

# **UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS**

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BIOPÉPTIDOS OBTENIDOS POR  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN VEGETAL  
DEL AMARANTO (*Amaranthus hypocondriacus* L.)**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:  
I. B. Q. OFELIA RAMÍREZ ISIDRO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA DE JESÚS GARCÍA GÓMEZ**

**SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, MEXICO DE 2017**

Maestría en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan. Programa Nacional  
de Posgrados de Calidad (PNPC) con número de registro de 003131 del  
CONACYT.

## DEDICATORIAS

**Dedico este trabajo principalmente a Dios.** Creador de todas las cosas, a él le doy muchas gracias, por su infinita bondad y amor; pero sobre todo por protegerme, por darme fuerzas para superar obstáculos, dificultades a lo largo de toda mi vida y por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

**A la memoria de mi madre.** Una mujer Inigualable que me enseñó sus valores, me enseñó a seguir adelante sin importar que tan mal estén las cosas, a luchar por lo que se quiere hasta el último momento, pero más que nada, por sus consejos que me permite ser una persona de bien, Muchas gracias mamita, siempre estarás en mi corazón.

**A mi papá.** Por apoyarme en todo, para salir adelante y por su amor.

**A mi esposo.** Quien me brindó su apoyo constante, por estar conmigo en aquellos momentos en la universidad y por cuidar de nuestra hija cuando yo no estaba. Gracias por toda tu ayuda.

**A mí adorada hija Génesis Alexa.** Gracias por tu cariño y amor, que son los que me dan fuerzas, ganas de seguir adelante y buscar lo mejor para ti. Aunque a tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando lo que es el amor verdadero e incondicional en esta vida. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida y no amargo, pero sobre todo le doy gracias a Dios, por permitirme tenerte a mi lado, eres y seguirás siendo mi mejor regalo. Fuiste mi motivación más grande para concluir este proyecto de tesis. ¡Gracias, mi niña hermosa!

**A mí cuñado Pedro.** Quien ha sido como un padre para mi, gracias por tu apoyo, por animarme a seguir adelante y muchos de mis logros te los debo, incluido éste.

**A mí querida hermana Tere.** Te lo dedico de manera especial pues has sido el principal cimiento para la construcción de mi vida, sentaste en mí las bases de la

responsabilidad y el deseo de superación, has sido como una madre para mí, agradezco tus consejos y a Dios por tenerte a mi lado. Estoy agradecida porque has cuidado de mi hija mientras realizaba mis estudios, sin ti no hubiese podido hacer realidad este sueño. Te quiero mucho.

**A todos mis hermanos.** Merced, Julia, Alicia, Eustacio, Raymundo y Alfonso por apoyarme, y sobre todo por con sus consejos, aunque algunos estén lejos siempre han estado en los momentos buenos y malos. Gracias a Dios por toda mi familia porque nunca dudaron que lograría este triunfo. ¡Los quiero mucho!

## AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec.** Institución que me dio la bienvenida, y que me encamino para realizar mi estudio profesional.

**A la Dra. María de Jesús García Gómez.** Por permitirme ser parte de esta investigación, por el apoyo que me ha brindado para terminar esta tesis, hacerme ver otros puntos de vista, por todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo por su confianza.

**A la Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre.** Por su tiempo, paciencia y apoyarme en el laboratorio.

**Al Dr. Luis Antonio Chel Guerrero.** Por haberme permitido realizar parte de mi investigación en el laboratorio de ciencias de los alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

**I.B.Q. Juan Hernández Sánchez.** Por su ayuda, disponibilidad y apoyo en los laboratorios de la universidad del Papaloapan (Bioprocesos y Químico Biológico).

**Q.F.B Leticia Saldaña.** Por todo el apoyo, ayuda, confianza y la atención que me dio en los laboratorios de la universidad del Papaloapan (Bioprocesos y Químico Biológico).

**Al Q.I. Felipe de Jesús Flores Narváez.** Técnico del Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, por su apoyo en los manejos de equipos y paciencia en el laboratorio, más que nada por su amistad.

**A los revisores: Dr. Mario de Jesús Domínguez Magaña, Dr. Oscar Nuñez Gaona, Dr. Ricardo Hernández Martínez, Dr. Luis Guillermo González Olivares y Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño.** Gracias por sus aportaciones y comentarios recibidas para la realización de esta tesis.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).** Por brindarme el apoyo económico para realizar la maestría en biotecnología con número de becaria 296718.

Proyecto “Estudio de las proteínas e hidrolizados proteicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)”, No. 158389, Convocatoria CB-2010-01, Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT

**Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).** Por brindarme el Proyecto “Caracterización de los componentes químicos de hidrolizados de la fracción vegetal de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)”. Convocatoria PROMEP 2009, segundo año Apoyo a la incorporación de Nuevos PTC”, Oficio No. PROMEP/103.5/11/6158.

## ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
ADN	Ácidos desoxirribonucleico
SOD	Superóxido dismutasa
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
NADPH <sub>2</sub>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
ET	Transferencia de electrones
AAPH	2,2'-Azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro
TRAP	Parámetro antioxidante total de captura de radicales peroxilo
Trólox	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
LDL	Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil
ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Persulfato de potasio
FVA	Fracción vegetal del amaranto
kDa	Kilo Dalton
HFVA	Harina de la fracción vegetal del amaranto
CP	Concentrado proteínico

GH	Grado de hidrólisis
%I	Porcentaje de inhibición
IC <sub>50</sub>	Concentración de péptido que inhibe el 50% de la actividad antioxidante
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al trolox
OPA	Orto- ftalaldehído
DTT	Ditiotreitol

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. Tomado de (Maldonado <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figura 2. Materia prima FVA. ....	25
Figura 3. Diagrama de proceso de ultrafiltración con las 4 membranas.....	30
Figura 4. Perfil electroforético del CP de la FVA; carril 1: marcador de PM (bajo rango), carril 2: BSA, Carriles 3, 4, 5 y 6 son replicas del CP de la FVA. ....	34
Figura 5. Hidrólisis enzimática del CP de la FVA hidrolizados con Flavourzyme® (♦) y Alcalasa® (■).....	36
Figura 6. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Flavourzyme®. Las letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones.....	39
Figura 7. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Alcalasa®. Las letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones.....	40
Figura 8. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Alcalasa® o Flavourzyme®. Las letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones. ....	41
Figura 9. Curva estándar de L-Serina .....	57
Figura 10. Curva de referencia para estimación del peso molecular de proteínas.....	60
Figura 11. Gráfica de la ecuación de la recta de albúmina. ....	61
Figura 12. Gráfica de la ecuación de la recta de la curva estándar de Trolox.....	64

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. ....	8
Tabla 2. Clasificación de los métodos según los tipos de ensayos. ....	11
Tabla 3. Péptidos bioactivos obtenidos enzimáticamente a partir de diferentes fuentes de proteínicas.....	14
Tabla 4. Péptidos con actividad antioxidantes obtenidos a partir de proteínas de fuentes vegetales convencionales y no convencionales.....	16
Tabla 5. Clasificación botánica del amaranto, modificado de Saucer (1967). ....	18
Tabla 6. Principales Estados de la Republica Mexicana productores de amaranto. ....	19
Tabla 7. Química proximal del grano y de la hoja del amaranto (A. Hypocondriacus L.).....	20
Tabla 8. Porcentaje de proteína en la HFVA y en el CP. ....	32
Tabla 9. Comparación del % de GH de diferentes fuentes proteínicas hidrolizados con Alcalasa® y Flavourzyme®. ....	38
Tabla 10. Comparación de la actividad antioxidante de péptidos de diferentes fuentes vegetales determinada con diferentes metodologías. ....	43
Tabla 11. Preparación del reactivo OPA. ....	56
Tabla 12. Curva estándar L-Serina (50mg/500mL). ....	56
Tabla 13. Movilidad electroforética relativa (Rf) del marcador de PM. ....	59
Tabla 14. Curva estándar para la determinación de proteína total (Bradford 1976). ....	61
Tabla 15. Curva estándar de Trolox. ....	63
Tabla 16. Comparación de tiempos de hidrólisis con Flavourzyme.....	65
Tabla 17. Comparación de tiempos de hidrolisis con Alcalasa.....	65
Tabla 18. Comparación de tiempo de hidrolisis entre Flavourzyme y Alcalasa.....	66
Tabla 19. Diferencias entre fracciones peptídicas con Flavourzyme.....	67
Tabla 20. Diferencias entre fracciones peptídicas con Alcalasa.....	67
Tabla 21. Comparación de fracciones peptídicas entre ambas enzimas. ....	68

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. El metabolismo. ....	3
2.2. Los radicales libres. ....	4
2.3. Antioxidante. ....	7
2.3.1. Sistemas antioxidantes. ....	7
2.4. Actividad antioxidante .....	8
2.4.1. Métodos de la actividad antioxidante. ....	10
2.5. Péptidos bioactivos .....	12
2.5.1. Obtención de péptidos bioactivos. ....	13
2.6. Péptidos antioxidantes .....	15
2.7. Péptidos bioactivos del grano y de la fracción vegetal de amaranto .....	17
2.8. Aspectos generales de amaranto. ....	17
2.8.1. Usos del grano y de la hoja de amaranto. ....	18
2.8.2. Producción del cultivo de amaranto. ....	19
2.8.3. Composición química proximal del grano y la fracción vegetal de amaranto.....	20
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVOS .....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivo específicos.....	23
6. DIAGRAMA DE DESARROLLO EXPERIMENTAL. ....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
7.1. Obtención de materia prima.....	25
7.2. Obtención de la harina de la FVA. ....	25
7.3. Extracción de proteínas. ....	26
7.4. Determinación de proteínas al CP de la FVA. ....	27
7.5. Hidrólisis monoenzimáticas .....	27

