

# Universidad del Papaloapan

## Campus Tuxtepec

---

---

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.)

T E S I S

Presenta

Ana Luisa Gómez Gómez

Para obtener el título de  
Ingeniero en Alimentos

Asesor de tesis

Dra. María de Jesús García Gómez

Co-Asesor de tesis

Dr. Luis Antonio Chel Guerrero



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oax., a 08 de Julio del 2014.


## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 25 de Junio del 2014 a las 12:00 h. se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Alimentos** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **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.)** presentado por la alumna **Ana Luisa Gómez Gómez**, con número de matrícula 07070005, aspirante al grado de **Licenciatura**.

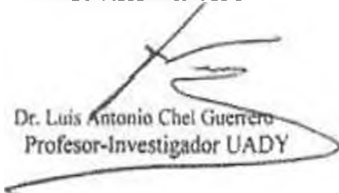
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que **LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**

### ATENTAMENTE, LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis

  
Dra. María de Jesús García Gómez  
Profesor-Investigador UNPA

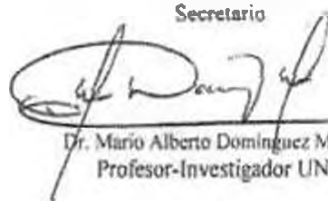
Co-Asesor de Tesis

  
Dr. Luis Antonio Chel Guerrero  
Profesor-Investigador UADY

Presidente

  
Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño  
Profesor-Investigador UNPA

Secretario

  
Dr. Mario Alberto Domínguez Magaña  
Profesor-Investigador UNPA

Vocal

  
Dra. Alma Xóchil Ávila Alejandre  
Profesor-Investigador UNPA

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres:**

Víctor Manuel y Victoria por estar siempre a mi lado, por su confianza, porque en ustedes encuentro el refugio, consuelo y consejos más sinceros. Gracias por enseñarme el valor de la honestidad y el respeto. Pero sobre todo gracias por su amor. A ustedes les dedico esta tesis con mucho cariño.

### **A mis hermanos:**

Javier y Adriana, por ser mis cómplices a lo largo de mi vida. Gracias por las palabras de aliento, apoyo incondicional, abrazos, porras, bromas y regaños. Son lo máximo, los amo y su ejemplo me impulsa a continuar cada día. A ustedes que me roban una sonrisa cada día les dedico esta tesis.

### **A mi tía:**

A mí querida y adorada tía Luisa quien ha sido un gran ejemplo y que siempre está presente en mi mente, por ser mi mamá-tía, por sus consejos, regaños, abrazos y cariño.

### **A mi cuñada y sobrinos:**

A Alejandra Méndez, mis sobrinos Alán y José gracias por sus demostraciones de afecto, risas, ocurrencias, abrazos y palabras de ánimo.

### **A mis amigos:**

A Nancy Cruz, Madeleine Perucini, Miguel Cadeza, y Adri Prado por ser mis confidentes incondicionales, y que hicieron mis días en la UNPA más alegres. A Sergio Tello por su cariño y hacerme sonreír. A ustedes mis amigos con cariño.

### **Al amigo fiel de la familia:**

A Omar amigo inseparable y fiel de la familia (DEP), confidente incondicional de Adriana y de mi madre en momentos complicados, recordaré tu estilo y bonitos ojos azules, gracias por ser el timbre que alegró la casa durante muchos años.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Papaloapan, en especial al campus Tuxtepec, por permitirme la experiencia de culminar mi formación profesional, por los buenos momentos compartidos con mis profesores y compañeros dentro de sus instalaciones.

A la Dra. María de Jesús García Gómez, asesora de esta tesis, por haberme invitado a participar en este proyecto, y brindarme la orientación académica, técnica, así como las observaciones necesarias durante el desarrollo de la tesis.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Antonio Chel Guerrero, Co-asesor de esta tesis, por las facilidades otorgadas dentro del laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. Por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño, a la Dra. Alma Xóchil Ávila Alejandre, y al Dr. Mario A. Domínguez Magaña, por las revisiones y observaciones realizadas para mejorar esta tesis, sobre todo por su disposición y amabilidad. A la Dra. Laura gracias por su ayuda incondicional en el laboratorio, dudas, tareas, y préstamo de libros.

Al Jefe de carrera de Ingeniería en Alimentos Dr. Alejandro Aparicio Saguilán por sus consejos, disposición y apoyo en el préstamo de reactivos y equipo de laboratorio. También expreso mis agradecimientos a todos los profesores que compartieron con empeño y entusiasmo su conocimiento, así como experiencias que contribuyeron a mi formación académica y personal.

Al M. en C. Miguel Ángel García Muñoz, quién durante su función como jefe de carrera procuró el bienestar académico de sus estudiantes, sin olvidar sus sabios y alentadores consejos, así como su apoyo durante la licenciatura.

A los técnicos responsables de los laboratorios de la universidad: Q.F.B Leticia Saldaña, I.B.Q Luz del Carmen Quevedo, I.B.Q. Juan Hernández Sánchez; por su ayuda, apoyo y consejos dentro de los laboratorios. En especial a la química Lety quien siempre tuvo una sonrisa amable, pero principalmente gracias por su amistad dentro y fuera de la universidad.

Agradezco al Dr. David Betancur por el préstamo de las unidades de ultrafiltración, al Dr. Santiago Gallegos por su asesoría con los geles de electroforesis, al Dr. Luis Corzo por su ayuda en parte del desarrollo experimental, al I.Q. Felipe de Jesús Flores Narvárez y su asistente Marcos por su amabilidad y apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos.

A Iván Santos por su amistad y los momentos tan gratos dentro y fuera del laboratorio, a Will, Hanai, Muktar, Hilda, por su apoyo, gentileza, amabilidad y compañerismo durante mi estancia en el laboratorio de Ciencias de los Alimentos, a todos ellos y quienes faltan gracias.

A la Dra. Ana Karin Navarro, jefa del Laboratorio de Biotecnología por haberme permitido trabajar en dicho laboratorio. A los minions Michell Urzúa y Cris Roldan por su cariño, confianza, bromas, chistes, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigas entrañables Goretty y Karime con las que a pesar de la distancia y circunstancias mantenemos una linda amistad y espero que perdure, para seguir recordando y compartir nuevos momentos juntas. Karime por ser una amiga sensible, honesta, y muy buena vendedora. Goretty por ser mi cómplice de risas en el laboratorio, por los abrazos asfixiantes de felicidad, a las dos las quiero y gracias por ser como mis hermanas.

Al Dr. Jorge Conde, Dr. Vladimir Sánchez y al Dr. Fabricio González, gracias por su amistad, consejos, anécdotas, convivencias dentro y fuera de la universidad.

A mis amigos Madeleine y Miguel, por ser incondicionales y como de mi familia, por haberme dado palabras de aliento cuando las necesite y por siempre estar ahí. A Nancy quien siempre ha estado en los momentos más importantes, por las risas,

consejos, noches de desvelo juntas, por la convivencia diaria durante muchos años, te quiero. A Adri Prado por permitirme conocer a la chica amable, audaz, inteligente y luchona, por ser mí amiga. A Jade por su sencillez y amistad sincera. A Heidi por permitirme su confianza y amistad. A Jorge Armando porque siempre se acuerda de los amigos y no nos abandona. A Jair por su amabilidad y calidez humana. A Raúl por las convivencias, noches de insomnio y vueltas al campo de fútbol. A Sergio por compartir a mi lado el proceso de la tesis, por el cariño, detalles y ánimos que me ha dado para continuar. A todos ellos y quienes me falten les agradezco por haber estado a mi lado y dejar en mi memoria buenos recuerdos (tristezas, alegrías, fiestas, desvelos, bromas, juegos, viajes, etc.), pero sobre todo por su amistad, gracias.

A las familias Perucini Avendaño, Sánchez Campana, Hipólito Gómez, Becerra Cano, Flores Méndez, Güendulain Ramírez, Méndez García, que me han apoyado en diferentes etapas de la licenciatura y que en su momento me han demostrado cariño, aprecio y me han recibido en sus hogares, a todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de las fracciones peptídicas bioactivas obtenidas de la hidrólisis enzimática de las proteínas de la harina de la fracción vegetal del amaranto (HFVA) (*Amaranthus hypochondriacus* L.) sobre la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I). Se determinó la eficiencia de tres métodos de extracción de proteínas: M1 (Martínez y Añón 1996), M2 (Betancur *et al.*, 1998) y M3 (Soriano *et al.*, 1992), obteniendo 54.27%, 61.16% y 26.12% respectivamente, se descartó la eficiencia más baja y se determinó el método definitivo de extracción en función al rendimiento de la porción proteínica, con la metodología M2 (Betancur *et al.*, 1998) se obtuvo un rendimiento de 95.76% mayor a la metodología M1 (Martínez y Añón 1996) con 59.49%. Posteriormente se determinó el perfil electroforético de las proteínas de la HFVA, donde se presume la presencia de albúmina 1 y subunidades de globulina. El máximo grado de hidrólisis (GH) en la porción proteínica de la HFVA con Alcalasa® fue de 26.97 % y se obtuvo a los 30 min. Con el fraccionamiento por ultrafiltración del hidrolizado se obtuvieron cuatro fracciones peptídicas: F1) 5-10 kDa; F2) 3-5 kDa, F3) 1-3 kDa, y F4) < a 1 kDa, de las que la fracción con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I (*in vitro*) fue F4 con un  $IC_{50} = 0.0786$  mg/mL (78.67  $\mu$ g/mL).

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Enfermedades crónicas esenciales del adulto .....	1
1.2. Hipertensión o presión arterial alta.....	1
1.3. Sistema de regulación central de la presión arterial sanguínea (Sistema Renina-Angiotensina) .....	5
1.4. Enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA-I) .....	6
1.5. Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina .....	8
1.6. Péptidos bioactivos .....	11
1.7. Péptidos con actividad antihipertensiva .....	13
1.8. Obtención de péptidos con actividad biológica mediante hidrólisis enzimática.....	15
1.9. Fuente no convencional de proteínas: Amaranto .....	18
1.9.1. Generalidades del amaranto .....	18
1.9.2. Cultivo y distribución de la producción del amaranto .....	19
1.9.3. Composición del grano y de la fracción vegetal del amaranto .....	21
1.9.4. Actividad biológica de los péptidos de las proteínas del amaranto .....	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo General .....	25

---

4.2. Objetivos Específicos .....	25
5. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO .....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1. Obtención de materia prima .....	27
6.2. Obtención de la harina de la fracción vegetal del amaranto (HFVA).....	27
6.3. Extracción de la porción proteínica de la fracción vegetal del amaranto..	27
6.3.1 Eficiencia de los métodos de extracción de proteínas en la HFVA....	29
6.4. Determinación de proteína en la porción proteínica de la HFVA.....	29
6.5. Rendimiento de los métodos de extracción de proteínas.....	30
6.6. Electroforesis (SDS-PAGE).....	30
6.7. Hidrólisis enzimática.....	32
6.8. Determinación del grado de hidrólisis .....	32
6.8.1. Hidrólisis total de la porción proteínica .....	33
6.8.2. Determinación de proteína soluble en el hidrolizado de la porción proteínica de la HFVA. ....	34
6.9. Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración .....	34
6.10. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas del hidrolizado de la porción proteínica sobre la ECA-I .....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
7.1. Eficiencia de los métodos de extracción de proteínas.....	37
7.2. Rendimiento del proceso para la obtención de la porción proteínica .....	38
7.3. Electroforesis (SDS-PAGE).....	39
7.4. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA .....	44
7.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración sobre la ECA-I .....	49
8. CONCLUSIONES .....	53

---

9. BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS .....	66
Anexo A .....	66
Anexo B .....	69
Anexo C.....	70
Anexo D.....	72
Anexo E .....	72
Anexo F .....	73

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Reacciones catalizadas por la ECA-I en los sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y calicreína-quinina .....	6
Figura 2. Estructura y conformación de la ECA-I encontrada en plasma, en células somáticas y testiculares mostrando los sitios activos catalíticos, dependencia del zinc y las regiones N y C terminal .....	7
Figura 3. Fórmula bidimensional del captopril y su estructura tridimensional .....	9
Figura 4. Enlaces hipotéticos de los inhibidores competitivos con el sitio activo de la ECA-I.....	10
Figura 5. Sitio activo de la ECA-I que muestra las interacciones entre la ECA-I y un péptido con actividad inhibitoria de la ECA-I .....	11
Figura 6. Variedades <i>A. hypochondriacus</i> , <i>A. cruentus</i> , y <i>A. dubius</i> .....	19
Figura 7. Distribución geográfica de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. en México	20
Figura 8. Estrategia general para la obtención de fracciones peptídicas con actividad inhibitoria de la ECA-I.....	26
Figura 9. Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M1 .....	40
Figura 10. Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M2 .....	41
Figura 11. Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M3 .....	42
Figura 12. Estimación cel PM de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M3.....	43
Figura 13. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA utilizando Alcalasa® 2.4L .....	45
Figura 14. Actividad inhibitoria “ <i>in vitro</i> ” de las fracciones peptídicas sobre la ECA-I .....	49
Figura 15. Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteínas .....	71
Figura 16. Curva estándar de L-Serina para la determinación del %GH por el método de OPA.....	72

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación de los niveles de presión sanguínea en humanos.....	3
Tabla 2. Medicamentos para el tratamiento de la hipertensión en México .....	4
Tabla 3. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo .....	12
Tabla 4. Péptidos con actividad antihipertensiva obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas de diversas fuentes .....	14
Tabla 5. Proteasas comerciales de grado alimenticio utilizadas para la obtención de hidrolizados .....	16
Tabla 6. Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana .....	20
Tabla 7. Composición proximal del grano de amaranto .....	21
Tabla 8. Composición proximal de la fracción vegetal del amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) .....	22
Tabla 9. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE .....	31
Tabla 10. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE .....	31
Tabla 11. Composición de buffer muestra para electroforesis SDS-PAGE.....	31
Tabla 12. Ensayo de la inhibición de la ECA-I utilizando diferentes fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de la porción proteínica de la fracción vegetal del amaranto .....	36
Tabla 13. Rendimiento de las metodologías de extracción de proteínas .....	39
Tabla 14. Comparación del peso molecular aparente de albúmina de amaranto utilizando diferentes métodos de extracción .....	44
Tabla 15. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA .....	45
Tabla 16. Grados de hidrólisis de diferentes fuentes proteínicas con Alcalasa y Flavorzima.....	48
Tabla 17. Comparación de la actividad inhibitoria de hidrolizados y fracciones peptídicas de fuentes vegetales sobre la ECA-I.....	52
Tabla 18. Volúmenes utilizados en la preparación de la curva estándar de L-Serina .....	69

Tabla 19. Concentraciones utilizadas para la obtención de la curva estándar de BSA ..... 70

Tabla 20. Concentraciones utilizadas para la obtención de la curva estándar de L-Serina..... 72

Tabla 21. Marcador de PM utilizado en la electroforesis SDS-PAGE ..... 73

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Enfermedades crónicas esenciales del adulto

A nivel mundial la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, o también denominadas enfermedades crónicas esenciales del adulto (ECEA), tales como hipertensión arterial sistémica (HTAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), dislipidemias, obesidad, aterosclerosis, entre otras; han demostrado un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, llegando a superar la prevalencia de las enfermedades transmisibles en el adulto. (Rosas *et al.*, 2005).

La prevalencia de HTAS guarda estrecha relación con la edad, medio ambiente-estilo de vida, género y factores comórbidos, tales como diabetes, obesidad, dislipidemias, tabaquismo y predisposición genética (Rosas *et al.*, 2004). Generalmente, el paciente acude al médico cuando ya han transcurrido varios años desde el inicio de su HTAS y, probablemente, ya habrá en su mayoría algún grado de daño a órganos blanco.

En México, de acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, se estima que hay 22.4 millones de adultos, de 20 años o más, que padecen hipertensión arterial, únicamente 11.2 millones han sido diagnosticados por médicos, y de estos, sólo 5.7 millones mantienen su padecimiento controlado (ENSANUT, 2012).

### 1.2. Hipertensión o presión arterial alta

La hipertensión arterial es un padecimiento multifactorial que puede dañar órganos vitales, por lo que está considerado como un problema importante de salud pública. Se define como la elevación patológica de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos (Hong *et al.*, 2003) y está asociada con daño en las arterias y en diversos parénquimas (conglomerados de células de igual

diámetro formando meatos entre sí y que pueden elaborar y almacenar sustancias). Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la hipertensión como el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS), es decir el impacto de la vida moderna; la sobreproducción de hormonas ahorradoras de sodio y vasoconstrictoras; la alta ingesta de sodio; la inadecuada ingesta de potasio y calcio; el incremento en la secreción o la inapropiada actividad de la renina, con resultante incremento en la producción de angiotensina-II (Ang-II) y aldosterona; la deficiencia de vasodilatadores, tales como la prostaciclina, el óxido nítrico (ON) y los péptidos natriuréticos; la alteración en la expresión del sistema caliceína-cinina o sencillamente sistema cinina, que afecta al tono vascular y el manejo renal del sodio; las anomalías en los vasos de resistencia, incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la remodelación vascular y la reducción de la complacencia (Gamboa, 2006.)

La presión arterial se mide mediante la presión sistólica dada por la sístole: que es la contracción del músculo cardíaco, representando el máximo esfuerzo; y por la presión diastólica, dada por la diástole: que es la relajación del corazón, permaneciendo las arterias con el mínimo flujo de sangre (Torresani y Somoza, 1999). El nivel de presión arterial es un importante parámetro para el diagnóstico y el abordaje terapéutico, siempre y cuando se tome en cuenta el contexto del enfermo, pues su clasificación está dada según el nivel de presión arterial expresada en mm de Hg (Tabla 1).

En general se acepta que presiones menores a 120/80 mm de Hg, representan las cifras con menor riesgo para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares, de ahí que reciba el término de óptimo. Mientras que de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), el valor límite para definir a un paciente con HTAS debe ser igual o mayor a 140 mm de Hg en la presión sistólica y/o un valor igual o mayor a 90 mm de Hg en la diastólica (Rosas *et al.*, 2004).

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

Categoría	Sistólica (mm de Hg)	Diastólica (mm de Hg)
Óptima	< 120	< 80
Presión arterial normal	120 a 129	80 a 84
Presión arterial fronteriza*	130 a 139	85 a 89
Hipertensión 1	140 a 159	90 a 99
Hipertensión 2	160 a 179	100 a 109
Hipertensión 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	< 90

\*Las personas con PA normal (con factores de riesgo asociados) o fronteriza aun no tienen hipertensión pero tienen alto riesgo de presentar la enfermedad por lo que ellos y los médicos deben estar prevenidos de dicho riesgo e intervenir para retrasar o evitar el desarrollo de la HTAS. La importancia de considerar los diferentes valores de la PA reside en la coexistencia con otros factores de riesgo y/o daño orgánico (subclínico o establecido) que incrementan la morbilidad y la mortalidad.

