseñarme a luchar por lo que quiero. Porque desde su lugar junto al Creador se sienta orgullosa de la persona en la que me he convertido.

Al Sr. Lauro Merlín quien me apoyó incondicionalmente mientras duró esta aventura.

A mis hermanos Perla, Isabel, Selene y Roberto, quienes han sido mi apoyo y sostén desde que mi madre partió.

CONTENIDO

HOJA DE AUTORIZACIÓN	i
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS AUTORALES	ii
HOJA DE DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	4
2.2 PROTEÍNAS	6
2.2.1 Aminoácidos.....	7
2.3 PROTEÍNAS FUNCIONALES.....	8
2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	9
2.4.1 Métodos para obtención e identificación de péptidos	11
2.5 ULTRASONIDO	12
2.6 SEPARACIÓN POR PRECIPITACIÓN.....	15
2.7 MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN	16
2.8 PROCESO ENZIMÁTICO PARA LIBERACIÓN.....	17
2.9 ALIMENTOS FUNCIONALES.....	20
2.9.1 Componentes funcionales en alimentos	21
2.10 EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	24
2.11 ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA	25
2.11.1 Péptidos anticolesterolémicos	26
2.12 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE	26
2.12.1 Digestión de carbohidratos y diabetes.....	27
2.12.2 Inhibidores de la enzima α -amilasa y α -glucosidasa.....	28
2.13 FUENTES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	29

Maestría en Ciencias en Alimentos

2.14 SEMILLA DE GIRASOL (<i>Helianthus annuus</i>).....	30
2.14.1 Origen.....	30
2.14.2 Descripción.....	30
2.14.3 Usos.....	31
2.14.4 Beneficios y Propiedades	32
2.14.5 Morfología de las semillas de girasol.....	33
2.14.6 Producción de semilla de girasol (mundial y nacional)	33
2.14.7 Proteínas de girasol	36
III. ANTECEDENTES.....	38
IV. JUSTIFICACION	42
V. OBJETIVO GENERAL.....	44
VI. METODOLOGÍA	45
6.1 Materiales.....	45
6.2 Obtención de la harina	45
6.3 Desengrasado de la harina	45
6.4 Obtención del concentrado proteico	45
6.5 Análisis químico proximal.....	46
6.6 Determinación del color.....	46
6.7 Hidrólisis del concentrado proteico	47
6.8 Determinación del grado de hidrólisis	47
6.9 Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades biológicas de los hidrolizados proteicos de semillas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).....	48
6.10 Inhibición “in vitro” de la solubilidad micelar del colesterol	48
6.11 Inhibición “in vitro” de α -amilasa y α -glucosidasa in vitro	49
6.12 Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración	50
6.13 Análisis estadístico	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
7.1 Análisis Químico proximal.....	52
7.2 Parámetros de color	54
7.3 Hidrólisis del concentrado proteico de la semilla de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).....	57
7.4 Actividad Anticolesterolemica (inhibición de la solubilidad micelar) de los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas de la semilla de girasol (<i>H. annuus</i>) con las enzimas Alcalasa [®] y Flavourzima [®]	59

Maestría en Ciencias en Alimentos

7.5 Actividad antidiabética mediante la inhibición <i>in vitro</i> de la α -amilasa y la α -glucosidasa del hidrolizado proteico y fracciones peptídicas de la semilla de girasol (<i>H. annuus</i>) con las enzimas Alcalasa [®] y Flavourzima [®]	63
VIII. CONCLUSIONES	72
IX. REFERENCIAS	74

Lista de figuras

Figura 1. Principio de cavitación acústica). _____ 13

Figura 2. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. _ 14

Figura 3. Perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH del medio. _____ 15

Figura 4. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica. _____ 19

Figura 5. Morfología del girasol. _____ 31

Figura 6. Partes de la semilla de girasol.. _____ 333

Figura 7. Esquema simplificado de la industrialización de las semillas de girasol . _____ 57

Figura 8. Separación de las fracciones peptídicas bioactivas de *H. annuus* por ultrafiltración con tres membranas de diferentes cortes moleculares (Torruco, 2009). _____ 52

Figura 9. a) Harina normal sin desengrasar; **b)** harina desengrasada y **c)** concentrado proteico de la semilla de girasol. _____ 56

Figura 10. Hidrolisis enzimática del concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*) con las enzimas Flavourzima® y Alcalasa®. ^{a-f} Letras diferentes en la misma enzima indica diferencias significativas al mismo tiempo de reacción ($p < 0.05$). _____ 58

Figura 21. Actividad anticolesterolémica de hidrolizados proteicos con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-e} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 59

Figura 32. Actividad anticolesterolémica de hidrolizados proteicos con Flavourzima® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-e} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 60

Figura 13. Actividad Anticolesterolémica de fracciones peptídicas de semillas de girasol (*H. annuus*) hidrolizado con Flavourzima® y con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción y concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima®. ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa® indicando diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 61

Figura 14. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) del hidrolizado proteico con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 64

Figura 15. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) del hidrolizado proteico con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 64

Figura 16. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) del hidrolizado proteico con Flavourzima® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 66

Figura 17. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) del hidrolizado proteico con Flavourzima® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 67

Figura 18. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) con fracciones peptídicas del hidrolizado proteico con Flavourzima® y Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes tiempos y

concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima[®]. ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa[®] indicando diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 68

Figura 19. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) con fracciones peptídicas del hidrolizado proteico con Flavourzima[®] y Alcalasa[®] de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes tiempos y concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima[®]. ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa[®] indicando diferencias significativas ($p < 0.05$). _____ 69

Lista de tablas

Tabla 1. Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de los péptidos. _____	11
Tabla 2. Principales componentes funcionales. _____	22
Tabla 3. Composición química de la semilla de girasol. _____	36
Tabla 4. Composición de aminoácidos (g/ 100 g de proteína) de la harina de girasol (DSM), concentrado de proteína (CP) y aislado de proteína (IP). _____	39
Tabla 5. Composición química proximal de la harina normal, harina desengrasada y concentrado proteico de la semilla de girasol (<i>Helianthus annuus</i>). _____	60
Tabla 6. Parámetros de color de la harina normal, harina desengrasada y concentrado proteico de la semilla de girasol (<i>Helianthus annuus</i>). _____	62

RESUMEN

Hernández Barillas, Arlette del Carmen. Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. “**Evaluación de las actividades anticolesterolémica y antidiabética *in vitro* de fracciones peptídicas de la harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus*)**”. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Codirector Interno: Dr. Jesús Rodríguez Miranda.

Actualmente las enfermedades crónico-degenerativas son la principal causa de muerte a nivel mundial, donde destacan las enfermedades de hipercolesterolemia y la hipoglucemia, mientras que, en México la incidencia de decesos por estas enfermedades es del 43 y 7.78% respectivamente. El tratamiento clínico de estas enfermedades es mediante el uso de fármacos sintéticos que pueden ocasionar reacciones secundarias en el organismo, por lo que, la Ciencia de los Alimentos ha optado por nuevas alternativas de origen natural, como son las oleaginosas, las cuales presentan un alto contenido de proteína (15-20%) pudiendo ser una rica fuente para la obtención de péptidos bioactivos; ya que, se ha demostrado que estos presentan diferentes actividades biológicas (anticolesterolémica, antihipertensiva, antioxidante, anticancerígena, hipoglucemiante, anticariogénica) que podrían ayudar en el tratamiento y/o prevención de algunas enfermedades, sin provocar efectos secundarios en el organismo. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar las fracciones peptídicas para determinar su actividad anticolesterolémica y antidiabética de la harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus*). La materia prima se obtuvo en el Mercado Central del Municipio de Tuxtepec, Oaxaca; a la cual se le realizó un proceso de secado (50 °C/24 h) obteniendo así una harina, misma que fue desengrasada con la ayuda de un baño ultrasónico (20 min/ 40 °C/ 80 Htz) utilizando como solvente hexano. Se realizó un análisis químico proximal al concentrado proteico, donde se pudo observar una reducción de grasa del 92.89% teniendo como resultado el 7.11% de grasa, mientras que el contenido de proteínas fue de 56.26%. El concentrado proteico fue hidrolizado enzimáticamente; empleando enzimas comerciales (Flavourzima® y Alcalasa®) de manera individual por un tiempo de reacción de 120 min. Posteriormente se determinó el porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) por el método de ortoftaldehído (OPA, por sus siglas en inglés), donde el

GH a los 120 min, fueron de 38.75% para Flavourzima® y para Alcalasa® fue de 70.06% demostrando tener un porcentaje de enlaces peptídicos rotos significativos en relación con la proteína intacta del concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*). El hidrolizado que se obtuvo a partir de la enzima Alcalasa® presentó mayor actividad anticolesterolémica; con 60 min de reacción con 74.76% de inhibición a una concentración de 20 µL/mL mientras que el hidrolizado de Flavourzima® obtuvo 74.63% con un tiempo de reacción de 40 min a una concentración de 40 µL/mL. Por otro lado, la actividad antidiabética fue evaluada en los hidrolizados mediante la inhibición de la α -amilasa y la α -glucosidasa, el hidrolizado con Alcalasa® obtuvo 50.89% de inhibición de la α -amilasa con 80 min de reacción en una concentración de 400 µL de muestra y 27.34% de inhibición de α -glucosidasa a 20 min de reacción con una concentración de 200 µL de muestra; de modo similar los hidrolizados con Flavourzima® presentaron una inhibición de ambas enzimas del 51.16% en una concentración de 500 µL de muestra a 40 min de reacción y 23.14% con 400 µL y 100 min respectivamente. El proceso de ultrafiltración (UF) permitió obtener fracciones peptídicas bioactivas de los hidrolizados de Alcalasa® y Flavourzima®, siendo la fracción peptídica 1-3 kDa la que presentó mejor actividad anticolesterolémica con una inhibición mayor al 79% en ambas enzimas. Mientras que, la actividad antidiabética fue mayor en la fracción peptídica <1 kDa inhibiendo 55.65% la enzima α -amilasa de los hidrolizados con Alcalasa® a 80 min y 70.18% con Flavourzima® a 100 min. Por otro lado, la mejor inhibición de la α -glucosidasa se obtuvo con la fracción peptídica <1 kDa con 34.73% del hidrolizado con Alcalasa® a 20 min y del hidrolizado con Flavourzima® a 100 min la fracción >5 kDa presentó 46.02% de inhibición. El desengrasado de la harina de las semillas de girasol con ultrasonido y solvente hexano, la hidrólisis enzimática y el proceso de ultrafiltración; permitió obtener fracciones peptídicas que contienen péptidos bioactivos de diferentes pesos moleculares que presentaron actividad anticolesterolémica y antidiabética los cuales podrían utilizarse como una alternativa para el diseño y desarrollo de productos nutraceuticos que ayuden en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

ABSTRACT

Hernández Barillas, Arlette del Carmen. Master of Science in Food. Technological Institute of Tuxtepec. **“Evaluation of the in vitro anticholesterolemic and antidiabetic activities of peptide fractions from defatted flour of sunflower seeds (*Helianthus annuus*)”**. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Internal Codirector: Dr. Jesús Rodríguez Miranda.

Chronic-degenerative diseases are currently the main cause of death worldwide, where hypercholesterolemia and hypoglycemia diseases stand out, while in Mexico the incidence of deaths from these diseases is 43 and 7.78%, respectively. The clinical treatment of these diseases is through the use of synthetic drugs that can cause secondary reactions in the body, so Food Science has opted for new alternatives of natural origin, such as oilseeds, which have a high protein content (15-20%) and can be a rich source for obtaining bioactive peptides; since it has been shown that these have different biological activities (anticholesterolemic, antihypertensive, antioxidant, anticancer, hypoglycemic, anticariogenic) that could help in the treatment and/or prevention of some diseases, without causing side effects in the body. Therefore, the objective of this research was to evaluate the peptide fractions to determine their anticholesterolemic and antidiabetic activity of defatted flour from sunflower seeds (*Helianthus annuus*). The raw material was obtained in the Central Market of the Municipality of Tuxtepec, Oaxaca; to which a drying process (50 °C/24 h) was carried out, thus obtaining some flour, which was degreased with the help of an ultrasonic bath (20 min/ 40 °C/ 80 Htz) using hexane as solvent. A chemical analysis proximal to the protein concentrate was carried out, where a fat reduction of 92.89% could be observed, resulting in 7.11% fat, while the protein content was 56.26%. The protein concentrate was enzymatically hydrolyzed, using commercial enzymes (Flavourzima[®] and Alcalase[®]) individually for a reaction time of 120 min. Subsequently, the percentage of the degree of hydrolysis (% GH) was determined by the orthophthaldehyde method (OPA), where the GH at 120 min was 38.75% for Flavourzima[®] and for Alcalasa[®] it was 70.06%. demonstrating to have a percentage of significant broken peptide bonds in relation to the intact protein of the protein concentrate of the sunflower seed (*Helianthus annuus*). The hydrolysate that was obtained from the Alcalase[®] enzyme presented greater anticholesterolemic activity; with 60 min of

reaction with 74.76% inhibition at a concentration of 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ while the Flavourzima[®] hydrolysate obtained 74.63% with a reaction time of 40 min at a concentration of 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$. On the other hand, the antidiabetic activity was evaluated in the hydrolysates through the inhibition of α -amylase and α -glucosidase, the hydrolysate with Alcalase[®] obtained 50.89% inhibition of α -amylase with 80 min of reaction at a concentration of 400 μL of sample and 27.34% inhibition of α -glucosidase at 20 min of reaction with a concentration of 200 μL of sample; similarly, the hydrolysates with Flavourzima[®] presented an inhibition of both enzymes of 51.16% in a concentration of 500 μL of sample at 40 min of reaction and 23.14% with 400 μL and 100 min, respectively. The ultrafiltration (UF) process made it possible to obtain bioactive peptide fractions from the Alcalasa[®] and Flavourzima[®] hydrolysates, with the 1-3 kDa peptide fraction showing the best anticholesterolemic activity with greater than 79% inhibition in both enzymes. While the antidiabetic activity was greater in the peptide fraction <1 kDa, inhibiting 55.65% of the α -amylase enzyme of the hydrolysates with Alcalase[®] at 80 min and 70.18% with Flavourzima[®] at 100 min. On the other hand, the best inhibition of α -glucosidase was obtained with the peptide fraction <1 kDa with 34.73% of the hydrolysate with Alcalase[®] at 20 min and of the hydrolysate with Flavourzima[®] at 100 min, the fraction >5 kDa presented 46.02% of inhibition. Degreasing of sunflower seed flour with ultrasound and hexane solvent, enzymatic hydrolysis, and ultrafiltration process; allowed to obtain peptide fractions that contain bioactive peptides of different molecular weights that presented anticholesterolemic and antidiabetic activity which could be used as an alternative for the design and development of nutraceutical products that help in the treatment of chronic-degenerative diseases.

I. INTRODUCCIÓN

Conforme con Organización Mundial de la Salud, en el 2019 se reportó la muerte de 18.6 millones de personas a causa de las enfermedades cardiovasculares, lo cual representa 48% de todas las muertes registradas en el mundo. Según el organismo, las causas más importantes son una mala alimentación, la falta de actividad física, el tabaquismo y el consumo nocivo de alcohol. La Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó a nivel mundial que en el 2021 se reportó que uno de cada 10 adultos (20-79 años) tiene diabetes (537 millones de personas) de los cuales uno de cada dos adultos no está diagnosticado (240 millones de personas) indicando que estas pueden ir en aumento hasta alcanzar 643 millones para 2030 y a 783 millones en 2045. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en México durante el 2018 la población de 20 años y más en el país era de 82 767 605 personas, de las cuales 10.32% reportaron (8 542 718) contar con un diagnóstico médico previo de diabetes mellitus. De los cuales el 13.22% (5.1 millones) de las mujeres de 20 años disponían de su diagnóstico médico y 7.75% (3.4 millones) de los hombres de 20 años y más. Es decir, la enfermedad está más presente en las mujeres que en los hombres (INEGI, 2021). La asociación entre obesidad, diabetes, presión arterial alta y colesterol alto explica porque las personas pierden años de buena salud, ya que son las principales causantes de las enfermedades graves y tienen factores comunes como la baja tasa de diagnóstico, la baja adherencia a la prescripción médica y un porcentaje reducido de individuos diagnosticados, tratados y controlados, ya que solo el 3.1% de la población del país cumple con estos tres principios. La mayoría de los fármacos aplicados para el tratamiento de estas enfermedades ocasionan efectos secundarios graves en otros órganos (SECTEI, 2021). 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.

Actualmente la Industria de los Alimentos se ha enfocado en alternativas más saludables que no provoque efectos colaterales en la salud, enfocándose en las proteínas de origen vegetal. Las cuales son una fuente de energía esencial en la nutrición humana, formando parte de los



alimentos ya que cumplen funciones nutricionales y funcionales. Obteniendo hidrolizados proteicos a partir de este origen empleando enzimas comerciales, podemos extraer componentes bioactivos como los péptidos, fracciones peptídicas, aminoácidos libres; tales componentes pueden tener actividades benéficas en el organismo humano, como: antihipertensivos, antimicrobianos, anticolesterolémicos, antidiabéticos, entre otros. La solubilidad que presentan estos hidrolizados es cercana al 100% tienen un amplio rango de pH y son hipoalergénicos. Además, se absorbe mejor en el intestino que las proteínas intactas. Actualmente, los hidrolizados proteicos se dividen en dos grupos: I) *Hidrolizados parciales*, con grados de hidrólisis menores del 10%, para el mejoramiento de las propiedades funcionales y II) *Hidrolizados extensivos*, con un grado de hidrólisis mayor al 10%, su uso se centra en la alimentación especializada. Los hidrolizados extensivos se puede dividir dependiendo su uso como los suplementos proteicos (tercera edad, deportistas, dietas), en dietas médicas y por último en productos enriquecidos con péptidos bioactivos (Vioque, 2001).

Los péptidos bioactivos son pequeñas cadenas de aminoácidos de dos a quince residuos, que están inactivas en las proteínas intactas y pueden liberarse durante la digestión de los alimentos en el cuerpo humano o mediante un tratamiento previo; como la hidrolisis enzimática, la cual aporta muchos efectos beneficiosos para la salud (Vioque, 2006). Son numerosos los péptidos bioactivos descritos hasta la fecha los cuales podemos obtener en diferentes fuentes de origen vegetal como: los cereales, las leguminosas, frutos secos, pero en particular en este caso nos enfocaremos en las semillas, en donde nuestro país existe una gran diversidad de estas, donde destaca las que se obtienen del girasol. Al obtener un concentrado proteico de la harina desengrasada de la semilla de girasol se pueden extraer péptidos bioactivos, fracciones peptídicas e incluso aminoácidos libres, las cuales tienen una elevada utilización digestiva al no encontrarse ligada a la pared celular y pueden presentar diversas actividades biológicas antes mencionadas (Vioque, 2000). La industria alimentaria se ha enfocado también en el desarrollo de técnicas para obtener, identificar y cuantificar nuevos biopeptidos a partir de proteínas, esto se ha podido lograr mediante la digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de diferente origen: vegetal, animal y microbiano. Empleando diversas funciones en el organismo. Con base en el retardo de la absorción del colesterol en el yeyuno y el control de los niveles glucémicos, se han

encontrado diferentes mecanismos de acción por los que aminoácidos, péptidos, hidrolizados proteicos y proteínas ejercen esta función. Dentro de los cuales se encuentran la inhibición de α -amilasas y α -glucosidasa. Los inhibidores de α -glucosidasa retrasan la digestión de carbohidratos por inhibición competitiva de estas enzimas (Sosa-Crespo et al., 2018).

Por lo que, el objetivo de este estudio es evaluar las actividades antiolesterolémica y antidiabética *in vitro* de fracciones peptídicas de la harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus*)”

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en todo el mundo y se espera que siga siéndolo debido a su creciente prevalencia en países con menos recursos. Los cambios en la dieta son importantes para interpretar el escenario epidemiológico. La alimentación también determina la selección evolutiva de individuos con las variantes genéticas más adecuadas para sobrevivir en un ambiente determinado. (Corella & Ordovas, 2007). Estas enfermedades corresponden a los trastornos del sistema circulatorio, las cuales incluye el corazón, los vasos sanguíneos y la sangre. El corazón se encarga de bombear sangre a través del sistema vascular (circulación menor o pulmonar y circulación mayor o sistemática). Las arterias parten del corazón y se encargan de transportar la sangre rica en oxígeno en todo el cuerpo. Las venas llevan hacia el corazón la sangre desoxigenada (azul), en donde el oxígeno ha sido se ha convertido en dióxido de carbono por los tejidos. Los capilares, de calibre muy fino, hacen más fácil el intercambio entre la sangre y los tejidos (Corella et al., 2004).

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) incluyen desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos como:

- La cardiopatía coronaria: Esta enfermedad da en los vasos sanguíneos e irriga el músculo cardíaco.
- Las enfermedades cerebrovasculares: Esta enfermedad irriga el cerebro a través de los vasos sanguíneos.
- Las arteriopatías periféricas: Enfermedad que se da en los vasos sanguíneos irrigando los miembros superiores e inferiores.
- La cardiopatía reumática: Son lesiones que se dan en el músculo cardíaco y en las válvulas cardíacas las cuales son provocadas por una fiebre reumática, causado por bacterias denominadas Estreptococos.
- Las cardiopatías congénitas: Son malformaciones del corazón las cuales están presentes desde el nacimiento.

- Las trombosis venosas profundas y embolias pulmonares: coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones (Córdova et al., 2013)

Las obstrucciones en el corazón impiden que la sangre fluya en este y en el cerebro; provocando así fenómenos agudos denominados “ataques al corazón”. La causa más frecuente es la acumulación de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro, podrían tener su origen al combinar diferentes factores de riesgo, como el tabaquismo, una alimentación alta en grasas, la obesidad, la falta de actividad física, el consumo excesivo de alcohol, la hipertensión arterial, la diabetes y la hiperlipidemia (Sánchez et al., 2016).

En México en el 2020, el Sistema Nacional de Salud, afirma que la diabetes mellitus, es la tercera causa de defunciones, superada por el COVID 19 y las enfermedades del corazón. Conforme aumenta la edad de las personas se ha observado un incremento del diagnóstico de la diabetes mellitus. La cardiopatía afecta principalmente a los hombres de mediana y avanzada edad, con una mortalidad del 20%, valor más alto que el reportado para las mujeres. La cardiopatía representa un factor importante de muerte en los adultos de ambos géneros de 45 a 54 años o más, indicándonos que la edad avanzada es un inductor de esta enfermedad. Este grupo de enfermedades es una de las primeras causas de mortalidad, en el año 2021 se reportó un exceso de mortalidad del 41.4% que representa 96,312 defunciones más de lo esperado para ese año (232,658). Es evidente la heterogeneidad de la distribución de la cardiopatía, cuya prevalencia y mortalidad van de la mano de la magnitud de la prevalencia de los factores mayores de riesgo que ocurren en los estados federativos con mejor situación económica e influenciados por el estilo de vida (INEGI, 2021).

El incremento de masa corporal aumenta el riesgo de padecer estas enfermedades. Las proteínas han presentado diversas propiedades nutricionales, funcionales y biológicas. Nutricionalmente las proteínas son una fuente de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo humano. Funcionalmente, contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos. Muchas proteínas alimentarias tienen propiedades biológicas específicas que hacen que de estos componentes posibles

ingredientes de alimentos funcionales o promotores de la salud, esto se puede atribuir a los péptidos fisiológicamente activos en las moléculas de dichas proteínas (Rivero Pino, 2012).

2.2 PROTEINAS

Las proteínas y los ácidos nucleicos constituyen a las moléculas de información en los seres vivos. Estas biomoléculas están formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Dependiendo del tipo de proteína pueden contener azufre, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Son considerados también como polímeros de pequeñas moléculas llamadas aminoácidos los cuales son monómeros unidad. Estos aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos. La unión de pocos aminoácidos da lugar a un péptido; cuando el número de aminoácidos no es mayor de 10 se denomina oligopéptido, si es superior a 10 se llama polipéptido y si el número es superior a 50 aminoácidos se le denomina proteína. Por tanto, las proteínas son cadenas de aminoácidos que al plegarse adquieren una estructura tridimensional permitiéndoles llevar a cabo miles de funciones. Las proteínas están codificadas en el material genético de cada organismo, donde es especificada su secuencia de aminoácidos, y luego es sintetizada por los ribosomas. Las proteínas juegan un papel central en los sistemas biológicos y su importancia en los sistemas alimenticios no es menor, ya que poseen propiedades nutricionales y funcionales. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre ellas funciones estructurales, enzimáticas, transportadora (Luque-Guillen, 2013). El aspecto más importante de una proteína es el nutricional, por su composición de aminoácidos, aunque otras características estructurales como la solubilidad y la glicosilación pueden afectar su digestibilidad y en consecuencia su valor nutricional (Ruiz et al., 2013).