7.6. Hidrólisis total (ácida).....	28
7.7. Determinación del grado de hidrólisis (%GH). ....	28
7.8. Electroforesis (SDS-PAGE) .....	29
7.9. Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración.....	29
7.10. Determinación de proteína en las fracciones peptídicas de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa® y Flavourzyme®. ....	30
7.11. Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas. .....	31
7.12. Análisis estadísticos.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
8.1. Extracción de las proteínas en las harinas. ....	32
8.2. Identificación de proteínas de los CP de la FVA y (SDS-PAGE). ....	34
8.3. Hidrólisis enzimática .....	36
8.4. Determinación de la actividad antioxidante.....	39
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA .....	44
9.1. Conclusiones. ....	44
9.2. Perspectiva. ....	44
10. BIBLIOGRAFÍA. ....	45
11. ANEXOS .....	56
Anexo 1 .....	56
Anexo 2. ....	59
Anexo 3. ....	60
Anexo 4. ....	62
Anexo 5. ....	65

## 1. INTRODUCCIÓN

El metabolismo es el conjunto de procesos físicos y químicos que ocurren en las células y, que convierte a los nutrientes de los alimentos en la energía necesaria para que el cuerpo cumpla con todas sus funciones vitales. El oxígeno es importante para llevar a cabo este proceso llamado respiración celular. Sin embargo, aunque el oxígeno es imprescindible, su uso en la respiración celular da lugar a la producción de radicales libres y otras especies reactivas a él. Además de esos radicales que se generan inevitablemente, hay otros factores como la exposición a ciertas radiaciones que pueden generar nuevos radicales libres (Finkel y Holbrook 2000).

Los radicales libres causan daños en las células al oxidar los lípidos de las membranas, proteínas celulares, ADN y enzimas, generando así enfermedades como arterioesclerosis, diabetes, artritis reumatoide cáncer, etc. (Pihlanto, 2006; Hwang *et al.*, 2010). Este tipo de moléculas pueden combatirse con antioxidantes, que son sustancias naturales que los neutralizan. El cuerpo humano tiene sistemas enzimáticos antioxidantes que incluyen la catalasa, la superóxido dismutasa entre otras (Samaranayaka y Li 2011). Los antioxidantes también están presentes en los alimentos y se pueden consumir a través de la dieta, estos antioxidantes incluyen a la vitaminas C, E, polifenoles, carotenoides y terpenoides (Shahidi 2008).

En los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes. Las proteínas tradicionalmente se han manejado como una fuente para obtención de aminoácidos, sin embargo se ha determinado que también son fuentes de péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes (Zhang *et al.*, 2014).

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas de 3 a 20 aminoácidos (Pihlanto 2000; Shahidi y Zhong 2008). Estos péptidos tienen diferentes

actividades biológicas como antitrombótica, antiinflamatoria, opiáceas, inmunomoduladores, antihipertensiva y antioxidante: Estos pueden ser utilizados como ingredientes de los alimentos funcionales o nutraceuticos, que no solo cumplen con la función de proporcionar nutrientes, sino también regulan alguna actividad biológica en el humano proporcionando beneficios para salud. Algunas de las presentaciones en las que se han incluido (los biopéptidos nutraceuticos) son: leches fermentadas, bebidas, barras energéticas, panes y dulces, entre otros (Draeos 2010). Recientemente se ha reportado la actividad antioxidante de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimáticas de fuentes proteicas como la canola (Cumby *et al.*, 2008), la papa (Cheng *et al.*, 2010; Kudo *et al.*, 2009), el trigo (Zhu *et al.*, 2006), el huevo (Memarpoor *et al.*, 2012) y la colza (He *et al.*, 2013; Mäkinen *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas obtenidas por hidrólisis monoenzimáticas de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El metabolismo.

El humano necesita nutrientes para sobrevivir, los cuales proporcionan energía para realizar cualquier actividad; para obtenerla se necesitan tres etapas; la primera es en el citosol de la célula a través de la glucólisis, enseguida tiene lugar el ciclo de Krebs, el cual se lleva a cabo en las mitocondrias y finalmente la última etapa para generar energía es en la membrana interna mitocondrial, donde existen proteínas de óxido-reducción (cadena de transporte de electrones). Estas usan como aceptor final de electrones al  $O_2$  para la formación de agua. La energía liberada en este proceso se utiliza para la síntesis de ATP. (Ravikumar *et al.*, 2010). Sin embargo, en el cuerpo humano existe un balance de óxido-reducción constante que preserva el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensas antioxidantes. La pérdida en este balance lleva a un estado de estrés oxidativo que se caracteriza por un aumento en la concentración de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ERO), si éste no puede ser compensado por los sistemas antioxidantes intrínsecos causa daño y muerte celular (Halliwell y Gutteridge 1999). Estos radicales se forman, mayormente, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como se muestra en la figura 1. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, el 5 o 10% se reduce por la acción de los electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria que escapan de ésta, siendo responsable de la formación del radical superóxido ( $O_2^-$ ), que por acción de la superóxido dismutasa (SOD) se convierte en peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y éste mediante la reacción de Fenton se convierte en el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). (Maldonado *et al.*, 2010).