FUENTE: Resumen integrado de la NOM-030-SSA2-2009 y Guía de Tratamiento Farmacológico y Control de la HTAS, 2012

Esta enfermedad ha sido tratada con medicamentos sintéticos que inhiben a la enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA-I), responsable de la alteración de la presión normal de la sangre, cuando esta circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano. Dentro de los medicamentos más comunes en el mercado se encuentran los inhibidores de la ECA I, los  $\beta$ -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de la Ang-II, todos ellos han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión (Tabla 2). Las desventajas de los medicamentos sintéticos, es que son costosos y durante su uso a corto y largo plazo pueden producir reacciones secundarias como tos, alteraciones del sentido del gusto y sarpullidos en la piel (Atkinson y Robertson, 1979).

Tabla 2. Medicamentos para el tratamiento de la hipertensión en México

Subgrupo	Nombre genérico	Nombre comercial	Efectos adversos
<b>Natriuréticos</b>			
Tiazidas	Clortalidona Hidroclorotiazida Indapamida	Higrotón 50 Diclotride, Rofucal NatriliX	Aumento en los niveles de colesterol y glucosa, Hiperuricemia.
Ahorradores de potasio	Espirionalactona Ambilorida + HCTZ Triamtereno+ HCTZ	Aldactone, Vivitar Moduretic Dyazide	Ginecomastia, Hipercalemia
De asa	Furosemida Bumetanida	Lasix Miccil	Deshidratación, hipocalcemia
<b>Agentes de acción en el Sistema Nervioso</b>			
Central	Metildopa Moxonidina	Aldomet Norcylnt	Rebote por supresión, depresión, bradicardia
<b><math>\beta</math>-bloqueadores</b>			
Cardioselectivos	Atenolol Bisoprolol Metoprolol	Tenomin, Boltex Concor Lopresor, Seloken Zok	Broncoespasmo, bradicardia, insuficiencia cardíaca, vasoconstrucción periférica,
No cardioselectivos	Nadolol Pindolol Propranolol	Corgard Visken Inderalici	insomnio, fatiga, hipertrigliceridemia
<b><math>\beta</math>-bloqueadores con efecto vasodilatador</b>			
	Carvedilol	Carvamis, Dilatrend	Hipotensión postural, broncoespasmo
<b>Bloqueadores <math>\alpha</math>-1</b>			
	Doxazosina Prazosina Terazosina	Cardura Minipres Hytrin	Hipotensión postural, cefalea, palpitaciones, edema
<b>Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina</b>			
	Benazepril Captopril Cilazapril Enalapril Fosinopril Lisinopril Moexipril Perindopril Quinapril Ramipril	Lotensin Capotena, Captral Inhibace Pulsol, Renitec Monopril Prinivil, Zestril Renoprotec Coversyl Acupril Tritace	Tos seca, rara vez angioedema, hipercalemia, eritema, disgeusia, leucopenia
<b>Inhibidores de la renina</b>			
	Aliskiren	Rasilles	Diarrea
<b>Antagonistas de los receptores AT1</b>			
	Losartán Olmesartan Valsartán	Ara 2, Cozaar Almetec Diovan	Angioedema infrecuente, hipercalemia

Fuente: Revista Mexicana de Cardiología 2012

### 1.3. Sistema de regulación central de la presión arterial sanguínea (Sistema Renina-Angiotensina)

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los sistemas de regulación central de la presión arterial sanguínea y la patogénesis de la hipertensión está estrechamente asociada con desórdenes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en el que la renina escinde el decapeptido angiotensina-I (Ang-I) del dominio N-terminal del angiotensinógeno (Matsui *et al.*, 2003; Santeliz *et al.*, 2008). El angiotensinógeno circulante (Ao) es una glicoproteína que se produce en el hígado y es el sustrato inicial del SRAA (Figura 1). La renina es la enzima que reacciona con el Ao, dando lugar a la Ang-I. La ECA-I actúa por un lado hidrolizando el decapeptido Ang-I para producir Ang-II que es el vasoconstrictor y por otro lado degrada el péptido vasodilatador bradiquinina. Por ser un potente vasoconstrictor la Ang-II actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso simpático, tanto periféricamente como centralmente para incrementar el tono vascular. La acción de la Ang-II está mediada por los receptores AT<sub>1</sub> provocando la vasoconstricción (efecto perjudicial), y los receptores AT<sub>2</sub> causante de la vasodilatación (efecto benéfico) en el organismo (Scow *et al.*, 2003). Además de participar en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas, la Ang-II, está vinculada con la modulación de la transmisión sináptica, estimulación de secreción de la vasopresina, estimulación de la sed, vasoconstricción, estimulación de la aldosterona por la corteza suprarrenal y acción mitogénica, modula la excreción renal de Na<sup>+</sup>, la contracción y relajación del miocardio, y el tono vascular (Touyz y Schiffrin, 2000; Touyz, 2004).

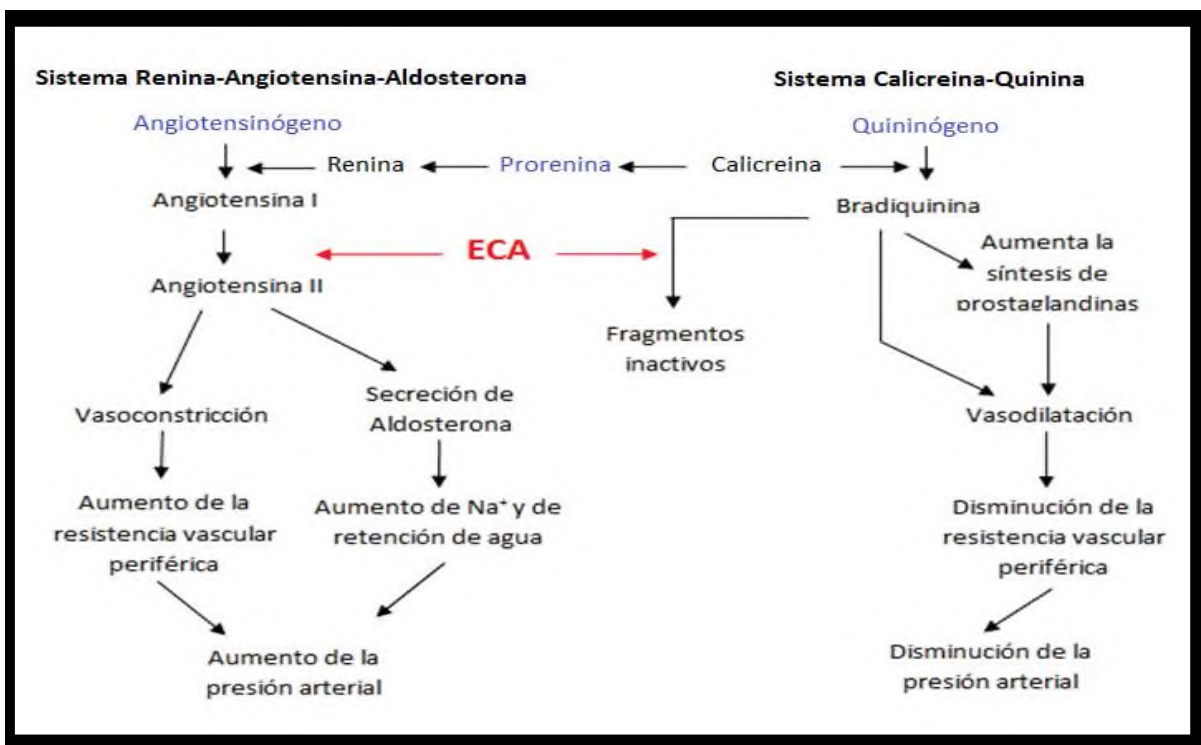


Figura 1. Reacciones catalizadas por la ECA-I en los sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y caliceína-quinina (Segura *et al.*, 2013)

#### 1.4. Enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA-I)

La enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I), descubierta en 1954, fue llamada en principio enzima convertidora de hipertensina. Su acción de convertir el péptido inactivo (Ang-I) en el péptido vasoconstrictor (Ang-II), fue evaluada en plasma purificado de ganado equino en presencia de ion clorito, de ahí surgió su nombre actual (Skeggs *et al.*, 1956). La ECA-I se encuentra en células epiteliales, células endoteliales (principalmente en el pulmón), neuroepiteliales y mononucleares, en fluidos biológicos como orina, líquido cerebroespinal y líquido amniótico. También se localiza en hígado, en las vellosidades de las membranas del intestino, en placenta y en el plexus coroide (Soubrier *et al.*, 1993).

En la actualidad se sabe que la ECA-I, que se encuentra en la gran mayoría de los mamíferos, es una proteasa conocida como peptidil dipeptidasa A o cininasa II, (E.C. 3.4.15.1) (Corvol *et al.*, 1995; Corvol y Williams, 1998). Es una zinc

carboxipeptidasa por contener este metal en su sitio activo. Su función principal, es transformar la Ang-I a Ang-II e inactivar el péptido vasodilatador bradiquinina (Tzacos *et al.*, 2003). Se han identificado tres formas de la ECA (Figura 2):

a) La forma somática (sECA) distribuida en las células endotelial, epitelial y neuroepitelial. Su peso molecular varía entre 150 y 180 kDa, ésta consiste de los dominios homólogos N y C

b) La forma testicular (tECA) presente en células germinales masculinas por lo que se relaciona con la maduración del espermatozoides en varones (Soubrier *et al.*, 1993). Tiene un peso molecular entre 90 y 110 kDa, está compuesta por el sitio activo del dominio-C y una porción del dominio-N, pero sin el sitio activo del dominio-N (Tzacos *et al.*, 2003)

c) La ECA (hECA) o ECA-2, denominada como un homólogo o forma soluble, se ha aislado mediante la acción de una secretasa y se ha encontrado en suero sanguíneo y otros fluidos corporales; sin embargo, aún no se esclarece su participación fisiológica en el ser humano (Parvathy *et al.*, 1997; Turner y Hooper, 2002).

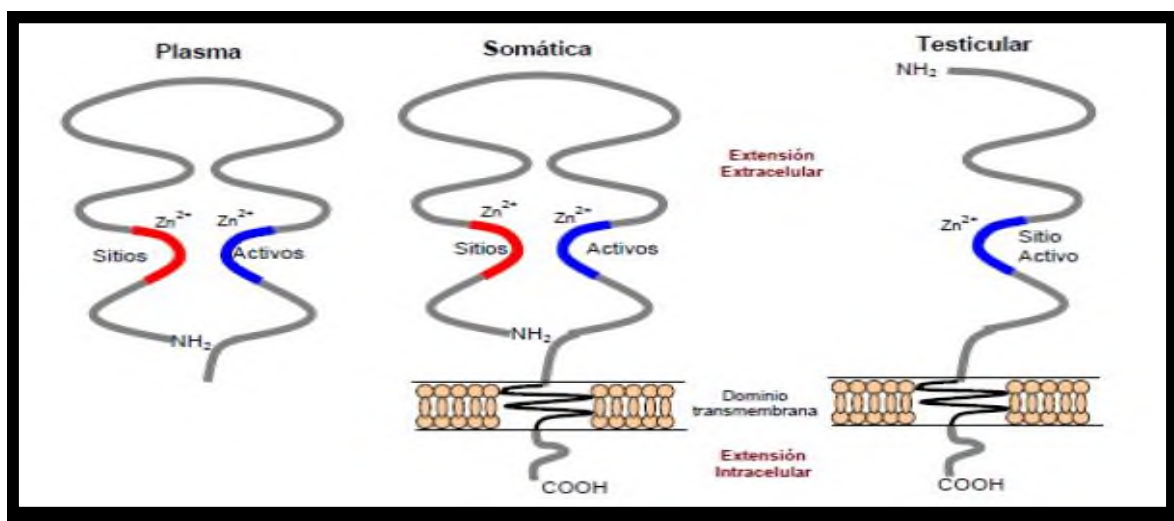


Figura 2. Estructura y conformación de la ECA-I encontrada en plasma, en células somáticas y testiculares mostrando los sitios activos catalíticos, dependencia del zinc y las regiones N y C terminal (Johnston, 1992)

La ECA-I presenta dos dominios, ambos dominios son capaces de hidrolizar la Ang-I y la bradiquinina, además el sitio activo del dominio-N es capaz de hidrolizar otros sustratos, incluyendo la sustancia P (neurotransmisor), precursores de encefalinas, la hormona luteinizante, péptidos  $\beta$ -amiloides y el derivado activo 1-7 de la Ang-II, Ang (1-7), entre otros (Benishin, 2005). Ambas isoformas de la ECA-I, sECA y tECA, se encuentran en la estructura de la membrana plasmática, en la que la parte del dominio-C se halla en la extensión intracelular, en tanto que la mayor parte de la cadena de la ECA-I permanece fuera de la célula; por esta razón se les ha denominado ectoenzimas cuya misión es hidrolizar péptidos circulantes en el exterior de las células (Domínguez *et al.*, 2012).

### 1.5. Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina

Como ya se explicó anteriormente, la ECA tiene dos funciones principales en el organismo. Por un lado, se encarga de sintetizar el octapéptido responsable de la vasoconstricción (péptido formado por 8 aminoácidos) Ang-II de su pre estadio inactivo, a partir del decapeptido (10 aminoácidos) Ang-I, separando dos aminoácidos C terminales. Por el otro, cataliza la eliminación del mediador bradiquinina en productos inactivos. La inhibición de la ECA-I hace que la concentración de angiotensina II en los receptores de angiotensina (AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>) disminuya. Así, empieza reduciendo el tono vascular y la presión sanguínea disminuye.

A principios de 1974, se demostró la eficacia de algunos fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, pero el desarrollo de un agente oral eficaz para su uso en terapia crónica parecía distante. Sin embargo, tan solo un año y medio después se sintetizó el captopril, un potente y específico inhibidor de la ECA-I, activo por vía oral (Cushman, *et al.*, 1981).

El captopril (Figura 3), es un fármaco inhibidor de la ECA-I que puede ser considerado como un análogo del dipéptido Ala-Pro de la región C-terminal del péptido aislado del veneno de la serpiente brasileña BPP5a (pentapéptido potenciador de la bradiquinina), en el que el grupo funcional amina de la alanina es

reemplazado por el grupo sulfhidrilo, que interactúa con mayor fuerza con el ión zinc catalítico de la ECA-I. En forma adicional, el grupo carboxilo terminal interactúa con la carga positiva de la arginina que se localiza en el sitio activo de la ECA-I, en tanto que el grupo carbonilo lo hace con el enlace donador de hidrógeno de la tirosina y el anillo heterocíclico del residuo prolina lo hace con el subsitio hidrofóbico de la enzima en la posición S2', finalmente el grupo metilo lo hace con el subsitio S1' (Büning, 1987; Cushman *et al.*, 1981, 1989).

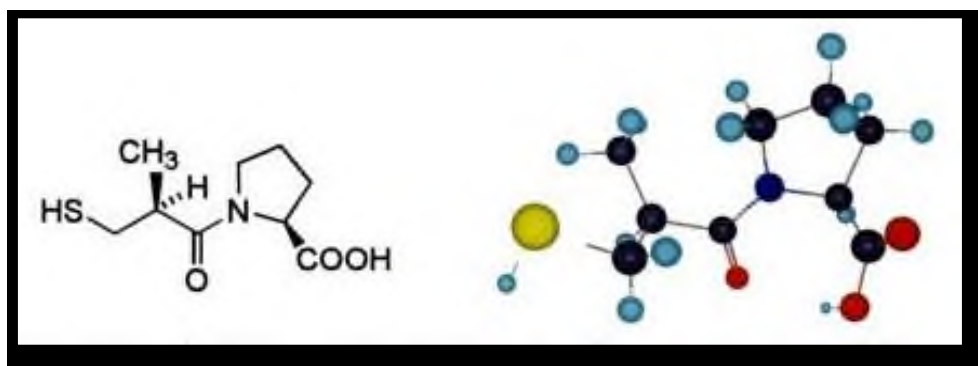


Figura 3. Fórmula bidimensional del captopril y su estructura tridimensional (Delgado *et al.*, 2004)

Otro fármaco análogo a la región C-terminal del tripéptido Phe-BPP5a, es el metabolito enalaprilat. Éste es la forma ácida activa liberada a partir del fármaco enalapril, el cual se administra como un precursor éster y el metabolito se libera después de la digestión intestinal (Johnston *et al.*, 1986). El enalaprilat se une con el sitio activo de la ECA-I empleando las demás interacciones del residuo del BPP5a en la región C-terminal, reemplazando la débil interacción de su región amida carbonilo con el ión zinc de la enzima, por la fuerte interacción del carboxilo del enalaprilat, a su vez esta interacción sirve para que no sea hidrolizado por la propia ECA-I. También existen otros inhibidores de la ECA-I que cuentan en su estructura con la función hidroxifosfonil que liga al átomo de zinc de la enzima.

De forma más clara en la figura 4 se resumen los mecanismos de inhibición de la ECA-I por el captopril, enalaprilat y el tripéptido Phe-Ala -Pro, donde S1, S1' y S2' son los subsitios que interactúan con el último, penúltimo y antepenúltimo residuo de aminoácido de la región C-terminal del inhibidor, mientras X-H es un donador de hidrógeno, en tanto que X es un aceptor de hidrógeno (Cushman *et al.*, 1989).