Desde un punto de vista nutricional, la proteína es un macronutriente que se encuentra en los alimentos. La importancia de las proteínas en la dieta proviene de su capacidad para suministrar aminoácidos y mantener la ingesta de proteínas del cuerpo para aumentando las durante el crecimiento. Dentro del mundo de vegetarianismo se desarrolló el término “complementación proteica” el cual está basado en la existencia de proteínas completas, las cuales contienen la mayoría de los aminoácidos indispensables y las proteínas incompletas a las cuales les falta uno o más de aminoácidos (aminoácidos limitantes). Este concepto se utiliza para desarrollar dietas o alimentos que combinan diferentes fuentes de proteínas con

el fin de mejorar la calidad de la combinación final. El punto de partida para la suplementación proteica es conocer la composición de aminoácidos esenciales y su biodisponibilidad. Los principales grupos de alimentos proteicos que pueden complementarse con aminoácidos esenciales son las leguminosas, la leche, los productos lácteos, las semillas, los frutos secos y los cereales. Al mezclar estas fuentes de proteína se puede mejorar mucho su calidad. Por lo tanto, se piensa que las mezclas más adecuadas son las de cereales con leguminosas. Las leguminosas contienen triptófano y metionina, los cereales la lisina, treonina y la isoleucina. (Martínez-Martínez,2006).

2.2.1 Aminoácidos

Los aminoácidos se han clasificado, en función de si pueden ser sintetizados o no por el organismo como “*de Novo*”. Por lo tanto, los aminoácidos esenciales (o indispensables), los cuales tienen un esqueleto hidrocarbonato que no se puede sintetizar en el cuerpo humano y, por lo tanto, se deben obtener de los alimentos para cumplir con las necesidades que tiene el cuerpo (crecimiento y mantenimiento de estructuras). Los nueve aminoácidos esenciales son: fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Actualmente, el grupo de aminoácidos no esenciales (o dispensables) se ha subdividido en los realmente dispensables los cuales son sintetizados en el organismo a partir de otros aminoácidos o metabolitos (alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y serina) y los esenciales son sintetizados por vías complejas y a partir de otros aminoácidos, en ocasiones su síntesis se puede ver restringida por situaciones fisiológicas (prematuridad) o fisiopatológicas (estrés catabólico severo o disfunción metabólica intestinal). Este grupo incluyen la arginina, cisteína/cistina, glutamina, glicina, prolina y tirosina. Sus precursores son glutamina/glutamato, aspartato, metionina, serina, ácido glutámico, amonio, colina, glutamato y fenilalanina respectivamente (Millward, 2004). Después de ingerirlas, la proteína del alimento es digerida y absorbida en el tracto digestivo. Esta se desnaturaliza por el ácido gástrico, para después ser hidrolizada por proteasas gástricas y pancreáticas que los convierte en pequeños péptidos y aminoácidos, y así, ser transportados a las células mucosas. Produciendo una nueva hidrolisis mediada por peptidasas intracelulares. Mientras que algunos aminoácidos presentes en la célula son utilizados como fuente de energía y recambio celular por los propios enterocitos antes de ingresar al torrente sanguíneo, por lo que el perfil

de aminoácidos que llega al hígado por vía periférica no refleja exactamente el de los aminoácidos absorbidos. (Fuller et al., 2005). Una vez en el hígado, una parte es absorbida y utilizada por este órgano, el resto va al sistema circulatorio y es utilizado por los tejidos periféricos. El destino metabólico de los aminoácidos va desde su uso como sustratos energéticos o gluconeogénicos hasta la síntesis de proteínas y péptidos, pasando por la síntesis de aminoácido no esenciales o la formación de otros compuestos nitrogenados. Todos los compuestos nitrogenados del cuerpo provienen de los aminoácidos, de aquí la importancia del consumo de proteínas.

2.3 PROTEÍNAS FUNCIONALES

En los últimos años, el interés en investigar y desarrollar productos funcionales y nutracéuticos ha aumentado significativamente, debido al valor terapéutico como por su gran interés para la industria alimentaria, teniendo en cuenta el gran impacto económico que supone la comercialización de este tipo de productos (Burdock et al., 2016, Bagchi, 2006). Los alimentos funcionales se definen como los alimentos y componentes alimentarios que, tomados como parte de la dieta, aportan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de padecer algunas enfermedades, mientras que los de carácter nutracéuticos serían componentes alimenticios que aportan beneficios añadidos para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Ruiz et al., 2013).

Las proteínas funcionales y los péptidos bioactivos, además de su valor nutricional como fuente de aminoácidos, tienen la capacidad de producir un efecto biológico específico (Rutherford et al., 2005, Korhonen et al., 2003). La mayoría de los péptidos bioactivos se forman espontáneamente tras la digestión *in vivo* a partir de las proteínas que los contienen. Sin embargo, también se han obtenido nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, utilizando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Meisel et al., 2004). Además, en estudios recientes se han obtenido péptidos modificados, constituidos a partir de péptidos naturales, para aumentar la actividad de éstos, es decir, por semi síntesis (Teschemacher et al., 1997). Por tanto, cualquier fuente de proteína alimentaria es capaz de proporcionar péptidos funcionales. De esta forma, se han

aislado péptidos a partir de hidrólisis enzimática de proteínas de diversas procedencias, como la leche, maíz, soja, huevo, gelatina, etc. (Korhonen et al 2003). La literatura científica indica que los péptidos bioactivos pueden tener actividad tanto a nivel local (tracto gastrointestinal) como sistémica (Rutherford et al., 2005, Vermeirssen et al., 2004), ya que pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través del torrente sanguíneo.

Por tanto, un concepto realmente nuevo en el campo de la nutrición es el uso de proteínas y péptidos de los alimentos con el fin de mejorar las funciones biológicas o para tratar, prevenir o reducir el riesgo de enfermedades. Así, se han propuesto varios péptidos y proteínas para tratar enfermedades dentales, malabsorción de minerales, diarrea, hipertensión, trombosis, o inmunodeficiencias (Teschmacher et al., 1997).

2.4 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

En investigaciones recientes sobre alimentos funcionales, ha causado interés a los compuestos bioactivos, incluidos los péptidos. Mellander en 1950 describió por primera vez la actividad biológica de los péptidos. Durante las últimas dos décadas, se ha dedicado un gran interés en la identificación y caracterización de estos compuestos. Diversas investigaciones siguen en la búsqueda de nuevas fuentes de obtención, diferentes métodos de extracción y así evaluando sus beneficios sobre la salud. Los péptidos bioactivos pueden ayudar a reducir la epidemia mundial de enfermedades crónicas las cuales afectan aproximadamente a 58 millones de personas al año. En la actualidad el mercado de proteínas y péptidos tiene un valor estimado de \$ 75 miles de millones al año. Los péptidos bioactivos de las proteínas tienen un gran potencial para ser incorporados en los alimentos funcionales y nutraceuticos. El problema está relacionado con la introducción de productos peptídicos que promueven la proteólisis, la rápida eliminación en el cuerpo, la baja solubilidad en agua, la inmunogenicidad y los obstáculos regulatorios (Kadam et al., 2015).

Los péptidos bioactivos son pequeñas cadenas peptídicas constituidas por 2 a 15 residuos de aminoácidos (Vioque et al., 2006). Sin embargo, Kitts y Weiler (2003) hacen mención que los péptidos bioactivos obtenidos de los alimentos pueden presentar entre 2 y 9 residuos de aminoácidos. Aunque puede haber excepciones ya que existen péptidos como la lunasina que

tienen con más de 20 residuos de aminoácidos, el cual, es un péptido extraído de la soya que presenta actividad anticancerígena la cual ha sido probada en ratas, presentando 43 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5400 Da (Jeong et al., 2002). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los péptidos bioactivos se han definidos como fragmentos específicos de proteínas, de origen vegetal o animal, teniendo un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo que pudieran tener influencia sobre la salud humana, más allá de buena nutrición y adecuada. Es por esto, que, dependiendo de la secuencia y composición de aminoácidos en el péptido, su administración oral puede afectar algunos de los sistemas del organismo, entre ellos, el sistema cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmunológico (Borja, 2014; Mulero et al., 2011). Por lo tanto, la actividad biológica de los péptidos está relacionada con la composición y secuencia de los aminoácidos que lo componen (Alvarado y Guerra, 2010). Los péptidos bioactivos descritos anteriormente comparten propiedades estructurales, como aminoácidos de cadena corta (de 2 a 9 aminoácidos), residuos aminoácidos hidrofóbicos en adición a grupos de prolina, lisina o arginina y resistencia a las peptidasas digestivas (Nongonierma-Fitzgerald, 2015). Este último le permite su absorción e ingresar al torrente sanguíneo, sin cambios (Alvarado y Guerra, 2010).

Por otro lado, en los hidrolizados extensivos, existe una aplicación que por su interés, novedad y potencial es especial, ya que por hidrólisis dirigida y un proceso de purificación, se pueden obtener péptidos bioactivos, que al ser liberados por hidrólisis, ya sea por digestión en el organismo o por un procesado previo, se pueden absorber por los enterocitos y llegar al flujo sanguíneo, realizando alguna actividad biológica para así obtener un efecto fisiológico o funcional que va más allá de proveer aminoácidos esenciales y proveer energía al metabolismo, con la capacidad de exhibir múltiples efectos (Hartmann-Meisel, 2007; Hong et al., 2008; Kitts-Weiler, 2003; Korhonen-Pihlanto, 2003; León et al., 2011).

En la tabla 1 se describen los mecanismos de absorción y transporte de los péptidos al torrente circulatorio. Los péptidos hipoalergénicos presentes en los hidrolizados se caracterizan por tener una solubilidad en agua cercana al 100% en un intervalo amplio de pH. Además, su absorción en el intestino es mejor que la de las proteínas intactas.

Tabla 1. Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de los péptidos.

Ruta de Transporte	Comentarios	Candidatos
Ruta paracelular	Difusión a través de las funciones entre células por un proceso de difusión pasiva independiente de energía.	Péptidos grandes solubles en agua.
Difusión pasiva	Difusión a través de un proceso transcelular.	Péptidos hidrofóbicos.
Vía transportadora	Es la salida de algunos péptidos del enterocito hacia la circulación a través de un transportador que está localizado en la membrana baso lateral del intestino.	Péptidos pequeños resistentes a hidrólisis.
Endocitosis	Unión de las moléculas a la célula para su absorción al interior vía vesiculación.	Péptidos polares grandes.
Sistema linfático	Absorción de péptidos del espacio intersticial hacia el espacio linfático intestinal.	Péptidos altamente lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos.

Fuente: Sarmadi y Ismail (2010).

2.4.1 Métodos para obtención e identificación de péptidos

Existe un interés creciente en el desarrollo de tecnologías rentables para aislar fracciones de proteínas (y péptidos) de diversas fuentes disponibles en el mercado alimentario. El desarrollo de un método de fraccionamiento de péptidos eficiente es de importancia crítica para la separación de péptidos y más aún cuando el proceso se utiliza a escala industrial. Las tecnologías de separación distinguen las diferencias de carga, tamaño e hidrofobicidad, las cuales se pueden utilizar para fraccionar los hidrolizados de proteínas y obtener así fracciones de péptidos con mayor valor funcional o nutricional en una forma más pura (León et al., 2011; Muro, Riera, y Fernández, 2013). Los procesos de producción de péptidos bioactivos

a escala piloto suelen utilizar membranas de ultrafiltración y cromatografía de líquidos procesando secuencialmente el fraccionamiento y aislando los componentes bioactivos a partir de los hidrolizados. Como se mencionó anteriormente la evolución de la separación de péptidos basada en propiedades moleculares proporciona información cuantitativa sobre la relación entre estructura y actividad. Donde se han podido desarrollar nuevas estrategias con respecto a la combinación o integración de procesos adicionales necesarios para establecerlos eficientemente y que sean rentables a escala industrial, no solo para el fraccionamiento sino también para la producción simultánea y continua de péptidos con diferentes propiedades bioactivas (Li-Chan, 2015).

2.5 ULTRASONIDO

La Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), se basa en la propagación de ondas mecánicas que consiste en un conjunto de ciclos, las cuales se definen como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresión y rarefacción, respectivamente (Awad et al. 2012; Musielak et al. 2016). Las principales características de las ondas que produce el ultrasonido son:

- Longitud: Es la distancia entre los dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud: Es altura máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): Es número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): Producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): Cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad (W/cm^2): Cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área (Tippens & Hernández 2007).

Se denomina ondas ultrasónicas al espectro de ondas implicadas al ultrasonido, cuyas frecuencias se encuentran por encima del rango audible (>20 kHz) y por debajo de las frecuencias del microondas (hasta 10 MHz) (Kadam et al., 2015). La cavitación acústica es la principal fuerza impulsora del EAU (Figura 1), la cual es capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas debido a los cambios de temperatura y presión (Shirsath et al., 2012).

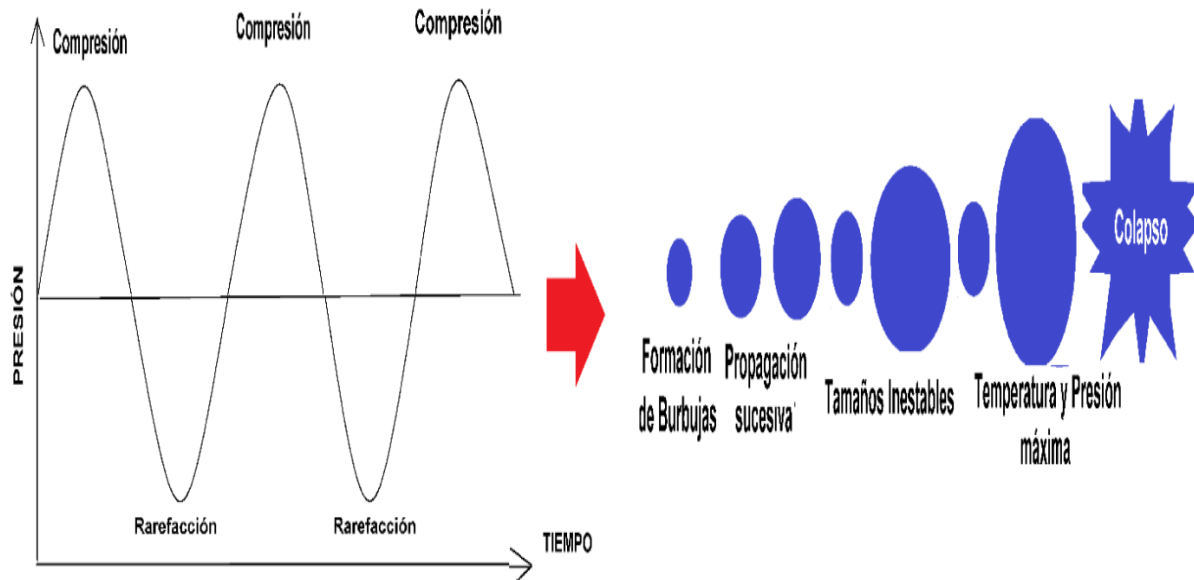


Figura 4. Principio de cavitación acústica (Medina-Torres et al., 2017).

La irradiación ultrasónica se aplica de dos formas: En contacto directo con la muestra, o indirecta (a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra), un ejemplo de esto es los sistemas de baño de ultrasonido. La principal desventaja de los baños ultrasónicos es que suelen funcionar a una sola frecuencia (20 o 40 kHz). En general, se han identificado varios mecanismos relacionados con el EAU, donde destaca la fragmentación, en esta se dan colisiones entre partículas y las ondas ultrasónicas, lo que conduce a la reducción del tamaño de partícula, facilitando a su vez la transferencia de masa. La erosión es un mecanismo que mejora la disponibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas en la superficie de la matriz vegetal. Por otro lado, los efectos de sonocapilaridad y de sonoporación mejoran la penetración de líquido a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, provocando cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, respectivamente. Finalmente, el esfuerzo de cizallamiento hace que las burbujas colapsen en el fluido debido a un fenómeno llamado oscilación (Figura 2) (Chemat et al., 2017). El ultrasonido promueve de extracción a través de la disrupción celular y aumenta la transferencia de masa en la capa límite que rodea la matriz sólida. Diversos factores mejoran la permeabilidad de las paredes

como lo son: la sonoporación, la perforación de las paredes y membranas celulares, esto suele ser un paso intermedio antes de que las células se interrumpan completamente por la sonicación. Diversos factores como; los efectos mecánicos de la cavitación inducida por los ultrasonidos, las ondas de choque, las diferencias de temperatura y presión, las fuerzas de cizallamiento y la microcorriente, mejoran la intensidad de penetración del disolvente en el interior de la célula mejorando la transferencia de masa entre la célula y el disolvente, transfiriendo los materiales intercelulares al disolvente.

La extracción por ultrasonido es utilizada en la industria de los alimentos, la industria de suplementos nutricionales y la farmacéutica; para la liberación de diferentes compuestos bioactivos como: vitaminas, polifenoles, polisacáridos, péptidos y otros fitoquímicos de los productos botánicos (Dogan et al., 2019).

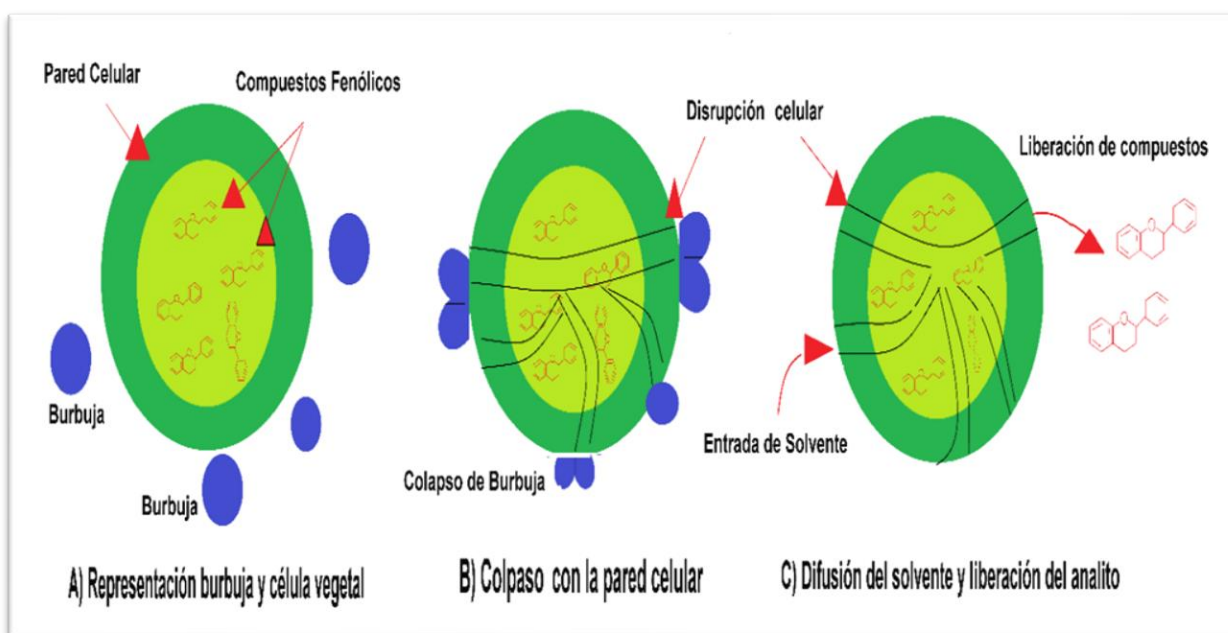


Figura 5. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal (Medina-Torres et al., 2017).

2.6 SEPARACIÓN POR PRECIPITACIÓN

El objetivo principal de la obtención de productos enriquecidos en proteínas tiene la eliminación de los compuestos no proteicos presentes en ella (Vioque et al., 2001). Estos procesos se basan generalmente en las diferencias en solubilidad que presentan las proteínas en función del pH del medio. En la Figura 3 se muestra un perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH. Observando que solubilidad es máxima a pH's muy ácidos (pH = 2-3) o muy alcalinos (pH = 9-11). En estas zonas, las proteínas poseen carga neta positiva o negativa, respectivamente; y las fuerzas repulsivas son la causa del incremento en su solubilidad. También se puede observar un mínimo de solubilidad en cercanías del pH isoelectrico (pI) (pH = 4-5), donde la carga neta de la proteína es cero, disminuyendo así la repulsión electrostática promoviendo la agregación (Salgado, 2009).

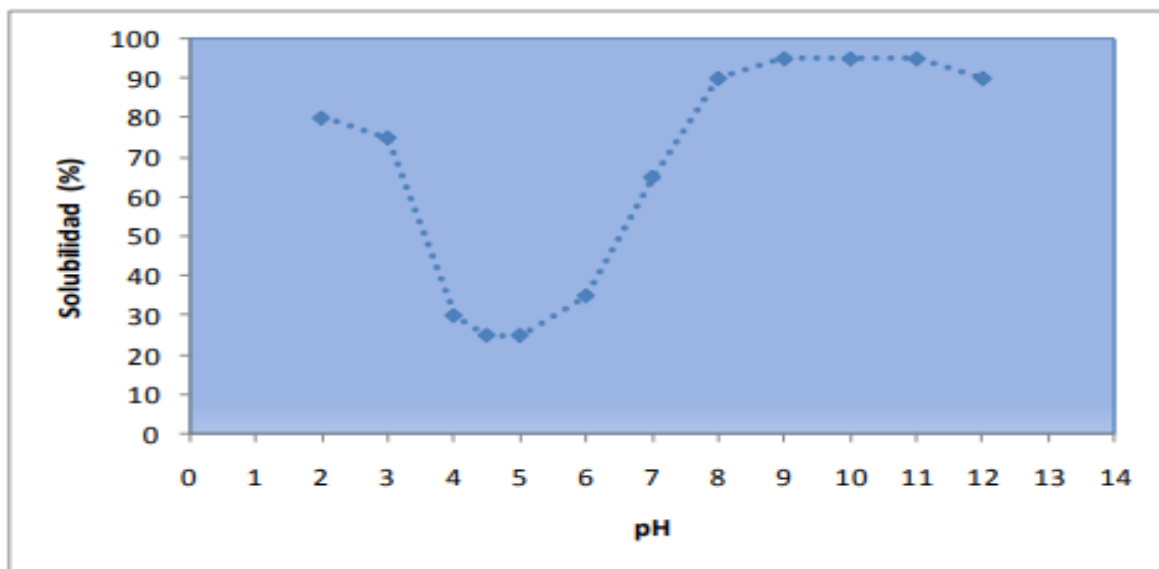


Figura 6. Perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH del medio (Salgado, 2009).

Así, el proceso de concentración clásico consiste en poner la harina desgrasada en contacto con el agua para posteriormente extraer las proteínas en un medio alcalino, donde se recupera el sobrenadante por medio de centrifugación y ser sometido a un proceso de secado; obteniendo un producto con un alto contenido de proteínas, llamado comúnmente como concentrado proteico. Sin embargo, este producto contiene otros componentes indeseables (fenoles, lípidos, fibra, sales, azúcares reductores, componentes anti nutricionales, etc.).

Algunos de estos componentes pueden ser eliminados utilizando varias tecnologías, como la precipitación isoelectrica o ultrafiltración. Por lo tanto, los aislados proteicos se pueden obtener mediante:

- Precipitación isoelectrica de las proteínas con separación por centrifugación: El aislado obtenido es presentado en forma de una crema insoluble concentrada. Este es lavado con agua a un pH ácido, para ser centrifugado posteriormente, y así obtener un aislado neutro y seco. En esta etapa se pueden perder proteínas solubles.
- Concentrado proteico por ultrafiltración: Las moléculas solubles que tienen un bajo peso molecular (incluidas algunas proteínas) atraviesan la membrana constituyendo el permeado, mientras que las proteínas de alto peso molecular son retenidas y posteriormente secadas.