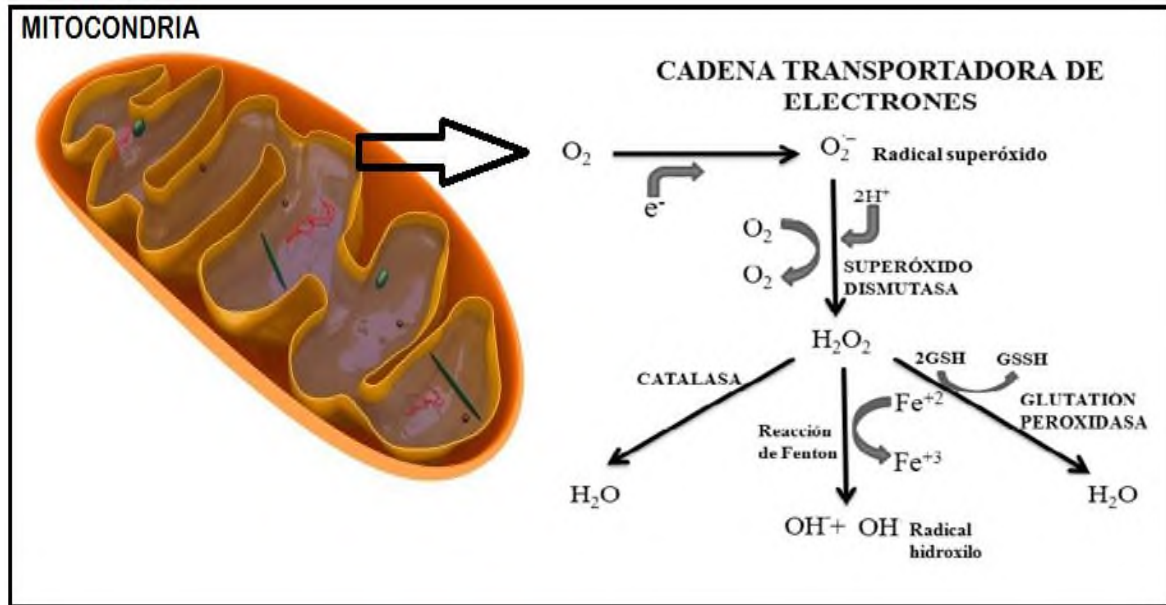


Figura 1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. Tomado de (Maldonado *et al.*, 2010).

## 2.2. Los radicales libres.

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado. Esta característica los hace muy reactivos debido a que quedan con la capacidad de captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre, que queda con un electrón desapareado. De esta forma se inicia una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre biomoléculas de células y tejidos (Maldonado *et al.*, 2010).

Como producto del metabolismo humano se generan distintos tipos de radicales libres, como:

- Especies reactivas de oxígeno (ERO):

- anión superóxido ( $O_2^-$ )
  - anión peróxido ( $O_2^{2-}$ )
  - radical perhidroxilo ( $HO_2$ )
  - radical hidroxilo ( $\bullet OH$ )
- Especies reactivas de nitrógeno (ERN):
- nitrosonium ( $NO^+$ )
  - radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
  - anión nitroxilo ( $NO^-$ )
  - dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ).

Los radicales libres también son generados por factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas

A pesar de que los radicales libres pueden cumplir numerosas funciones útiles en el organismo, como señalización y prevención contra infecciones (Halliwell 2006), un desequilibrio y exceso de radicales libres pueden dañar las células ya que por su alta inestabilidad atómica pueden colisionar con cualquier biomolécula sustrayéndole un electrón hasta oxidarla. De esta manera, lípidos, proteínas y ADN pierden su función biológica dentro de la célula (Criado y Moya 2009) causando enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares entre otras (Halliwell 2006)

**Daño a ácidos nucleicos (ADN).** La presencia o incremento con los años de productos oxidativos del ADN señalan una permanente agresión causada por estrés oxidativo, lo que tiene serias consecuencias carcinógenas y mutantes (Mayor 2010).