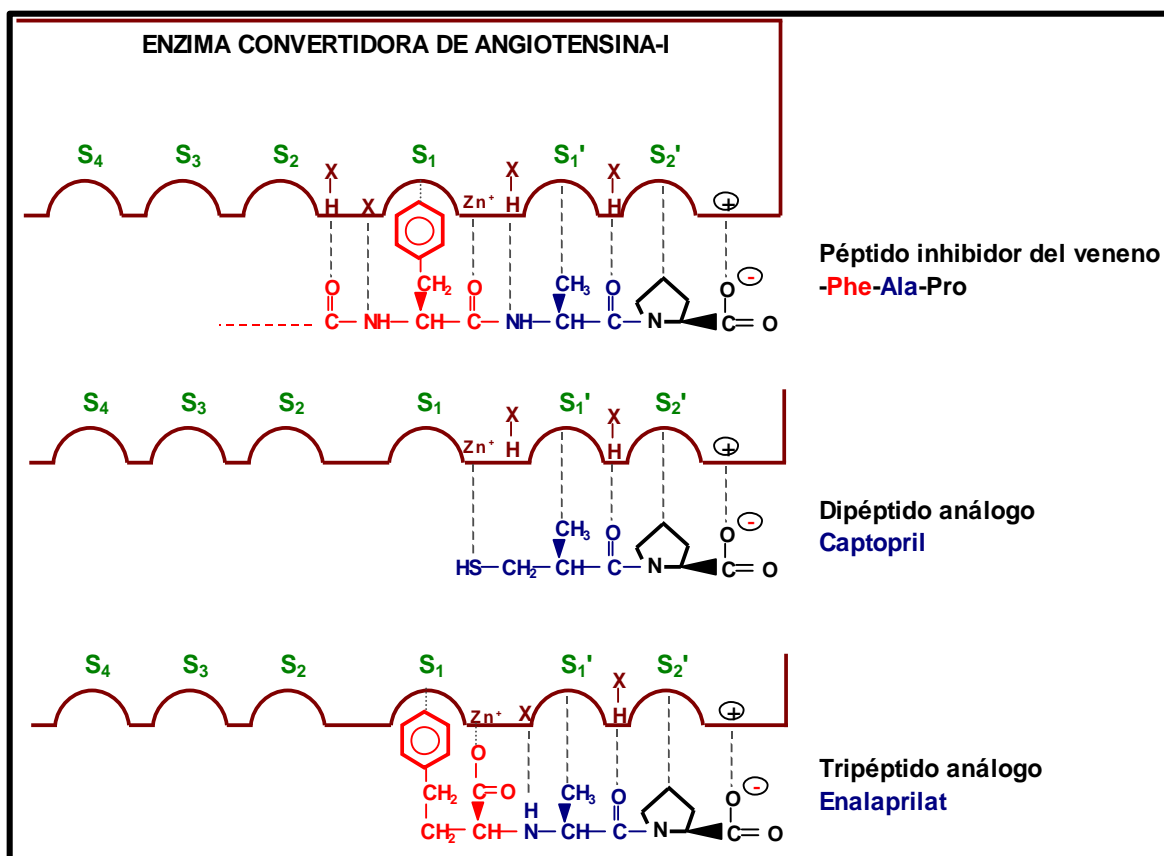


Figura 4. Enlaces hipotéticos de los inhibidores competitivos con el sitio activo de la ECA-I (Domínguez et al., 2012)

Estos fármacos han sido considerados como inhibidores competitivos, reversibles y de rápida acción para enlazarse con la ECA-I provocando la inhibición (Büning, 1987), y se pueden agrupar de acuerdo a la función de inhibición que tiene su fórmula o estructura de la siguiente manera:

- a) Fármacos que tienen la función sulfhidrilo
- b) Fármacos que tienen la función carboxilo
- c) Fármacos que tienen la función fosfonilo (Domínguez *et al.*, 2012)

Otro tipo de compuestos que inhiben a la ECA-I son los péptidos bioactivos, estos muestran características estructurales comunes, es decir, son péptidos de longitud relativamente corta con aminoácidos hidrofóbicos (prolina, lisina o arginina). La funcionalidad de los péptidos inhibidores de la ECA-I se basa en la relación estructura-actividad. Estos péptidos son considerados como sustratos competitivos

para la ECA-I, y su actividad está influenciada por la secuencia de los tres últimos aminoácidos de la región C-terminal, principalmente aminoácidos de carácter hidrofóbico. Se ha postulado que la carga positiva asociada con el grupo funcional de la cadena lateral de estos aminoácidos contribuyen a la potencia inhibitoria de la ECA-I (Fang *et al.*, 2008).

En el trabajo de investigación de Ondetti *et al.*, (1982), se propuso un modelo donde los residuos de la región C-terminal pueden interactuar con los subsitios S1, S1', y S2 del sitio activo de la ECA-I, ya que ésta tiene mayor especificidad por sustratos o inhibidores competitivos que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las últimas tres posiciones de la región C-terminal (Figura 5).

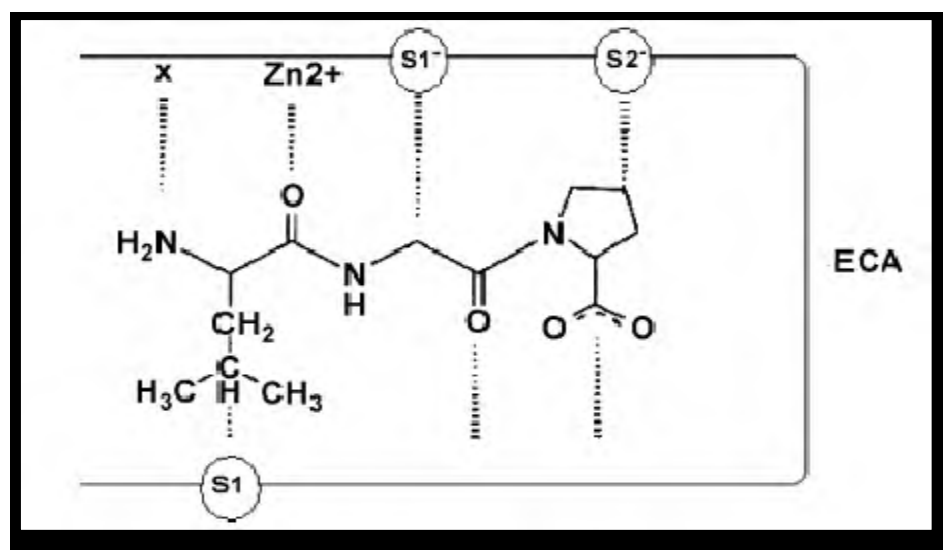


Figura 5. Sitio activo de la ECA-I que muestra las interacciones entre la ECA-I y un péptido con actividad inhibitoria de la ECA-I (Fang *et al.*, 2008)

## 1.6. Péptidos bioactivos

Actualmente los péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector de los alimentos funcionales. Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones del cuerpo y pueden influir en la salud (Kitts y Weiler, 2003). Generalmente, son péptidos compuestos de 3 a 20

aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud; pueden ser liberados durante el proceso industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal contribuyendo en la regulación y modulación metabólica (Pihlanto *et al.*, 2008). A su vez los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto sobre algunos sistemas como el cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso (Tabla 3) (FitzGerald *et al.*, 2000; Korhonen y Pihlanto, 2006), lo que sugiere su uso como productos nutracéuticos y/o ingredientes de alimentos funcionales que coadyuven para la prevención de enfermedades.

Se han aislado péptidos bioactivos, tanto de fuentes animales como vegetales; entre las primeras se pueden mencionar a la caseína, el queso a base de suero de la leche (requesón), la leche fermentada, el músculo de pollo y pescado, entre otras; de origen vegetal se han aislado del gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, garbanzo, frijol mungo, etc. (Megías *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003) los cuales han presentado diversas actividades biológicas.

**Tabla 3. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo**

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

### 1.7. Péptidos con actividad antihipertensiva

Como se mencionó anteriormente la hipertensión es una de las enfermedades de mayor impacto en el mundo, por lo que se han estado buscando alternativas nuevas para su tratamiento, es por esto que en los últimos años los péptidos bioactivos más estudiados en alimentos son los antihipertensivos. Existen estudios que demuestran que este tipo de péptidos inhiben la actividad de la ECA-I, que está relacionada con la regulación de la presión arterial por la modulación del sistema SRAA (Wang *et al.*, 2005), es decir, son los responsables de disminuir la presión arterial en animales de laboratorio (Matsufuji *et al.*, 1995) y en individuos hipertensos (Matsui *et al.*, 2000); un ejemplo es el nonapéptido SQ20881 (Tripotide) Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro aislado del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* cuya secuencia de aminoácidos mostró un mayor efecto al disminuir la presión sanguínea de animales modelos con hipertensión, y un efecto marcado en el tratamiento de la hipertensión en humanos (Guan *et al.*, 2004). Generalmente, este tipo de péptidos contiene de 5 a 13 residuos de aminoácidos, por molécula, y muchos de ellos presentan la secuencia Ala-Pro o Pro-Pro en la región C-terminal. La mayoría de los biopéptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I se han identificado como productos de la hidrólisis enzimática de proteínas, de diversos orígenes, presentes en los alimentos (Tabla 4).

**Tabla 4. Péptidos con actividad antihipertensiva obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas de diversas fuentes**

Fuente	Secuencia (aminoácidos liberados por proteasas comerciales)	IC <sub>50</sub>	Referencia
Arroz	TQVY	18.2 <sup>a</sup>	Fang <i>et al.</i> , (2008)
Espinaca	MRWRD	0.0021 <sup>a</sup>	Yang <i>et al.</i> , (2003)
	MRW	0.0006 <sup>a</sup>	
	LRIPVA	0.00038 <sup>a</sup>	
	LAYKPAG	0.0042 <sup>a</sup>	
Gelatina	GPAGAZ+GPPGAZ	8 <sup>a</sup>	Oshima <i>et al.</i> , (1979)
Germen de trigo	I(VY)	0.5 <sup>a</sup>	Matsui <i>et al.</i> , (2000)
Legumina de chícharo	MD	0.021 <sup>a</sup>	Yust <i>et al.</i> , (2003)
	MDFLI	0.011 <sup>a</sup>	
	MDL	0.013 <sup>a</sup>	
	MFDL	0.021 <sup>a</sup>	
	MDLA	0.013 <sup>a</sup>	
Microalga ( <i>Spirulina platensis</i> )	IAPG	11.40 <sup>b</sup>	Suetsuna <i>et al.</i> , (2001)
Músculo de pollo	FKGRYYP	0.55 <sup>b</sup>	Fujita <i>et al.</i> , (2000)
	IKW	0.21 <sup>b</sup>	
Músculo de sardina	KW	1.63 <sup>b</sup>	Matsui <i>et al.</i> , (1993)
	AKK	3.13 <sup>b</sup>	Matsui <i>et al.</i> , (1994)
	GWAP	3.86 <sup>b</sup>	
Músculo porcino	MNP	67 <sup>a</sup>	Arihana <i>et al.</i> , (2001)
Plasma humano	LIY 2-aceína	0.8 <sup>a</sup>	Nakagomi <i>et al.</i> , (2000)
Semilla de girasol	FVNPQAGS	0.0069 <sup>a</sup>	Megías <i>et al.</i> , (2004)
Sésamo	LVY	0.0018 <sup>a</sup>	Fang <i>et al.</i> , (2008)
	LSA	0.00781 <sup>a</sup>	
Soya	DLP	5 <sup>a</sup>	Wu y Ding (2001)
Trigo	YQY	4 <sup>a</sup>	Li <i>et al.</i> , (2002)

<sup>a</sup>(mM)

<sup>b</sup> (μmol/L)

Fuente: Domínguez *et al.*, 2012

### **1.8. Obtención de péptidos con actividad biológica mediante hidrólisis enzimática**

Los hidrolizados han sido utilizados para muchos propósitos, tales como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios, en la formulación de productos farmacéuticos, así como para reducir la alergenicidad de la proteína y en la obtención de péptidos bioactivos (Tardioli *et al.*, 2003).

Para la obtención de los hidrolizados se tienen dos alternativas, la hidrólisis química y la hidrólisis enzimática. La hidrólisis realizada bajo condiciones ácidas o alcalinas, provoca efectos desfavorables en la calidad del hidrolizado, ya que se destruyen los L-aminoácidos y se forman compuestos tóxicos como la lisinoalanina. Se ha reportado que la hidrólisis alcalina favorece la descomposición de aminoácidos como la arginina y cisteína; mientras que con la hidrólisis ácida se elimina el triptófano y desaminan aminoácidos como serina y treonina (Guadix *et al.*, 2000). En cambio, la hidrólisis enzimática presenta algunas ventajas frente a la tradicional hidrólisis química. Dentro de estas ventajas se pueden mencionar la selectividad y especificidad de las enzimas para un aminoácido en particular y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos secundarios. Además se realiza bajo condiciones moderadas de temperatura (40 a 60 °C) y pH (entre 4 a 8); lo que permite que se mantenga el valor nutritivo de los hidrolizados (Guadix *et al.*, 2000).

Durante la hidrólisis enzimática de las proteínas, la selección de la enzima 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). Existen un gran número de enzimas que han sido utilizadas en la producción de hidrolizados proteínicos de diferentes fuentes (Tabla 5) por lo que un factor importante a considerar es su actividad específica.

Tabla 5. Proteasas comerciales de grado alimenticio utilizadas para la obtención de hidrolizados (Benítez *et al.*, 2008)

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temperatura óptima (°C)	Intervalo óptimo de pH	Sitio de acción catalítica	
<b>Serinproteasa</b>						
Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30 - 60	7 - 9	-*Lys (o Arg) -*Trp ( Tyr, Phe, Leu) -*Ala	
	Quimiotripsina		45 - 55	8 - 9		
	Elastasa					
Bacteriana	Subtilisin, Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	50 - 60	6 - 10	*AA <sub>hf</sub>	
	Alcalasa					
	Subst. BPN	<i>Bacillus</i>	40 - 55	6 - 10		
	Subtilisin Novo	<i>amyloliquefaciens</i>				
<b>Cisteinproteasas</b>						
Plantas	Papaína	Papaya	40 - 75	5 - 8	-*Phe (o Val, Leu)	
	Bromelaína	Piña	20 - 65	5 - 8	-*AA <sub>hf</sub>	
	Ficina	Látex de <i>Ficus</i>		5 - 8		
<b>Aspartato proteasas</b>						
Animal	Pepsina	Porcino, bovino	NR	1 - 4	- Phe (o Tyr, Leu)	
	Quimosina	Becerro		4 - 6	- Trp (o Phe, Tyr)	
Fúngica	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35 - 50	2 - 5	Glu, Asp, Leu*	
	Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40 - 50	3 - 6	Similar a la pepsina	
<b>Metaloproteasas</b>						
Animal	Carboxipeptidasa A	Pancreas		6 - 7, 5	- Phe, Leu, Val*	
Bacteriana	Neutrasa®	<i>B. amyloliquefaciens</i>	40 - 55	7 - 9	-Ile, Leu, Val, Phe*	
	Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>				
<b>Preparaciones enzimáticas</b>						
	Mezcla papaína, quimopapaína y lisozima	Papaína cruda	Fruto de la papaya	NR	5 - 9	Amplia especificidad
	Mezcla de tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa.	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30 - 80	7 - 9	Muy amplia especificidad
	Mezcla de serin, aspartato y metaloproteasas	Veron P Sumicina LP Biocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40 - 55	4 - 8	Muy amplia especificidad
	Mezcla de endo y exo proteasas, actividad en pH alcalino y neutro	Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>	NR	7 - 9	Muy amplia especificidad

\*Indica el sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato

AA<sub>hf</sub> Indica los aminoácidos hidrofóbicos

NR: no reportada

Los parámetros fundamentales a considerar en una hidrólisis enzimática son la concentración del sustrato, la relación enzima-sustrato, pH y temperatura de reacción, la naturaleza de la enzima; todos estos factores en conjunto influyen en el grado de hidrólisis y el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.*, 2008).

El grado de hidrólisis (GH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados (Adler-Nissen, 1977), es la propiedad fundamental de un hidrolizado y determina en gran medida las características del mismo y por tanto su posible uso. Los hidrolizados proteínicos se pueden agrupar en hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (GH de 1 a 10%), que sirven para el mejoramiento de las propiedades funcionales; hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como saborizantes; y por último hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para usos en alimentación especializada (Benítez *et al.*, 2008).

Existen diversos métodos para la determinación del GH, dentro de los más utilizados se encuentran el pH-stat (basado la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH), TNBS (ácido trinitrobenzenosulfónico) que se basa en la determinación de los grupos  $\alpha$ -amino libres y la reacción primaria de estos grupos con el ácido trinitrobenzenosulfónico, el método de OPA (ortofenilftaldehído) que se fundamenta en una reacción colorimétrica entre el ortofenilftaldehído y el grupo  $\alpha$ -amino en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol detectable a 340 nm, el método de SN-TCA (nitrógeno soluble en ácido tricloroacético) este método como su nombre lo indica se basa en la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético, y debido a sus diferencias presentan ventajas y desventajas (rapidez, monitoreo en tiempo real, derivatización del uso de compuestos tóxicos, etc.) (Nielsen *et al.*, 2001; Rutherford, 2010; Guadix *et al.*, 2000).

## 1.9. Fuente no convencional de proteínas: Amaranto

### 1.9.1. Generalidades del amaranto

Existen evidencias arqueológicas que indican que el amaranto es originario de América y que fue uno de los alimentos más importantes en el México prehispánico. El huauhtlí, como lo llamaban los aztecas, llegó a ser uno de los cuatro cultivos más importantes junto con el maíz, el frijol y la chíá. Tras la conquista española el amaranto fue prohibido al igual que otros cultivos, lo que ocasionó que se convirtiera en un cultivo subutilizado. En 1979, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos y la FAO propusieron que debido a su alta calidad nutricional el amaranto podría ser un grano con gran potencial para ser explotado comercialmente (National Academy of Sciences, 1984). El amaranto puede consumirse casi desde la siembra, en forma de germinado, de hojas tiernas en ensalada, o molidas para servirse en forma de sopa, pero se consume principalmente el grano como cereal reventado, del cual se elaboran diferentes productos como: alegrías, galletas, granola, atole, horchata, bebidas chocolatadas, hojuelas, harinas, etc. (Bressani, 1995).

De acuerdo con su clasificación taxonómica el amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae*, sub-familia *Amaranthoideae*, género *Amaranthus*. El género *Amaranthus* comprende aproximadamente 60 especies (Sauer, 1967). Es una planta dicotiledónea no gramínea que produce semillas tipo granos, por lo que se le ha denominado como pseudocereal (Belton y Taylor, 2002). Por el tipo de usos que tiene, el amaranto se clasifica también como amaranto de grano y foliáceo, aunque también se usa con fines ornamentales. Dentro de las especies productoras de grano se reconocen a *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, originarias de América; mientras que entre los amarantos productores de hoja, se encuentran *A. cruentus*, *A. dubius*, *A. hybridus* y *A. tricolor*, todos ellos cultivados principalmente en Asia y África (Shukla *et al.*, 2006; Morales-Guerrero *et al.*, 2009). Las principales especies productoras de grano cultivadas en México y Guatemala son *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, y en Perú es *A. caudatus*, (Hernández-García y Herrerías-Guerra, 1998).



Figura 6. Variedades *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, y *A. dubius* (Mapes-Sánchez, 2010)

### 1.9.2. Cultivo y distribución de la producción del amaranto

Desde el punto de vista agronómico, el amaranto es un cultivo que prospera en regiones de baja precipitación donde los cultivos básicos tienen poco éxito. Es muy resistente a la sequía y al calor y requiere menos cantidad de agua. Es un cultivo fácil de establecer y crece vigorosamente, adaptándose a nuevos medios (Mapes-Sánchez, 2010). Dicho lo anterior el amaranto es una planta muy versátil por su resistencia a heladas, plagas y a su adaptación en diferentes tipos de suelo, además de que los granos de amaranto poseen alto contenido de proteína (13-17%) y su composición de aminoácidos es cercana al balance óptimo requerido en la dieta humana (Barba de la Rosa *et al.*, 1992).

En la República Mexicana, las zonas de producción y cultivo de amaranto son las mismas de la época precolombina, es decir Puebla, Morelos, México, Distrito Federal, Tlaxcala, Oaxaca, Jalisco y Querétaro; aunque actualmente los estados con mayor producción de amaranto son el Distrito Federal, México, Morelos, Puebla Querétaro y Tlaxcala (Tabla 6, Figura 6). Se estima que el rendimiento medio nacional del grano es de 1.0 t/ha (Martínez, 2010) mientras que el rendimiento de la fracción vegetal es de 3.8 a 4.1 t/ha de peso fresco en variedades de *Amaranthus hypochondriacus* (Soriano *et al.*, 2004).