La separación de proteínas por precipitación modifica las propiedades físicas de la solución para reducir la solubilidad de las proteínas. Las proteínas generalmente tienen baja solubilidad a pH cerca del punto isoelectrico y en soluciones de baja fuerza iónica. Por lo tanto, utilizando las condiciones anteriores (ajustando el pH a punto isoelectrico), las proteínas comenzarán a aglomerarse. El tratamiento térmico, cuando es aplicado, cambia la estructura y solubilidad de la proteína. Por ejemplo; cuando el suero se calienta a más de 90 °C durante 10 min en condiciones acidas (pH 3.5 a 5.5.), se puede observar un precipitado de proteína (Cuñaña, 2018).

2.7 MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN

Los procesos de membrana se consideran herramientas eficaces para el desarrollo de productos con valor añadido como los péptidos bioactivos (Pouliot, 2008). Estos procesos de separación se basan en la permeabilidad selectiva de uno o más líquidos a través de la membrana en función con la diferencia de presión. Los métodos de ultrafiltración con membranas han sido aprobados para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas ya que el peso molecular de la mayoría de los péptidos bioactivos se encuentra dentro del rango del tamaño normal del poro de estas membranas (León et al., 2011).

La ultrafiltración (UF) es una técnica utilizada con éxito para obtener fracciones ricas en péptidos con actividad antihipertensiva procedentes de proteínas lácteas (Gómez et al., 2006;

Hernández et al., 2004). Se puede usar un sistema de ultrafiltración para separar péptidos que tienen el peso molecular y las propiedades funcionales deseadas. La ultrafiltración se usa comúnmente para preparar soluciones enriquecidas con péptidos a partir de hidrolizados de proteínas para mejorar la bioactividad de estos; se utiliza para separar péptidos de tamaños inferiores a 7 kDa (Mehra y Kelly, 2004). La obtención de polipéptidos se puede obtener en la combinación de procesos de UF (ultrafiltración) y nanofiltración.

2.8 PROCESO ENZIMÁTICO PARA LIBERACIÓN

La proteína precursora puede generar de múltiples maneras péptidos bioactivos, como:

- a) Digestión gastrointestinal *in vivo*.
- b) Hidrólisis *in vitro* por acción de enzimas digestivas, proteolíticas u otras enzimas derivadas de microorganismos o plantas.
- c) Fermentación microbiana.

No obstante, la digestión gastrointestinal *in vivo* es uno de los métodos más efectivos, sin embargo, es más complejo y costoso, por otro lado, la hidrólisis enzimática se considera un método efectivo, confiable y económico para la obtención de péptidos bioactivos. La cual consiste en un conjunto de etapas, originando péptidos de tamaño decreciente:

Proteínas → proteasas → peptonas → péptidos → aminoácidos.

Trata de un conjunto de reacciones simultáneas que da una ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio (Borja, 2014). La hidrólisis enzimática ofrece ventajas, ya que al ocupar enzimas selectivas para un tipo de enlace no existe un proceso de degradación del sustrato, los valores de pH y temperatura pueden ser controlados (pH están en un rango de 4 a 10 y la temperatura entre 40 a 60 °C), manteniendo o mejorando el valor nutritivo de la proteína. Por otro lado, una ventaja adicional de la hidrólisis enzimática es la disminución de alérgenos. El tamaño, la cantidad, la composición de péptidos y aminoácidos libres es afectada por la especificidad de la enzima, así como su secuencia de aminoácidos. Utilizando diferentes enzimas se obtienen la formación de una mezcla de péptidos con diferentes grados de hidrólisis y en consecuencia diferentes rangos de actividad biológica (Borja, 2014).

Los ácidos gástricos y la pepsina presentes en el estómago se encargan de desnaturalizar la proteína cuando es ingerida; posteriormente, las proteasas hidrolizan los fragmentos a péptidos, los cuales van a las células de la mucosa para ser hidrolizados por peptidasas. Es así como los enterocitos aprovechan una parte de estos mientras que otra fracción pasa al hígado para emplear las funciones hepáticas, los productos que quedan se incorporan a la circulación para ser utilizados por otros órganos en general (Rodríguez et al., 2014; Saavedra et al., 2013).

Los hidrolizados enzimáticos se utilizan para una variedad de propósitos, como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios, en formulaciones farmacéuticas y aplicaciones clínicas específicas, así como para reducción de reacciones alérgicas producidas por la proteína y en la obtención de péptidos bioactivos (Tardioli et al., 2003). Durante la hidrólisis de las proteínas, la selección de enzimas y las condiciones del proceso influyen en la composición de los péptidos en el hidrolizado y, por lo tanto, en sus propiedades funcionales (Van der Ven et al., 2002). Dependiendo del grado de hidrólisis (GH), los productos proteicos se pueden clasificar en hidrolizados parciales (GH <10%) e hidrolizados extensivos (GH >10%), cada uno con propiedades específicas que afectan a su utilización (Vioque et al., 2006). Con este propósito, un gran número de enzimas exógenas se han empleado con éxito en la producción de hidrolizados proteínicos de diversas fuentes, por lo que la naturaleza de la actividad enzimática o su actividad específica es un factor importante por considerar (Vioque et al., 2001).

presenta ambas actividades. Últimamente las tendencias mundiales de la alimentación muestran que los consumidores están interesados en algunos productos alimenticios, que además de su valor nutricional, ofrecen beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humanos.

2.9 ALIMENTOS FUNCIONALES

. Las diferencias dietéticas han abierto una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición con respecto a los alimentos funcionales. Aunque el vínculo entre la dieta y la salud ha sido reconocido por la medicina china desde el año 1000 a. de C. con la frase “deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación”, propuesta por Hipócrates (Astiasarán, 1999).

Según los expertos, muchas enfermedades crónicas que afectan a la sociedad de una forma u otra (cáncer, obesidad, hipertensión, trastornos cardiovasculares) están íntimamente relacionadas con la nutrición (Jones, 2002). Actualmente, existe una clara preocupación en la sociedad sobre el posible vínculo entre la salud personal y la ingesta de alimentos. Incluso se reconoce que la salud es buena y se controla mejor con alimentos, por lo que el mercado alimentario tiene una clara preferencia por los alimentos anunciados como saludables. Las propuestas de nuevos productos con ciertos beneficios para la salud aparecieron por primera vez en 1960. Desde entonces, se han introducido en el mercado nuevos alimentos, con el fin de utilizar en dietas estrictas como las exentas de gluten, aquellas bajas en calorías o bajas en sodio, etc. Estos productos se les conoce como:

- Alimento funcional: Cualquier alimento en forma natural o procesada, que contiene componentes nutritivos y otros adicionales los cuales favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. Este término está relacionado con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", es decir la característica que tiene un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo.
- Producto nutracéutico: Cualquier producto que pueda tener la consideración de alimento, parte de un alimento, capaz de proporcionar beneficios saludables, incluidos la prevención y el tratamiento de enfermedades (Astiasarán, 1999). El

concepto de alimento nutracéutico ha sido recientemente reconocido como "aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal" (Zeisel, 1999).

- Alimentos diseñados: Alimento procesado, el cual tiene ingredientes naturales ricos en sustancias capaces de prevenir enfermedades. Este término es utilizado frecuentemente como sinónimo de alimento funcional.
- Productos fitoquímicos: Sustancias que se encuentran en verduras y frutas, que pueden ser ingeridas diariamente con la dieta en cantidades de gramos y muestran un potencial capaz de modular el metabolismo humano (Astiasarán, 1995). Actualmente también es considerado como alimentos funcionales a los microorganismos probióticos.

2.9.1 Componentes funcionales en alimentos

En la actualidad existen muchos alimentos funcionales en el mundo. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de componentes presentes en los alimentos funcionales. Uno de los países que tiene claro el objetivo de alimento funcional es Estados Unidos ya que tienen la finalidad de prevenir enfermedades en la población, por ejemplo, es fácil encontrar barras de cereales con el fin de ayudar a mujeres de mediana edad, estas están suplementadas con calcio que previene la osteoporosis, o por proteína de soya la cual ayuda a reducir el riesgo de padecer cáncer de mama y con ácido fólico, para tener un corazón más sano, también panecillos energizantes y galletas adicionadas con proteínas, zinc y antioxidantes (Hasler, 2000).



Tabla 2. Principales componentes funcionales.

Clase/Componente	Origen	Beneficio potencial
Carotenoides		
Betacaroteno	Zanahoria	Neutraliza los radicales libres que podrían dañar a las células.
Luteína	Vegetales Verdes	Contribuye a una visión sana.
Licopeno	Tomate	Podría reducir el riesgo de cáncer de próstata.
Fibras dietéticas		
Fibra insoluble	Cáscara de trigo	Podría reducir el riesgo de cáncer de colon.
Betaglucano	Avena	Reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular.
Ácidos grasos		
Omega 3, ácido graso DHA	Aceites de peces	Podrían reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y mejorar funciones mentales y visuales.
Acido linoleico	Queso, productos cárnicos	Podrían mejorar la composición corporal, podrían reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer.
Flavonoides		
Catequinas	Te	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer.
Flavonas	Cítricos	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer.
Esteroles vegetales		
Ester estanol	Maíz, soya, trigo	Reduce los niveles de colesterol sanguíneo.
Prebióticos/probióticos		
Fructooligosacáridos	Achicoria, cebolla	Podría mejorar la salud gastrointestinal.



Lactobacilos	Yogurt	Podría mejorar la salud gastrointestinal.
Fitoestrógenos		
Isoflavonas	Alimentos de soya	Podrían reducir los síntomas de menopausia
Proteínas y péptidos bioactivos		
Lactoferrina	Leche	Previenen y controlan la hipertensión, fortalece el sistema inmune, reduce el riesgo de cáncer, osteoporosis, contiene antioxidantes; los cuales disminuyen los radicales libres y podrían ser antimicrobianos, actividad anticolesterolémica y antidiabético controlando los niveles de glucosa en la sangre.
Péptidos bioactivos	Oleaginosas, Leguminosas, etc.	

Fuente: Korhonen, (2002).

Los productos se desarrollan con el objetivo de proporcionar beneficios fisiológicos a un grupo de consumidores específicos, por ejemplo: grupos con riesgo en su salud, personas mayores, deportistas, etc. La funcionalidad de estos productos alimenticios se basa en ingredientes bioactivos que están naturalmente presentes en el producto, pero a menudo se requiere el desarrollo de tecnologías apropiadas para optimizar las propiedades benéficas deseadas. (Korhonen, 2002). Esto a menudo requiere el desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías. La aplicación de tecnologías de procesamiento se centra en dos aspectos:

- 1) En retener la bioactividad al máximo durante el procesamiento y almacenamiento de los productos formulados; y
- 2) En liberar los componentes bioactivos deseados en el sitio requerido del cuerpo (Bellisle et al., 1998).

Los alimentos promotores de la salud pueden también presentar desafíos con respecto a su posición regulatoria y el desarrollo de estrategias para lanzarlos al mercado. En la última instancia, estos nuevos productos deben ser aceptados por los consumidores, en términos de eficacia documentada, propiedades sensoriales y precio (Hasler, 1998).

2.10 EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Aunque existen diferentes medicamentos disponibles para tratar o ralentizar el progreso de ciertas enfermedades en humanos, sus efectos secundarios pueden ser mayores que sus beneficios. En contexto, los péptidos derivados de proteínas podrían convertirse en un sustituto natural de los fármacos utilizados en el tratamiento de diferentes enfermedades (Nongonierma & Fitzgerald, 2015). La literatura científica indica que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar los tejidos periféricos a través de la circulación sistemática, siendo capaces de realizar funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistemático. (Mulero et al., 2011; Rodríguez et al., 2014). Los péptidos y aminoácidos pueden ser absorbidos en forma intacta a través del espacio intersticial en el sistema linfático cuando escapan a la digestión. Sin embargo, la permeabilidad de los capilares y la solubilidad de los lípidos afecta la capacidad de los compuestos para entrar en el sistema linfático intestinal. Se ha sugerido que los fármacos transportados a través del sistema linfático gastrointestinal no se pueden metabolizar en el hígado. Es así como la ruta de transporte de los péptidos es afectada por el tamaño y la hidrofobicidad (Sarmadi & Ismail, 2010). La actividad biológica depende de la secuencia de aminoácidos que conformen los péptidos al momento de terminar la hidrólisis, estos tendrán la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos, alterando el metabolismo celular y actuando como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona receptor y cascadas de señalización: los cuales pueden ejercer su acción regulando el metabolismo a través de las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, la memoria, el dolor, el apetito y los efectos sobre el sistema nervioso central (Mulero et al., 2011; Rodríguez et al., 2014). Según las propiedades estructurales, la composición y la secuencia de sus aminoácidos, los biopeptidos pueden desempeñar diversas funciones, tales como hipocolesterolémicos, antihipertensivos, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, anticancerígenos, opiáceos, inmunomoduladores, saciantes, entre otras (Nongonierma & Fitzgerald, 2015). Lo cual permite ofrecer una amplia variedad de alimentos enfocados a cierto grupo de consumidores. La capacidad antioxidante y antihipertensiva son las más comunes (Domínguez et al., 2014; González et al., 2014). No obstante, su biodisponibilidad no está clara, ya que necesitan ser liberados de las proteínas que se encuentran en contacto con las proteasas gástricas e intestinales, para poder atravesar

el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea para ser capaces de ejercer su acción. (Mulero et al., 2011).

2.11 ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLÉMICA

La dislipidemia, se caracteriza por la presencia de uno o más de lípidos concentrados en sueros anormales (total de colesterol-TC, LDL-C, triglicéridos y HDL-C), siendo el principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (ECV). El efecto hipocolesterolemiante de los péptidos bioactivos se puede atribuir a dos acciones: Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, esto se puede atribuir a que reprimen la solubilidad micelar del colesterol; algunos péptidos pueden aumentar la concentración o el número de receptores LDL, los cuales están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta. Diversos estudios del efecto hipocolesterolémico de péptidos obtenidos a partir de la soya han resultado en la hipótesis que un péptido con alta capacidad de unión al ácido biliar puede inhibir la reabsorción de la bilis en el íleon y estimular la transformación del colesterol en ácidos biliares en el plasma e hígado, y por lo tanto bajar los niveles de colesterol en sangre (Borja, 2014).

Se cree que los mecanismos responsables de la actividad hipocolesterolémica de los alimentos de soya y sus péptidos bioactivos incluyen la estimulación de la secreción de ácidos biliares, la alteración del metabolismo del colesterol en el hígado, efectos hormonales y la regulación de los receptores de colesterol de actividad biofuncional de péptido bioactivo *in vitro* no implica relación directa con la actividad *in vivo*. Esto se debe principalmente a la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos, para tener un efecto potencial cuando se administra por vía oral, ya que este tiene que alcanzar el objetivo en una forma activa. Por lo tanto, deben permanecer activos durante la digestión por proteasas humanas y ser transportados a través de la pared intestinal a la sangre (Borja, 2014; Singh et al., 2014). Los estudios han demostrado que los hidrolizados de proteína de soya reducen el colesterol plasmático que la proteína de soya intacta. También se han obtenidos péptidos bioactivos con efecto hipocolesterolémicos a partir de β -Lactoglobulina, hidrolizado de proteína de carne de cerdo y proteína vegetal (Mulero et al., 2011).

2.11.1 Péptidos anticolesterolémicos

Uno de los factores de riesgo más importantes que se atribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares son la hiperlipidemia, y en especial el hipercolesterolemia.

Pocos péptidos con actividad hipocolesterolémica han sido secuenciados y así también su relación estructura-actividad no ha sido 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 de tal forma que son absorbidas en el yeyuno. Así, los péptidos IIAEK, LPYP y WGAPSL han sido aislados del hidrolizado trípico 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.

2.12 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

La dieta es importante para el control del peso y para la prevención de la diabetes, ya que la obesidad está asociada al número de receptores de insulina y, por lo tanto, con el desarrollo de resistencia a esta hormona. Cuando la dieta y el ejercicio no son suficiente para normalizar los niveles de glucosa en la sangre, se deben prescribir medicamentos hipoglucemiantes. Los medicamentos hipoglucemiantes incluyen insulina y agentes hipoglucemiantes orales como las sulfonilureas, biguanidas y acarbosa. (Vargas et al., 2015). Los fármacos hipoglucemiantes orales actúan en varios mecanismos fisiopatológicos de la diabetes: la resistencia a la insulina, las alteraciones en la secreción de la insulina por las células beta del páncreas, la producción hepática de la glucosa, la absorción intestinal de la glucosa derivada de la digestión de los alimentos, el control funcional insular total con base en las hormonas incretinas, la actividad del glucagón, etc. Al disminuir la hiperglucemia, mejora la glucotoxicidad independientemente del medicamento empleado y por esa razón aumenta la sensibilidad a la insulina y la capacidad secretora de las células beta (Vargas et al., 2015). Los hipoglucemiantes orales se encuentran agrupados según su principal mecanismo de acción en: secretagogos de insulina, reductores de la producción hepática de glucosa, sensibilizadores de la insulina e inhibidores de la α -glucosidasa intestinal. Se han reportado otros efectos además del hipoglucemiante en los fármacos antes mencionados; atribuyéndoles efectos en los factores de riesgo cardiovascular como los lípidos, en fenómenos inflamatorios, resistencia a la insulina, la disfunción endotelial, el vaciamiento

del estómago, la producción de radicales libres, la preservación de las células beta y la diferenciación a partir de precursores. Los problemas que se mencionan anteriormente podrían evitarse con el uso de sustancias hipoglucemiantes puras (Herrera-Chale et al., 2014).

2.12.1 Digestión de carbohidratos y diabetes

El metabolismo de los carbohidratos se encarga de transformar los carbohidratos ingeridos a través de los alimentos en moléculas de glucosa, formándola la fuente de energía más eficiente. Los carbohidratos en los alimentos suelen ser polisacáridos (celulosa o almidón) o como disacáridos (sacarosa o lactosa). Las enzimas y una compleja serie de procesos metabólicos están involucrados en la digestión de carbohidratos. Inicialmente, las enzimas digestivas hidrolizan estos polisacáridos complejos. Las principales hidrolasas digestivas son:

- La α -amilasa (EC 3.2.1.1). Esta enzima es secretada por las glándulas salivales y pancreáticas. Se encarga de hidrolizar carbohidratos complejos (almidón) en oligosacáridos, los cuales son hidrolizados posteriormente por la α -glucosidasa.
- La α -glucosidasa (EC 3.2.1.20). Esta enzima está unida a la membrana de la mucosa epitelial del intestino delgado. Liberando moléculas de glucosa libre de residuos de α -glucosa no reductores enlazados (1-4) terminales.

El consumo de alimentos provoca la liberación de hormonas en el intestino llamadas incretinas (polipéptido inhibidor gástrico, GIP y péptido 1 similar al glucagón, GLP-1). Estos dos afectan a la mayoría de los tejidos diana en el cuerpo, actuando como señales endocrinas al páncreas, lo que lleva a la producción de insulina en las células β y la supresión de la liberación de glucagón en las células α . Estas dos incretinas son responsables del 70% de la secreción de insulina en el páncreas después de ingerir alimentos (Nauck et al., 2004). La reducción de la glucemia tras la ingestión se da como resultado la absorción de la glucosa por los músculos y la menos producción de glucosa en el hígado, regulando los niveles de glucemia postprandial.

La enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) se encarga de la regulación en la degradación de las incretinas según las necesidades fisiológicas, después de su liberación en el torrente



sanguíneo y la unión a receptores específicos. GLP-1 y GIP tienen un corto tiempo de vida aproximadamente 2 min y 5-7 min respectivamente, antes de que sean degradados por DPP-IV (Tahrani et al., 2011; Yang, & Zhao, 2019). DPP-IV es una enzima (EC 3.4.14.5) que divide dipéptidos del extremo N-terminal de los polipéptidos, en el que la prolina está en la penúltima posición (Lammi et al., 2018). La DPP-IV puede ser encontrada en la superficie luminal de los enterocitos; interactuando así con cualquiera de las moléculas de la ingesta de alimentos antes de su absorción, metabolizándose aún más antes de la interacción de las moléculas con la DPP-IV endotelial soluble y vascular (afectando los niveles de GIP y GLP-1). Durante la regulación de la ingesta de alimentos las hormonas intestinales liberadas por las células entero-endócrinas (Carón et al., 2017). Una de las enfermedades más prevalentes es la diabetes mellitus tipo 2, la cual afecta a más de 400 millones de personas y se estima que para el año 2045 se vean afectadas aproximadamente a 700 millones de personas (IDF Diabetes Atlas, 2017). Este trastorno metabólico es caracterizado por la resistencia a la insulina, es decir, la incapacidad que tiene el organismo para reaccionar a la acción de la insulina, o la producción insuficiente de esta hormona. Es importante controlar el nivel de glucosa postprandial, ya que las consecuencias a largo plazo son diversas, desde insuficiencia renal hasta un daño neurológico y trastornos cardiovasculares (Li & Hölscher, 2007; Patil et al., 2015). Algunas causas como los factores genéticos intervienen en el desarrollo de la diabetes. Sin embargo, se piensa que la obesidad es la causa principal ya que opera a través de varias vías que incluyen un desequilibrio en la concentración de hormonas, citoquinas y otras señales inflamatorias (Tahrani et al., 2011). La inyección de insulina (Howard et al., 2018) es el tratamiento más utilizado para esta enfermedad, ya que regula positivamente el funcionamiento del organismo. Su desventaja principal que no se puede ingerir por vía oral.

2.12.2 Inhibidores de la enzima α -amilasa y α -glucosidasa

Conforme al proceso de digestión y las enzimas que se involucra en el metabolismo de los carbohidratos, evitar la degradación de los polisacáridos en glucosa es el primer paso para prevenir un aumento del nivel de glucosa en sangre. La inhibición de las hidrolasas digestivas (amilasas, glucosidasa) impide la hidrólisis de los polisacáridos complejos y, por tanto, su absorción en el torrente sanguíneo. La inhibición de las amilasas puede ocurrir en la saliva y en el tracto gastrointestinal, lo que reduce el nivel de glucosa en sangre (Yan et al., 2019).

Por su parte, la inhibición de la α -glucosidasa impide la captación de glucosa en el torrente sanguíneo, disminuyendo así efectivamente la hiperglucemia postprandial (Ibrahim et al., 2017; Konrad et al., 2014; Patil et al., 2015). Los inhibidores de glucosidasa no estimulan a las células β a secretar insulina, un factor adecuado para la estimulación de la secreción de GLP-1 es la absorción retardada de carbohidratos, lo que conduce al efecto incretina. Entre los principales inhibidores de la α -glucosidasa y la α -amilasa se encuentran la acarbosa, el miglitol y la voglibosa. Sin embargo, se han limitado su uso como inhibidores ya que se han descrito numerosos efectos secundarios, como molestias gastrointestinales, dolor de estómago y flatulencias (Patil et al., 2015). Por lo tanto, es un interesante tema de investigación la obtención de inhibidores de estas enzimas sin efectos secundarios.

2.13 FUENTES DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional, puede ser empleada como fuente de péptidos con actividad biológica, llamados también biopeptidos (Karelín et al., 1998). De esta forma, se puede establecer la generación de biopeptidos como un nuevo criterio para establecer el valor de una proteína (Meisel, 1998). Dentro de las proteínas precursoras de biopeptidos destacan las proteínas lácteas, del cual se han aislado péptidos con actividad antihipertensiva, antimicrobiana, opioide e inmunomoduladores (Darewicz et al., 2007; Dziuba et al., 2004; Gobetti et al., 2002). también destacan las proteínas de la carne de pollo y del huevo los cuales son importantes fuentes de biopeptidos con actividad antihipertensiva (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). Por su parte, el colágeno y la elastina son precursores de péptidos con actividad anticoagulante (Maruyama et al., 1992). Una alternativa para la obtención de péptidos son las proteínas vegetales ya que tienen mayor disponibilidad y un menor costo, como es el caso de la soya, el trigo, el arroz y el maíz (Gibbs et al., 2004; Yoshikawa et al., 2000). Enfocándonos en las semillas de girasol, algunos estudios han identificado su contenido de proteínas, péptidos y aminoácidos en la harina desengrasada (Villanueva 1999), la cual es la harina restante después del proceso de extracción de aceite y su uso se centra principalmente en la alimentación para el ganado dejando de lado su uso humano, la cual puede contener péptidos con actividad biológica pudiéndose utilizar como suplementos alimenticios o coadyuvantes en enfermedades crónicas degenerativas. Dentro de los alimentos mencionados anteriormente se han identificado

diferentes péptidos con actividad biológica los cuales que pueden ser beneficiosos para la salud y la prevención de enfermedades. (Carrillo et al., 2015).