**Daño a proteínas.** Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina,

el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los más propensos a sufrir procesos oxidativos. Esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica. El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Céspedes y Sánchez 2000; Stadtman y Levine 2003). Estos efectos de modificación de las proteínas aumentan o disminuyen su función y se relacionan con procesos reumáticos, patologías de tipo gastroentéricas, renales, neurológicas, endócrinas, broncopulmonares, entre muchas otras; las más destacadas son las cardiopatías, cáncer y diabetes (Valko *et al.*, 2007; Moskovitz *et al.*, 2002).

**Daño a carbohidratos.** Los efectos de los radicales libres sobre los carbohidratos, son poca conocidos. Sin embargo se ha mencionado que el ácido hialurónico, la condroitina y el dermatán sulfato, todos ellos polisacáridos del grupo de los glucosaminoglucanos, son susceptibles a su degradación en presencia de las especies reactivas de oxígeno, particularmente a los radicales superóxido e hidroxilo, lo que probablemente altera la función de los proteoglicanos de los que forman parte y esto se ha relacionado con la patogenia del proceso inflamatorio (Moseley *et al.*, 1997).

**Daño a lípidos.** En el caso de los lípidos especialmente aquellos que contienen ácidos grasos poli-insaturados son especialmente susceptibles a desarrollar procesos de oxidación no controlados. El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la pérdida de los gradientes iónicos en ambos lados de la membrana (Kim *et al.*, 2002).

Todos estos daños están asociados al estrés oxidativo, es decir, un aumento en las especies oxidantes principalmente ERO (Valko *et al.*, 2007). Por lo tanto los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Huang *et al.*, 2005).

## **2.3. Antioxidante.**

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes (Zamora 2007). En términos alimentarios, los antioxidantes son capaces de retardar o prevenir el proceso de oxidación y la formación de subproductos indeseables (Samaranayaka y Li, 2011). Se han clasificado dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres (Zamora 2007).

### **2.3.1. Sistemas antioxidantes.**

a) Sistema antioxidante enzimático. Producidos por el organismo para contrarrestar los efectos de los radicales libres en cierto grado; son un conjunto de enzimas que constituyen la primera línea de defensa celular frente a los oxidantes biológicos, disminuyendo la concentración intracelular de radicales libres. En este tipo de sistemas se destacan las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Katalinic *et al.*, 2005).

b) Sistema antioxidante no enzimático. Es la segunda línea de defensa y está constituido por secuestradores de radicales libres residuales que no hayan podido ser neutralizados por las enzimas antioxidantes (Allen y Tresini 2000). En la tabla 1, se muestran los dos grupos de sistemas antioxidantes.

Tabla 1. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Enzimáticos	No enzimáticos
Superóxido dismutasa (SOD)	Flavonoides
Catalasa	Carotenoides
Glutación peroxidasa (GPx)	Vitaminas C y E
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Péptidos antioxidantes

Los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el superóxido ( $O_2^-$ ) al ser metabolizado por la SOD se reduce a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), éste a su vez es metabolizado hasta  $H_2O$  y  $O_2$  por la catalasa o la glutación peroxidasa que actúan en forma acoplada con la glutación reductasa. La eficiencia de estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, durante ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica (Dorado *et al.*, 2003).

#### 2.4. Actividad antioxidante

En el contexto de la inhibición de procesos de reacción en cadena mediados por radicales libres (por ejemplo peroxidación lipídica), un antioxidante actúa gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y por lo tanto recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por otro lado, la actividad antioxidante mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti radicales libres no siempre se correlaciona con una alta actividad antioxidante, en particular, algunos

compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante, debido a la alta reactividad de los derivados fenoxil o semiquinona formados después de la estabilización de los radicales libres. En conclusión, la actividad antioxidante está determinada por: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (Roginsky *et al.*, 2003). Revisando los reportes de trabajos científicos sobre antioxidantes se encontró una diversidad de términos utilizados para describir la capacidad antioxidante. Algunos de ellos son la capacidad antioxidante total (o eficiencia, potencia, parámetro, el potencial, la potencia y la actividad). La "actividad" de una sustancia química no tendría sentido sin las condiciones específicas de la reacción, tales como la presión, la temperatura, el medio de reacción y los puntos de referencia (Huang *et al.*, 2005). Por esta razón, surgió la necesidad de establecer métodos unificados para medir capacidad antioxidante lo que quedó manifestado durante el I Congreso Internacional sobre métodos antioxidantes (Orlando, Florida, EUA. Junio 2004). El propósito de esta reunión fue discutir acerca de las metodologías para determinar la capacidad antioxidante de alimentos, productos fitoterapéuticos, nutraceuticos y suplementos dietarios; y proponer métodos analíticos que pudieran ser estandarizados como procedimientos de rutina, debido a que los métodos existentes presentan resultados que no son equivalentes entre ellos, por lo que las interpretaciones y conclusiones no son comparables. El argumento de esta propuesta se fundamenta en el auge, cada vez más creciente en el tema, de los antioxidantes. De hecho, se estima que el incremento en el número de publicaciones en esta área en los últimos 10 años fue de más del 340%, mientras que en las demás áreas incrementaron tan solo 39%. Por lo tanto, existe la necesidad de tener métodos estandarizados que permitan:

- 1.- Dar una guía para una aplicación correcta del ensayo.
- 2.- Comparar entre alimentos o productos comerciales.
- 3.- Servir como una herramienta para el control de calidad.