Tabla 6. Principales estados productores de amaranto en la República Mexicana

Ubicación	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	PMR <sup>a</sup> (\$/t)	Valor Producción (Miles de pesos)
<b>Distrito Federal</b>	183.00	138.00	157.20	1.14	19,538.17	3,071.40
<b>México</b>	187.50	187.50	362.08	1.93	11,148.46	4,036.64
<b>Morelos</b>	270.00	270.00	372.00	1.38	15,000.00	5,580.00
<b>Puebla</b>	2,333.30	2,233.30	2,886.82	1.29	3,472.61	10,024.80
<b>Querétaro</b>	2.00	2.00	1.40	0.70	15,000.00	21.00
<b>Tlaxcala</b>	461.00	461.00	499.20	1.08	9,445.19	4,715.04
	<b>3,336.80</b>	<b>3,291.80</b>	<b>4,278.70</b>	<b>1.30</b>	<b>6,415.24</b>	<b>27,448.87</b>

<sup>a</sup> Precio Medio Rural. Fuente: Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2012, SAGARPA



Figura 7. Distribución geográfica de *Amaranthus hypochondriacus* L. en México (Espitia et al., 2010)

### 1.9.3. Composición del grano y de la fracción vegetal del amaranto

De acuerdo con la literatura, la proteína del amaranto es una fuente de lisina, triptófano y aminoácidos azufrados. Por lo que el balance de aminoácidos esenciales es significativamente mejor que el de otras proteínas de fuentes vegetales. El contenido de proteína en el grano en variedades como *A. caudatus*, *A. cruentus*, y *A. hypochondriacus* oscila entre 13.2% y 17.6% (Tabla 7), donde la mayor parte de la proteína se encuentra en el germen y la cáscara (65%), mientras que el endospermo contiene el 35% de la proteína total. Como se mencionó el grano es una fuente de lisina y esto se explica en función de la distribución de las proteínas en el grano, esto se debe a que las proteínas del germen son fuente de aminoácidos esenciales en comparación con las proteínas de reserva del endospermo (Bressani, 1995).

Tabla 7. Composición proximal del grano de amaranto

Componente (%)	<i>Caudatus</i> *	<i>Cruentus</i> **	<i>Hypochondriacus</i> **
<b>Humedad</b>	b.s.	6.2 – 6.7	11.1
<b>Proteína cruda</b>	14.0 -16.0	13.2 – 17.6	13.9 -17.3
<b>Lípidos</b>	9.4 -10.2	6.3 – 8.4	4.8 – 7.7
<b>Fibra cruda</b>	---	3.4 – 5.3	2.6
<b>Fibra dietética</b>	7.6 -16.4	---	---
<b>Ceniza</b>	2.4 -3.8	2.8 -3.6	3.3 – 4.1
<b>Almidón</b>	51.5 -65.8	----	---

\* Pederson, Kalinowski y Eggum 1987.

\*\* Citado por Teutonico y Knorr 1985.

Fuente: Bressani, 1995

En lo que respecta a la composición de la fracción vegetal del amaranto (Tabla 8), se ha encontrado que el contenido promedio de proteína es de 22.2% (Alfaro *et al.*, 1987), superior al del grano (13-17%) (Barba de la Rosa *et al.*, 1992). La hoja de amaranto supera en 1.3% en el contenido de fibra, en comparación con la espinaca, acelga y col, 0.3%, 0.3% y 0.8% respectivamente (Soriano *et al.*, 1992). Así mismo se ha encontrado que las hojas son excepcionalmente ricas en calcio y contienen más fibra, niacina y ácido ascórbico que la espinaca (Alfaro *et al.*, 1987), y en la variedad *Amaranthus hypochondriacus*, la hoja corresponde de 45 a 48% del peso total de la planta (Soriano *et al.*, 2004). Investigaciones realizadas en los últimos años han reportado que los extractos acuosos de hojas de *Amaranthus gangeticus* poseen actividad anticancerígena en células de hígado, mama y colon (Sani *et al.*, 2004), además algunas partes vegetales de *Amaranthus tricolor* poseen actividad antitumoral y antiproliferación celular (Jayaprakasm *et al.*, 2004). Sin embargo existen pocos estudios sobre las proteínas y los hidrolizados enzimáticos de la fracción vegetal del amaranto y sus posibles aplicaciones, en función de sus propiedades nutricionales y funcionales.

Tabla 8. Composición proximal de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)

Componente (%)	Harina de la fracción vegetal del amaranto (Gómez <i>et al.</i> , 2011)	Harina de la fracción vegetal de amaranto (Alfaro <i>et al.</i> , 1987)	Harina de hoja de amaranto (Soriano <i>et al.</i> , 2004)	Harina de hoja de amaranto (Arce-Vázquez, 2011)
Humedad	2.26	10.14	5.73	5.8
Cenizas	15.33	9.27	20.73	11.7
Extracto Etéreo	4.24	2.64	4.46	4.9
Proteína Cruda	24.75	14.18	22.2	18.4
Fibra Cruda	7.7	15.44	14.13	8.2
ELN	45.69*	48.33	-	49

\*ELN= Extracto libre de nitrógeno, se calculó por diferencia a 100.

#### **1.9.4. Actividad biológica de los péptidos de las proteínas del amaranto**

Existen varias investigaciones que han demostrado que la hidrólisis de las proteínas presentes en el grano del amaranto genera péptidos biológicamente activos. Estos péptidos presentan diversas actividades biológicas, tales como la antihipertensiva, antitrombótica, antitumoral, antioxidante, inhibidores de proteasas, opioide, inmunomoduladora entre otras (Tovar *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2011, Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa, 2011). Así mismo los extractos acuosos de la fracción vegetal también han demostrado actividad anticancerígena y antitumoral (Sani *et al.*, 2004; Jayaprakasm *et al.*, 2004). Sin embargo no se han reportado investigaciones específicas sobre la obtención de péptidos a partir de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto, a pesar de sus antecedentes (alto contenido de proteínas y características nutricionales).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas degenerativas representan el 59% de los padecimientos a nivel mundial, en orden de importancia se distribuyen entre la hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemias, obesidad y aterosclerosis. La hipertensión arterial es una enfermedad que hasta hace 10 años afectaba sólo a personas mayores de 40 años de edad. Ahora, a causa de estilos de vida poco saludables, el aumento del sobrepeso y la obesidad, entre otros, también están presentes en 16% de los jóvenes de 20 a 29 años. A escala nacional, el padecimiento está presente en 22.4 millones de personas; la mitad desconocen que son hipertensos. Entre los que tienen la enfermedad diagnosticada, únicamente la mitad toman medicamentos, y de éstos, 50% mantienen bajo control sus niveles de presión arterial. El uso de medicamentos sintéticos para el control de dicha enfermedad puede causar efectos secundarios en el organismo, como tos, alteración del sentido del gusto, eczema (dermatitis atípica), entre otros.

Una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad es el uso de compuestos bioactivos tales como los péptidos antihipertensivos, obtenidos a partir de proteínas de origen animal y vegetal.

Por otro lado, tanto las hojas como el grano del amaranto son una fuente proteínica de excelente calidad nutrimental. Sin embargo el consumo de amaranto se ha enfocado mayoritariamente al grano. A partir de éste se han obtenido, a través de la hidrólisis enzimática con Alcalasa de la albúmina 1 y globulina,, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I. Recientes estudios (Alfaro *et al.*, 1987; Soriano *et al.*, 2004; Bonóli, 2010; Arce, 2011; Gómez *et al.*, 2011) han demostrado que la fracción vegetal del amaranto, principalmente las hojas, tienen un alto contenido de proteínas, pero hay una carencia de investigaciones sobre el uso de estas proteínas para la obtención de péptidos bioactivos.

### 3. HIPÓTESIS

La hidrólisis enzimática de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto permitirá la obtención de péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Alcalasa® 2.4L a partir de la porción proteínica (PP) de la fracción vegetal del amaranto sobre la enzima convertidora de la angiotensina I.

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar diferentes métodos para la obtención de la porción proteínica a partir de la harina de la fracción vegetal del amaranto.
- Hidrolizar la porción proteínica de la fracción vegetal del amaranto utilizando la proteasa Alcalasa® 2.4L y determinar el grado de hidrólisis.
- Determinar la actividad inhibitoria (*in vitro*) de la enzima convertidora de la angiotensina I de las 4 fracciones peptídicas (F1: 10-5 kDa; F2: 5-3 kDa, F3: 3-1 kDa, y F4: < a 1 kDa) obtenidas por hidrólisis enzimática de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto.

## 5. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

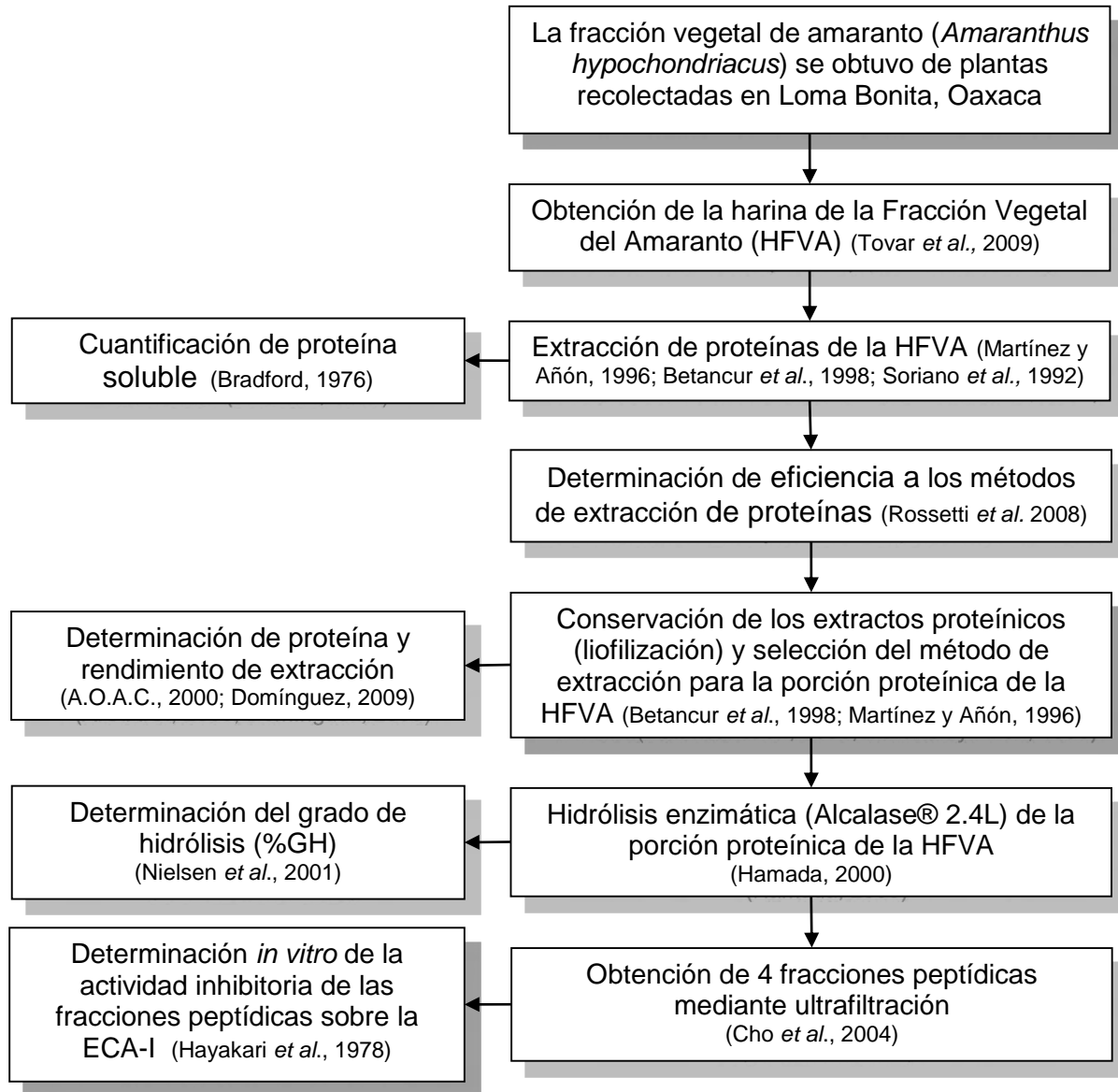


Figura 8. Estrategia general para la obtención de fracciones peptídicas con actividad inhibitoria de la ECA-I

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de materia prima

En el presente estudio se usaron semillas de amaranto, de la variedad *Amaranthus hypochondriacus*, donadas por el Ing. Alejandro Ortiz Sánchez (Nutriamto S. de R.L. de C.V.). Se cultivaron utilizando un sistema de riego en una parcela de la Universidad del Papaloapan campus Loma Bonita, Oaxaca; en el periodo de febrero a mayo de 2010 (28°C, 66% de humedad, laltitud: 18°06´ Norte, longitud: 95°53´ Oeste, altitud: 30 msnm). Después del corte, (el corte se realizó en la etapa reproductiva, es decir al inicio del crecimiento de la panoja) los tallos, hojas y restos de panoja, se dejaron secar a la sombra durante una semana.

### 6.2. Obtención de la harina de la fracción vegetal del amaranto (HFVA)

Las hojas y tallos del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) se sometieron a un proceso de secado en horno a  $65 \pm 3$  °C (Scorpion Scientific, A62060), se molieron en una licuadora industrial de 4L (modelo CB15 Waring Laboratory) y se tamizaron para obtener un tamaño de partícula de 0.1 cm.

La harina se desgrasó con acetona (5 mL/g) en una placa de calentamiento con agitación (Yamato, 1BEL00004) durante 16 h, posteriormente se retiró la acetona sucia (alta concentración de grasa), y se repitió este procedimiento 3 veces (Tovar *et al.*, 2009).

### 6.3. Extracción de la porción proteínica de la fracción vegetal del amaranto

Se analizaron tres metodologías para la extracción de las proteínas de la HFVA. La primera metodología (M1) se realizó de acuerdo a lo descrito por Martínez y Añón (1996). Se hizo una suspensión al 10% p/v de la HFVA en agua destilada ajustando a pH 11 (Potenciómetro Hanna Instruments HI4212) con NaOH 2N y se agitó a 400

rpm a temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente se centrifugó (Termocentrífuga Megapure de Thermo Scientific) a  $9000 \times g$  durante 20 minutos, el sobrenadante se ajustó a un pH 5.0 con HCl 1 N, se centrifugó nuevamente a  $9000 \times g$  por 20 minutos y el precipitado se resuspendió en agua destilada.

La segunda metodología (M2) de extracción fue una modificación del método reportado por Hoover *et al.*, (1991) y adaptado por Betancur *et al.*, (1998). Se realizó una suspensión de HFVA en agua destilada en una relación 1:6 p/v (harina/agua), se ajustó el pH a 11 con una solución de NaOH 1 N y se dejó en agitación por 1 h a 400 rpm. Posteriormente la suspensión se pasó por dos tamices (malla 80 y 100), secuencialmente se separó el bagazo de la mezcla de almidón y proteína, éste se lavó seis veces con agua destilada, el filtrado se colectó en un recipiente de plástico y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. El residuo (bagazo) se secó en charolas de aluminio a  $60^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo de reposo (30 min) se decantó el sobrenadante, para obtener así el sedimento, el cual se secó de igual forma que el bagazo. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1 N, posteriormente se centrifugó a  $1,317 \times g$  por 12 min para recuperar el precipitado, el cual se secó a  $-47^{\circ}\text{C}$  y  $13 \times 10^{-3}$  mbar en un liofilizador Labconco (FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry System).

La tercera metodología (M3) de extracción utilizada fue la reportada por Soriano *et al.* (1992). Se pesaron 50 g de HFVA desgrasada y se mezclaron con 300 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (5% p/v) a 450 rpm, durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , después se centrifugó a  $13000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al residuo se le adicionaron 200 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (5% p/v) y nuevamente se centrifugó a  $13000 \times g$  durante 20 minutos, a los sobrenadantes obtenidos se les dio un tratamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50, 70 y 100 % de saturación (se centrifugó en cada nivel a  $13000 \times g$  durante 20 minutos). Los sobrenadantes que se obtuvieron del tratamiento previo se filtraron en papel Whatman No. 4. El residuo del filtrado se mezcló con los residuos del sobrenadante tratado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50, 70 y 100 %. La mezcla de residuos se dializó con agua

desionizada (24 h, con 4 cambios de agua), después se centrifugó el dializado a 13000 x g durante 20 minutos, en el sobrenadante se recuperó la albúmina 1.

Para los 3 métodos se cuantificó el contenido de proteína en cada etapa por el método de Bradford (1976), para posteriormente determinar la eficiencia de extracción. Se realizó una electroforesis para identificar el tipo de proteínas presentes. Se realizó una comparación de medias con un intervalo de confianza de 95%, donde la variable respuesta fue el porcentaje de eficiencia de los métodos de extracción (Statgraphics, versión 5.1).

### 6.3.1 Eficiencia de los métodos de extracción de proteínas en la HFVA

Para determinar la eficiencia de los métodos de extracción de proteína se realizó una adaptación a la fórmula propuesta por Rossetti *et al.*, (2008), en la denominación de las variables utilizada el cálculo de la eficiencia de conversión de alimento. Donde  $P_f$  corresponde a la cantidad de proteína al final del método de extracción, y  $P_i$  a la cantidad inicial de proteína en el primer paso de la extracción.

$$\% \text{ de Eficiencia} = \frac{(P_f - P_i)}{P_f} \times 100$$

### 6.4. Determinación de proteína en la porción proteínica de la HFVA

La determinación de proteína cruda en la porción proteínica se realizó mediante el método de Kjeldahl (método 933.05 A.O.A.C., 2000), donde el contenido de proteína se calcula multiplicando el porcentaje nitrógeno (% N) por el factor de conversión de Kjeldahl ( $f_N$ ) cuyo valor utilizado fue 5.85 de acuerdo a lo reportado por Becker *et al.* (1981).

$$\% \text{ Proteína} = (\%N) \times (f_N)$$

### 6.5. Rendimiento de los métodos de extracción de proteínas

Para el cálculo del rendimiento de cada método de extracción se tomó como referencia el contenido de proteína total de la HFVA (24.75%) determinado por Kjeldahl (método 933.05 A.O.A.C., 2000), de acuerdo a la fórmula reportada por Domínguez (2009):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{[\text{Proteína en la porción proteínica (g)}]}{[\text{Proteína en la harina (g)}]} \times 100$$

Se realizó una comparación de medias donde la variable respuesta fue el porcentaje de rendimiento de los métodos de extracción M1 y M2, para lo cual se empleó el software Statgraphics, versión 5.1. Se descartó M3 debido las bajas cantidades de porción proteínica obtenida después de la liofilización.

### 6.6. Electroforesis (SDS-PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para el análisis electroforético de la porción proteínica (PP), de acuerdo al método de Laemmli (1970). La composición de los geles, cuyas dimensiones fueron de 10 cm x 10 cm, se muestran en las tablas 9 y 10; con una T de 30% y una C de 2.67%. Cada muestra se diluyó (0.25:1) en buffer de muestra (tabla 11) y se aplicaron 10 µL (10 mg/mL) de la PP por carril. Para estimar el peso de las proteínas se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango (BIO-RAD®, No. cat. 161-0318) (Anexo F).