2.14 SEMILLA DE GIRASOL (*Helianthus annuus*)

Las semillas de girasol provienen de la planta con el mismo nombre, científicamente se les conoce (*Helianthus annuus*), cuyo nombre viene del griego que significa “flor que gira con el sol”. El significado de este nombre se puede relacionar con la función que tienen estas flores, es conocida como “heliotrópica”, refiriéndose a la capacidad que tiene la planta para que sus hojas giren en busca de la luz solar. El nombre de la planta varía según la zona donde se cultive, es decir, en cada país o región se le conoce con un nombre distinto, como los siguientes: jáquima, calón, mirasol, maravilla, maíz de teja y tlapololote (Unisima, 2017).

2.14.1 Origen

Las semillas de girasol, conocidas también como pipas o pepas, son frutos de la planta de girasol, la cual anteriormente existía exclusivamente en el continente americano, se cree que el cultivo de esta planta se remonta aproximadamente de hace 3,000 años o más. Los estudios que se han realizado en torno a la historia de las plantas y sus orígenes han comprobado que el girasol era utilizado en México 2,600 años a. de C. Sin embargo, en la actualidad los girasoles son plantas que se cultivan sin ningún problema en todas las regiones propicias en cualquier parte del planeta (Gonzalez-Peréz, 2003).

2.14.2 Descripción

Son plantas anuales (como lo indica su nombre específico latín: *annuus*) las cuales pueden medir tres metros de alto. Los tallos generalmente son erectos e hispídos. La mayoría de sus hojas son caulinares, pecioladas, alternas, con base cordiforme y bordes aserrados (Figura 5). Usualmente la cara inferior es más o menos hispída, a veces glandulosa y la superior glabra. Las brácteas involúcrales llamadas filarias se encuentran en número de 20-30, y hasta más de 100, ovaladas a lanceoladas brutalmente estrechadas en el ápice nerviadas longitudinalmente, con el borde generalmente hispído o hirsuto, al igual que sus caras exteriores, raramente son glabras. El involucro es hemisférico o anchado y mide 15-40 mm y hasta más de 20 cm.

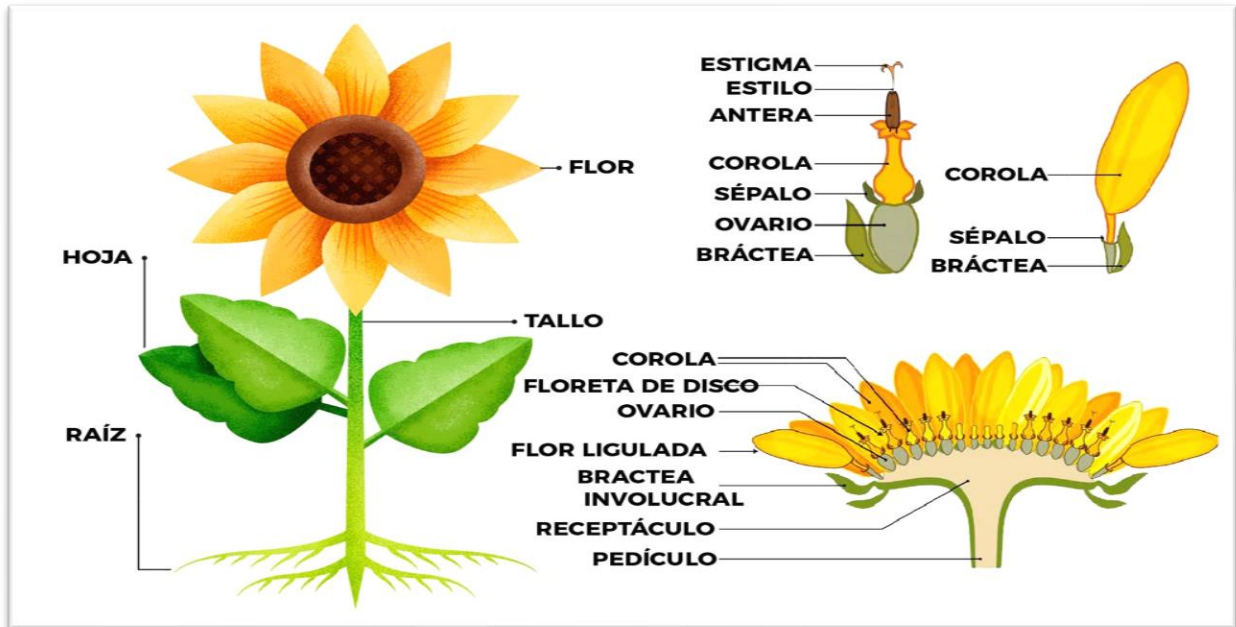


Figura 8. Morfología del girasol.

Fuente: Agro Krebs (<https://www.facebook.com/agrokrebs/potos/1292364127914703>).

Las lígulas, son de color amarillo a anaranjado en ocasiones rojas, miden aproximadamente 2.5-5 cm; los flósculos, , del mismo color con los estambres pardos-rojizos. Los frutos conocidos comúnmente como aquenios ovalados, estos son algo truncados en la base, miden de 3-15 mm de largo, estriados por finos surcos verticales, de color oscuro, generalmente casi negras, aunque pueden ser también blancas, rojas, de color miel, o con bandas longitudinales más claras. El vilano consiste en dos escamas lanceoladas de 2-3.5 mm acompañadas, o no, de hasta cuatro escamitas obtusas de 0.5-1 mm, todas tempranamente caedizas (Barros et al., 2004).

2.14.3 Usos

Los girasoles se pueden clasificar en: oleaginosos, de alto contenido de ácido oleico, de confitura o confitería, y ornamental. El girasol contiene alrededor de 58% de aceite en su fruto, el cual es utilizado comúnmente para cocinar, y también para producir biodiesel. El aceite de girasol virgen obtenido del prensado de las pipas, posee vitamina E. La harina conocida que queda después de la extracción del aceite, conocida como "orujo" y las hojas se utiliza como alimento para el ganado. Los tallos contienen una fibra que puede ser usada en la elaboración del papel (Barros et al., 2004).

2.14.4 Beneficios y Propiedades

Además de ser un producto popular para comer y usar, las semillas de girasol también son un alimento rico en vitaminas, proteínas, minerales y otros nutrientes. Por lo que ingerirlo puede tener muchos beneficios al organismo ayudando a mantener una salud óptima.

Los beneficios que más destacan de las semillas de girasol son los siguientes:

- Tiene un alto nivel de ácidos grasos insaturados.
- Disminuye el nivel de colesterol y reduce los triglicéridos.
- Contienen una gran cantidad de antioxidantes, su consumo ayuda previene el cáncer y mantiene el cuerpo estimulado para retardar el envejecimiento.
- Mejora el proceso digestivo, ya que contiene fibra, previniendo el estreñimiento y los problemas gastrointestinales.
- Es un depurativo natural en el cuerpo.
- Da saciedad.

En diversos estados del país se usa en diversas enfermedades como pleuresía, resfriado, catarro, para las llagas, heridas, trastornos nerviosos, dolor de cabeza y las reumas. Su alto contenido en grasas libres de colesterol, su gran cantidad de proteínas y el nivel de hidratos de carbono son los compuestos más importantes que tiene esta semilla. (Linares et al., 2009).

2.14.5 Morfología de las semillas de girasol

La semilla de girasol (Figura 6) está formada por un embrión el cual está cubierto por un tegumento seminal y por el pericarpio (o cáscara). El embrión representa el 75-80% del peso seco de la semilla, y en él se encuentran dos cotiledones en donde se almacenan las reservas de lípidos y proteína (que son utilizadas durante la germinación de la semilla). Mientras que el pericarpio representa el 20-25% del peso seco de la semilla, y es principalmente de naturaleza lignocelulósica (González-Pérez, 2003). El tamaño depende de la variedad y de las condiciones de cultivo. El contenido en grasa de las semillas depende en gran medida del grosor del pericarpio, que suele ser una característica genética, correspondiendo a pericarpios muy finos un alto contenido en grasa.

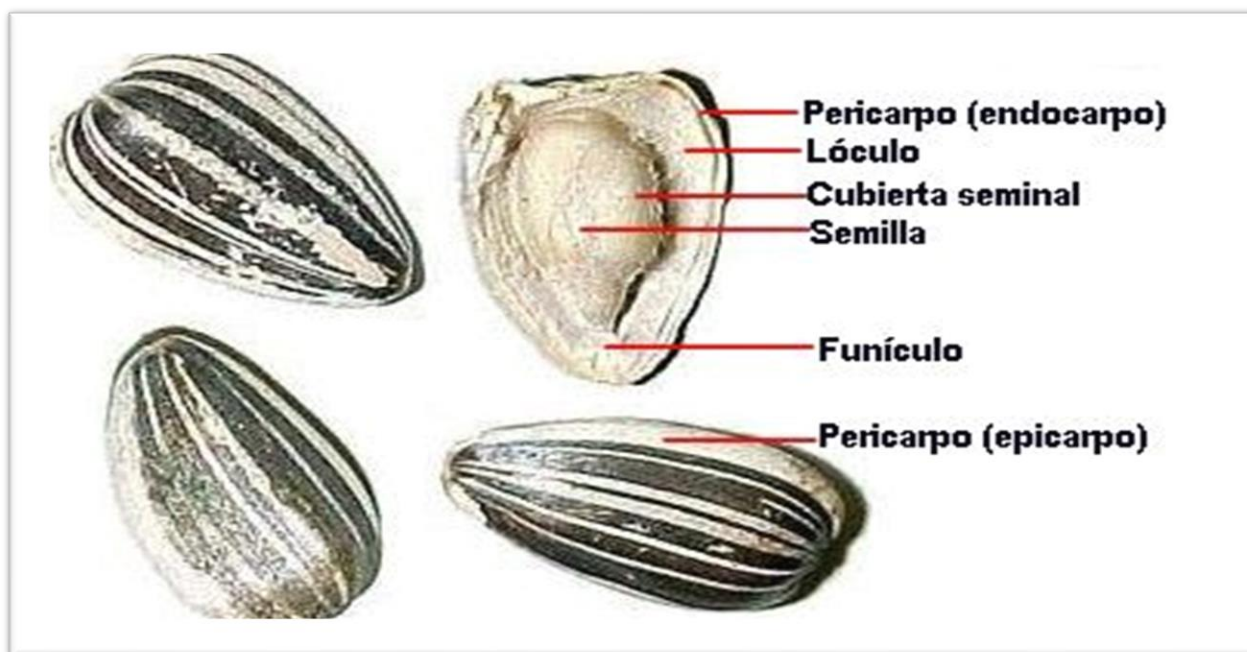


Figura 9. Partes de la semilla de girasol. **Fuente:** (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. & Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, 2016).

2.14.6 Producción de semilla de girasol (mundial y nacional)

2.14.6.1 Panorama Mundial

Los principales países productores de girasol son, de acuerdo con su orden de importancia: Rusia, Ucrania, Argentina, India, China, Rumania y EU. En el último mes de abril 2022, el



Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) proyectó que la producción mundial de girasol 2021/2022 puede alcanzar los 57.31 millones de toneladas, un poco más de 0.12 millones de toneladas que la proyección del mes pasado. En el 2021 se produjeron 49.27 millones de toneladas de girasol. Se estimaron para este año 57.31 millones de toneladas lo cual puede significar un incremento de 8.04 millones de toneladas o 16.33% en la producción de girasol alrededor del mundo.

2.14.6.2 Importancia económica

A nivel mundial en 2019, según datos de la FAO, con una producción mundial del 27.43% Rusia fue el principal productor de semillas de girasol, seguido de Ucrania con 27.20%. Estos dos países concentraron el 54.63% de la producción. El tercer país productor, Argentina, tuvo una producción de 6.82% muy bajo en comparación de los primero dos países. Los dos países que completan el top 5 de países productores son Rumania y China, con 6.37 y 4.32% respectivamente. México se ubicó como el productor 53° a nivel mundial al cierre del 2019 con una producción de 4,913 toneladas de semilla, lo cual representa el 0.009% de la producción mundial, obtenida 2,779 hectáreas sembradas. Los principales estados productores de semilla de girasol en México para 2019 fueron Guanajuato (33.24%), Jalisco (28.24%), Sonora (15.60%), Tamaulipas (8.67%) y el Edo. de México (7.53%); sin embargo, el cultivo se tiene reportado para 12 estados de la República Mexicana, representando un valor de producción de \$34,905,890.00 pesos.

La composición de las semillas varía según la variedad del girasol. En la tabla 5 se muestra la composición química porcentual promedio de las semillas de girasol enteras, sin cascara y de la harina resultante de la extracción de aceite. Se puede observar que, como era de esperar, las semillas de girasol enteras como las descascaradas son ricas en componentes lipídicos (principalmente triglicéridos neutros, fosfolípidos, glicolípidos y ceras). También poseen importantes contenidos de proteínas y carbohidratos. Sin embargo, la cascara contiene principalmente fibra y compuestos fenólicos (Pometa et al., 1971). En la Figura 7 se muestra un diagrama simple del proceso industrial de extracción de aceite de semillas de girasol. Se puede observar allí que, el descascarado mecánico de las semillas es parcial, justificando así la presencia de alto niveles de fibras y de componentes fenólicos en el subproducto resultante.

Esta harina residual tiene altos porcentajes de proteínas e hidratos de carbono. En él, las proteínas son los componentes que poseen mayor valor agregado, siendo de interés su recuperación y su empleo en diversas aplicaciones. Sin embargo, las propiedades de estas macromoléculas, como la solubilidad, pueden ser afectadas por las condiciones del proceso (temperatura, presión, solventes orgánicos, etc.) y por la presencia de compuestos fenólicos (González-Pérez et al., 2005). Por lo tanto, es necesario conocer algunas características de las proteínas de girasol y de los compuestos fenólicos presentes.

Tabla 3. Composición química porcentual promedio de la semilla de girasol, semilla descascarada y harina residual resultante de la extracción de aceite.

Componente	Semilla completa	Semilla descascarada	Harina residual
Lípidos	34 – 55	47 – 65	0.8 – 1.9
Proteínas	10 – 27	20 – 40	25 – 35
Carbohidratos	18 – 26	4 – 10	8 – 12
Fibra	22 – 24	8 – 12	15 – 29
Fenoles	1 – 4.5	0.3 – 3	1.5 – 5.8
Minerales	2 – 4	3 – 4	5 - 7

Fuente: (Salgado, 2009)

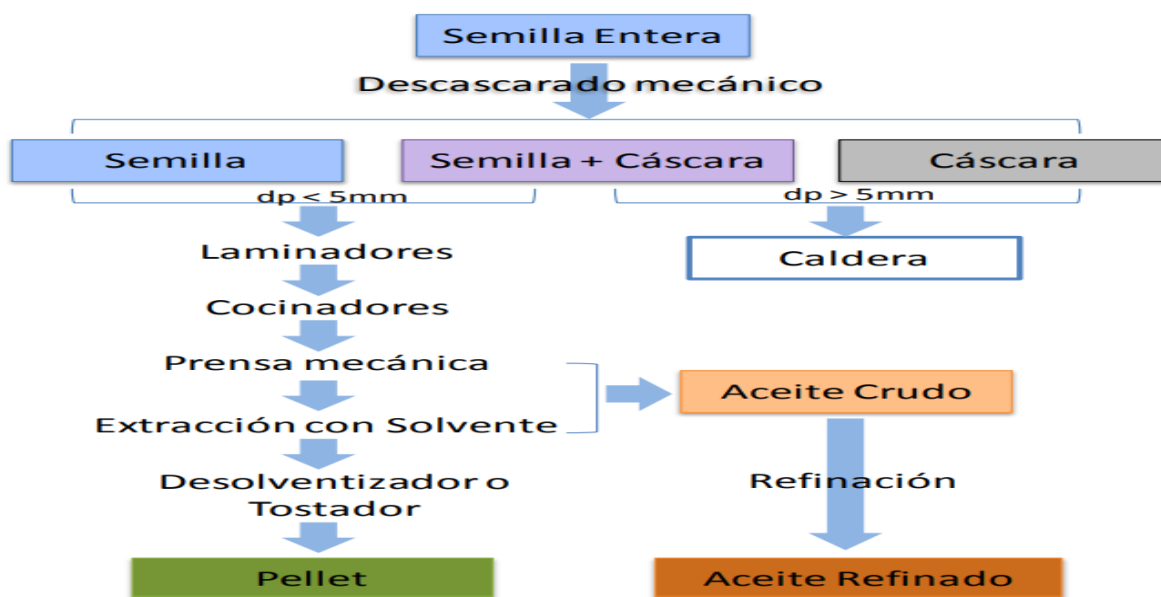


Figura 7. Esquema simplificado de la industrialización de las semillas de girasol (Salgado, 2009).

2.14.7 Proteínas de girasol

Según Osborne (1924) Las proteínas de reserva de semillas se clasifican normalmente en base a su solubilidad en: albúminas (solubles en agua), globulinas (insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas), prolaminas (solubles en alcoholes) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas). Siguiendo esta clasificación, las proteínas que destacan en las semillas de girasol son las globulinas y las albúminas, las cuales representan el 40-90 y 10-30% del total de las proteínas, respectivamente (Raymond et al., 1995). Sin embargo, algunos autores (Sabir et al., 1973; González-Pérez et al., 2008) han descrito la presencia de pequeñas cantidades de glutelinas y prolaminas.

El polimorfismo es una de las características de las proteínas de reserva de semillas. No obstante, en el caso de girasol, el grado de polimorfismo ha sido poco estudiado, pero se sabe que al menos existirían dos familias génicas, habiéndose descrito tres familias en algunos genotipos. Este grado de polimorfismo se ha manifestado al analizar las proteínas extraídas de las semillas por electroforesis desnaturizantes en presencia de SDS y de un agente reductor, donde se observó los polipéptidos α en tamaños comprendidos entre 30-40 kDa y los polipéptidos β entre 21-27 kDa (González-Pérez et al., 2005). Por otra parte, la segunda fracción proteica mayoritaria presente en las semillas de girasol son las albúminas. Estas se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de proteínas de coeficiente de sedimentación 2S, el cual está formado por subunidades simples cuyos tamaños moleculares oscilan entre 10 y 19 kDa y que son ricas en metionina y cisteína. Las cadenas polipeptídicas simples es una característica distintiva respecto a albúminas de otras semillas. (Pantoja-Uceda et al., 2004).

Villanueva et al., (1999) produjeron un hidrolizado proteico extenso de girasol mediante hidrólisis secuencial con endo y exo proteasas, donde obtuvieron a partir de la harina desengrasada de girasol un aislado proteico de alta calidad, mediante extracción alcalina y precipitación isoeléctrica. Donde incrementó el contenido proteico desde un 31.2% en la harina desengrasada hasta un 97% en el aislado proteico. Sus porcentajes de fibra, azúcares solubles, polifenoles y lípidos residuales se redujeron en más del 90% en el aislado proteico respecto a la harina desengrasada. Ellos usaron el aislado proteico como material de partida para la producción de un hidrolizado enzimático proteico extenso. La hidrólisis la realizaron

en un reactor usando secuencialmente una endo-proteasa (Alcalasa) y una exo-proteasa (Flavourzima). Obteniendo un hidrolizado proteico, con un grado de hidrolisis del 50.7% el cual era blanco y no presentaba amargor.

También realizaron una composición de aminoácidos determinada con una hidrólisis ácida, mediante cromatografía líquida de alta resolución, donde obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4 Composición de aminoácidos (g/100 g de proteína) de la harina de girasol (DSM), concentrado de proteína (CP) y aislado de proteína (IP).

aminoácido	DSM	CP	IP
Asp + Asn	9.6	9.5	10.7
Glu + Gln	21.1	20.3	22.1
Ser	5.5	5.3	5.1
His	3.0	2.8	2.9
Gly	6.4	6	4.5
Thr	4.8	4.3	3.6
Arg	11.2	10.8	11.6
Ala	4.1	3.9	3.7
Pro	0.9	4.5	5.1
Tyr	3.1	3.1	3.2
Val	5.0	4.6	4.1
Met	2.3	2.7	2.9
Cys	2.3	2.3	2.0
Ile	4.6	4.2	3.9
Leu	7.1	7.1	6.9
Phe	4.8	4.7	5.2
Lis	4.2	3.9	2.6

Los resultados se expresan como porcentaje de materia seca de la muestra \pm SD de tres determinaciones.

III. ANTECEDENTES

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

Martínez, (2010). Desengrasó la harina de la semilla de girasol eliminando el ácido clorogénico antes de preparar el concentrado proteico por precipitación donde obtuvieron un rendimiento de extracción de 31.4% con un contenido de proteína de 86.5%. Para realizar los hidrolizados usaron combinaciones con dos enzimas de origen vegetal (hemisfericina, bromelaína) y una de origen animal (pepsina). Determinando las condiciones de hidrólisis adecuadas para cada enzima con el fin de obtener hidrolizados que estuvieran en un rango de entre un 70 a 80%. Eligieron enzimas vegetales con un tiempo de reacción de 90 min, [50 µg/mL] a pH 7.6 y T = 35 °C y para la enzima animal un tiempo de 90 min, [400µg/mL] a pH 2, y T = 35 °C. De todas las combinaciones enzimáticas que realizaron el mayor grado de hidrólisis fue obtenido con la combinación hemisfericina-bromelaína-pepsina, con un 80% de hidrólisis. Por electroforesis llevaron a cabo el seguimiento del hidrolizado donde comprobaron que no había proteínas sino péptidos de menor tamaño, y aminoácidos libres. El contenido de aminoácidos les disminuyó en comparación con la proteína sin hidrolizar, donde mencionan que esto pudiera ser debido a los tratamientos térmicos usados para detener las reacciones enzimáticas. El producto hidrolizado obtenido en esta investigación presentó una digestibilidad del 90%.

Maldonado et al. (2017). Ellos evaluaron la actividad hipolipemiente e hipocolesterolémica del extracto etanólico de hoja de *Mangifera indica L.* en un modelo de rata ovariectomizada. Utilizando el Kit-SPINREACT (Colesterol-LQ) para determinar el parámetro de colesterol total, mientras que para determinar los niveles de glucosa utilizaron el método de la glucosa oxidasa empleando un equipo Accutrend® de Roche. Los resultados mostraron que la depleción estrogénica mediante ovariectomía incrementa los niveles de glucosa y colesterol total en ratas adultas jóvenes. Por otro lado, se demostraron que la administración crónica del extracto de *Mangifera indica L.* a una concentración de 15 mg/mL vía oral, disminuye

significativamente los niveles alterados de glucosa y colesterol en este modelo animal de menopausia inducida.

Kongo et al. (2011), Evaluaron la actividad anticolesterolémica *in vitro* en hidrolizado proteínico de maíz obtenidos por hidrólisis enzimática con Flavourzima® para la producción de hidrolizados con actividad hipocolesterolémica, 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 hipocolesterolémica mediante dos métodos, 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 hipocolesterolémica 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.

Domínguez, (2019). Estudió los hidrolizados proteicos a partir de semillas de quelite blanco (*A. hybridus*) “SQB” y amaranto (*A. hypochondriacus*) “SA” los cuales se obtuvieron empleando enzimas comerciales (Pepsina y Alcalasa), evaluó su efecto sobre la solubilidad micelar de colesterol a diferentes concentraciones (10, 5 y 2.5 mg/mL). Obteniendo valores en el concentrado proteico SQB con un 19.81% de inhibición micelar de colesterol al emplear una concentración de 10 mg/mL y 10.81% de inhibición a una concentración de 2.5 mg/mL. Mientras que, el concentrado de la SA tuvo los menores porcentajes ya que a una concentración de 10 mg/mL tuvo un 9.17% y a 2.5 mg/mL 4.40% de inhibición. Donde mencionan que esta variación podría atribuirse a la presencia 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.