4.- Proveer estándares para la regulación y las declaraciones de efectos en la salud (Prior *et al.*, 2005).

#### **2.4.1. Métodos de la actividad antioxidante.**

Los métodos para evaluar actividad antioxidante se dividen en análisis químicos *in vitro*, análisis biológicos *in vitro* e *in vivo* (Samaranayaka y Li 2011). Generalmente, los análisis basados en reacciones químicas *in vitro* involucran la cuantificación de los átomos de hidrógeno donados, la transferencia de electrones o la capacidad quelante de metales. Por otro lado, los análisis biológicos *in vitro* utilizan modelos de cultivos celulares *in vitro* que permiten la detección de la biodisponibilidad, metabolismo y bioactividad de compuestos antioxidantes; mientras que los *in vivo* utilizan modelos animales y ensayos clínicos con humanos, estos generalmente son esenciales para la aprobación de un compuesto, por parte de agencias gubernamentales, en la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos.

Es importante tener en cuenta que la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* no puede ser extrapolable a la capacidad *in vivo*, porque no se toma en cuenta, en estos análisis, su biodisponibilidad, reactividad y estabilidad (Sarmadi y Ismail 2010). Sin embargo, los métodos *in vitro* resultan más adecuados para realizar los estudios preliminares de la actividad antioxidante y cuando se ha establecido el potencial antioxidante del compuesto de interés se pueden considerar los estudios *in vivo*, que son muy costosos, toman mucho tiempo e implican cuestiones éticas (Samaranayaka y Li 2011).

Con base en las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos mecanismos: a) ensayos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y b) ensayos basados en la transferencia de electrones (ET). La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una cinética de reacción competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una

prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang *et al.*, 2005). En la tabla 2, se muestra la clasificación de ambos métodos con sus respectivos ensayos (Huang *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación de los métodos según los tipos de ensayos.

Tipo de ensayos	Métodos para determinar la actividad antioxidante
Transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).	<p><b>Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).</b> Consiste en medir la capacidad de captación de un radical específico, el peroxilo. Se realiza a una longitud de onda de 493 nm. y la de emisión de 515 nm. en presencia de antioxidantes (Woodill <i>et al.</i>, 2001).</p>
	<p><b>Parámetro antioxidante total de captura de radicales peroxilo (TRAP).</b> Se mide por fluorescencia y como patrón de referencia se usa trólox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Wayner <i>et al.</i>, 1985).</p>
	<p><b>Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL).</b> La oxidación de las lipoproteínas LDL por los radicales libres es un proceso que ocurre en los seres vivos. La absorbancia es de 234 nm. (Caldú <i>et al.</i>, 1997).</p>
Transferencia de electrones (ET).	<p><b>Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).</b> Reduce el complejo de la tripiridiltriazina férrica a su forma ferrosa en medio ácido (Benzie <i>et al.</i> 1996). La absorbancia es de 595 nm durante 30 minutos para completar la reacción (Pulido <i>et al.</i>, 2000).</p>
	<p><b>2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).</b> Es ampliamente utilizado en</p>

alimentos y extractos vegetales. La absorbancia es de 515 nm (Williams *et al.* 1995).

**Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS).**

La generación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. Es un ensayo de decoloración, el radical  $ABTS^{\bullet+}$  tiene un color verde-azulado antes de la reacción y al agregar el antioxidante se estabiliza el ABTS quedando incoloro (Re *et al.*, 1999). La técnica mejorada para la generación del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$ , implica la producción directa del cromóforo  $ABTS^{\bullet+}$  verde-azulado a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) (Moreno, 2002). Presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. Usan como patrón al trolox, bajo las mismas condiciones (Zuleta *et al.*, 2009).

---

## 2.5. Péptidos bioactivos

Las proteínas que tomamos a través de la dieta nos aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. En la actualidad, existe un gran interés en las proteínas alimentarias no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, ya que estos péptidos tienen actividad biológica (Mulero *et al.*, 2011). La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vaso reguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores.

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos (fragmentos específicos de la proteína) de peso molecular menor a 6 kDa, con tamaño de entre 2 y 20 aminoácidos, aparentemente inactivas dentro la proteína intacta pero que pueden activarse al ser liberados, durante la digestión del alimento en el organismo del individuo, o por un procesado previo a la ingesta del mismo (hidrólisis química, enzimática, o fermentación) ejerciendo diversos efectos benéficos para la salud (Korhonen y Pihlanto 2006).