Tabla 9. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE

Solución	Tris (M)	Glicina (g)	pH	SDS (%)
0.5 M Tris-HCl	0.5	-	6.8	-
1.5 M Tris-HCl	1.5	-	8.8	-
Buffer de corrida	15 (g/L)	72	8.3	0.5
SDS	-	-	-	10
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida	% acrilamida (p/v)		% bisacrilamida	
30% T <sup>a</sup> . 2.67% C <sup>b</sup>	29.2		0.8	

a % concentración de acrilamida y bisacrilamida

b % concentración de entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida

\* Ajuste de pH con HCl concentrado

Tabla 10. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Gel concentrado (11%)	Gel de separación (11%)
Agua desionizada	3.7	3.7 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Solución de acrilamida-bisacrilamida (30 T, 2.67% C)	3.7 mL	3.7 mL
Persulfato de amonio (10% p/v)	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Tabla 11. Composición de buffer muestra para electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	3.55
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25
Glicerol	2.5
SDS (10% p/v)	2
Azul de bromofenol (0.5% p/v)	0.2
B-mercaptoetanol	0.5

Se utilizó un gel concentrador y un gel separador 11% p/v de poliacrilamida, respectivamente, en presencia de dodecil sulfato de sodio (tabla 10). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis (Mini Protean Tetra Cell, *BIO-RAD*) a 4° C y 200 V durante 120 minutos. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 (2.5 g de azul de Coomassie R-250, 450 mL metanol, 100 mL de ácido acético, y aforar a 1 L con agua desionizada) durante 2 h, y se destiñeron con una solución de metanol, ácido acético y agua (40,10, y 50 mL respectivamente).

### **6.7. Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática de la porción proteínica de la HFVA se efectuó acorde al método reportado por Hamada (2000). Bajo condiciones controladas de temperatura, pH y agitación en un vaso de precipitado acoplado a un baño de agua equipado con un termómetro, un electrodo y un agitador mecánico. Se realizó una suspensión de proteína al 2 % (p/v) en buffer de Tris-HCl 50 mM pH 8, se ajustó el pH a 8 durante todo el proceso con trozos de perlas de NaOH, y se adicionó Alcalasa® 2.4L en una relación enzima sustrato 1:20 (v/v). La reacción enzimática tuvo una duración de 90 min a temperatura (50° C) y agitación (350 rpm) constantes. La hidrólisis fue detenida por calentamiento a 80 °C durante 20 min. El hidrolizado fue centrifugado (Optima LE-80K Ultracentrifuge, rotor TYPE 45 Ti. Beckman Coulter) a 10,000 x g por 20 min a 4 °C para precipitar el sustrato insoluble y la enzima residual; al sobrenadante se le añadió azida de sodio al 0.02%, y se refrigeró (4 °C) hasta su uso posterior.

### **6.8. Determinación del grado de hidrólisis**

El grado de hidrólisis (GH) se determinó por el método de OPA (ortofeniltaldehído) (Nielsen *et al.*, 2001). En un microtubo de 2 mL se agregaron 1.5 mL del reactivo de OPA y 200 µL del hidrolizado diluido (1:100), la mezcla se agitó en un vórtex (Scientific Industries Inc. modelo Vortex-Genie®2) durante 5 s. Después de 2 minutos, se leyeron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda 340

nm. Las absorbancias obtenidas se utilizaron para saber la concentración de grupos amino libres presentes en el hidrolizado, mediante la ecuación de la recta dada por la curva de calibración de L-serina (Anexo D), considerando los factores de dilución. Finalmente se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje del grado de hidrólisis:

$$\% \text{ GH} = \frac{\text{Grupos amino libres en el hidrolizado enzimático}}{\text{Grupos amino libres en el hidrolizado ácido}} \times 100$$

El número de grupos amino libres en el hidrolizado ácido también se determinó mediante la técnica de OPA a partir de la hidrólisis total del aislado proteínico descrita en el apartado 6.8.1.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficaron los promedios del porcentaje del grado de hidrólisis contra el tiempo de reacción.

#### **6.8.1. Hidrólisis total de la porción proteínica**

La hidrólisis total del aislado proteínico se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Megías *et al.*, (2004) Se pesaron 4 mg de proteína en un tubo PYREX con tapón de rosca, se le añadieron 6 mL de HCl 6 N, esta mezcla se incubó a 110 °C durante 24 horas en una estufa de convección (Fisher Scientific, modelo Isotemp Oven), posteriormente el ácido se evaporó en una estufa de vacío (National Appliance Company modelo 5851) a 90 °C durante 24 horas. Al producto obtenido se le determinó el grado de hidrólisis (apartado 6.8). La determinación se hizo por triplicado.

### **6.8.2. Determinación de proteína soluble en el hidrolizado de la porción proteínica de la HFVA.**

La determinación de la proteína soluble en el hidrolizado proteínico se determinó mediante el método de Bradford (1976). Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de hidrolizado y se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford, se agitó brevemente en un vortex (Scientific Industries Inc. modelo Vortex-Genie®2), después de 5 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm (VE-5100UV SPECTROPHOTOMETER. VELAB™). Se utilizó una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) a una concentración de 0.25 mg/mL para realizar una curva estándar (ver Anexo C) en la que se interpolaron las absorbancias obtenidas con las muestras del hidrolizado.

### **6.9. Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración**

El sobrenadante del hidrolizado enzimático obtenido como se mencionó en el apartado 6.7 se sometió a un fraccionamiento por ultrafiltración de acuerdo con la metodología descrita por Cho *et al.* (2004). Se utilizaron unidades de ultrafiltración (Stirred Ultrafiltration Cell, Modelos 8200 y 8050 De Millipore) equipadas con agitador magnético para evitar la sedimentación, un flujo de nitrógeno a una presión de 250 kPa y cuatro membranas con diferentes cortes de peso molecular (NMWL): 10,000 (10 kDa); 5,000 (5 kDa); 3,000 (3 kDa) y 1000 (1 kDa). Se obtuvieron cuatro fracciones peptídicas: F1) 5-10 kDa; F2) 3-5 kDa; F3) 1-3 kDa y F4) < a 1 kDa.

### **6.10. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas del hidrolizado de la porción proteínica sobre la ECA-I**

Se utilizó el método reportado por Hayakari *et al.* (1978) como se describe a continuación. El fundamento de este método consiste en que la ECA-I hidroliza el compuesto HHL (Hipuril-L-histidil-L-leucina) produciendo ácido hipúrico e His-Leu; el ácido hipúrico junto con 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TT) producen una reacción colorimétrica.

La actividad inhibitoria de la ECA-I *in vitro* se determinó en las fracciones peptídicas F1) 5-10 kDa; F2) 3-5 kDa; F3) 1-3 kDa; F4) < a 1 kDa. Se utilizaron las soluciones de HHL 0.3 % (p/v) en un buffer de fosfato 0.1 M pH 8.3, NaCl 5 M y TT en dioxano al 3 % (p/v). La ECA utilizada se extrajo a partir del pulmón de conejo (Hayakari *et al.*, 1978) (Anexo E). Para cada fracción se prepararon, por triplicado, una serie de microtubos como se muestra en la Tabla 12.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, los microtubos fueron centrifugados a 12,000 x g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 382 nm en un espectrofotómetro (VE-5100UV SPECTROPHOTOMETER, VELAB™).

Para determinar la concentración (mg de proteína/mL) de las fracciones requerida para producir el 50% de inhibición de la ECA-I (IC<sub>50</sub>), se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad ECA-I} = \frac{(AM-ABM)}{(AES-ABES)} \times 100$$

$$\% \text{ de Inhibición de la ECA-I} = 100 - \text{Actividad ECA-I}$$

Donde AM (2) es la absorbancia de la muestra, ABM (1) es la absorbancia del blanco de la muestra, AES (4) es la absorbancia de la enzima-sustrato y ABES (3) es la absorbancia del blanco de la enzima-sustrato.

Después se graficó la concentración (mg proteína/mL) de la fracción peptídica contra el porcentaje de inhibición de la ECA-I, se realizó su respectiva linealización para obtener la ecuación de la recta y con ello calcular el valor de IC<sub>50</sub> que se define como la concentración de péptidos en 1 mg de proteína/mL requerido para inhibir el 50% de la actividad de la ECA-I bajo las condiciones descritas anteriormente.

Tabla 12. Ensayo de la inhibición de la ECA-I utilizando diferentes fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de la porción proteínica de la fracción vegetal del amaranto

	<b>Blanco Muestra- Enzima (1)</b>	<b>Enzima- Sustrato- Muestra (2)</b>	<b>Blanco- Enzima- Sustrato (3)</b>	<b>Enzima - Sustrato (4)</b>
NaCl 5 M (μL)	15	15	15	15
HHL (μL)	-	20	20	20
<b>Buffer de fosfato 0.1 M pH 8.3 (μL)</b>	175	175	195	195
Muestra (μL)	20	20	-	-
ECA (μL)	20	20	-	20
<b>Incubar a 47 °C durante 45 minutos</b>				
ECA (μL)	-	-	20	-
TT (μL)	665	665	665	665
<b>Buffer de fosfato 0.1 M pH 8.3 (μL)</b>	1100	1100	1100	1100

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Eficiencia de los métodos de extracción de proteínas

Las metodologías de extracción de proteínas se basan en la solubilidad de estas en un medio particular. En la precipitación salina (*salting out*) la solubilidad de las proteínas generalmente es baja en medios donde las concentraciones de sales son elevadas, por lo que tienden a precipitar (*salting out*), la adición de una sal en una proporción adecuada induce la precipitación selectiva de algunas proteínas, mientras que otras permanecen en solución. El sulfato de amonio se utiliza principalmente por su solubilidad en agua y porque aumenta las fuerzas iónicas. Por otro lado, en la precipitación isoeléctrica el valor de pH al cual una proteína muestra un mínimo de solubilidad es conocido como punto isoeléctrico, y es el valor de pH en que la molécula proteínica posee una carga eléctrica neutra y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico (Bernal, 2009). La precipitación isoeléctrica por lo general ha sido utilizada para la obtención de aislados proteínicos de origen vegetal (Torruco, 2009; Domínguez, 2009; Marrufo, 2012; Segura *et al*, 2013), en el caso del grano de amaranto ya se ha reportado que la albúmina 1 precipita en un rango de pH de 4 a 5 (Martínez y Añón, 1996).

En este trabajo se evaluaron la precipitación isoeléctrica y la precipitación salina (*salting out*); seleccionándose la mejor en función de la eficiencia de extracción. Con las metodologías M1 (Martínez y Añón, 1996), y M2 (Betancur *et al.*, 1998) basadas en la extracción de proteínas por precipitación isoeléctrica se obtuvieron eficiencias de extracción de  $54.27\% \pm 1.845$  y  $61.16\% \pm 0.172$ , respectivamente; estos valores son mayores al de la eficiencia de extracción de proteína obtenida por precipitación salina (*salting out*) con el método M3 (Soriano *et al.*, 1992) que fue de  $26.12\% \pm 0.951$ , descartando esta última metodología.

La baja eficiencia en la metodología M3 se puede atribuir a que el método está diseñado para el grano de amaranto y tal vez existan interferencias entre el sulfato

de amonio y algún compuesto de la fracción vegetal (pigmentos o residuos lignocelulósicos), aunado a que la proporción de sulfato de amonio está calculada en base a la proteína presente en el grano. La precipitación salina requiere de varios pasos (sección 6.3) para llegar a una extracción deseable y una inversión tanto de reactivos como de tiempo, debido a lo anterior se consideró que la metodología M3 no es recomendable para la obtención de proteínas de la HFVA, aunado a la baja eficiencia. En el caso de la HFVA, las eficiencias de extracción de proteínas con la precipitación isoelectrica fue mayor al 50%, estas eficiencias podrían aumentar optimizando las condiciones de las metodologías.

## **7.2. Rendimiento del proceso para la obtención de la porción proteínica**

Considerando el contenido de proteína en la harina de la fracción vegetal del amaranto (HFVA) (0.2472 g de proteína/g de HFVA) y en las porciones proteínicas se determinó el rendimiento de cada metodología obteniéndose los siguientes resultados. En la metodología M1 (Martínez y Añón, 1996) se utilizó una relación harina/agua 1:10 (p/v), con 30 min de agitación, sin lavados; en tanto que en la metodología M2 (Betancur *et al.*, 1998) se utilizó una relación harina/agua 1:6 (p/v), con 1 h de agitación y seis lavados; los rendimientos para ambas metodologías fueron 59.49% y 95.76% respectivamente (Tabla 13). Estos resultados son superiores a los reportados por Bónoli (2010), quien utilizó una relación harina/solvente 1:15, con 2h de agitación y 3 lavados con NaOH al 0,2%, obteniendo un rendimiento de extracción de la proteína del follaje de amaranto (*Amaranthus dubius*) de 53% (considerando un porcentaje de proteína total de 29.75%). El rendimiento obtenido con la metodología M2 se atribuye a que hubo un mayor tiempo de contacto entre el NaOH y la HFVA, a diferencia de la metodología M1.

Tabla 13. Rendimiento de las metodologías de extracción de proteínas

Método de extracción	Porción proteínica (g) HFVA	Proteína (%)	Rendimiento (%)
M1	50	14.727 ± 0.995	59.499 ± 4.021 <sup>b</sup>
M2	50	23.704 ± 0.652	95.767 ± 2.634 <sup>a</sup>

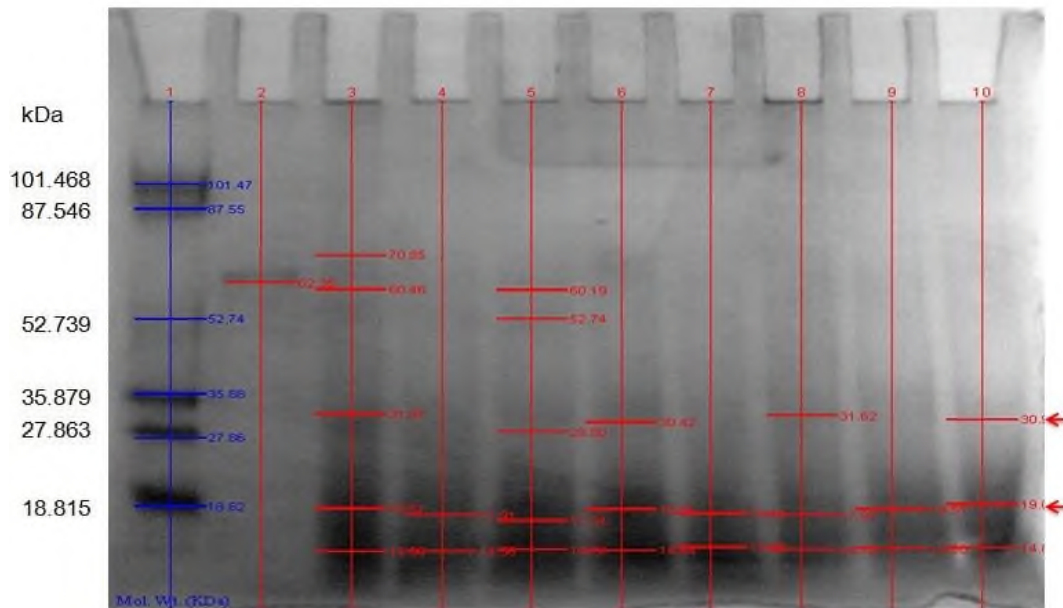
<sup>a-b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )  
Los datos son el promedio de tres repeticiones

### 7.3. Electroforesis (SDS-PAGE)

Los pesos moleculares de las proteínas de la HFVA obtenidas con los diferentes métodos de extracción se determinaron mediante una electroforesis SDS-PAGE, y se utilizó el software BIORAD® GEL-DOC XR+IMAGER.

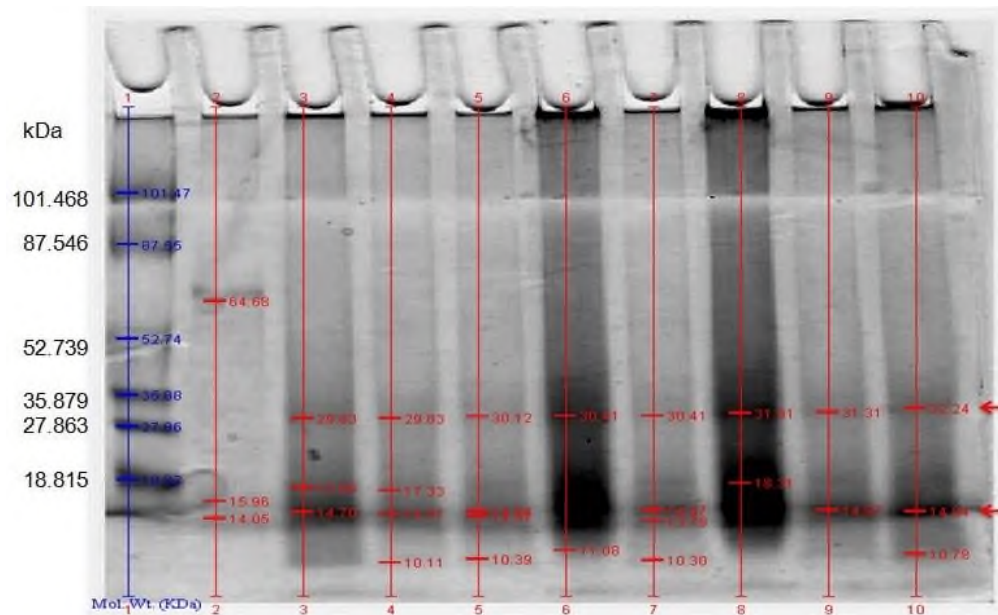
Para la fracción proteínica obtenida a partir de la metodología M1 se cuantificó la proteína y se realizó un perfil electroforético en cada etapa de extracción: a) suspensión ajustada a pH 11 con NaOH 2N; b) sobrenadante de la primera centrifugación; c) sobrenadante ajustado a pH 5.0 y d) el precipitado recuperado por centrifugación. En la figura 9 se observa el gel de electroforesis para las muestras de la metodología M1. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 BSA como control positivo; en los carriles 3, 4, 5 y 6 las muestras correspondientes a las diferentes etapas de extracción a, b, c y d, los carriles 7, 8, 9 y 10 son repeticiones. En esta figura, a partir del carril 3 hasta el 10 se aprecia una banda entre 35.879 y 27.863 kDa que de acuerdo a lo reportado (30 - 35 kDa Martínez y Añón, 1996; Raina y Datta, 1992) podría corresponder a albúmina. Además se observan varias bandas por debajo de 18.815 kDa que suponen la presencia de subunidades proteicas. En este gel también se muestra que a través de las etapas del proceso de extracción no hay una buena purificación de las proteínas de la HFVA. Un patrón similar fue reportado por Martínez y Añón (1996) en proteína del grano de amaranto, donde determinaron que la albúmina 1 tenía un peso aproximado de 30 kDa, mientras que la albúmina 2 un peso molecular entre 51.2 y 55.8 kDa. En ese estudio concluyeron que la albúmina 2

precipita a un pH entre 6 y 7, mientras que la albúmina 1 y las globulinas precipitan a pH 5 o menor.