Temitola et al., (2019) El objetivo de este trabajo fue producir péptidos derivados de la proteína del guisante amarillo como inhibidores de las actividades de la α -amilasa, la α -glucosidasa y la lipasa pancreática. Se hidrolizó un concentrado de proteína de guisante con

Alcalasa[®], quimotripsina, pepsina o tripsina y los hidrolizados se separaron en diferentes fracciones (<1, 1–3, 3–5, 5–10 kDa) mediante ultrafiltración de membrana. El análisis de la secuencia de péptidos mostró que el hidrolizado de Alcalasa[®] tenía niveles más altos de dipéptidos y tripéptidos en comparación con los hidrolizados de quimotripsina, pepsina y tripsina. Las fracciones peptídicas inhibieron las actividades de α -amilasa y α -glucosidasa a niveles similares a los de los hidrolizados no fraccionados. Los péptidos fueron más activos contra la α -amilasa que contra la α -glucosidasa. Por el contrario, los péptidos fraccionados tenían una capacidad reducida ($IC_{50} >4.2 \text{ mg mL}^{-1}$) en comparación con el hidrolizado no fraccionado ($IC_{50} <4.2 \text{ mg mL}^{-1}$) para inhibir la actividad de la lipasa. Los estudios de cinética enzimática revelaron que los péptidos reducían la actividad de la amilasa a través de la inhibición competitiva. Sin embargo, la inhibición de la actividad de la α -glucosidasa no fue competitiva.

Valencia et al., (2019). Reportaron un estudio donde examinaron el potencial antidiabético de los péptidos naturales y las fracciones hidrolizadas de frijoles fáciles de cocinar (ETC) y difíciles de cocinar (HTC). Todas las fracciones se probaron con respecto a sus actividades inhibitorias *in vitro* contra la α -amilasa y la α -glucosidasa, así como los efectos anti hiperglucémicos e hipoglucémicos *in vivo*. Los resultados evidenciaron que las fracciones peptídicas con el peso molecular más bajo (<3 kDa) tuvieron las actividades inhibitorias más altas, y se observó una inhibición de la α -amilasa de 16.9 a 89.1% y una inhibición de la α -glucosidasa de 34.4 a 89.2%. En cuanto a la actividad anti hiperglucemiante, la fracción ETCNO3–10 mostró un mejor desempeño que el control positivo (acarbose). Además, los resultados de la actividad hipoglucemiante evidenciaron que las fracciones peptídicas probadas fueron capaces de disminuir los niveles de glucosa a la misma extensión de la glibenclamida, manteniendo un nivel de glucosa basal constante sin un pico de hiperglucemia posprandial. Finalmente, es posible sugerir que los péptidos naturales y las fracciones hidrolizadas obtenidas de los frijoles comunes ETC y HTC podrían usarse en la producción de alimentos funcionales o formulaciones farmacéuticas para prevenir la diabetes.

Estos estudios, son algunos de los cuales demuestran el potencial de los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas, a partir de materias primas alimenticias, como

componentes bioactivos. Mostrando que las semillas de girasol poseen diversas actividades biológicas, entre las cuales resaltan la anticolesterolemia e hipoglucemiante. Con base en esto, se sugiere el estudio de dichas matrices alimentarias, como coadyuvantes en el tratamiento de algunas enfermedades tales como hipercolesterolemia y diabetes, así como su posible uso en la formulación de alimentos funcionales.

IV. JUSTIFICACION

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de defunción en el mundo, se cobran alrededor de 17.9 millones de vidas cada año. Cuatro de cada cinco defunciones por estas enfermedades se deben a cardiopatías coronarias y accidentes cerebrovasculares, y una tercera parte de esas defunciones ocurren prematuramente en personas menores de 70 años. Los factores de riesgo conductuales más son la dieta malsana, la falta de ejercicio, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Estos efectos se pueden manifestar en las personas en forma de hipertensión, hiperglucemia e hiperlipidemia, además de sobrepeso y obesidad. Entre los principales precursores de las enfermedades del tipo cardiovascular se encuentra el 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. Por su parte La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que se desarrolla cuando el organismo no usa o produce insulina de manera eficiente. El concepto clásico de “nutrición adecuada” aporta los nutrientes suficientes en las dietas (hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas y minerales) estos satisfacen las necesidades básicas, sin embargo este término tiende a ser sustituido por el de “nutrición óptima”, que incluye, la potencialidad de los alimentos para promocionar la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades.

Aunque actualmente se cuenta con tratamiento farmacológico tanto para tratar la diabetes, 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. Las proteínas son conocidas por presentar una amplia gama de propiedades nutricionales, funcionales y biológicas. Nutricionalmente, son fuente de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento. Funcionalmente, contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de alimentos ricos en proteínas. Además, muchas proteínas de la dieta poseen propiedades biológicas específicas que hacen de estos componentes posibles ingredientes de alimentos funcionales o promotores de salud.

Muchas de estas propiedades se atribuyen a los péptidos fisiológicamente activos encriptados en las moléculas de dichas proteínas.

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 algunas oleaginosas como la semilla de girasol la 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 hipoglucemiantes y anticolesterolémica, por lo que en este trabajo se propone utilizar la variedad *Helianthus annuus* como fuente de proteínas para ser sometidas a hidrólisis enzimática empleando las enzimas comerciales Alcalasa[®] y Flavourzima[®], esto con el fin de obtener fracciones peptídicas que contengan péptidos bioactivos que ayuden en el tratamiento de dichas enfermedades.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad anticolesterolémica y antidiabética (*in vitro*) de fracciones peptídicas de la harina desengrasada de semillas de girasol (*Helianthus annuus*).

5.1 Objetivos Específicos:

- 1) Obtener harina desengrasada a partir de las semillas de girasol (*H. annuus*) mediante el uso de solvente orgánico-ultrasonido y caracterizarla químicamente.
- 2) Obtener el concentrado proteico a partir de la harina desengrasada de semillas de girasol (*H. annuus*).
- 3) Evaluar los parámetros de color de la harina sin tratamiento, harina desengrasada y concentrado proteico de semillas de girasol (*H. annuus*) como parámetros de calidad.
- 4) Analizar las cinéticas de hidrólisis enzimática individual del concentrado proteico de la harina desengrasada de la semilla de girasol (*H. annuus*).
- 5) Evaluar la actividad anticolesterolémica y antidiabética del hidrolizado proteico de las semillas de girasol (*H. annuus*) en un sistema *in vitro*.
- 6) Obtener las fracciones peptídicas por ultrafiltración a partir de los hidrolizados proteicos que presenten mayor actividad biológica.
- 7) Evaluar la actividad anticolesterolémica y antidiabética *in vitro* de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

Las semillas girasol fueron adquiridas en el Mercado Central de Tuxtepec, Oaxaca, México, las cuales fueron cosechadas en el municipio El Salto, Jalisco, México, y fueron procesados en el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos del TecNM campus Tuxtepec. Todos los reactivos empleados fueron grado alimenticio o superior.

6.2 Obtención de la harina

Las semillas de girasol se colocaron en charolas de aluminio, en donde fueron secadas en un secador de charolas (Estufa Binder mod. ED 115, Alemania) a una temperatura de 55 °C durante 4 h. Posterior al secado se les realizó una molienda utilizando un molino marca Krups® (Mod. GX4100, U.S.A), se obtuvo una harina, la cual fue pasada en un tamiz de No. 80 (0.177 mm). Una vez conseguida la harina se almacenó en botes de plástico a una temperatura de 4 °C para su posterior utilización (Torruco, 2009).

6.3 Desengrasado de la harina

La harina obtenida de las semillas de girasol fue sometida a ultra sonicación, para reducir el contenido de grasa de estas, para ello se utilizó un baño ultrasónico (Misonix 3000, Nez Highway, Farmingdale, NY 11735, U.S.A) en el cual se introdujeron frascos de cristal con tapas metálicas los cuales contenían 15 g de harina y 250 mL de éter petróleo. La harina fue sonicada durante 20 min a una temperatura de 50 °C a una frecuencia de 40 Hz, posteriormente fueron filtradas en papel Whatman No. 1 para recuperar las harinas ya desengrasadas (Domínguez, 2019).

6.4 Obtención del concentrado proteico

Se utilizó una modificación del método reportado por Torruco-Uco (2009). Se realizó una suspensión de harina en agua destilada en una relación 1:20 p/v (harina/agua), se ajustó el pH a 10 con una solución de NaOH 1 N y se dejó en agitación por 1 h con un agitador

mecánico (Caframo RZR-1, Heidolph Instruments GmbH & KG, Alemania) a 400 rpm. Posteriormente la suspensión se pasó por dos tamices malla no. 80 y 100 (0.177 y 0.149 mm) secuencialmente se separó el bagazo de la mezcla de almidón y proteína el cual se lavó tres veces con agua destilada y el filtrado se colectó en un recipiente de plástico y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente (35-40 °C). El residuo (bagazo) se secó en charolas de aluminio a 60 °C en una estufa de convección (Binder mod. ED 115, Alemania). Transcurrido el tiempo de reposo (30 min) de la suspensión se decantó el sobrenadante, para obtener así el sedimento rico en almidón, el cual se secó de igual forma que el bagazo. Al sobrenadante se le ajustó el pH a su punto isoeléctrico (pI) 4.6 con HCl 1 N, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 10 °C para recuperar el precipitado, el cual se secó a 50 °C durante 24 h en una estufa de convección (Binder mod. ED 115, Alemania).

6.5 Análisis químico proximal

Se realizó un análisis químico proximal a la harina y concentrado proteico de las semillas de girasol (*Helianthus annuus*), y determinado por triplicado según los métodos de la AOAC (2012): humedad (925.09), cenizas (923.03), proteínas (960.59), grasas (920.39) y fibra cruda (962.09) y el contenido de los carbohidratos totales por diferencia.

6.6 Determinación del color

El color se determinó mediante el método de (Wani et al. 2013) empleando un colorímetro de laboratorio Hunter Lab (Ultra Scan-VIS, Model USVIS1347, Inc., Reston, Virginia, USA). Se obtuvieron los valores L^* (Luminosidad), a^* (cromaticidad rojo-verde) y b^* (cromaticidad amarilla/azul), a partir de los cuales se calcularon los valores de Cromaticidad (C^*) (Ecuación 6) y ángulo Hue (h°) (Ecuación 7). La carta de color y el número del color se obtuvieron con la ayuda del motor de búsqueda de colores EasyRGB.

Ecuación 6

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Ecuación 7

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

6.7 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 Flavourzima[®] 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 Flavourzima[®] el pH se ajustó a 7 con HCl 1 N y se incubó por 120 min a una temperatura de 50 °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 120 min a una temperatura de 55 °C. La hidrólisis se realizó en un vaso de precipitado de 1000 mL, el cual se agitó 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 20, 40, 60, 80, 100 y 120 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 3000 rpm durante 25 min a 4 °C, y el sobrenadante se filtró y se guardó en congelación a -10 °C hasta su posterior utilización.

6.8 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 8:

Ecuación 8

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



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

6.9 Evaluación *in vitro* de las actividades biológicas de los hidrolizados proteicos de semillas de girasol (*Helianthus annuus*).

Se evaluó “*in vitro*” las actividades biológicas anticolesterolemica por la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol y la capacidad hipoglucemiante en los hidrolizados a los diferentes tiempos de hidrólisis y se compararon con los concentrados proteicos.

6.10 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 líquido. 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 sometió a sonicación dos veces por 1 min respectivamente a temperatura ambiente usando un baño ultrasónico (Misonix 3000, Nez Highway, Farmingdale, NY 11735, U.S.A)) Posteriormente la solución micelar fue incubada durante una noche a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió las muestras en concentraciones de 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 mg a cada tubo que con 1 mL de solución micelar. La mezcla se incubo a 37 °C durante 24 h y se centrifugo a 1400 rpm durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y las concentraciones de colesterol se determinó usando un Kit de Colesterol Oxidasa (Elite Group, U. S. A), midiendo la absorbancia a 505 nm con un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis, USA). 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 9 y 10.

Ecuación 9

$$\text{Colesterol} = \frac{OD_s}{OD_c} \times [\text{calibrador}]$$

Donde:

Colesterol: concentración de colesterol en mmol

OD_c: es la absorbancia del calibrador

OD_s: es la Absorbancia de la muestra

[Calibrador]: concentración del calibrador en mmol

Ecuación 10

$$\text{Capacidad de inhibición (\%)} = \frac{C_o - C_s}{C_o} \times 100$$

Donde:

C_o: es la concentración de colesterol de las micelas originales

C_s: es la concentración de colesterol de micelas con hidrolizados

6.11 Inhibición “in vitro” de α -amilasa y α -glucosidasa in vitro

La eficiencia de las fracciones de péptidos y proteínas de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*) para actuar como inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa se evaluaron siguiendo la metodología descrita por (Valencia-Mejía et al. 2015).

6.11.1 Para el ensayo inhibidor de α -amilasa

Se agregaron 500 μL de la muestra (que contiene 10 mg de proteína mL^{-1}) o acarbosa (10 mg mL^{-1}) a 500 μL de α -amilasa de un páncreas porcino (10 U/ mL , en 50 mmol L^{-1} tampón de fosfato de sodio, pH 6.9) y se incubó a 25 °C durante 10 min. Luego, se agregan 500 μL de una solución de almidón al 1% a la mezcla y el sistema se incubó durante 10 min a 25 °C. El contenido de azúcares reductores liberados se determinó según Miller (1959), utilizando ácido dinitrosalicílico.

6.11.2 La inhibición de la α -glucosidasa

Se evaluó mezclando 60 μL de 2 U/mL de solución de α -glucosidasa con 60 μL de la muestra (que contiene 10 mg de proteína mL^{-1}) o acarbosa (10 mg mL^{-1}) y se incubó a 37 °C durante 5 min. Luego, se agregan 60 μL de una solución de 0.1 mol de L^{-1} p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (ρ -NPG) y la mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C. Después de eso, también se agregaron al sistema 150 μL de una solución de carbonato de sodio de 1.0 mol L^{-1} y 120 μL de solución tampón de fosfato de 0.5 mol L^{-1} , pH 6.8. La absorbancia de las muestras se midió en espectrofotómetro a 405 nm.

Los resultados se expresaron como porcentajes y se calcularon de acuerdo con la ecuación 11:

Ecuación 11

$$\text{inhibición enzimática (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100$$

Donde: A_0 es la absorbancia de la enzima (α -amilasa o α -glucosidasa) en ausencia de inhibidores y A_i es la absorbancia de la enzima en presencia de inhibidores (acarbosa o fracciones de proteína/péptido).

6.12 Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración

Los hidrolizados obtenidos que presentaron mayor actividad inhibitoria de la solubilidad micelar del colesterol y de la α -amilasa y α -glucosidasa fueron sometidos a un fraccionamiento por ultrafiltración (UF) de acuerdo con la metodología indicada por Torruco (2009). Los hidrolizados proteínicos fueron centrifugados a 3000 rpm por 20 min usando una centrifuga (Hettich zentrifugen, Rotina 380 R, Alemania). El sobrenadante con las fracciones solubles fue utilizado para iniciar la separación por UF. Se utilizó una unidad de UF el cual está equipada con un agitador magnético para evitar el sedimento de la muestra sobre las membranas. Se utilizaron tres membranas con diferentes cortes de peso molecular (MWCO): 5000 (5 kDa); 3000 (3 kDa) y 1000 (kDa). Obteniéndose con ello cuatro fracciones peptídicas

(Figura 8) y estas se denominaron como: A (peso molecular >5 kDa), B (peso molecular entre 3 y 5 kDa), C (peso molecular entre 1 y 3 kDa) y D (peso molecular <1 kDa).

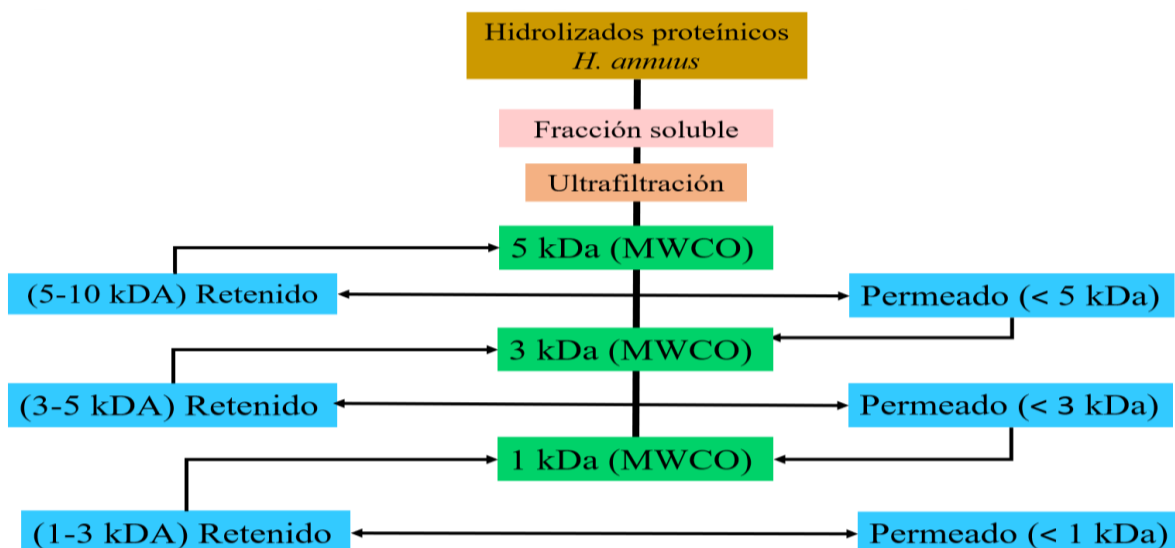


Figura 8. Separación de las fracciones peptídicas bioactivas de *H. annuus* por ultrafiltración con tres membranas de diferentes cortes moleculares (Torruco, 2009).

La actividad inhibitoria del colesterol y antidiabética *in vitro* se determinó a las cuatro fracciones peptídicas obtenidas de cada tratamiento enzimático. Utilizando la metodología antes mencionada.

6.13 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía y se determinaron las diferencias entre las medias con una prueba de diferencia mínima significativa (LSD), con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa estadístico Stat graphics Plus versión Centurión 18 (Stat Soft, Inc. 1984-2008, USA).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis Químico proximal

La caracterización química proximal de las harinas y concentrado proteico de la semilla de girasol se muestra en la Tabla 5, las cuales mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sí. Considerando que la materia prima es una oleaginosa, existen interacciones proteína-lípido; en donde la interacción entre las cadenas alifáticas apolares del lípido y las regiones apolares de las proteínas impide la desnaturalización térmica de la proteína, debido a la formación de zonas de alta capacidad calorífica y a la ausencia de agua tal como lo menciona (Sánchez-Vioque et al. 1999). Aunado a esto y al proceso para la obtención del concentrado proteico en donde se sometió la proteína a ambientes alcalinos provocando una saponificación de las grasas creando así más interacciones proteína-lípido aumentando la humedad; esto también podría ser atribuido al proceso de secado por el que se llevó a cabo el concentrado proteico, ya que se manejó una temperatura de 50 °C para no dañar la estructura de la proteína la cual proporciona las propiedades de estas.

Los datos obtenidos fueron menores a los reportados por (Rahma & Narasinga, 1979), ya que en la harina de semilla de girasol encontraron un contenido de humedad de 7.7%. El contenido de humedad del concentrado hallado en el presente estudio fue mayor que el contenido de humedad del aislado proteico de semilla de girasol (*Helianthus annuus*) reportado por (Vioque et al. 2001) con 4.1% y fue menor que el concentrado proteico de garbanzo (*Cicer arietinum*) donde obtuvieron un contenido de humedad de 5.5%. El menor contenido de humedad hallado en el concentrado proteico representa una ventaja en términos de vida de anaquel y preservación de la calidad del concentrado proteico. (Lovatto 2015) mencionó que el contenido de humedad se relaciona con la edad de la semilla y el manejo postcosecha, así como con los métodos y condiciones de procesamiento. Las diferencias halladas entre los valores de humedad comparado con otras oleaginosas, puede ser atribuido a la diferencia microestructural entre los materiales evaluados, el cual puede darle mayor o menor capacidad para ligar moléculas de agua (Betancur et al., 2009).

Tabla 5. Composición química proximal de la harina normal, harina desengrasada y concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*).

Componentes (%)	Harina normal	Harina desengrasada	Concentrado proteico
*Humedad	(2.24 ± 0.03) ^a	(2.31 ± 0.03) ^a	(4.26 ± 0.44) ^b
Proteína cruda	23.38 ± 2.67 ^a	47.04 ± 0.41 ^b	64.88 ± 3.29 ^c
Grasa cruda	51.55 ± 1.20 ^c	31.02 ± 2.62 ^b	3.67 ± 1.24 ^a
Fibra cruda	2.69 ± 0.76 ^a	2.54 ± 0.45 ^a	4.39 ± 1.47 ^b
Cenizas	12.79 ± 1.52 ^c	7.48 ± 0.09 ^b	4.20 ± 1.47 ^a
ELN	9.59 ± 0.51 ^a	11.92 ± 0.63 ^b	22.86 ± 0.51 ^c

Los valores presentados son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar y expresados en base seca, con *excepción de la humedad. ^{a-c} Letras superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$). ELN: extracto libre de nitrógeno.

En lo que respecta a los valores de proteína la harina normal y la harina desengrasada se muestra una diferencia significativa lo cual puede ser atribuido al proceso de desengrasado en baño ultrasónico al que se sometió la harina, disminuyendo un 77% el contenido de lípidos de la harina normal al concentrado proteico. El contenido proteico hallado en la harina fue menor a lo obtenido por (Lovatto, 2015) para la harina de la semilla de girasol con 54.58%, por otro lado, (González-Pérez, 2003) reportaron un contenido de proteína del 51.36% en la harina de la semilla de girasol. Por su parte, (Vioque et al. 2001) reportaron un contenido de proteína en el aislado proteico de garbanzo (*Cicer arietinum*) de 83.4%. Estas diferencias del contenido proteico encontrado en la presente investigación pueden deberse al tipo de suelo donde fueron cosechadas las semillas, la altitud a la cual se realizó la siembra, temperatura del medio ambiente, tiempo, nutrientes en el suelo, fertilizantes y el método de sembrado (Bruner et al., 2011).

En lo que respecta al contenido de grasa cruda, la harina normal sin desengrasar, la harina desengrasada y el concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*) presentaron valores significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$) tuvieron un valor de 51.55 y 31.02% respectivamente, mientras que, la disminución del contenido de grasa cruda en el concentrado proteico se puede atribuir al proceso de desengrasado por baño ultrasónico

al cual fue sometido. Este contenido de grasa cruda encontrado en la harina normal de la semilla de girasol (*H. annuus*) fue semejante a lo obtenido por (Rahman & Narasinga 1979) en harina de girasol quienes reportaron un contenido de grasa cruda de 51.1%. Por otro lado, (Rossel-Kipping et al., 2018) reportaron diferentes valores de grasa en las semillas de calabaza (*Cucúrbita máxima*) donde la semilla de calabaza entera tuvo un valor de 28.32% y en la pepita de calabaza obtuvieron un valor de 29.65%.




7.2 Parámetros de color

Los colorantes naturales alimentarios, reciben gran atención ya que además que atribuyen color al producto, pueden proveer ciertos beneficios sobre la salud (Gengatharan et al., 2015) debido a su efecto como antioxidantes y diferentes propiedades funcionales (Rodríguez, 2016). Además, estos son más seguros y brindan ciertas características organolépticas. El color de los pigmentos puede ser un indicador del tipo de compuesto presente en el alimento; por ejemplo, verdes de las clorofilas, amarillo de los carotenoides, azul-morado de las antocianinas y rojo de las Betalaínas (Rodríguez, 2016). El color de la harina normal sin desengrasar, harina desengrasada y el concentrado proteico se pueden observar en la Figura 9, mientras que los parámetros de color se muestran en la Tabla 5. Se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Siendo la harina desengrasada la que mostró mayor claridad, esto puede ser debido a que se removió el contenido de grasa cuando se utilizó el US usando como solvente el hexano para desengrasar la muestra, el cual logró una remoción efectiva de grasa. (Petruccelli & Añón, 2009) mencionan que el contenido de grasa en la muestra pudo causar un oscurecimiento en la misma, previo a la extracción de proteínas, como se puede observar en el resultado de luminosidad (77.31) obtenido en el concentrado proteico. De igual forma el uso de NaOH durante la extracción de proteínas pudo producir la oxidación de los compuestos fenólicos, las cuales pueden condensar o reaccionar con los grupos catiónicos de las proteínas.



Figura 9. a) Harina normal sin desengrasar; b) harina desengrasada y c) concentrado proteico de la semilla de girasol.

Tabla 6. Parámetros de color de la harina normal, harina desengrasada y concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*).