### **2.5.1. Obtención de péptidos bioactivos.**

Los péptidos biológicamente activos pueden ser producidos a partir de las siguientes metodologías:

- Hidrólisis con enzimas digestivas, durante la ingesta o *in vitro* (digestión gastrointestinal simulada)
- Hidrólisis con microorganismos (fermentaciones)
- Hidrólisis con enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas.
- Combinación de los métodos anteriores.

Muchos de los péptidos bioactivos identificados han sido producidos usando enzimas gastrointestinales, usualmente pepsina y tripsina. Otras proteasas utilizadas incluyen Alcalasa®, quimotripsina, pancreatina, pepsina han sido utilizadas en la generación de péptidos bioactivos provenientes de diversa fuentes proteínicas (Korhonen and Pihlanto 2006). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los péptidos bioactivos presentan diferentes actividades, por ejemplo; antimicrobiana, antitrombótica, antihipertensiva, inmunomoduladora y antioxidante (Fitz y Meisel 2003; Korhonen y Pihlanto 3003; Shimizu 2004). Muchos de los péptidos bioactivos conocidos son multifuncionales y pueden ejercer más de una de las actividades biológicas mencionadas (Cheung *et al.*, 2008; Sarmadi y Ismail 2010). En la tabla 3 se muestran algunas de las

actividades biológicas de péptidos obtenidos a partir de diferentes fuentes proteínicas.

Tabla 3. Péptidos bioactivos obtenidos enzimáticamente a partir de diferentes fuentes de proteínicas.

Actividades biológicas	Alimento de origen	Enzimas	Referencia
	Garbanzo	Alcalasa® y Flavourzyme®	Pedroche <i>et al.</i> , 2002
	Gluten de trigo	Flavourzyme®	Suh <i>et al.</i> , 2003
	<i>P. lunatus</i> y <i>P. vulgaris</i>	Alcalasa® y Flavourzyme®	Torruco 2009
Antihipertensivo (Inhibidora de ACE)	Grano de amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	Alcalasa®	Tovar <i>et al.</i> , 2009
	Grano de amaranto ( <i>Amaranthus mategazzianus</i> )	Alcalasa®	Fritz <i>et al.</i> , 2011
	Fracción vegetal del amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	Alcalasa®	Gómez 2014
Antitrombótica	Grano de amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	Alcalasa® y Tripsina	Sabbione y Scilingo 2010
	Grano de amaranto ( <i>Amaranthus mantegazzianus</i> )	Alcalasa®	Tironi y Añon 2010
Antioxidante	Gluten de maíz	Proteasa alcalina y Flavourzyme®	Zhuang <i>et al.</i> , 2013
	Papa	Alcalasa®	Zhang <i>et al.</i> , 2014

## 2.6. Péptidos antioxidantes

Péptidos con capacidad antioxidante, procedentes de diversas fuentes proteínicas, han sido ampliamente estudiados desde que este efecto fue descrito por primera vez por Marcuse (1960). Los péptidos antioxidantes contienen entre 5 y 16 residuos de aminoácidos (Chen *et al.*, 1995), son considerados compuestos seguros y saludables con bajo peso molecular, bajo costo y fácil absorción. Además, presentan otras propiedades de interés como las nutricionales y funcionales (Hattori *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2008). Las propiedades antioxidantes de los péptidos se encuentran relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad. Presentan en sus secuencias aminoácidos específicos, tales como prolina (Pro), metionina (Met), triptófano (Trp), lisina (Lys), histidina (His), cisteína (Cys) y tirosina (Tyr) (Wang y De Mejía 2005). Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a radicales con deficiencia en electrones, esto favorece su capacidad de atraer radicales libres (Rajapakse *et al.*, 2005).

Los estudios sobre los péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos (Gibbs *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001; Gobbetti *et al.*, 2002). En estos trabajos se encontró que las fracciones peptídicas y/o los hidrolizados proteínicos tienen una mayor actividad antioxidante que las proteínas intactas o la mezcla de aminoácidos, sugiriendo que los péptidos juegan un papel en la acción antioxidante (Shahidi y Zhong 2008). Por otra parte, los péptidos antioxidantes extraídos de fuentes alimentarias muestran pesos moleculares de 500 a 1800 Da (Kim *et al.*, 2010 y Wu *et al.*, 2003).

En la tabla 4, se observan algunos estudios en los que se han identificado las secuencias de aminoácidos de los péptidos que presentan actividades antioxidantes obtenidas a partir de proteínas de fuentes vegetales convencionales y no convencionales.

Tabla 4. Péptidos con actividad antioxidantes obtenidos a partir de proteínas de fuentes vegetales convencionales y no convencionales.