**Figura 9.** Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M1. Carril 1) PM; 2) BSA; 3, 4, 5 y 6) Etapas de extracción a, b, c y d respectivamente; 7, 8, 9 y 10) Repeticiones de las etapas de extracción

La metodología M2 comprendió 4 etapas de extracción: a) suspensión harina/agua a pH 11, b) sobrenadante en reposo después de los 6 lavados, c) sobrenadante a pH 4.5 y d) el precipitado recuperado por centrifugación. Las muestras de cada etapa se colocaron en el gel (figura 10) en el siguiente orden: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 BSA como control positivo, en los carriles 3, 4, 5 y 6 las muestras a, b, c y d, respectivamente; los siguientes carriles son repeticiones. En la figura 10 nuevamente se observa una banda con un peso molecular entre 35.879 y 27.863 kDa a partir del carril 3 hasta el 10, ésta coincide con lo observado en la metodología M1. Además, distingue una banda con un peso molecular menor 18.815 kDa, desde el carril 3 hasta 10, que podría tratarse de una subunidad de la albúmina similar a la observada en el grano de amaranto (Huerta-Ocampo & Barba de la Rosa, 2012).



**Figura 10. Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M2. Carril 1) PM; 2) BSA; Carriles 3, 4, 5 y 6) Etapas de extracción a, b, c y d respectivamente; Carriles 7, 8, 9 y 10) Etapas b, d, c y a respectivamente**

Por último en la metodología M3 se clasificaron 14 etapas durante el proceso de extracción. Las muestras de cada etapa se colocaron en 2 geles como se muestra en la figura 11, en el gel a) se colocaron en el carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 BSA como control positivo, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 las muestras de las etapas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, mientras que en el gel b) se colocaron en el carril 1 el marcador de peso molecular, carril 2 BSA como control positivo, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 las muestras de las etapas 8, 9, 10, 11, 12, 13, y 14 respectivamente. Se puede observar (Figura 12) en los carriles 3, 4, 5 y 6 del gel principalmente dos bandas que se ubican entre 35.879 y 27.863 kDa. Estas bandas tienen un peso molecular similar al de la albúmina 1 (30 kDa) y albúmina 2 (51.2 a 55.8 kDa) reportadas por Martínez y Añón (1996) en aislados proteínicos del grano de amaranto. En los carriles 3, 4, 5 y 6 del gel se pueden distinguir bandas con pesos moleculares menores a 27.863 kDa, estas mismas banda se ven en la figura 11 en el gel b) a partir del carril 3 hasta el 10, este patrón electroforético es similar al que reportaron Tovar *et al.*, (2009) en grano de amaranto. Estas bandas con pesos moleculares menores a 27.863 kDa pueden

sugerir la presencia de una de las subunidades de globulina presente en el grano de amaranto, dicha proteína (globulina) está formada por las subunidades ácidas y básicas de 36 - 32 kDa y de 20 -18 kDa respectivamente (Huerta-Ocampo & Barba de la Rosa, 2012).

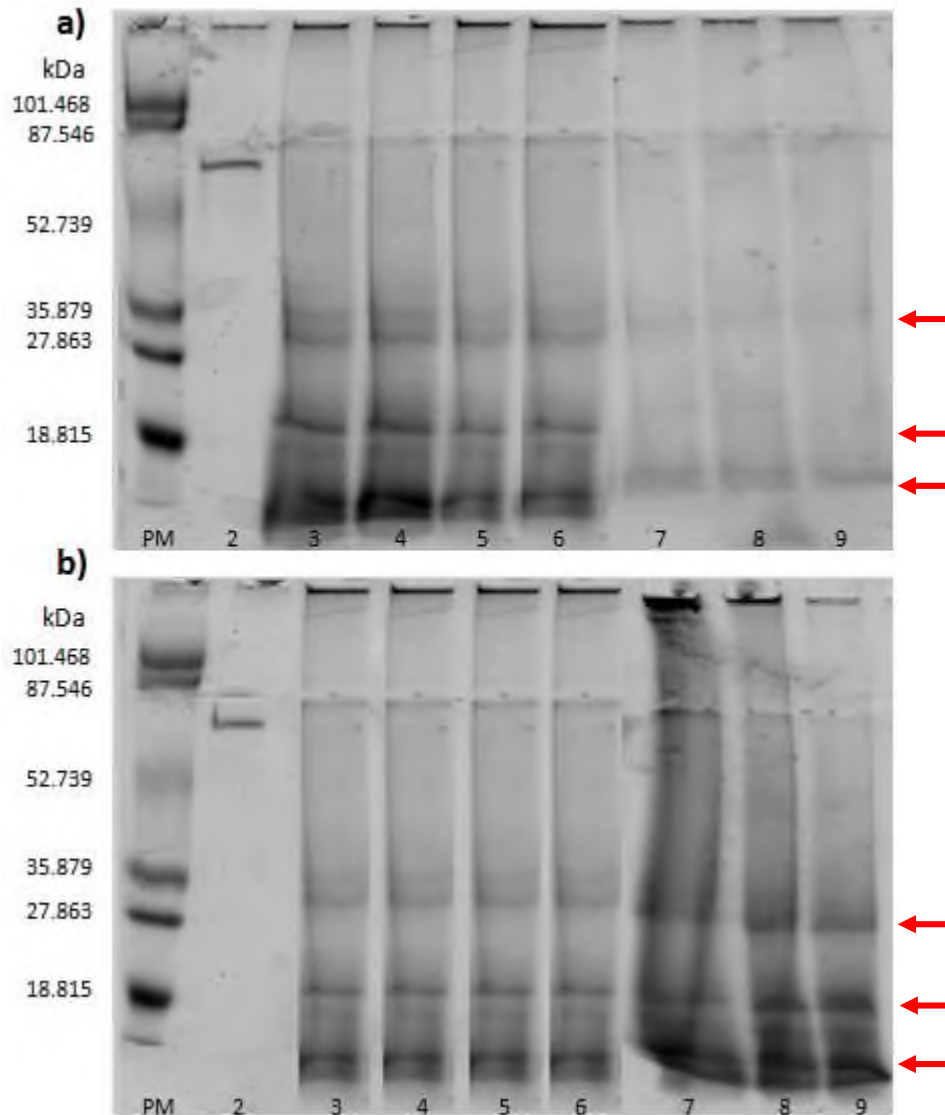


Figura 11. Electroforesis de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M3. Gel a): Carril 1) PM; 2) BSA; Carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) Etapas de extracción 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. Gel b): Carril 1) PM; 2) BSA; Carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) Etapas de extracción 8, 9,10, 11, 12, 13 y 14

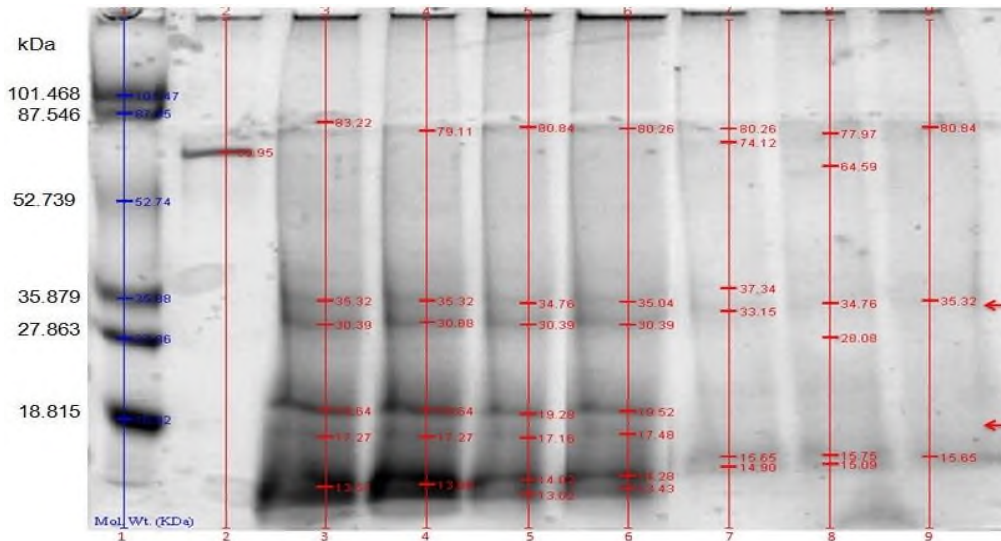


Figura 12. Estimación del PM de las proteínas de la HFVA aisladas con la metodología M3

Los resultados obtenidos con todas las metodologías son similares a lo reportado por Raina y Datta (1992) quienes aislaron una proteína de 35 kDa de la fracción de albúmina del grano *Amaranthus hypochondriacus*, así mismo Villanueva y Arnao (2007) purificaron una proteína de 35 kDa de albúmina del grano *Amarantus caudatus* concluyendo que es una proteína específica de la semilla. Los resultados obtenidos en la HFVA indican que las proteínas presentes en la porción proteínica podría tratarse de albúmina, coincidiendo con los resultados de las investigaciones realizadas en el grano de amaranto (Tabla 14), indicando que estas proteínas también se encuentran en la fracción vegetal.

La presencia de esta proteína en la HFVA se explica en función a su genética, ya que se ha reportado que el gen AmA1 de albúmina de amaranto (*A. hypochondriacus* L.) codifica para una proteína de 35 kDa con altas cantidades de aminoácidos esenciales, y ha sido empleado para transformar el trigo panadero y la papa, incrementar significativamente el contenido de proteína y aminoácidos esenciales (Tamás *et al.*, 2009; Chakraborty *et al.*, 2010). Por último el perfil electroforético de albúmina 1 y globulina reportado a partir del grano de amaranto por Tovar *et al.* (2009) es similar al obtenido en este trabajo, por lo que es probable que la porción proteínica extraída con los tres métodos podría estar conformada de albúmina 1.

Tabla 14. Comparación del peso molecular aparente de albúmina de amaranto utilizando diferentes métodos de extracción

Fuente	Tipo de extracción	pH de extracción/ pH de precipitación	Proteína obtenida	PM (kDa)	Referencia
HFVA <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Isoeléctrica	11/5	Albúmina	30.74	Este trabajo
HFVA <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Isoeléctrica	11/4.5	Albúmina	30.64	Este trabajo
HFVA <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Salting out	-	Albúmina	33.16	Este trabajo
Grano de <i>Amaranthus caudatus</i>	Salting out	7 / -	Albúmina	35	(Villanueva y Arnao, 2007)
Grano de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Salting out	-	Albúmina	35	(Raina y Datta, 1992)
Grano de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Isoeléctrica	8 / 5	Albúmina 1	30 kDa	(Martínez y Añón, 1996)

#### 7.4. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA

La propiedad fundamental de un hidrolizado, que determina en gran medida las características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos. Éste está determinado por las condiciones establecidas durante la hidrólisis como concentración del sustrato, relación enzima-sustrato, tiempo, pH y temperatura, así como el tipo y la actividad específica de la enzima. En este trabajo, bajo las condiciones ensayadas, el máximo grado de hidrólisis de la porción proteínica de la FVA fue de 26.97 %, alcanzado a los 30 min de reacción, después de este tiempo el GH permaneció constante hasta el final de la proteólisis (figura 13 y tabla 15).

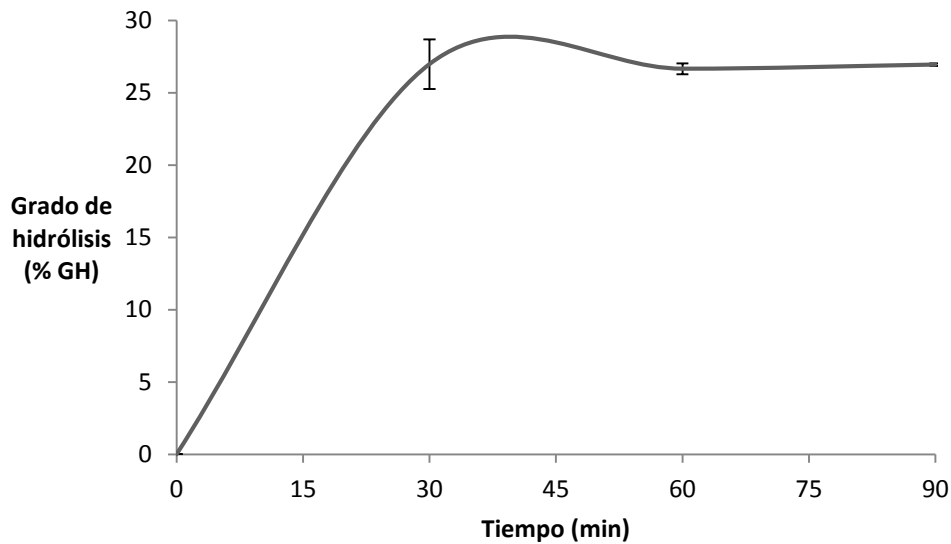


Figura 13. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA utilizando Alcalasa® 2.4L

Tabla 15. Grado de hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA

Tiempo	%GH
30 min	26.976 ± 1.713 <sup>a</sup>
60 min	26.662 ± 0.371 <sup>a</sup>
90 min	26.947 ± 0.080 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Letras iguales en la columna indican que no hay diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ )

Morais *et al*, (2013) realizaron la comparación de cuatro métodos (OPA, TNBS; pH-Stat, TCA) para la cuantificación del %GH, evaluando los efectos del tipo de enzima (*B. licheniformis*) y el tiempo de reacción, así como la correlación entre el % GH, los péptidos y el contenido de aminoácidos libres en el concentrado proteínico del suero. Utilizando el método de OPA, precisó que hubo un aumento en el %GH (18.4 a 20.7% de 1 a 3 h respectivamente), posteriormente el % GH se mantuvo constante, esto se le atribuye a que los sitios activos de la enzima ya están ocupados por el sustrato. La detección del %GH mediante el método TNBS indicó valores de % GH (3.4 - 15.7%) cuando el tiempo de reacción aumentó de 1 a 2 h, con un incremento

del valor máximo en el % GH de 21.2% a las 5 h, así mismo menciona la ventaja del uso de la proteasa de *B. licheniformis*, ya que produce un mayor contenido de di y tripéptidos y por lo tanto un menor contenido de oligopéptidos. Considerando que el % GH obtenido en la porción proteínica de la HFVA, se mantuvo constante a partir de los 30 minutos de reacción, se puede considerar que el comportamiento es similar al descrito por Morais *et al.*, (2013) con respecto a los efectos del tipo de enzima utilizada.

Como ya se mencionó uno de los parámetros que influye en el GH es el tipo de enzima y su especificidad. Para la hidrólisis de la porción proteínica de la HFVA se utilizó Alcalasa® 2.4L, que es una endoproteasa de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*), esta enzima tiene una amplia especificidad sobre aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal. Hidroliza la mayoría de los enlaces peptídicos, preferencialmente aquellos que contienen residuos de aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr), ácidos (Glu), con azufre (Met), alifáticos (Leu y Ala), hidroxilos (Ser), y básicos (Lys) (Doucet *et al.*, 2003). Debido a su especificidad la Alcalasa® ha sido utilizada en la obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I a partir de diversas fuentes proteicas como piñón (*Jatropha curcas* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris*), frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) y chía (*Salvia hispanica*) entre otras fuentes vegetales, como se indica en las referencias de la tabla 16.

El % GH determinado en la porción proteínica de la HFVA hidrolizada con Alcalasa® es menor al grado de hidrólisis reportado para el grano de amaranto (Tovar *et al.*, 2009; Fritz *et al.*, 2011), sin embargo se obtiene una hidrólisis extensiva (% GH mayor a 10%) en menor tiempo comparado con otras fuentes vegetales bajo condiciones similares (Tabla 16). En el caso del frijol Jamapa (*Phaseolus. Vulgaris*) y frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) a partir de los 15 min se alcanzan grados de hidrólisis superiores al 10% con Alcalasa®, donde el mayor % GH se da a los 30min (41.78%) y 45 min (37.94%) respectivamente (Torruco, 2009), este comportamiento es similar al reportado por Pedroche *et al.*, (2004) con la hidrólisis de un concentrado

proteínico de colza con Alcalasa®, que a partir de los 10 minutos alcanza un GH mayor a 20% y después permanece casi constante hasta finalizar la hidrólisis.

En algunos casos se realizan procesos secuenciales para obtener grados de hidrólisis mayores, en el caso de la chía (*Salvia hispanica*) se pudo observar que la diferencia en el % GH a los 90 min entre una hidrólisis con Alcalasa® (34.9 %) y una hidrólisis secuencial usando Alcalasa® y Flavorzima (37.5%) varía por 3.7%, lo que indica que esta última enzima fue poco efectiva, sin embargo en la hidrólisis secuencial a los 60 min se alcanza un GH de 23% con Alcalasa® (Salazar *et al.*, 2012), que es menor al % GH obtenido en la porción proteínica de la HFVA a los 30 min, lo anterior se infiere porque el máximo % GH con Alcalasa® oscila entre 20 y 25%, dependiendo del sustrato, bajo condiciones moderadas (Segura *et al.*, 2013), aunque en estos casos la enzima mostró una amplia especificidad sobre el sustrato obteniendo grados de hidrólisis mayores.

Es difícil hacer una comparación debido a la diferencia entre las fuentes vegetales y su composición proteínica, debido a la escasa información sobre las proteínas de la fracción vegetal del amaranto, por lo que los resultados obtenidos pueden ser útiles como referencia para futuras investigaciones.

Tabla 16. Grados de hidrólisis de diferentes fuentes proteínicas con Alcalasa y Flavorzima

Fuente	%GH	Método de determinación	Enzima	Tiempo de hidrólisis	pH en la hidrólisis	Referencia
HFVA ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	26.97	OPA	Alcalasa®	30 min	8	Este trabajo
Frijol Jamapa ( <i>Phaseolus. Vulgaris</i> )	41.78	TCA	Alcalasa®	30 min	8	Torruco, 2009
Frijol Lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> )	37.94	TCA	Alcalasa®	45 min	8	Torruco, 2009
Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	13 - 14	OPA	Alcalasa®	90 min	-	Marrufo <i>et al.</i> , 2012
Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	21.35	OPA	Alcalasa®	60 min	8	Segura <i>et al.</i> , 2013
Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	31.2	TNBS	Alcalasa®	60 min	8	Villanueva <i>et al.</i> , 1999
Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	34.7	TNBS	Alcalasa®	180 min	8	Villanueva <i>et al.</i> , 1999
Grano de amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	57	TNBS	Alcalasa®	24 h	7.4	Tovar <i>et al.</i> , 2009
Grano de amaranto ( <i>Amaranthus mantegazzianus</i> )	65	TNBS	Alcalasa®	4 h	7.8	Fritz <i>et al.</i> , 2011
Chía ( <i>Salvia hispanica</i> )	34.9	TCA	Alcalasa®	90 min	8	Inurreta <i>et al.</i> , 2007
Chía ( <i>Salvia hispanica</i> )	37.5	OPA	Alcalasa® y Flavorzima	90 min	7/8	Salazar <i>et al.</i> , 2012
Chía ( <i>Salvia hispanica</i> )	43.8	OPA	Alcalasa® y Flavorzima	150 min	7/8	Salazar <i>et al.</i> , 2012
Garbanzo y chicharos	58.89 - 78.58	TNBS	Alcalasa® y Flavorzima	1/1.5 h	7/8	Barbana y Boye, 2010
Frijol bayo ( <i>Vigna sinensis</i> )	10.2	pH - Stat	Alcalasa® y Flavorzima	60 min	5.5/8	Arcila, 2011
Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	54.3	TNBS	Alcalasa® y Flavorzima	180 min	7/8	Villanueva <i>et al.</i> , 1999

### 7.5. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración sobre la ECA-I

La actividad inhibitoria de la ECA-I de las fracciones peptídicas ultrafiltradas con diferentes cortes de membrana se observa en la figura 14, donde F4 (< a 1 kDa) presentó la mayor actividad con un valor de  $IC_{50} = 0.0786 \text{ mg/mL}$  ( $78.67 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ), mientras que los valores de actividad inhibitoria para F2 (3-5 kDa) y F3 (1-3 kDa) fueron de  $IC_{50} = 0.13011 \text{ mg/mL}$  ( $130.11 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ),  $IC_{50} = 0.21908 \text{ mg/mL}$  ( $219.08 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ), respectivamente; la fracción que presentó la menor actividad fue F1 (5-10 kDa) con un valor de  $IC_{50} = 0.27301 \text{ mg/mL}$  ( $273.01 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ).