Parámetros de color	Harina normal	Harina desengrasada	Concentrado proteico
Luminosidad (L^*)	61.84 ± 0.01 ^a	79.34 ± 0.10 ^c	77.31 ± 1.14 ^b
Enrojecimiento (a^*)	2.65 ± 0.22 ^c	0.59 ± 0.05 ^b	-2.35 ± 0.07 ^a
Amarillamiento (b^*)	15.17 ± 0.77 ^c	12.48 ± 0.16 ^b	6.86 ± 0.05 ^a
Diferencia total de color (ΔE)	40.64 ± 0.26 ^c	23.60 ± 0.02 ^b	22.57 ± 1.09 ^a
Pureza o saturación (C^*)	15.40 ± 0.17 ^c	13.89 ± 0.09 ^b	7.25 ± 0.02 ^a
Tono o matiz (h°)	84.47 ± 0.62 ^b	86.08 ± 0.37 ^c	71.03 ± 0.71 ^a
Código de color	#a4927a	#cfc3ad	#bfbfb1
Paleta de color			

Los valores presentados son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. ^{a-c} Letras superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Domínguez (2019) y Rodríguez (2021) reportaron para la harina de la semilla de quelite blanco y frijol costeño un valor de $L^* = 61.65$ y 60.61% y para el concentrado proteico valores de 59.88 y 77.26% respectivamente, inferiores a los observados en esta investigación. Atribuyendo esta variación de luminosidad en las muestras al contenido de carotenoides presente en la misma y a su degradación, mencionando que las matrices alimentarias ricas en β -carotenos y la degradación de éstos pueden ayudar a aumentar los valores de luminosidad. También se puede mencionar que este cambio de color puede ser atribuido a la eliminación del contenido de almidón que fue removido durante la obtención del concentrado proteínico,

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

En lo que respecta a los valores de a^* el concentrado proteico presento una coloración verde, esta tendencia pudiera deberse a la presencia de algunos pigmentos como la clorofila. Los valores de b^* la harina sin desengrasar presentó tendencia a la coloración amarilla pudiendo atribuirlo a la aún presencia de lípidos y de algunos compuestos fenólicos en las muestras. En cuanto a Cromo (C^*) se aprecia una mayor pureza de color en la harina normal sin desengrasar (Tabla 6). Los valores de Hue (h°) correspondieron en el primer cuadrante indicando tonalidades amarillas con tendencia al verde para la muestra del concentrado proteico viéndose influenciados por los parámetros de a^* y b^* presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) tal como lo muestran la paleta de color de cada muestra (Tabla 6).

Armas (2017) reportó valores de a^* 4.07 y 1.26% en la harina de frijol de mayo y frijol pinto, mientras que en los concentrados proteicos de estas leguminosas obtuvo 4.03 y 3.06% respectivamente. Así mismo obtuvo valores de b^* 9.96 y 9.03% en las harinas del frijol de mayo y pinto, en los concentrados proteicos obtuvo para este parámetro con valores de 8.66 y 11.35%, respectivamente, los cuales son valores menores a los reportados en esta investigación, esto se puede atribuir a que la materia prima utilizada por este autor es una leguminosa y la que se evaluó en esta investigación es una oleaginosa, por lo tanto, ambas están compuestas por diferentes componentes, destacando la oleaginosa su alto contenido en ácidos grasos. Sin embargo, se menciona que (Adebowale et al., 2005), 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. Sin embargo, el sulfito de sodio ha sido prohibido en los productos alimenticios debido al riesgo que representa para la salud humana.

7.3 Hidrólisis del concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*)

La hidrólisis enzimática se realizó empleando dos enzimas Flavourzima® y Alcalasa® de manera individual, la cinética de dichos procesos se muestra en las Figura 10 respectivamente, indicando diferencia estadística ($p < 0.05$) entre las enzimas y entre los tiempos de reacción.

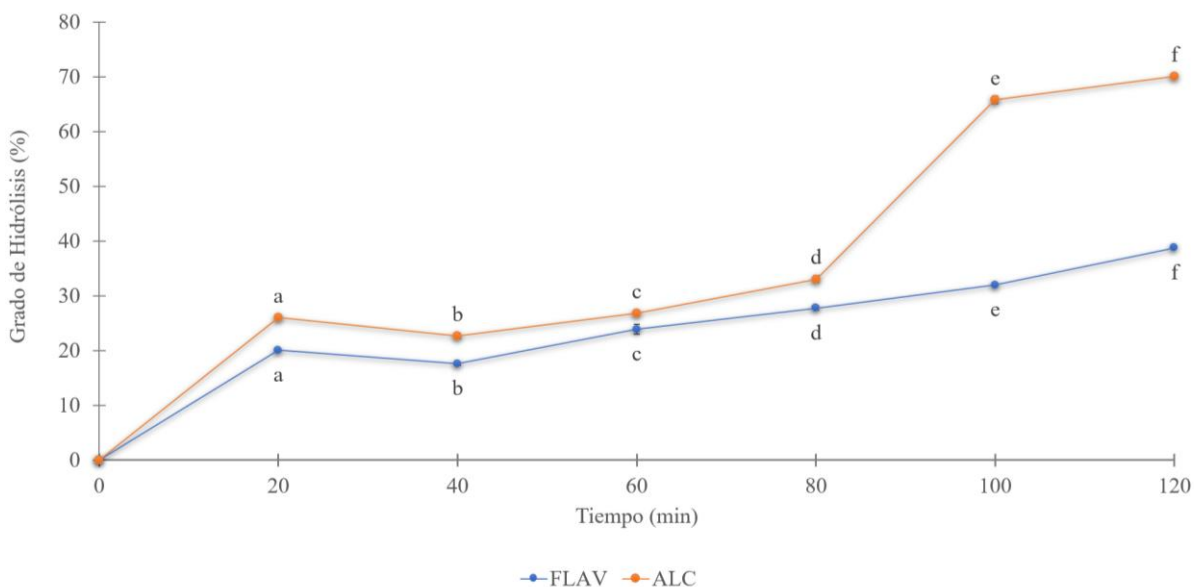


Figura 100. Hidrolisis enzimática del concentrado proteico de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*) con las enzimas Flavourzima® y Alcalasa®. ^{a-f} Letras diferentes en la misma enzima indica diferencias significativas al mismo tiempo de reacción ($p < 0.05$).

En el presente estudio, se obtuvieron valores de GH altos a partir de los 20 min de reacción, donde el concentrado proteico con la enzima Flavourzima® tuvo un menor GH que con la Alcalasa® (Figura 10). Así mismo se puede observar cómo desciende en el minuto 40, teniendo para Flavourzima® un GH = 17.59% y para Alcalasa® un GH = 22.69%, esto podría estar asociado a la inhibición del sustrato y en segundo orden, a la desactivación de la enzima con respecto a su concentración y dependiendo de la concentración del sustrato. Posteriormente se observa como ambas enzimas se recuperan y van aumentando el grado de hidrólisis conforme paso el tiempo, ya que a los 120 min de reacción se obtuvieron valores de 38.75 y 70.06% respectivamente para cada enzima. (Córdova, 2013) obtuvo un GH del

concentrado proteico del frijol pallar de 12.4% en un tiempo de hidrólisis total de 10 min en un tratamiento hidrolítico con pepsina. Por otro lado, (Ariza, 2014) obtuvo un GH en los concentrados proteicos del frijol negro plus de 22.59%, en el del frijol azufrado higuera 24.72% y en el del frijol pinto saltillo 22.49% a 120 min de reacción en un tratamiento hidrolítico con la enzima Alcalasa[®]. En estos casos los grados de hidrólisis no son mayores a los obtenidos en esta investigación, esto se puede atribuir a la materia prima y enzimas que ocupan los autores antes mencionados, ya que al ser leguminosas su composición química y estructura primaria de las proteínas es diferente que las oleaginosas. Respecto a la naturaleza de las enzimas empleadas, (Mosquera, 2014) señala que la especificidad de las proteasas afecta al tamaño, cantidad, composición de aminoácidos libres, tipo de péptidos y sus secuencias de aminoácidos, lo que a su vez influye en la actividad biológica de los hidrolizados. Por otro lado, se ha reportado que la enzima Alcalasa[®] (serin-endopeptidasa), de origen bacteriano, actúa como nucleófilo y escinde enlaces peptídicos con su átomo de oxígeno parcialmente negativo, rompiendo las proteínas principalmente en aminoácidos hidrofóbicos como: Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val y Met, por lo que es probable que este tipo de reacción haya sido generada durante la hidrólisis de las proteínas de la semilla de girasol (Ariza, 2014). Cabe mencionar que la Flavourzima[®], es un complejo de proteasa fúngica y peptidasa producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae*, contiene tanto actividades de endoproteasa como de exopeptidasa las cuales son enzimas proteolíticas que hidrolizan los enlaces peptídicos dentro de la cadena de la proteína; que irán a eliminar aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos (Rivero, 2021). Con esto esperaríamos que tal enzima pudiese presentar mayor grado de hidrólisis, sin embargo, su especificidad tiene afinidad por los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trip) mientras que la Alcalasa[®] tiene afinidad por aminoácidos hidrofóbicos los cuales se mencionaron anteriormente y en este caso la materia prima pudiera contener mayoritariamente estos aminoácidos.

Se logró obtener hidrolizados proteicos con GH >10%, indicando que se alcanzó una hidrólisis extensiva, este tipo de hidrolizados se utilizan en nutrición clínica y son una tendencia prometedora en el campo de los alimentos (Vioque et al., 2006).

7.4 Actividad Anticolesterolémica (inhibición de la solubilidad micelar) de los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas de la semilla de girasol (*H. annuus*) con las enzimas Alcalasa® y Flavourzima®

La capacidad inhibitoria de la solubilidad micelar se evaluó en los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas de las semillas de girasol. En las siguientes figuras se observan los porcentajes de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol de los hidrolizados proteicos obtenidos con las enzimas Alcalasa® y Flavourzima® a diferentes concentraciones (80, 60, 40 y 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$).

En la Figura 11 se presenta el hidrolizado individual con la enzima Alcalasa® obteniendo mayores porcentajes de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol con 60 y 100 min de reacción en concentración de 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ con 74.76 y 74.71% de inhibición. Se puede observar que a menor concentración obtenemos mayor inhibición del colesterol, esto se puede atribuir a que a mayor concentración de hidrolizado pudiera existir una saturación en el medio disminuyendo así la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol (León-Espinoza et al., 2015).

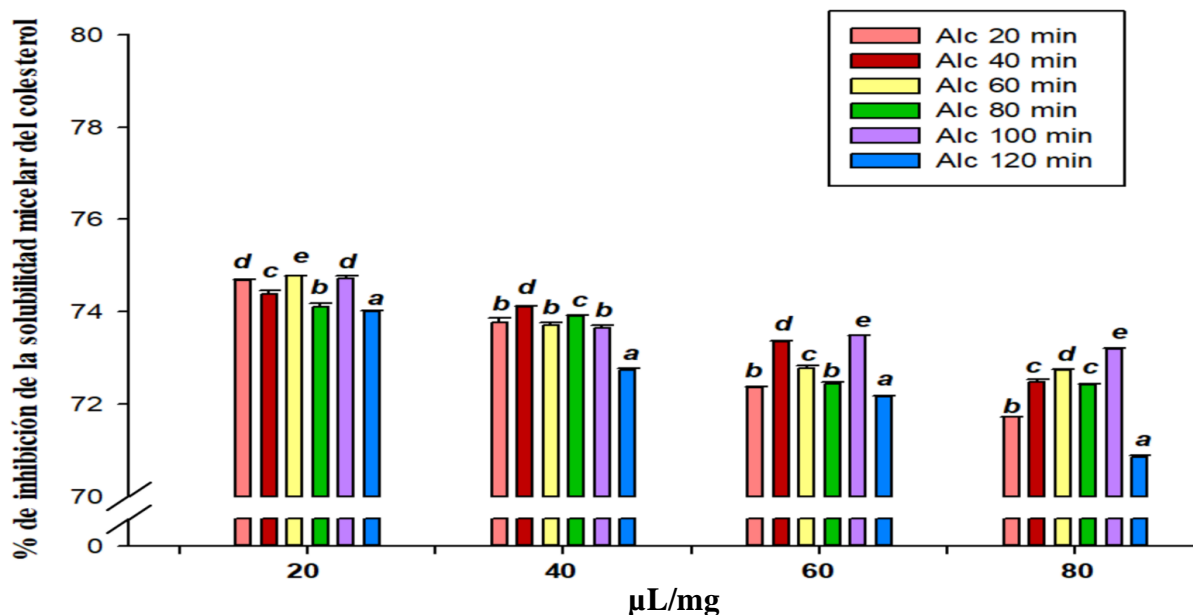


Figura 111. Actividad anticolesterolémica de hidrolizados proteicos con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-c} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, en la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de la actividad anticolesterolemica de los hidrolizados proteicos de Flavourzima® de la semilla de girasol. Donde los hidrolizados que mostraron mejores resultados fueron los de 60, 80 y 100 min con una concentración de 20 µL/mg con 74.63, 74.57 y 74.42% respectivamente.

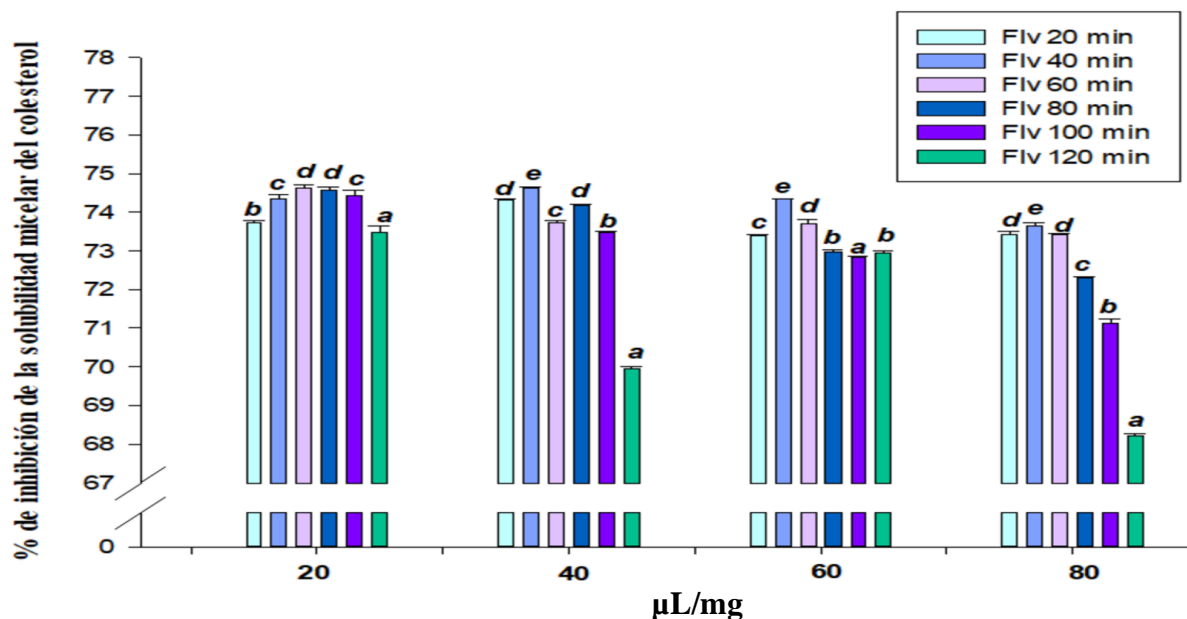


Figura 122. Actividad anticolesterolemica de hidrolizados proteicos con Flavourzima® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-c} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados son comparados con lo reportado por (Domínguez, 2019) quien obtuvo 49.80% de inhibición de la solubilidad micelar de colesterol con una concentración de 10 µL/mg del hidrolizado de la semilla de quelite blanco a 60 min de reacción en relación 1/1 (enzima/sustrato) la enzima Pepsina® y 35.67% con una concentración de 10 µL/mg del hidrolizado de la semilla de amaranto en un tiempo de reacción de 15 min con la enzima Pepsina®. Donde mencionan que los mayores porcentajes de inhibición micelar del colesterol se lograron al realizar la hidrólisis enzimática con la enzima Pepsina®, debido a que esta enzima actúa principalmente sobre enlaces peptídicos de naturaleza hidrofóbica (*Phe [Tyr o Leu], Trp [Phe o Tyr]), ya que estos están asociados con inhibición de la absorción del colesterol, mientras que la Alcalasa® 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. Sin embargo, (Herrera-Chale et al., 2014), mencionan que los hidrolizados proteínicos de soja obtenidos en la hidrólisis con la enzima Alcalasa® presentan un mayor efecto hipocolesterolémico el cual puede ser atribuido a la supresión de la absorción y solubilidad micelar del colesterol y a la inhibición de la reabsorción en el íleo de los ácidos biliares. Prescindiendo que en este trabajo se utilizó como materia prima una oleaginosa, los resultados pueden variar con otras materias primas ya que su composición química y proteica es diferente.

En la Figura 13, se observan los resultados de la actividad anticolesterolémica de las fracciones peptídicas de los hidrolizados que presentaron mejor actividad anteriormente. El proceso de ultrafiltración nos permitió obtener fracciones peptídicas con diferentes pesos moleculares donde se puede destacar, que la fracción C (1-3 kDa) obtenida de los hidrolizados proteicos con las enzimas Alcalasa® y Flavourzima® mostraron una inhibición de la solubilidad micelar del colesterol de 79.85 y 82.62% respectivamente.

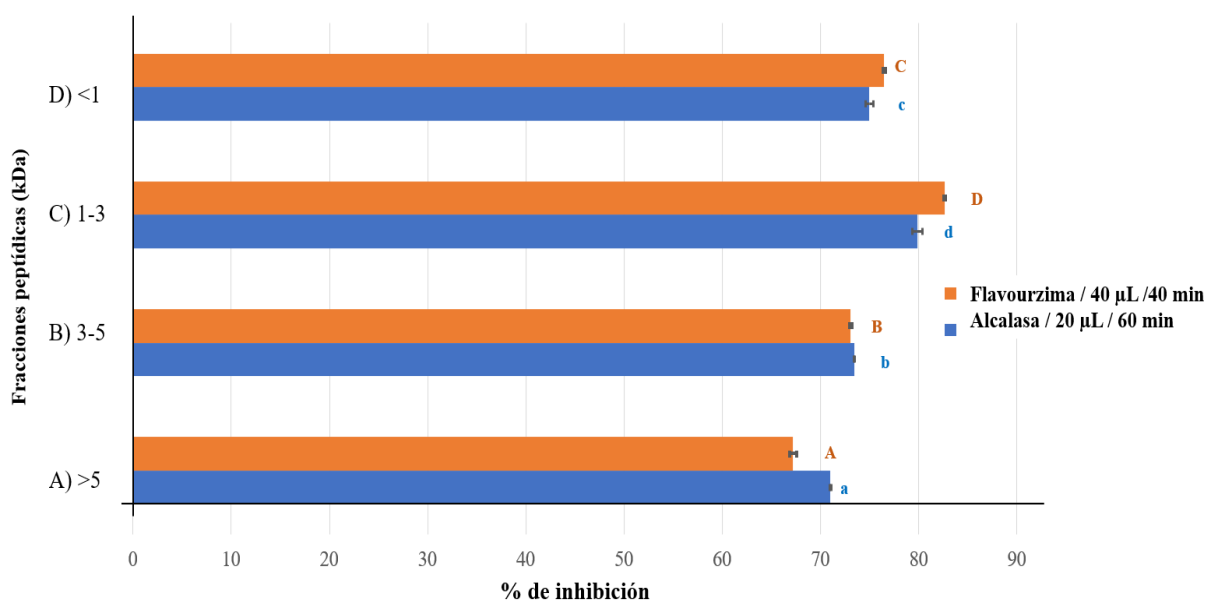


Figura 13. Actividad Anticolesterolémica de fracciones peptídicas de semillas de girasol (*H. annuus*) hidrolizado con Flavourzima® y con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción y concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima®, ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa® indicando diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados presentados en los hidrolizados y fracciones peptídicas evaluados con ambas enzimas fueron semejantes, esto se podría atribuir al efecto de las proteínas en la reducción de los niveles de lípidos por la presencia de algunos péptidos bioactivos hidrofóbicos potentes, que se sabe que se unen a los ácidos biliares principalmente debido a la interacción hidrofóbica con estructuras de anillos tetracíclicos, lo que contribuye a aumentar la excreción fecal del colesterol de la dieta (Howard & Udenigwe, 2013). Esta hipótesis fue respaldada por el estudio de (Guerin et al. 2016) quienes informaron que las interacciones entre los péptidos y las sales biliares micelares dependían principalmente de la naturaleza hidrofóbica/hidrofílica de los péptidos. Además, el efecto hipolipidémico de los hidrolizados de proteínas también podría deberse a la interrupción de la solubilidad micelar del colesterol (CMS), lo que da como resultado la reducción de la absorción de colesterol.

Aquino (2016) obtuvo un 92.2% de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol con fracciones peptídicas obtenidas de la Hez de Malta utilizando un sistema secuencial con las enzimas Neutrasa-Flavourzima[®] exhibiendo mayor capacidad para reducir la incorporación del colesterol a las micelas e inhibir a la enzima lipasa pancreática. Donde mencionan que esto podría deberse a la presencia de oligopéptidos con elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos y, en menor medida, aminoácidos cargados. Por otro lado, (Megías et al. 2009) reportaron que la inhibición de la solubilidad micelar del colesterol aumentaba al aumentar la hidrofobicidad y que los péptidos inhibidores presentaban mayores cantidades de Ala, Tyr, Val, Leu o Lys por lo que, posiblemente la mayor hidrofobicidad favorece la inmersión de estos péptidos en las micelas lipídicas. Mientras que, (Prados et al. 2018) estudiaron la actividad hipolipemiente de hidrolizados proteicos de olivos, fraccionados por ultrafiltración, y encontraron que los péptidos de mayor tamaño (>5kDa) inhibían en mayor medida la adición del colesterol en micelas y la enzima colesterol esterasa, y que los residuos de aminoácidos podrían ser importantes para ejercer estas actividades.

Debido a que el colesterol necesita ser primero solubilizado en forma de micelas de constituidas por ácidos biliares y otros lípidos para su absorción intestinal, se ha encontrado que los péptidos con actividad hipocolesterolemica 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 hipocolesterolemica han sido secuenciados y su relación estructura-actividad. 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 trípico de la glicina de soja y de hidrolizados con Alcalasa de soja (Herrera-Chale. 2014). Con base a lo anterior (Villanueva et al. 1999) realizó una composición de aminoácidos del concentrado proteico de la semilla de girasol, donde reporta el contenido de los aminoácidos que forman los péptidos antes mencionados, así como también la presencia de Asp, Asn, Gln, His, Thr, Arg, Val, Met, Cys y Phe, esto nos indica que al contener aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos podrían presentar más actividades biológicas, las cuales podrían ser evaluadas en posteriores trabajos de investigación.

7.5 Actividad antidiabética mediante la inhibición *in vitro* de la α -amilasa y la α -glucosidasa del hidrolizado proteico y fracciones peptídicas de la semilla de girasol (*H. annuus*) con las enzimas Alcalasa® y Flavourzima®

Los hidrolizados proteicos y las fracciones peptídicas de la semilla de girasol (*H. annuus*) fueron evaluados en cuanto a su capacidad para actuar como inhibidores de la α -amilasa y la α -glucosidasa.

En la Figuras 14 y 15 se muestran los porcentajes de la inhibición *in vitro* de la α -amilasa y la α -glucosidasa del hidrolizado proteico con la enzima Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) fueron evaluados a diferentes tiempos de reacción con diferentes concentraciones del hidrolizado, observando que en la inhibición de la α -amilasa, el hidrolizado que presentó mayor porcentaje (50.89%) de inhibición fue el del tiempo 80 min con una concentración de 400 μ L/mg (Figura 14), teniendo como referencia la inhibición con la acarbosa que fue de 86%. Mientras que en la inhibición de la α -glucosidasa el hidrolizado que presentó mayor porcentaje de inhibición (27.34%) fue el del tiempo 20 min con una concentración de 200 μ L/mg (Figura 15).