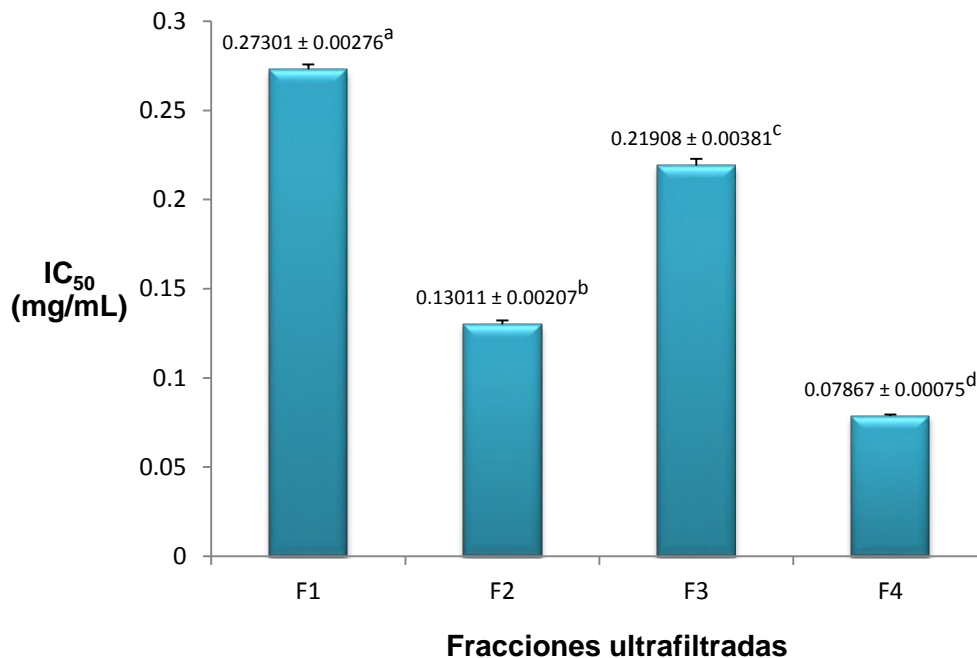


Figura 14. Actividad inhibitoria “*in vitro*” de las fracciones peptídicas sobre la ECA-I

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

Existen reportes de la actividad inhibitoria de la ECA-I utilizando hidrolizados enzimáticos de proteínas de diversas fuentes vegetales, incluyendo el amaranto (Tabla 17). En algunas investigaciones se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  similares a los encontrados con las fracciones peptídicas F2 (3-5 kDa,  $IC_{50} 0.130 \pm 0.002 \text{ mg/mL}$ )

y F3 (1-3 kDa,  $IC_{50}$   $0.219 \pm 0.002$  mg/mL). Tal es el caso de Tovar *et al.*, (2009) quienes obtuvieron valores de  $IC_{50}$  para fracciones peptídicas de albúmina 1 (Al.1.2., 0.4 kDa) y globulina (G.2.2.2, 0.55 kDa), utilizando grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), de  $0.35 \pm 0.02$  mg/mL y  $0.15 \pm 0.03$  mg/mL, respectivamente. Análogamente, Fritz *et al.*, (2011) reportaron un  $IC_{50}$  de  $0.12 \pm 0.02$  mg/mL en hidrolizados proteínicos del grano de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*). Por otro lado, en el hidrolizado de las proteínas de garbanzo (hidrólisis de 30 min) se determinó un  $IC_{50}$  de 0.18 mg/mL (Yust *et al.*, 2003); mientras que en el concentrado proteínico de arroz hidrolizado durante 2 h, se obtuvo un  $IC_{50}$  de 0.14 mg/mL (Guan *et al.*, 2007). A su vez, el concentrado proteínico de piñón hidrolizado por 1 h reportó un  $IC_{50}$  de 2.8 mg/mL (Marrufo *et al.*, 2012). En cuanto al concentrado proteínico de frijol mungo, después de 2 h de hidrólisis alcanzó un  $IC_{50}$  de 640  $\mu$ g/mL (Hong *et al.*, 2005). Por su parte, los hidrolizados del concentrado de frijol lima sin germinar (0.5 h), y germinado (2 h) presentaron un  $IC_{50}$  de 0.61 mg/mL y 0.56 mg/mL, respectivamente (Domínguez, 2009), en todos las proteólisis mencionadas utilizaron Alcalasa®.

Aun cuando con la fracción F4 (< a 1 kDa) se obtuvo la máxima actividad inhibitoria de la ECA-I existen reportes en los que se alcanza el  $IC_{50}$  con concentraciones de péptidos menores a lo encontrado en el presente trabajo, tal es el caso de lo reportado por Segura *et al.*, (2013) quienes determinaron que con las fracciones de 5-10 kDa y < a 1 kDa, obtenidas a partir de piñón (*Jatropha curcas*), se alcanzaron valores de  $IC_{50}$  de 6.7  $\mu$ g/mL y 4.78  $\mu$ g/mL. Por otro lado, Torruco (2009) reportó que la fracción peptídica de frijol lima con mayor actividad inhibitoria de la ECA-I fue la < a 1 kDa ( $IC_{50}$ = 30.3  $\mu$ g/mL) con Alcalasa®, y la fracción de 5-10 kDa ( $IC_{50}$ = 17.5  $\mu$ g/mL) con Flavorzima; mientras que para frijol Jamapa con Alcalasa® y Flavorzima en la fracción < 1 kDa ( $IC_{50}$ = 63.8  $\mu$ g/mL y 65.8  $\mu$ g/mL, respectivamente) se observó este mismo fenómeno. En el caso del hidrolizado de papá en la fracción menor a 3 kDa, se observaron las mayores actividades sobre la inhibición de la ECA-I (Pihlanto *et al.*, 2008). Los péptidos obtenidos de alfalfa ( $IC_{50}$ = 8.8  $\mu$ g/mL), garbanzo ( $IC_{50}$ = 11  $\mu$ g/mL), brócoli ( $IC_{50}$ = 10.5  $\mu$ g/mL) esto demuestra que hay otras fuentes vegetales que aportan péptidos con una mayor actividad inhibitoria de

la ECA-I, pero la ventaja de las fracciones peptídicas de la HFVA es que se trata de una fuente vegetal considerada como desecho agroindustrial.

En la mayoría de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA-I predominan los aminoácidos hidrofóbicos, principalmente la prolina (Lee *et al.*, 2006; Kapel *et al.*, 2006). Se ha reportado que la hidrólisis con Alcalasa® produce residuos de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal, pero también presenta preferencia a los enlaces peptídicos que contengan aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr) (Doucet *et al.*, 2003). Esto fue corroborado por Domínguez (2009) quien encontró que en el perfil de aminoácidos para las fracciones peptídicas de frijol Lima los aminoácidos predominantes fueron Pro, Trp, Met y Phe, así como aminoácidos hidrofóbicos. Por otro lado, Torruco (2009) indicó que la composición de aminoácidos de los hidrolizados proteínicos y de las fracciones peptídicas, tanto de frijol Lima y Jamapa, mostraron alto contenido de aminoácidos esenciales e hidrofóbicos como Trp, Thr, Val, Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Cys, Tyr e His. En el caso del brócoli la mayor actividad inhibitoria de la ECA-I la presentó el tripéptido Tyr-Pro-Lys (IC<sub>50</sub> 10.5 µg/mL) (Lee *et al.*, 2006). Yang *et al.*, (2003) realizaron la identificación de 4 secuencias peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis del aislado proteínico de la espinaca (MRWRD, MRW, LRIPVA y IAYKPAG), donde el tripéptido MRW tuvo la mayor actividad inhibitoria de la ECA-I. En base a lo mencionado anteriormente y aunque no se realizó la determinación del perfil de aminoácidos, la fracción F4 fue con la que se obtuvo la mayor actividad inhibitoria de la ECA-I, y es probable que dicha actividad esté en función de la secuencia, tamaño de la cadena peptídica (dipéptidos, tripéptidos, tetra péptidos o pentapéptidos) y características de los aminoácidos (principalmente hidrofóbicos y aromáticos).

Tabla 17. Comparación de la actividad inhibitoria de hidrolizados y fracciones peptídicas de fuentes vegetales sobre la ECA-I

Fuente proteica	Fracción con actividad IECA	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Referencia
HFVA ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	F4 (< a 1 kDa)	78.67	Este trabajo
HFVA ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	F3 ( 1-3 kDa)	219.08	Este trabajo
HFVA ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	F2 (3-5 kDa)	130.11	Este trabajo
HFVA ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	F1 (5-10 kDa)	273.01	Este trabajo
Frijol Lima ( <i>Phaseolus lunatus</i> )	< a 1 kDa	30.3	Torruco, (2009)
Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> )	< a 1 kDa	4.78	Segura <i>et al.</i> , (2013)
Grano ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	-	350 150	Tovar <i>et al.</i> , (2009)
Grano ( <i>Amaranthus mantegazzianus</i> )	-	120	Fritz <i>et al.</i> , (2011)
Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	-	18 86	Pihlanto <i>et al.</i> , (2008)
Garbanzo	-	180	Yust <i>et al.</i> ,(2003)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	-	140	Guan <i>et al.</i> , (2007)
Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> )	-	2800	Marrufo <i>et al.</i> , (2012)
Frijol mungo	-	640	Hong <i>et al.</i> , (2005)
Frijol Lima sin germinar Frijol Lima germinado	-	610 560	Domínguez, (2009)
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	Ala-Trp-Pro-Cys	8.8	Kapel <i>et al.</i> , (2006)
Garbanzo	Met-Asp-Leu	11	Yust <i>et al.</i> ,(2003)
Brócoli ( <i>Brassica oleracea Italica</i> )	Tyr-Pro-Lys	10.5	Lee <i>et al.</i> , (2006)
Espinaca Rubisco	Met-Arg-Trp	6	Yang <i>et al.</i> , (2003)

## 8. CONCLUSIONES

La extracción de la porción proteínica por precipitación isoeléctrica (M2 Betancur *et al.*, 1998) resultó más eficiente y con la que se obtuvo el mayor rendimiento. Siendo ésta una opción para la obtención de proteínas de la fracción vegetal del amaranto con la finalidad de aprovechar sus características nutricionales y funcionales.

La porción proteínica de la HFVA obtenida con el método M2 podría estar compuesta de albumina-1 ( $30.645 \pm 0.831$  kDa) y subunidades de globulina.

El GH de la albúmina-1 con Alcalasa® 2.4L fue de  $26.976 \pm 1.713$  % y se obtuvo a los 30 min de reacción permaneciendo constante hasta el final de la proteólisis.

Todas las fracciones peptídicas presentaron actividad inhibitoria *in vitro* sobre la ECA-I; obteniéndose la mayor actividad inhibitoria sobre la ECA-I ( $IC_{50} = 78.67$  µg/mL) con la fracción menor a 1 kDa.

Los resultados obtenidos en este trabajo son un precedente para el aprovechamiento integral del cultivo de amaranto, destacando el potencial de la fracción vegetal. Sin embargo aún falta optimizar las técnicas de extracción con solventes o líquidos iónicos, que son más inocuos al ambiente y que pueden incrementar los porcentajes de extracción de otras proteínas de interés; determinar el perfil de aminoácidos de los péptidos e investigar otras posibles actividades biológicas y/o tecnológicas de estos productos.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. (2000). Official methods of analysis. Editorial Gaithersburg. Cap. 2-13-14, Cap.4-13, Cap. 25-28, Cap. 32-1,2.
2. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6): 1256-1262
3. Alfaro, M.A., Martínez, A., Ramírez, R. y Bressani, R. (1987). Rendimiento y composición química de las partes vegetativas del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) en diferentes etapas fisiológicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 35 (01) 108-121.
4. Arce-Vásquez M. B. (2011). Obtencion de compuestos bifuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de maestria. Universidad Autonoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.
5. Arcila, N. (2011). Aplicación de un proceso enzimático para la obtención de un hidrolizado proteico a partir del frijol bayo (*Vigna sinesis*). Núcleo Regional de Educación Avanzada Valencia. Revista Electrónica Encuentro Transdisciplinar, Vol.1 N°1.
6. Atkinson, A. B., y Robertson, J. I. S. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *The Lancet*, 2: 836-839.
7. Barba de la Rosa A.P., Gueguen J., Paredes López O. y Viriben G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 931-936.
8. Barbana, C. y Boye, J. I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43: 1642-1649.

9. Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Betschart, A. A., y Saunders R. M. (1981). A compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*. 46(4): 1175-1180.
10. Belton, P.S. y Taylor, J.R.N. (2002). Pseudocereals and less common cereals. Grain properties and utilization potential. *Springer-Verlag*. Berlin, Heideberg, Alemania. 261 p.
11. Benishin, G. C. (2005). Tissue isoforms of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Hypertension*, 23(10): 1793-1794.
12. Benítez, R., Ibarz A., y Pagan J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 42(2): 227-36.
13. Bernal A. C. (2009). Purificación de inmunoglobulinas de suero de leche por técnicas cromatográficas. Tesis de licenciatura en Química. Universidad Industrial de Santander.
14. Betancur AD, Pérez FV, y Chel GL (1998). Procesamiento Tecnológico del grano de *Phaseolus lunatus*: Extracción y Caracterización de Proteína y Almidón. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Memorias Seminario de Investigación Precompetitiva XI.8. Quito, Ecuador.
15. Bónoli-Camacho, L.C. (2010). Evaluación del proceso para extraer proteínas totales del follaje de amaranto (*Amaranthus dubius*). Universidad de Oriente, Barcelona España. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química.
16. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
17. Bressani, R. (1995). Amaranto: Composición química y valor nutritivo del grano. Boucher, F. & Muchnik José (Eds.). Agroindustria rural, recursos técnicos y alimentación. (pp. 83-114). San José, Costa Rica.
18. Bünning, P. (1987). Kinetic properties of the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 10:S31-S35.
19. Chakraborty, S., Chakraborty, N., Agrawal, L., Ghosh, S., Narula, K., Shekhar, S., Naik, P.S., Pande, P.C., Chakraborti, S.K., y Datta, A. (2010). Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene *AmA1* is a result of

- proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41):17533- 17538.
20. Cho, J. M., Unklesbay, N., Hsieh, F-H., y Clarke, D. A. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5895-5901.
  21. Corvol, P. y Williams, T.A. (1998). In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. Eds.; *Academic Press: New York*: 1066-1076.
  22. Corvol, P., Williams, T.A. y Soubrier, F. (1995). Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods in Enzymology*, 248: 283-305.
  23. Cushman, D. W.; Cheung, H. S.; Sabo, E. F., y Ondetti, M. A. (1981). Angiotensin converting enzyme inhibitors: Evaluation of a new class of antihypertensive drugs. In Z. P. Horovitz (Ed.), *Angiotensin converting enzyme inhibitors: Mechanism of action and clinical implications*. *Urban & Schwarzenberg Baltimore-Munich*. pp. 1-25.
  24. Cushman, D.W., Wang, F.L., Fung, W.C., Grover, G.J., Harvey, C.M., Scalese, R.J., Mitch, S.L. y Deforrest, J.M. (1989). Comparisons in vitro, ex vivo, and in vivo of the actions of seven structurally diverse inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). *British Journal of Clinical Pharmacology*, 28:115S-131S.
  25. Delgado A., Minguillón C., y Joglar J. (Eds.) (2003). Capítulo 9. Nuevas tecnologías en el diseño de fármacos. Introducción a la química terapéutica. (pp. 169-182). Madrid, España.
  26. Domínguez, M. M., Betancur, A. B. y Chel G. L. (Eds) (2012). Caracterización de la ECA-I e inhibición con péptidos alimentarios. La enzima convertidora de angiotensina I y su inhibición. Editorial Académica Española, 115 p.
  27. Domínguez-Magaña, M. A. J. (2009). Aislamiento de biopéptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I a partir de hidrolizados de *P. lunatus*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional De Ciencias Biológicas. Tesis Doctoral en Ciencias en Alimentos.
  28. Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F. y Foegeding, A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide

- identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6300-6308.
29. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales (2012) Instituto Nacional de Salud Pública. Abúndez-Oropeza, C., Reveles, F., García-Letechipia, J., Voguel-Gutiérrez, S., y Gómez-Ocampo, Y. (Eds). Subdirección de Comunicación Científica y Publicaciones del Instituto Nacional de Salud Pública. Primera Edición, México, 192 p.
  30. Espitia, R. E, Mapes-Sánchez E. C., Nuñez-Colín C. A., y Escobedo-López D. (2010). Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(3): 427-437.
  31. Fang, H., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Youngquan, Wu., y Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs?. *Peptides*, 29(6): 1062-1071.
  32. FitzGerald, R. J., y Meisel, H. (2000). Milk Protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84: S33-S37.
  33. Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. y Añón M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Journal of Food Chemistry*, 126: 878-884.
  34. Gamboa A. R. (2006). Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Médica Peruana*, 23(2): 72-82
  35. Gómez, G., A.L., García, G., M.J., y Soriano S., J.(2011). Composición química proximal de harina elaborada a partir de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Memorias del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Juriquilla, Querétaro.
  36. Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89
  37. Guan-Hong, Li, Guo-Wei, Le, Yong-Hui Shi, y Shrestha S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24: 469-486.