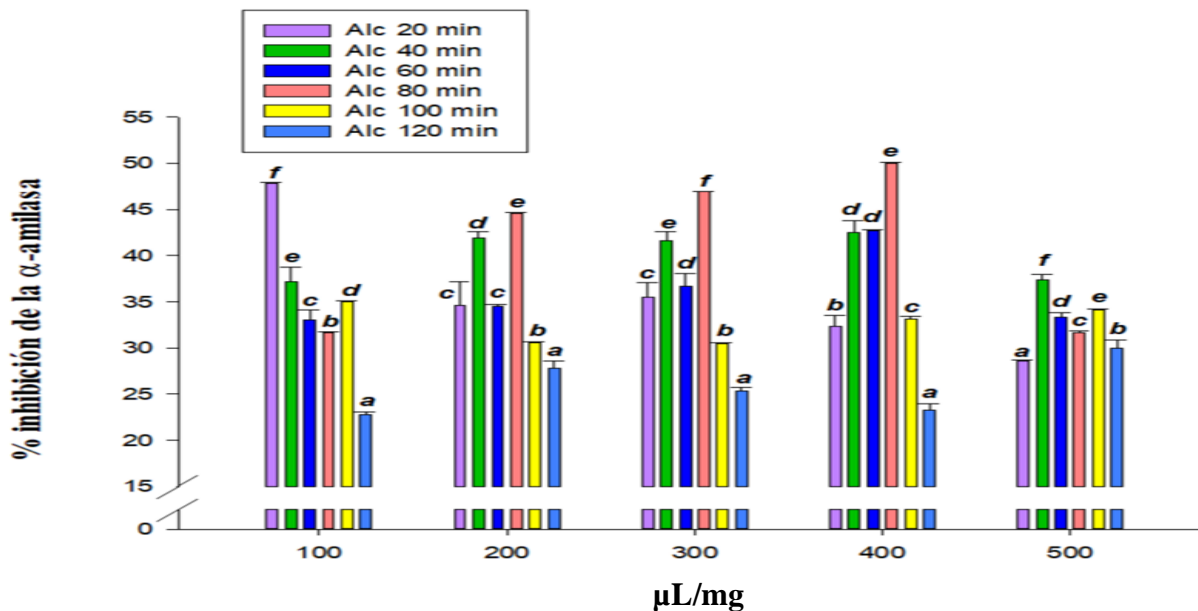


Figura 14. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) del hidrolizado proteico con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

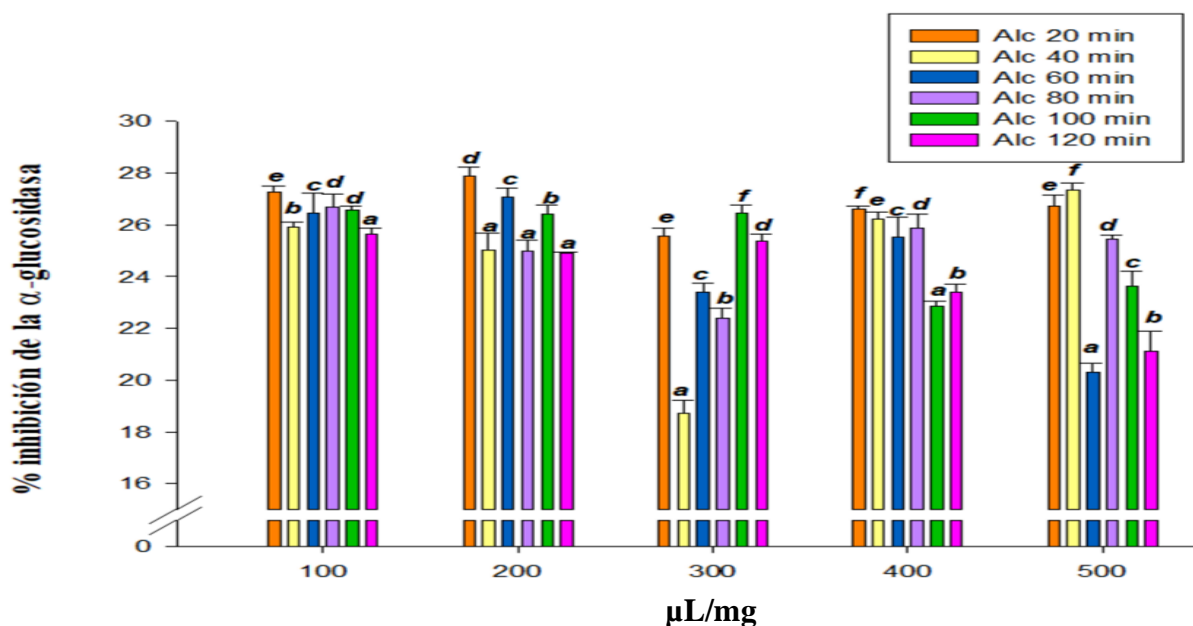


Figura 15. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) del hidrolizado proteico con Alcalasa® de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la inhibición de la α -amilasa el hidrolizado que obtuvo mejor resultados (51.16%) fue el del minuto 40 de reacción en una concentración de 500 $\mu\text{L}/\text{mg}$ teniendo como control la acarbosa con 86% de inhibición (Figura 15). Mientras que, para la inhibición de la α -glucosidasa los hidrolizados fueron evaluados de la misma forma antes mencionada, siendo el hidrolizado que mostró mejor resultado fue el del minuto 100 de reacción donde presentó un 23.14% de inhibición a una concentración de 400 $\mu\text{L}/\text{mg}$.

Varios estudios informaron que la α -amilasa y la α -glucosidasa juegan un papel importante en el ajuste de la insulina. Por tanto, la inhibición de estas enzimas se considera una alternativa útil en el tratamiento de la diabetes. De hecho, la inhibición de estas enzimas puede suprimir la digestión de carbohidratos y retardar la absorción de glucosa (Bhandari et al. 2008). En este sentido, se han informado varios compuestos hipoglucemiantes, que ejercen una actividad inhibidora de la α -glucosidasa y pueden disminuir el nivel de glucosa en sangre (BGL), como la acarbosa y los extractos de plantas (que pueden contener varios compuestos biológicamente activos) (Preetha et al., 2012). (Temitola et al. 2019) obtuvieron hidrolizados de chícharo con la enzima Alcalasa, con una inhibición de la α -amilasa de 30.52% a una concentración de 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$, y una inhibición de la α -glucosidasa de 44.74% con una concentración de 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$. Por otra parte, (Valencia-Mejía et al. 2019) obtuvieron un hidrolizado de frijol empleando la enzima pepsina, la cual tuvo una inhibición de la α -amilasa de 44.2% con una concentración de 500 $\mu\text{L}/\text{mg}$ y una inhibición de la α -glucosidasa de 35.9% con una concentración de 500 $\mu\text{L}/\text{mg}$.

Al obtener en esta investigación hidrolizados extensivos estos tienen enlaces peptídicos escindidos por la hidrólisis enzimática, lo que permitió la obtención de fracciones peptídicas. La función del hidrolizado se pudo haber efectuado en base a la enzima que se aplicó al realizar la hidrólisis, al hablar de la Alcalasa que tiene como principal componente la subtilisin Carlsberg la cual es una serina proteasa alcalina extracelular, que cataliza la hidrólisis de proteínas y amidas peptídicas, mostrando una alta especificidad para los aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos. Mientras que, los hidrolizados que se obtuvieron con la enzima Flavourzima la cual es una enzima con actividad endoproteasa y exopeptidasa, la primera actúa cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas confiriendo la capacidad

de romper enlaces peptídicos liberando aminoácidos simples, dipéptidos o tripéptidos, mientras que, las exopeptidasas actúan en el extremo carboxilo liberando un único amino o un dipéptido en los extremos C-Terminales de la cadena polipeptídica (Marroquín et al. 2019) . Con base a lo anterior se podría decir que los hidrolizados de la semilla de girasol pueden tener péptidos con aminoácidos hidrofóbicos como la Val, Met, Ile, Leu y Phe (Villanueva et al. 1999), que pudieran estar realizando una inhibición enzimática de tipo competitiva, considerando que el sustrato, en este caso, los hidrolizados de la semilla de girasol, podrían ocupar el sitio activo de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa observando diferencias en el efecto inhibitorio de estas (Sosa-Crespo et al. 2021).

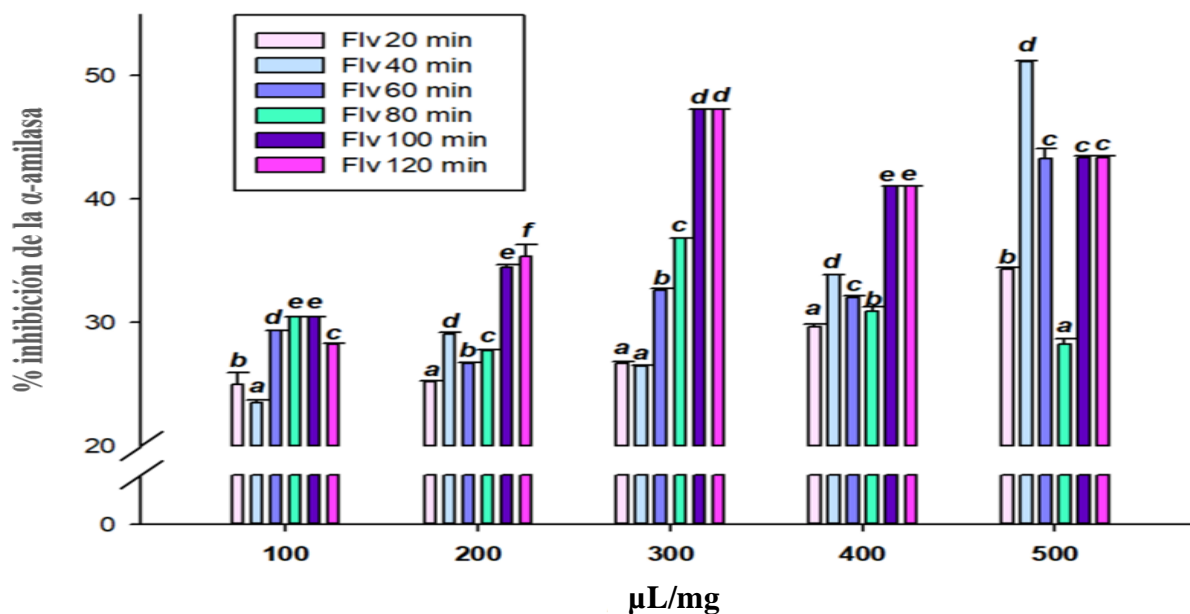


Figura 16. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) del hidrolizado proteico con Flavourzima[®] de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

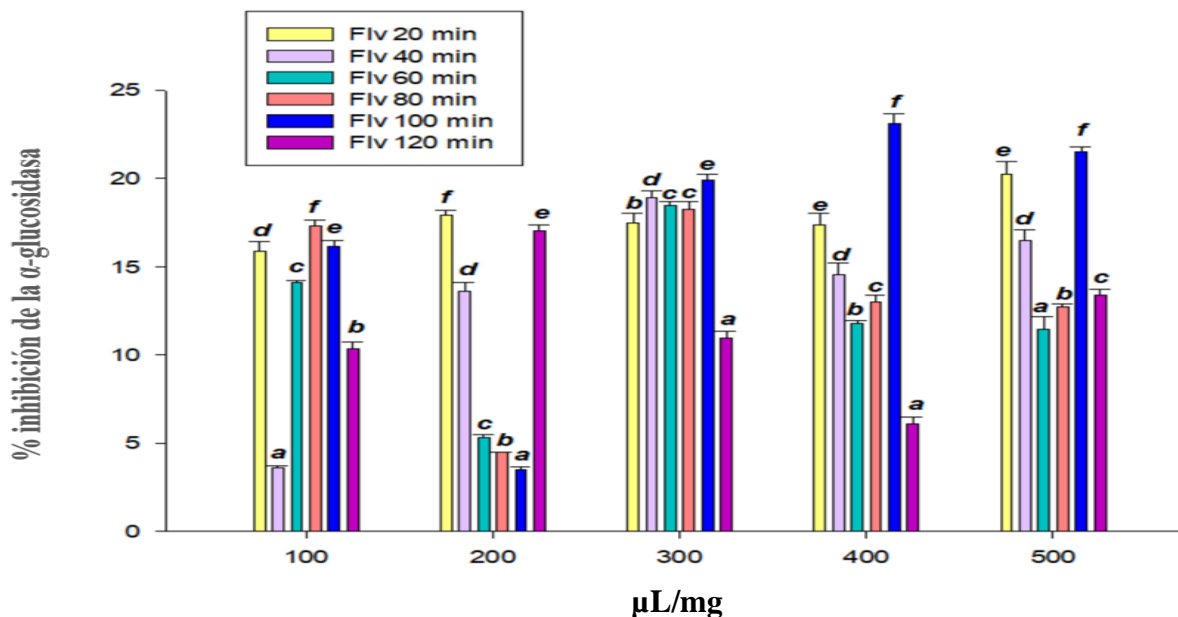


Figura 17. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) del hidrolizado proteico con Flavourzima[®] de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes concentraciones. ^{a-f} Letras diferentes en las mismas concentraciones indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados demostraron que hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las fracciones para un mismo sistema enzimático. Estos valores fueron comparados con acarbosa como inhibidor de referencia. Para el sistema enzimático con Alcalasa[®], la mayor inhibición (55.65%) fue con la fracción D (<1 kDa); sin embargo, esta fue menor a lo obtenido por la ascarbosa (86%) con la concentración de 20 $\mu\text{L}/\text{mg}$ y la menor inhibición fue la presentada por la fracción A (>5 kDa) con 28-82% de inhibición.

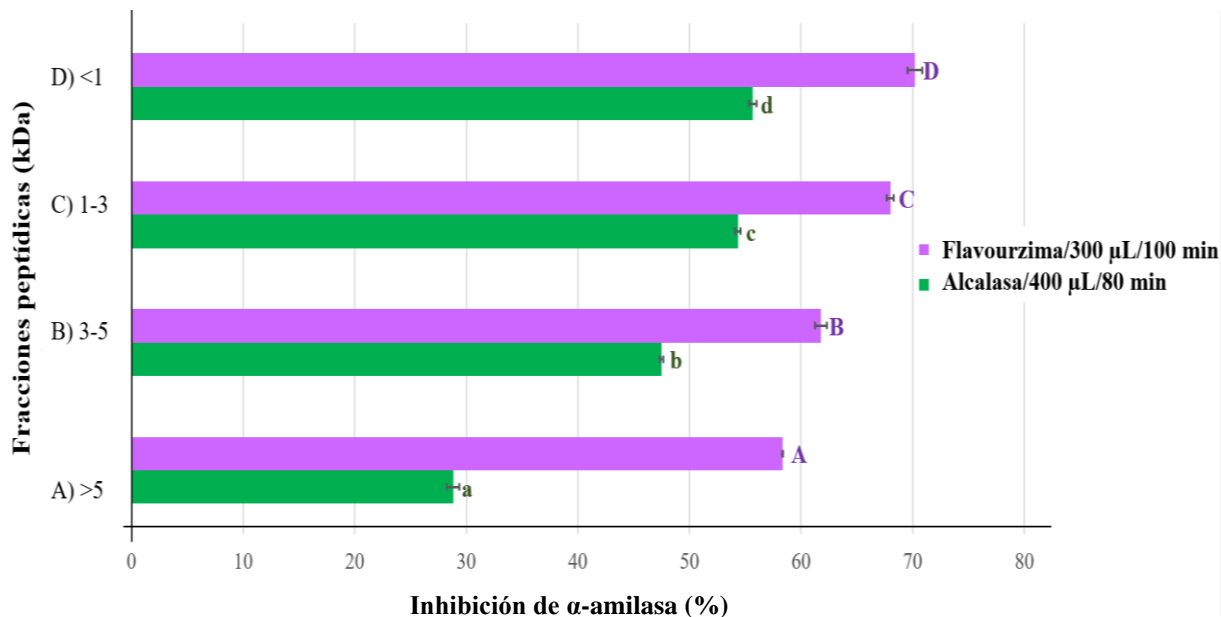


Figura 18. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) con fracciones peptídicas del hidrolizado proteico con Flavourzima[®] y Alcalasa[®] de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes tiempos y concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima[®]. ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa[®] indicando diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, las fracciones de los hidrolizados proteicos obtenidas del sistema realizado con Flavourzima[®], mostraron que hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) siendo las fracciones de menor tamaño molecular C y D (1-3 y <math><1kDa</math>) las que presentaron una mayor actividad (70.18 y 67.99%, respectivamente) sobre la α -amilasa. (Zhipeng et al. 2012) Sugirieron en su investigación que, para una mejor inhibición, se requiere una determinada secuencia de aminoácidos o que las cadenas polipeptídicas sean más cortas, como sucede en su estudio con albúmina de huevo, donde obtuvieron fracciones de cinco o más aminoácidos como QITKPN, AEAGVD y NVLQPS.

En lo que respecta a las fracciones peptídicas obtenidas de los hidrolizados con la enzima Alcalasa[®] sobre el efecto inhibitorio de la enzima α -glucosidasa (Figura 19) mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Para el sistema enzimático con Alcalasa[®] se presentó mayor inhibición (34.73%) en la fracción D (<math><1 kDa</math>), utilizando una concentración de 200 μ L/mL de la fracción peptídica de la semilla de girasol. Mientras que, para el sistema

con Flavourzima[®], los resultados demostraron que la fracción A (>5 kDa) presentó la mayor inhibición de la enzima α -glucosidasa (46.2%), mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con las demás fracciones peptídicas. El valor presentado por la acarbosa fue de 95% con una concentración de 2 mg/mL. Esto sugiere que es necesario utilizar una concentración mayor (200 μ L/mg) de las fracciones peptídicas C (1-3 kDa) del hidrolizado proteico de la semilla de girasol (*H. annuus*) para poder observar el efecto inhibitorio.

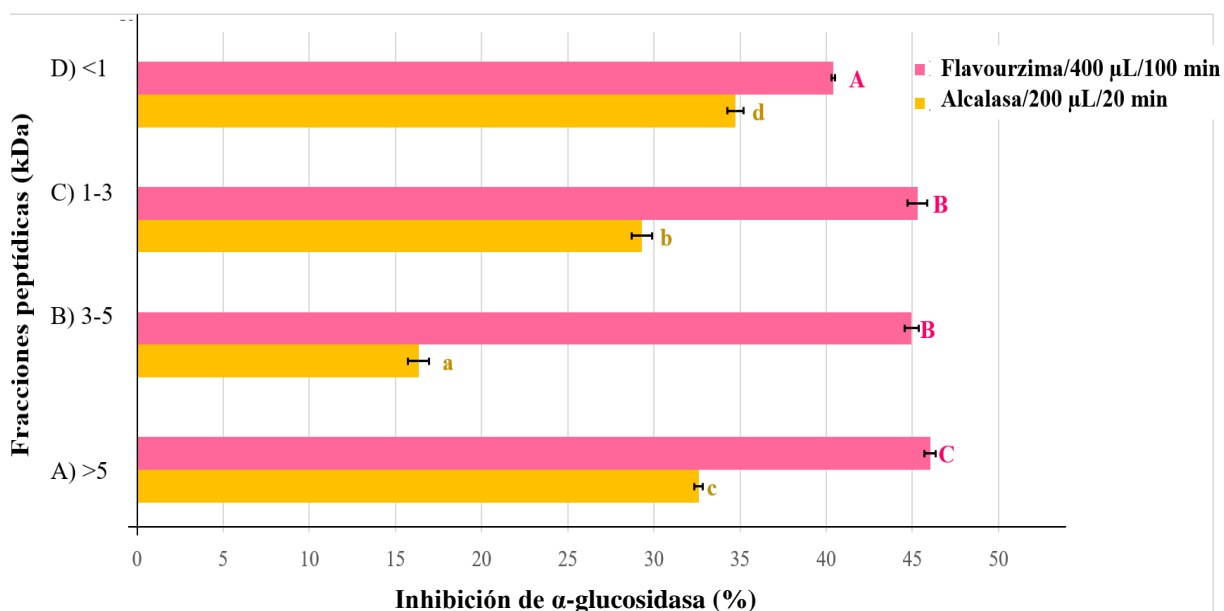


Figura 19. Actividad antidiabética (% inhibición de la α -glucosidasa) con fracciones peptídicas del hidrolizado proteico con Flavourzima[®] y Alcalasa[®] de la semilla de girasol (*H. annuus*) a diferentes tiempos y concentraciones. ^{A-D} Letras mayúsculas significan comparación entre las fracciones de Flavourzima[®]. ^{a-d} Letras minúsculas significan comparación entre las fracciones con Alcalasa[®] indicando diferencias significativas ($p < 0.05$).

El efecto inhibitorio de la α -glucosidasa generado por las fracciones peptídicas de alto peso molecular (PM) posiblemente se deba a la hidrólisis con Flavourzima[®] la cual al ser una enzima con naturaleza endoproteasa y exopeptidasa permite obtener una determinada secuencia de aminoácidos pudiendo obtener una mejor inhibición de la α -amilasa. Después del proceso de ultrafiltración, las propiedades moleculares de las proteínas podrían cambiar, pudiendo producir una disminución del PM, el aumento de la carga y la liberación de grupos o aminoácidos hidrofóbicos (Megías et al., 2004). Por lo anterior, los aminoácidos apolares

como la leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, así como la valina, prolina, glicina y metionina podrían estar presentes en la proteína de la semilla de girasol y estas pueden interactuar con la enzima α -glucosidasa en su sitio activo, retrasando la digestión de carbohidratos, tal como lo menciona (Sandoval et al. 2012). En consecuencia, la absorción de la glucosa es completada en un periodo más largo y la hiperglicemia posprandial es reducida (Bhandari et al., 2008; Yilmazer et al., 2012), por lo que las fracciones peptídicas de semilla de girasol actuarían como inhibidores competitivos de las α -glucosidasa, localizadas en el borde de cepillo de los enterocitos en la luz de las vellosidades intestinales.

Valencia-Mejía et al. (2019) consideraron que la actividad inhibitoria de los péptidos puede estar influenciada por la composición de los residuos de aminoácidos, y que es posible que la hidrólisis con Alcalasa[®] (una endopeptidasa que escinde donde están presentes aminoácidos hidrofóbicos y Flavourzima[®] un complejo enzimático de (una mezcla de endo y exopeptidasas que escinde aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos) puede haber eliminado diferentes residuos de aminoácidos en los péptidos bioactivos, lo que podría haber causado diferentes cambios en su capacidad para interactuar con la α -amilasa y la α -glucosidasa. Además, ellos mencionan que el mantenimiento del 20-80% de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa y el uso de la ultrafiltración les aumentó un 30% en la inhibición de la α -amilasa para las fracciones peptídicas (> 10 kDa - <3 kDa) sugiriendo que los péptidos producidos de su materia prima son resistentes a la Alcalasa[®] y la Flavourzima[®] y podrían ser absorbidos intactos en el intestino delgado, por lo tanto, pueden ser capaces de ejercer su actividad biológica.