38. Guan-Hong, Li, Ming-Ren, Q., Ju-Zhen, W. y Jin-Ming, Y. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(1): 275-280.
39. Hamada, J. S. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, 65(2): 305-310.
40. Hayakari, M.; Kondo, Y., y Izumi, H. (1978). A Rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84: 361-369.
41. Hernández-García, D. R., y Herrerías-Guerra G. (1998). Amaranto: Historia y Promesa. Tehuacán: Horizonte del Tiempo (1) 529.
42. Hong, E., Bravo, G., y Villalobos-Molina, R. (2003). Hipertensión arterial. *Avance y Perspectiva*, 22: 243-249
43. Hong, G., Wei, G., Liu, H. y Hui Y. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11(4): 281-287.
44. Hoover R, Rorke SC y Martin AM (1991). Isolation and Characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Starch. *Journal of Food Biochemistry*. 15:117-136.
45. Huerta-Ocampo J., y Barba de la Rosa A. P. (2011) Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Current Nutrition & Food Science*, 7: 1-9.
46. Inurreta-Ynurreta, F., González, J. R., Domínguez-Magaña, M., Ruiz-Ruiz, J., Betancur-Ancona, D., y Chel-Guerrero, L. (2007). Incorporación de hidrolizados proteicos de diversas fuentes vegetales en extruidos de mezclas de maíz-leguminosa: caracterización física y evaluación de la actividad antioxidante. *Memorias del IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de alimentos*. (pp 538-545).
47. Jayaprakasm, B., Zhang, Y., y Nair, M. G. (2004). Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzymes inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23): 6939-6943.

48. Johnston, J.I. (1992). Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *Journal of Hypertension*, 10: S13-S26.
49. Johnston, C.I., Jackson, B., Cubela, R., Larmour, I. y Arnolda, I. (1986). Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE) in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ACE inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 8:S9-S14.
50. Kapel, R., Chabeau, A., Lesage, J., Riviere, G., Ravallec-Ple, R., Lecoutrurier, Wartelle, M., Guillochon, D. y Dhulster P. (2006). Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. *Food Chemistry*, 98: 120-125
51. Kitts, D. D., y Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16): 1309-1323.
52. Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9): 945-960.
53. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680–685.
54. Lee, J.E., Bae, Y.I., Lee, G.H, y Yang C.B. (2006). Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). *Food Chemistry*, 99; 143-148.
55. Mapes-Sánchez, E. C. (2010). El amaranto (*Amaranthus spp.*) planta originaria de México. *Academia, Ciencia y Cultura. AAPAUNAM*, 4: 217-222.
56. Marrufo-Estrada, D.M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., y Escalante-Hernández, V. (2012). Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I con hidrolizados proteicos de *Jatropha curcas*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(3): 385-392.
57. Martínez, E.N. y Añón, M.C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 2523-2530.

58. Martínez-González, J. C. (2010). Variedades sobresalientes de amaranto en el estado de Tlaxcala. Centro de Investigación Regional Centro INIFAP Tlaxcala. Desplegable para productores No. 8.
59. Matsufuji, H., Matsui, T., Ohshige, S., Kawasaki, T., Osajima, K., y Osajima, Y. (1995). Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 59: 1398–1401.
60. Matsui, L., Tanaka, T., Maki, T., Osajima, Y., y Matsumoto, K. (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 23: 427–431.
61. Matsui, T.; Hayashi, A.; Tamaya, K.; Matsumoto, K.; Kawasaki, T.; Murakami, K., y Kimoto, K.-I. (2003). Depression effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensin system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30: 262-265.
62. Megías, C., Yust, M. M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., y Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1928-1932.
63. Monrrone, J.J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76: 207-252
64. Morais, H.A., Silvestre, M.P.C., Silva, V.D.M., Silva, M.R., Simoes, A.C. & Silveira, J.N. (2013). Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology*, 8: 1-16.
65. Morales-Guerrero, J. C., Vázquez-Mata, N., y Bressani-Castignoli, R. (2009). El amaranto, características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. 269 p.
66. National Academy of Sciences. (1984). Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington D.C.

67. Nielsen, M.P., Petersen, D., y Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5): 642-646.
68. Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the reninangiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 283-308.
69. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Global Health Observatory. Raised blood pressure. Situation and trends*. Consultado el 01 de febrero de 2014, [en línea]: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_prevalence\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/index.html)
70. Parvathy, S., Oppong, S. Y., Karran, E. H., Buckle, D. R., Turner, A. J. y Hooper, N. M. (1997). Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochemical Journal*, 327: 37-43.
71. Pedroche, J., Yust, M., Megías, C., Lqari, H., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., y Vioque, J. (2004). Utilisation of rapessed protein isolates for production of peptides with angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 354-358.
72. Pilhanto, A., Akkanen, S., y Korhonen, H. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 109: 104-112.
73. Raina A, y Datta A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed specific protein with nutritional and balanced aminoacid composition from *Amaranthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80: 11774-11778.
74. Rosas Peralta M., Lara Esqueda, A., Pastelín Hernández, G., Velázquez Monroy, O., Martínez Reding, J., Méndez Ortiz, A., Lorenzo Negrete, J. A., Estrada C. L. González Hermosillo, A., Herrera Acosta, J., y Tapia Conyer, R. (2005). Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): consolidación mexicana de los factores de riesgo cardiovascular. Cohorte nacional de seguimiento. *Archivos de Cardiología de México*, 75: 96-111.

75. Rosas, M., Pastelín, G., Reding-Martínez, J., y Herrera-Acosta J. (2004). Hipertensión arterial en México. Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*, 74: 134-157.
76. Rossetti, M.R., Defagó, M.T., Carpinella, M.C, Palacios, S.M. y Valladares G. (2008). Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 67(1-2): 115-125
77. Rutherford S.M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International*, 93(5): 1515-1522.
78. SAGARPA (2012). Cierre de la producción agrícola por estado <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
79. Salazar-Vega, I. M., Segura-Campos, M. R., Chel-Guerrero, L. A., y Betancur-Ancona, D. A. (2012). Antihypertensive and antioxidant effects of functional foods containing chia (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*, Dr. Benjamin Valdez (Ed). (pp 381-398).
80. Sani, H. A., Rahamat, A., Ismail, M., Rosli, R., y Endrini, S. (2004). Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangengitus*) extract. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(4): 396-400.
81. Sauer, J. D. (1967). The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 54:103-137.
82. Sauer, J. D. (1993). Historical geography of crop plants: a select roster. CRC Press. Los Angeles, USA. 320 p.
83. Scow, T. D., Smith, G. E., y Shaughnessy, F. A. (2003). Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin-receptor blockers heart failure. *Clinical Pharmacology*, 68(9): 1795-1798.
84. Segura-Campos, M. R., Peralta-González, F., Castellanos-Ruelas, A., Chel-Guerrero, L. A. y Betancur-Ancona, D. A. (2013). Effect of *Jatropha curcas* peptide fractions on the angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *BioMed Research International*, vol. 2013, article ID 541947, (1-8).

85. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. y Betancur Ancona, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience.136
86. Shukla, S. Bhargava, A., Chatterjee, A., Srivastava, J., Singh, N. y Singh, S. P. (2006). Mineral profile and variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*) *Plant Foods for Human Nutrition*, 61: 23-28.
87. Skeggs, L. T., Kahn, J. R. y Shumway, N. P. (1956). The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, 103: 295-299.
88. Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S., & Fujimoto, K. (1992). Solubility of amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride: the main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 27(3): 337-346.
89. Soriano-Santos, J., Malpica-Sánchez, F.P., Ramírez-Romero, M.A.G. y Escamilla-Hurtado, M.L. (2004). Análisis granulométrico de una harina de hoja de amaranto deshidratada, para la elaboración de una bebida de fibra dietética. *Tecnología de Alimentos*, 39(01): 7-12.
90. Soubrier, F.; Hubert, C., Testut, P.; Nadaud, S.; Alhenc-gelas, F., y Corvol, P. (1993). Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *Journal of Hypertension*, 11: 471-476.
91. Tamás, C., Kisgyörgy, B. N., Rakszegi, M., Wilkinson M.D., Yang, M.S., Lang, L., Tamás, L. y Bedö, Z. (2009). Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality
92. Tardioli, W.P., Fernández-Lafuente, R., Guisán, M.J. y Giordano, 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.
93. Torresani, M. E., y Somoza, M. I. (1999) Lineamientos para el cuidado nutricional. Ed. Eudeba. Buenos Aires.
94. Torruco-Uco, J. G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol Jamapa

- (*Phaseolus vulgaris*) Tesis de doctorado. Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
95. Touyz, R.M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8): 1263-1273.
  96. Touyz, R.M. y Schiffrin E.L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Review*, 52(4): 639-672.
  97. Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A. y Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme – inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 116: 437-444.
  98. Turner, A.J. y Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23:177-183.
  99. Tzacos, A.G, Galanis, A., Spyroulias, G.A., Cordopatis, P., Manessi-Zoupa, E. y Gerothanassis, I.P. (2003). Structure-function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl- activation and peptide hydrolysis mechanisms. *Journal of Protein Engineering*, 16(12): 993-1003.
  100. Van der Ven C., Gruppen, H., De Bont, A. B. D. y 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.
  101. Villanueva, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Bautista, J. y Millán F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo- proteases. *International Journal of Fats and Oils*, 50: 472-476.
  102. Villanueva, O. y Arnao, I. (2007). Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (kiwicha). *Anales de la Facultad de Medicina*, 68(4): 344-350.

103. Wang, W. y Gonzales de Mejía, E. (2005). A new Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-Related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4: 63-78.
104. Yang, Y., Marczak, E. D., Yokoo, M., Usui, H. y Yoshikawa, M. (2003). Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4897-4902.
105. Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., y Millán, F. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestión of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81: 363-369

## ANEXOS

Anexo A  
NOMENCLATURA

## Abreviaturas para aminoácidos

A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina o ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina o ácido glutámico

---

**Abreviaturas comunes en el texto**

---

A	absorbancia
BSA	albúmina sérica bovina
Ang-I	Angiotensina I
Ang-II	Angiotensina II
Ao	Angiotensinógeno circulante
Na <sup>+</sup>	catión sodio
cm	centímetro
IC <sub>50</sub>	Concentración de péptido que inhibe 50% la actividad de la ECA
DM-2	Diabetes mellitus tipo 2
ECEA	Enfermedades crónicas esenciales del adulto
ECA-I	Enzima convertidora de la angiotensina I
hECA	forma hidrosoluble de la ECA
sECA	forma somática de la ECA
tECA	forma testicular de la ECA
x g	Factor de multiplicación de la fuerza de gravedad
GH	Grado de hidrólisis
°C	grados Celsius
g	gramo
HFVA	Harina de la fracción vegetal del amaranto
ha	hectárea
HTAS	Hipertensión arterial sistémica
h	horas
kDa	kiloDalton
NMWL	límite de peso molecular nominal
L	Litro
$\lambda$	longitud de onda
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ mol	micromol
mg	miligramos

---

---

mL	mililitro
mm de Hg	milímetros de mercurio
mM	milimolar
min	minutos
M	Molar
nm	nanómetros
N	Normal
OMS	Organización mundial de la salud
\$	pesos
pH	potencial de hidrógeno
PA	presión arterial
AT <sub>1</sub>	receptores AT <sub>1</sub>
AT <sub>2</sub>	receptores AT <sub>2</sub>
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
t	tonelada

---

## Anexo B

### Preparación de la curva estándar de L-Serina

Se realizó una curva de calibración (Tabla 18), empleando como testigo L-Serina en agua desionizada al 0.1% (50mg/500mL), y 1.5 mL del reactivo de OPA, el cual se preparó con 3.81 g de tetraborado de sodio y 100 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS) en 150 mL de agua desionizada. A parte se disolvió 80 mg de OPA en 2 mL de etanol, y por último disolver 88 mg de DTT (treo-2,3-dihidroxi-1,4-butanoditiol) en 100 mL de agua desionizada, después mezclar las tres soluciones anteriores.

Tabla 18. Volúmenes utilizados en la preparación de la curva estándar de L-Serina

	H <sub>2</sub> O (µL)	L- Serina (µL)
<b>Blanco</b>	200	-
<b>Testigo 1</b>	150	50
<b>Testigo 2</b>	100	100
<b>Testigo 3</b>	50	150
<b>Testigo 4</b>	-	200

El reactivo de OPA y los testigos fueron agitados durante 5 s y las absorbancias se determinaron a 340 nm, después de 2 min, en un espectrofotómetro VE-5100UV de VELAB™ SPECTROPHOTOMETER.

## Anexo C

### Curva estándar para la cuantificación de proteína, por el método de Bradford

En la Tabla 19, se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de proteína en el hidrolizado enzimático y en las fracciones peptídicas menores a 10 kDa.

Tabla 19. Concentraciones utilizadas para la obtención de la curva estándar de BSA

BSA [mg prot/mL]	Absorbancia (595nm)
0.05	0.181 ± 0.007
0.075	0.247 ± 0.005
0.1	0.338 ± 0.005
0.125	0.401 ± 0.016
0.15	0.441 ± 0.017
0.175	0.480 ± 0.002
0.2	0.537 ± 0.011
0.225	0.612 ± 0.017
0.25	0.676 ± 0.017

En la figura 15, se muestra la curva estándar de BSA (mg/mL), donde se grafica en el eje de las abscisas la concentración de BSA expresada en mg/mL y en el eje de las ordenadas la absorbancia a 595 nm correspondientes a cada concentración de BSA, así como la ecuación obtenida a partir de su linealización para la determinación de proteínas en las muestras analizadas en el presente trabajo.

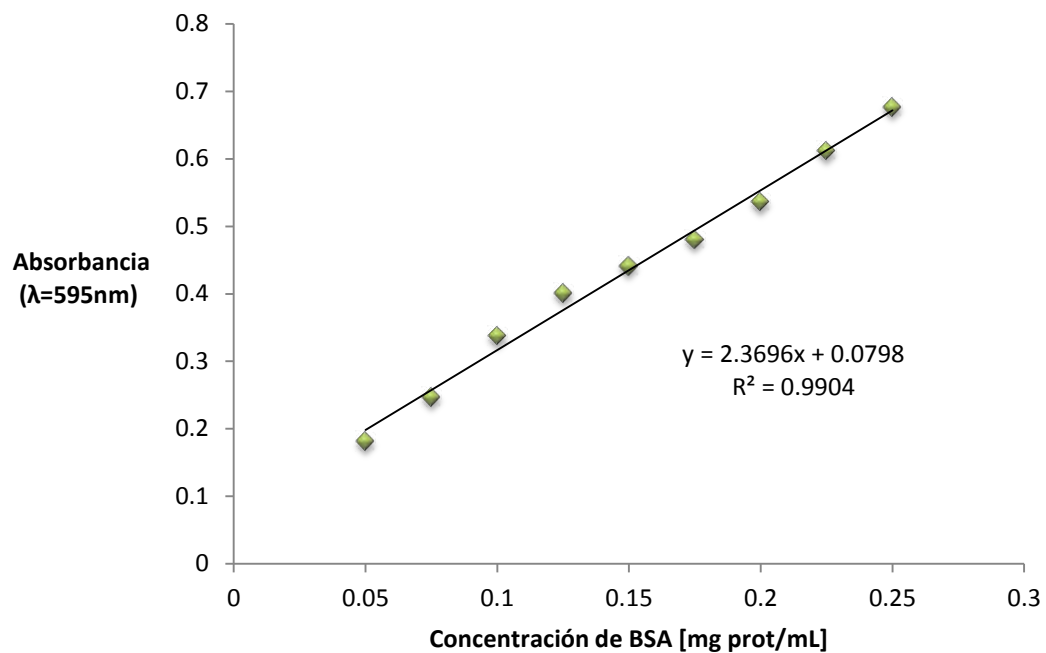


Figura 15. Curva estándar de BSA para la cuantificación de proteínas

## Anexo D

### Curva estándar de L-Serina, para la determinación del %GH por OPA

En la Tabla 20, se muestra las absorbancias obtenidas para la elaboración de la curva de calibración, que se utilizó en la determinación del grado de hidrólisis, de acuerdo a la técnica del ortofeniltaldehído (OPA).

Tabla 20. Concentraciones utilizadas para la obtención de la curva estándar de L- Serina

L-Serina [mg/mL]	Absorbancia (340 nm)
0	0.071 ± 0.003
0.025	0.259 ± 0.001
0.05	0.447 ± 0.013
0.075	0.624 ± 0.001
0.1	0.802 ± 0.005

En la figura 16, se muestra la curva de calibración de L-Serina, donde se grafica en el eje de las abscisas la concentración de L-Serina expresada en mg/mL y en el eje de las ordenas la absorbancia a 340 nm, así como la ecuación obtenida a partir de su linealización, para la determinación del grado de hidrólisis.

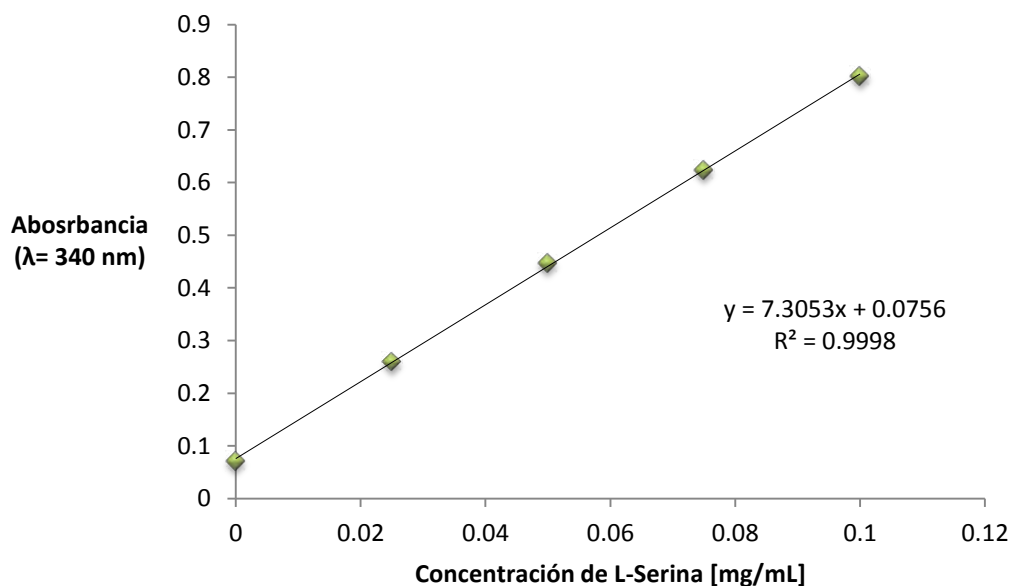


Figura 16. Curva estándar de L-Serina para la determinación del %GH por el método de OPA

## Anexo E

### Extracción de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA-I) a partir del pulmón de conejo

La enzima se obtuvo a partir del pulmón de conejo. Para ello se homogenizó en frío 1 g de pulmón con un tampón de fosfato 0.1 M pH 8.3 – sacarosa 0.25 M en relación 1:5, adicionando 5  $\mu$ L PMSF 0.1 M (Fenilmetilsulfonilfluor). Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente se guardó en congelación.

## Anexo F

### Marcador de peso molecular de amplio rango (BIO-RAD®, No. cat. 161-0318)

Tabla 21. Marcador de PM utilizado en la electroforesis SDS-PAGE

Proteína	PM (kDa)
Miosina	209.998
$\beta$ -Galactosidasa	117.068
BSA	97.834
Ovoalbúmina	55.145
Anhidrasa carbónica	37.491
Inhibidor de la tripsina de soya	29.005
Lisozima	19.720
Aprotinina	6.869