Sosa-Crespo et al. (2019) evaluaron el efecto inhibitorio de las fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis de semillas de Chía (*Salvia hispánica*) sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa donde encontraron que la fracción >10 kDa fue la que tuvo mayor inhibición con 39.9% y la que tuvo menor fue la fracción <1 kDa con 8.29% de inhibición de la α -amilasa teniendo como control la acarbosa con 93.42% de inhibición, mostrando en sus datos una diferencia significativas ($p < 0.05$) en las fracciones mayores (>10 y 5-10 kDa) generadas en un sistema secuencial con pepsina-pancreatina, donde sugirieron que para una mejor inhibición de la α -amilasa pudiera requerir una determinada secuencia de aminoácidos o

cadena polipeptídicas más largas. Mientras que, en la inhibición de la α -glucosidasa obtuvieron mejores resultados en las fracciones obtenidas a partir de hidrolizados de un sistema secuencial con Alcalasa-Flavourzima[®] fue la fracción de 1-3 kDa con un porcentaje de 33.75% mientras que para el sistema de pepsina-pancreatina los mejores resultados los obtuvieron con la fracción de 1-3 kDa con una inhibición de 96.91%, estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con las otras, teniendo como referencia el valor de la acarbosa que fue de 46%. Donde mencionan que el efecto inhibitorio de la α -glucosidasa generado por las fracciones peptídicas de bajo peso PM posiblemente se deba a la hidrólisis con pepsina-pancreatina, ya que estas enzimas hidrolizan por el extremo del C-terminal de los aminoácidos aromáticos residuales, como el Tyr y Phe, que están presentes en la materia prima que ellos ocuparon. Estos hallazgos de los ensayos *in vitro* muestran que una de las vías de la actividad antidiabética de los péptidos presentes en las fracciones peptídicas de las semillas de girasol (*H. annuus*) es la inhibición de las enzimas amilolíticas. Por lo tanto, estas fracciones peptídicas podrían mejorar la diabetes al disminuir la tasa de absorción de glucosa, previniendo la elevación aguda de la glucemia posprandial de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

VIII. CONCLUSIONES

1. El empleo de ultrasonido y solvente hexano ayudó a un buen desengrasado de la harina de la semilla de girasol (*Helianthus annuus*), obteniendo así un concentrado proteico con un contenido de proteína superior al 50%.
2. Los parámetros de color del concentrado proteico obtenido de la harina desengrasada de la semilla de girasol, presentó un oscurecimiento debido al medio alcalino utilizado en este proceso de concentración de proteína, así como al empleo de solvente (Hexano), sin embargo, considerando la coloración obtenida de este concentrado podrían emplearse en la elaboración de suplementos ricos en proteína, siempre y cuando se tenga en cuenta la concentración de este a utilizar.
3. El grado de hidrólisis enzimático del concentrado proteico de *H. annuus* fue más eficiente con Alcalasa® con un valor de 70.06%, mientras que con Flavourzima® se obtuvo un 38.75% ambas a los 120 min de reacción. La enzima Alcalasa® posee mayor selectividad por los enlaces peptídicos presentes en el concentrado proteico.
4. Las mejores condiciones de hidrólisis fueron con Alcalasa® al minuto 60 con una concentración de 20 μL y con Flavourzima® al minuto 40 con una concentración de 40 μL presentando una actividad anticolesterolémica mayor a 74% de inhibición para ambas enzimas. Las fracciones peptídicas que se obtuvieron a partir de estos pudieran presentar aminoácidos hidrofóbicos (Asp, Asn, Gln, His, Thr, Arg, Val, Met, Cys y Phe) los cuales pueden competir con el colesterol por un sitio en las micelas de este reduciendo de esta forma su solubilidad, su absorción intestinal y por ende los niveles de colesterol plasmático.
5. En la Actividad antidiabética (% inhibición de la α -amilasa) los hidrolizados con Alcalasa® y Flavourzima® que presentaron mejores resultados fueron al minuto 80 y 100 (400 y 300 μL respectivamente), mientras que la α -glucosidasa fueron al minuto 20 y 100 con una concentración de 200 μL para la Alcalasa® y 400 μL para la Flavourzima®.
6. El proceso de ultrafiltración permitió obtener fracciones peptídicas que presentaron actividad anticolesterolémica y antidiabética: La fracción C (1-3 kDa) presentó la mejor actividad anticolesterolémica con una inhibición mayor al 79%. Mientras que,

en la actividad antidiabética, la fracción D (<1 kDa) presentó la mejor actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa de los hidrolizados con Alcalasa[®] a 80 min y Flavourzima[®] a 40 min. En la inhibición de la α -glucosidasa la mejor fracción peptídica del hidrolizado con Alcalasa[®] a 20 min fue la fracción D (<1 kDa) y del hidrolizado con Flavourzima[®] a 100 min fue la fracción de A (>5 kDa).

7. El desengrasado de la harina de las semillas de girasol con ultrasonido, la hidrólisis enzimática y el proceso de ultrafiltración; permitió obtener fracciones peptídicas que contienen péptidos bioactivos de diferentes pesos moleculares que presentaron actividad anticolesterolémica y antidiabética los cuales podrían utilizarse como una alternativa para el diseño y desarrollo de productos nutracéuticos que ayuden en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

IX. REFERENCIAS

- 1) Adebawale, K.O.; Lawal, O.S. (2003). Foaming, gelation, and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 83, 237-246.
- 2) Adebawale, 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.
- 3) Ahmad-Qasem, M. J. Cánovas, E. Barrajón-Catalán, V. Micol, J. A. Cárcel, and J. V. García-Pérez. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (*var. Serrana*) by using power ultrasound. *Innovative Food Science Emerging*, 17, 120-129.
- 4) Alvarado, C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23(1), 42–49.
- 5) AOAC International. (2012). Official methods of analysis (19 ed.). Gaithersburg, MD: The Association.
- 6) Aquino, M. (2016). Propiedades hipolipemiantes de péptidos obtenidos a partir de la hez de malta. *Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química, UNL*. pp. 1-4.
- 7) Ariza Ortega TJ. (2014). Obtención de fracciones peptídicas de *Phaseolus vulgaris* L. y evaluación de su actividad biológica. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Ciudad de México-México. pp. 20-90.
- 8) Armas Luna, SC. (2017). Obtención y caracterización de fracciones peptídicas de dos variedades de frijol y su evaluación como componentes bioactivos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Oaxaca, México. Pag: 3-60.
- 9) Astiasarán I, Martínez A. (1999). Alimentos, Composición y Propiedades. Mc.Graw-Hill. Interamericana España, 1ª edición.

- 10) Bagchi, D. (2006). Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world. *Toxicology*.
- 11) Bangoura, M., Wenshui, X., & Jiali, Z. (2009). In vitro binding capacity of cholesterol and bile salts by partially depolymerized chitosan's. *American Journal of Food Technology*, 4(3), 126-135.
- 12) Betancur-Ancona, R. Martínez-Rosado, A. Corona-Cruz, A. Castellanos-Ruelas, M. E. Jaramillo-Flores and L. Chel-Guerrero. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 44, no. 1, pp.128-137.
- 13) Bhandari MR, Nilubon JA, Gao H, Kawabata J. (2008). α -glucosidasa y α -amilasa inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.). *Food Chem*;106:247-52.
- 14) Borja, J. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* (tarwi) mediante proteasas de *Bacillus sp.* (Tesis de pregrado), Lima, Perú.
- 15) Brunner, J. Beaver and L. Flores. (2011). *Mucuna*. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales Estación Experimental de Lajas, Lajas, Puerto Rico. Ppp 1-4.
- 16) Burdock GA, Carabin IG, Griffiths JC. (2016). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements, and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology*. In press.
- 17) Carrillo, W., Vilcacundo, R., & Carpio, C. (2015). Compuestos bioactivos derivados de amaranto y quinoa. *Actualización En Nutrición*, 16, 18–22.
- 18) Casal, E., Montilla, A., Moreno, F. J., Olano, A., & Corzo, N. (2006). Use of chitosan for selective removal of beta-lactoglobulin from whey. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1384–9.
- 19) Castro-Rodríguez J, López-Cueto R, Castro-Rodríguez E. (2014). Tomografía computada multidetector en el paciente con síndrome coronario agudo. *Rev Mex Enferm Cardiol*. 22 (3): 128-131. 10.

- 20) Chen W, Wang W, Zhang H. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of watersoluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydr Polym.* 87: 614-619.
- 21) Consejo de Salubridad General. (2013). Guía práctica clínica, prevención secundaria y rehabilitación cardiaca postinfarto del miocardio en el primer nivel de atención. México: Editor General.
- 22) Córdova-Lizama, A., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero, & D. Betancur Ancona, Instituto Tecnológico de Tuxtepec - Maestría en Ciencias en Alimentos. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (págs. 123-137). Barcelona: Omnia Science.
- 23) Corona-Jiménez, N. Martínez-Navarrete, H. Ruiz-Espinosa, J. Carranza-Concha. (2016). Ultrasound-assisted extraction of phenolics compounds from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and their antioxidant activity. *Agrociencia*, vol. 50, pp. 403-412.
- 24) Darewicz, M., Dziuba, J., & Minkiewicz, P. (2007). Computational characterisation and identification of peptides for in silico detection of potentially celiac-toxic proteins. *Food Science and Technology International*, 13(2), 125–133.
- 25) Dogan Kubra, P.K. Akman, F. Tornuk. (2019). Improvement of Bioavailability of Sage and Mint by Ultrasonic Extraction. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(2): p.122- 135.
- 26) Domínguez G. (2019). Obtencion y evaluacion de hidrolizados proteicos de semillas de quelite blanco (*Amaranthus hybridus*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como componentes bioactivos. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Maestría en Ciencias de los Alimentos. Tuxtepec.
- 27) Dominguez, K., Cruz, A., Gonzalez, H., Gómez, L., García, M., & Rodríguez, G. (2014). El Efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Asociación Argentina de Microbiología*, 46(1), 58–65.



- 28) Duca, M., A. Levitchi, and I. Anisimova (2008). Polymorphism of helianthin in polypeptides from various sunflower genotypes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 22(4): 897-900.
- 29) Dziuba, J., Niklewicz, M., Iwaniak, A., Darewicz, M., & Minkiewicz, P. (2004). Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins. *Acta Alimentaria*, 33(3), 227–235.
- 30) E. H. Rahma and M. S. R. Narasinga. (1979). Characterization of sunflower proteins. *Journal of Food Science*, vol. 44, no. 2, pp. 579-582.
- 31) Gengatharan, Ashwini; Diques, Gary A.; Chu, Wee Sim (2015). Betalaínas: Pigmentos vegetales naturales con potencial aplicación en alimentos funcionales. *LWT - Ciencia y tecnología de los alimentos*, 64(2), 645–649. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.052
- 32) Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., and Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123–131.
- 33) Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (3), 223–239.
- 34) 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 Tuxtpec.
- 35) Gómez LA. (2011). Las enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Biomédica*, 3 (4).
- 36) Gómez, J. Á., Taborda, G., Amigo, L., Recio, I., and Ramos, M. (2014).- Identification of 75 ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223 (5), 595–601.
- 37) González, E., Marina, M. L., and García, M. C. (2014). Plum (*Prunus Domestica L.*) byproduct as a new and cheap source of bioactive peptides : Extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods*, 11, 428–437.

- 38) Gonzalez, L., Jiménez, J., Cruz, A., Rodríguez, G., Gómez, L., and García, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lacticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 179–188.
- 39) González-Pérez, S. (2003). Physics-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph. D. Thesis Wageningen University, The Netherlands.
- 40) Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P.; Camacho, F. (2000). Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. *Ars Pharmaceutica* 41(1), 79-89.
- 41) Guerin, J., Kriznik, A., Ramalanjaona, N., Le Roux, Y., & Girardet, J. M. (2016). Interaction between dietary bioactive peptides of short length and bile salts in submicellar or micellar state. *Food Chemistry*, 209, 114-122.
- 42) Hartmann, R., and Meisel, H. (2014). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163–9.
- 43) Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., and Recio, I. (2004). Application of highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*, 1049(1-2), 107–114.
- 44) Herrera Chalé, F; Betancur Ancona, B; Segura Campos, MR. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*. 29:10-20.
- 45) Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., and Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs Peptides. 29(6), 1062–71. 76.
- 46) Howard, A., and Udenigwe, C. C. (2018). Mechanism and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food and Function*, 4, 40-51.

- 47) Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2021). Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social. Cuaderno Número 19. México, D.F. 2003. pp. 50-51.
- 48) Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., and Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, 141(4), 3774–80.
- 49) Jakubczyk, A., Karas, M., Zlotek, U., and Szymanowska, U. (2017). Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris L.*) seeds. *Food Research International*, 100, 489–496.
- 50) Jones, P.J. (2002). Clinical nutrition: 7 Functional foods – more than just nutrition. *Can. Med. Assoc. J.* 166 (12):1555.
- 51) Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Alvarez, C., and Donnell, C. P. O. (2015). Ultrasound for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science y Technology*, 46(1), 60-67. .
- 52) Karelin, A. A., Blishchenko, E. Y., and Ivanov, V. T. (1998). A novel system of peptidergic regulation. *FEBS Letters*, 428(1-2), 7–12. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00486-4](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00486-4)
- 53) Kirana, C., Rogers, P.F., Bennett, Le, Abeywardena, Me. (2005). Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactive. *j. Agric Food Chem.* 53: 4623-4627.
- 54) Kitts, D. and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recover. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323.
- 55) Kongo-Dia, J; Zhang, H; Claver Irakoze, P. (2011). *In Vitro* Binding Capacity of Bile Acids by Defatted Corn Protein Hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 1066–1080. doi:10.3390/ijms12021066
- 56) Korhonen, H. (2002). Milk-derived bioactive peptides : From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187.

- 57) Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308.
- 58) Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. C., Braga, A. R. C., Egea, M. R., and Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1–24.
- 59) León, E. ., Jiménez, C., and Davila, G. (2011). Péptidos Bioactivos de Fuentes Vegetales: 77 Un nuevo ingrediente para alimentos funcionales. (O. Science, Ed.). Barcelona.
- 60) León-Espinosa, E.B., Jiménez-Martínez, C., & Dávila-Ortiz, G. (2015). Péptidos bioactivos de fuentes vegetales: Un nuevo ingrediente para alimentos funcionales. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: Omnia Science. 37-71.
- 61) Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28–37.
- 62) Lin, G., Chen, Y., Yen, P., and Chang, S. (2016). Antihyperglycemic and antioxidant activities of twig extract from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6, 281–288.
- 63) Lovatto. (2015). Estudio del valor nutritivo de la semilla de girasol entera descascarillada en raciones de pollos boiler y su efecto sobre la concentración de ácidos grasos en la grasa abdominal. Departamento de producción animal. Facultad de Veterinaria. Ciudad Universitaria. Madrid, España. vol. 48, No. 183, pp. 250.
- 64) Marroquín, A, Olivares, J. Diaz, P., Cruz. L. (2019). La ciencia y las mujeres en Mexico. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Queretaro.
- 65) Martínez-Augustin1, O. & Martínez-Victoria Muñoz, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* 21. 2: 1-14.

- 66) Maruyama, S., Miyoshi, S., Osa, T., and Tanaka, H. (1992). Prolyl endopeptidase inhibitory activity of peptides in the repeated sequence of various proline-rich proteins". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(3), 145–148.
- 67) Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*.7(3): 47
- 68) Megías C, Yust MM, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alai M. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) Protein isolates. *J Agric Food Chem*;52:1928-32.
- 69) Megias, C., Pedroche, J., Yust, M., Alaiz, M., Giron-Calle, J., Millan and Vioque, J. (2009). Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. *Plan Foods Hum Nutr*. 64:86-93.
- 70) Mehra, R., and Kelly, P. M. (2004). Whey protein fractionation using cascade membrane filtration. *Bulletin-International Dairy Federation*, 389, 40–44.
- 71) Meisel, H. (1998). Overview on Milk Protein-derived Peptides. *International Dairy Journal*, 8(5-6), 363–373.
- 72) Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
- 73) Millward DJ. (2004). Macronutrient Intakes as Determinants of Dietary Protein and Amino Acid Adequacy. *J Nutr*. 134:1588S-1596S.
- 74) Mojica, L., Chen, K., and Mejía, E. G. (2016). Impact of commercial precooking of common beans (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *Journal of Food Science*, 80, 188–198.
- 75) Mosquera-Jordán, M. E. (2014). Nano encapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos. Madrid, España. P: 20-324.

- 76) Mulero, J., Zafrilla, P., Martínez, A. M., Leal, M., and Alemán, A. (2011). Péptidos bioactivos”. *Clin Invest Arterioscl*, 23 (5), 219–227..
- 77) Muro, C., Riera, F., and Fernández, A. (2003). Advancements in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. *Bioactive Food Peptides in Health 78 and Disease*. InTech, Rijeka, 241–266.
- 78) Nongonierma, A. B., and Fitzgerald, R. J. (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640–656.
- 79) OCDE/FAO. (2017). *Semillas oleaginosas y sus productos*. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, OECD Publishing, París.
- 80) Ochoa Pachas KG. (2018). Purificación de péptidos de un hidrolizado proteico de cañahua (*Chenopodium Pallidicure Aillen*): con actividad antioxidante y antihipertensiva. Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Industrias Alimentarias. Lima-Perú. Pag: 20-100.
- 81) OMS y OPS México. (2014). Perfil de enfermedades cardiovasculares. Disponible en: www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task.
- 82) Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K., and Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 54, 863–880.
- 83) Pedroche, J.; Yust, M. M.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M. Millán, F. and Vioque, J. (2002). Utilization of Chickpea Protein Isolates for Production of Peptides with Angiotensin I Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 960-965.
- 84) Pezo Cuñaña, CM. (2018). Obtención y caracterización de un aislado proteico a partir de la torta desengrasada de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Tarapoto, Perú. Pag: 15-50.

- 85) Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., and Korhonen, H. (1998). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 8 (4), 325–331.
- 86) Pomenta, J. V.; Burns, E. E. (1971). Factors affecting chlorogenic, quinic and caffeic acid levels in sunflower kernels. *J. Food Sci.* 36, 490-492.
- 87) Prados, I., Marina, M., and Garcia, M. (2018). Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipidlowering capacity. *Food Research International*. 111: 77-86.
- 88) Preetha, P. P., Girija-Devi, V., and Rajamohan, T. (2012). Hypoglycemic and antioxidant potential of coconut water in experimental diabetes. *Food and Function*, 3, 753-757.
- 89) R. Sánchez-Vioque; A. Clemente; J. Vioque; J. Bautista and F. Millán. (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, vol. 64. pp. 237-243.
- 90) Righetti, P. G., Nembri, F., Bossi, A., and Mortarino, M. (1997). Continuous Enzymatic Hydrolysis of β - Casein and Isoelectric Collection of Some of the Biologically Active Peptides in an Electric Field". *Biotechnology Progress*, 13(3), 258–264.
- 91) Rivero Pino, Fernando. (2021). Obtención de biopeptidos reguladores del índice glucémico para alimentación funcional. Granada: Universidad de Granada. [<http://hdl.handle.net/10481/68559>]
- 92) Rodríguez Ortiz, JD. (2021). Obtención de hidrolizados proteicos a partir de germinados de frijol costeño (*Vigna unguiculada*) y su evaluación como antioxidantes y anticolesterolémicos. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Maestría en Ciencias en Alimentos. Oaxaca, México. Pag: 11-77.
- 93) Rodríguez, G., Rentería, A., Rodríguez, J., and Chavez, A. (2014). Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 281–294.

- 94) Rodríguez-Amaya. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, vol. 7, pp. 20-26.
- 95) Ross, S. A., Gulve, E. A., and Wang, M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*, 104, 1255–1282.
- 96) Rossel-Kipping, H. Ortiz-Laurel, A. Amante-Orozco, H. M. Durán-García, L.A. López Martínez. (2018). Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. *Nova Scientia. Ciencias naturales e Ingenierias*. pp. 4-18.
- 97) Ruiz, P. (2013). Efecto antihipertensivo, mediante inhibición de la enzima convertora de angiotensina I, de péptidos derivados de lactoferrina bovina y péptidos diseñados racionalmente (Tesis doctoral no publicada). Universidad Politècnica de Valencia, Valencia, España. <http://doi:10.4995/Thesis/10251/31123>.
- 98) Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ. (2005). Bioactive peptides derived from food. *J AOAC*. 88:955-966.
- 99) S. González-Pérez. (2003). Physic-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands. pp. 1-145.
- 100) S. Petruccelli and M. C. Añón. (2009). Thermal aggregation of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, pp. 3035-3041.
- 101) Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., and Ferranti, P. (2013). An overview of “ omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Reserch International*, 54(1), 925–934.
- 102) Sabeena Farvin, K. H., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., and Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, 123(4), 1090–1097.
- 103) Salgado, P. (2009). Proteínas de girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. La Plata, Argentina. Pag: 1-220.
- 104) Sandoval-Oliveros M, Paredes-López O. (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica*). *J Agric Food Chem*;61:193- 201.

- 105) Sarmadi, B. H., & Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- 106) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. (2017). Oleaginosas: Canola, Cártamo, Girasol, Soya Mexicanas. *Planeación Agrícola Nacional 2017-203*. pp. 1-24.
- 107) Segura, M., Guerrero, L., & Betancur, D. (2013). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. Omnia Science. Barcelona.
- 108) Seward, N. and Jakubke, H. D. (2002). *Peptide: Chemistry and Biology*. [http://doi: 10.1002/9783527626038](http://doi:10.1002/9783527626038)
- 109) Silva-Pinto, M., Kwon, Y. I., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I., and Shetty, K. (2008). Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*) cultivars: Evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4386–4392.
- 110) Singh, B. P., Vij, S., and Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171–9.
- 111) Sosa Crespo I, Chel Guerrero L, Acevedo Fernández JJ, Negrete León E, Betancur Ancona D. (2021). Evaluación del efecto hipoglucemiante de una fracción peptídica de las semillas de chía (*Salvia hispánica L.*) en ratas macho Wistar inducidas con aloxano. *Nutr Hosp*;38(6):1257-1262
- 112) Sosa Crespo I, Laviada Molina H, Chel-Guerrero L, Ortiz-Andrade R, and Betancur-Ancona D. (2018). Efecto inhibitorio de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis de semillas de chía (*Salvia hispánica*) sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. *Nutr Hosp*.35(4):928-935.
- 113) Suarez, G., Burgos, A., and Ezquerra, J. (2012). Bioactive Peptides and Dipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. *Marine Drugs*, 963–986.
- 114) Tardioli, W. P.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, M. J.; Giordano, and C. R. L. (2003). Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative

- for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnology Progress* 19(2), 565-574.
- 115) Temitola O. Awosika and Rotimi E. Aluko. (2019). Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum L.*) protein hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology*.
- 116) Teschemacher H, Koch G, and Brantl V. (2019). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymer*. 43:99-117.
- 117) Torruco-Uco 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. DF.
- 118) Torruco-Uco, J. G; Domínguez-Magaña, M. A; Dávila-Ortíz, G; Martínez-Ayala, A; Chel-Guerrero, L.A. and Betancur-Ancona D.A. (2008) Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. *Journal of Food*, 6:2, 158-168. DOI: 10.1080/11358120809487641
- 119) Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M. L., Mikkola, L., and Nissinen, A. (2004). Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 18(11), 795–802. 81.
- 120) Unisima. (2017). Semilla de girasol: Contraindicaciones, beneficios, propiedades y alergias. (<https://unisima.com/salud/semillas-girasol/>).
- 121) Valencia-Mejía, Erika; Batista, Karla A.; Fernández, Juan José A.; Fernández, Katia F. (2019). Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Food Research International*, 121(), 238–246. doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.043
- 122) Van der Ven, C.; Gruppen, H.; De Bont, A. B. D.; and Voragen J. G. A. (2002). Correlations between Biochemical Characteristics and Foam-Forming and -

- Stabilizing Ability of Whey and Casein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2938-2946.
- 123) Vargas, C., De, T. G., Bonilla, J., and Lourenc, G. (2015). Recent patents on the application of bioactive compounds in food : a short review. *Aparecida Makishi and Paulo Jose. Current Opinion in Food Science*, 5, 1–7.
- 124) Vercruyse, L., Camp, J.V. y Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 19, (53): 8106-8115.
- 125) Vermeirssen V, Van Camp J, and Verstraete W. (2004). “Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides”. *Br J Nutr*. 92:357-366. 2004.
- 126) Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Bautista J, Millán F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo and exo a protease. *Grasas y Aceites*. Vol. 50. Fasc. 6. Pag: 472-476.
- 127) Vioque, J. Pedroche, M. M. Yust, H. Lqari, C. Megías, J. Girón-Calle, M. Alaiz and F. Millán. (2006). Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology*, III JIPCA. pp. 99-102.
- 128) Vioque, J.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M. M. and Millán, F. (2001). Obtención y Aplicaciones de Hidrolizados Proteicos. *Grasas y Aceites* 52(2), 132-136.
- 129) Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M. M. and Millán, F. (2000). Péptidos Bioactivos en Proteínas de Reserva. *Grasas y Aceites* 51(5), 361-365.
- 130) Walstra, P., and Van Vliet, T. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. In Artmed (Ed.), *Química de Alimentos de Fennema* (pp. 611–660).
- 131) Wang, W., Mejia, D., and Gonzalez, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4), 63–78.

- 132) Wani, D. S. Sogi, A. A. Wani, and B. S. Gill. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, vol. 53, 278-284.
- 133) Yilmazer-Musa M, Griffith A, Michels A, Schneider E. and Frei B. (2012). Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity by tea and grape seeds extracts and their constituent catechins. *J Agric Food Chem*; 60(36):8924-9.
- 134) Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., and Takahata, K. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors*, 12(1-4), 143–146.
- 135) Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., & liu, J., and Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, 129, 1376–1382.
- 136) Yuan, X., Gu, X., and Tang, J. (2008). Optimization of the production of *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase. *Food Chemistry*, 111, 340-344.
- 137) Zhipeng Y, Yongguang Y, Wenzhu Z, Jingbo L, and Feng C. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -amilasa and α -glucosidasa. *Food Chem*;135:2078-20.
- 138) Zou T, Xia E, He T, Huang M, Jia Q, Li H. (2014). Ultrasound-assisted extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. *Molecules*. 19(2):1411-21.