	<b>Fuente</b>	<b>Secuencia de péptidos</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Referencia</b>
<b>Proteínas de fuentes convencionales</b>	Soya	Leu-Leu-Pro-His-His	Pepsina, papaína, quimotripsina, Alcalasa® y Flavourzyme®	De Mejia y De Lumen, 2006; Pihlanto 2008.
	Arroz	Fen-Arg-Asp-Glu-His-Lis-Lis (959.5 Da) y Lis-His-Asp-Arg-Gli-Asp-Glu-Fen	Alcalasa®, quimotripsina, Neutrasa, papaína y Flavorasa	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	Maíz	No han sido reportadas	Alcalasa®	Zhu <i>et al.</i> , 2008.
	Garbanzo	Asn-Arg-Tir-His-Glu	Alcalasa®	Zhang <i>et al.</i> , 2011.
<b>Proteínas de fuentes no convencionales</b>	Trigo Sarraceno	Trp-Pro-Leu, Val-Pro-Trp y Val-Fen-Pro-Trp	Alcalasa®, pepsina y pancreatina	Chuang <i>et al.</i> , 2009 y Ma <i>et al.</i> , 2010.
	Colza	Pro-Ala-Gli-Pro-Fen	Alcalasa®	Bing <i>et al.</i> , 2009.
	Piñón mexicano	His, Arg, Tir y Fen	Alcalasa®	Gallegos <i>et al.</i> , 2011.
	Grano del amaranto	No ha sido reportada.	Alcalasa®	Tironi y Añon 2010.

## 2.7. Péptidos bioactivos del grano y de la fracción vegetal de amaranto

Los péptidos de las proteínas del grano de amaranto han mostrado tener diversas actividades biológicas como antihipertensiva (Tovar *et al.*, 2009; Vecchi y Añón 2009; Fritz *et al.*, 2011), y antifúngica (Lipkin *et al.*, 2005; Rizzello *et al.*, 2009). Por otro lado, Orsini *et al.*, (2011), reportaron que a partir de hidrolizados de proteínas del grano de amaranto con pepsina y pancreatina obtuvieron péptidos con actividad antioxidante. Esa misma actividad fue observada por Tironi y Añón (2010) en péptidos obtenidos a partir de las fracciones proteínicas (albúminas, globulinas y glutelinas) del grano de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*). Ortiz (2013) determinó la actividad antioxidante de los péptidos obtenidos de la albúmina 1 del grano del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L). Por otro lado, Gómez (2014) obtuvo péptidos (5-10, 3-5, 1-3 y < 1 kDa) con actividad antihipertensiva a partir de hidrolizados de proteínas de la fracción vegetal del amaranto (FVA) utilizando Alcalasa®.

## 2.8. Aspectos generales de amaranto.

El amaranto es una planta cultivada, domesticada y utilizada en México desde hace más de 4000 años (Iturbide *et al.*, 2012; Casas *et al.*, 2001). El cultivo del amaranto posee características agronómicas que le permiten adaptarse a condiciones ambientales adversas, donde otros cultivos no prosperan (Omami *et al.*, 2006; Gutiérrez 2001). Esto hace al amaranto una alternativa para los pequeños productores por tener las características de mayor resistencia a la sequía (Morales *et al.*, 2009; Turriza *et al.*, 1991).

El amaranto es clasificado como pseudocereal, es una planta dicotiledónea pertenece a la familia de las amarantáceas. El género *Amaranthus* está compuesto por más de 60 especies, entre las más importantes: *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Amaranthus cruentus* (Segura *et al.*, 1994). De acuerdo a su variedad, puede alcanzar alturas de 0.5 a 3 metros; posee

hojas anchas y abundantes de color brillante, espigas y flores púrpuras, naranjas, rojas y doradas.

Tabla 5. Clasificación botánica del amaranto, modificado de Saucer (1967).

Clasificación	Principales especies:
Reino: Vegetal	<i>A. hypochondriacus</i> L.
División: Embriophita Sphonogamia	
Subdivisión: Angioespermae	<i>A. cruentus</i> L.
Clase: dicotiledónea	<i>A. caudatus</i> L.
Subclase: Arcichomydae	
Género: amaranthus	

### 2.8.1. Usos del grano y de la hoja de amaranto.

El amaranto tiene múltiples usos tanto en la alimentación humana y animal como en la industria, medicina y en la ornamentación. Para la alimentación humana, el grano se utiliza principalmente para la fabricación de dulces llamados alegrías, granola, harinas integrales, frituras, panificados, pasta; hasta productos más sofisticados como aceites comestibles, papillas para bebés, barras energéticas y alimentos nutracéuticos especiales para enfermos diabéticos o con cáncer. (Oke 1983). Las hojas tiernas reemplazan a las hortalizas de hoja, y las plántulas también se utilizan para consumo. La planta en estado fresco se utiliza como forraje para la alimentación del ganado sobre todo para combinar con otras especies forrajeras. También se utiliza para la producción de concentrados proteicos foliares debido a su alto rendimiento en biomasa verde y alto rendimiento de proteína (Cai *et al.*, 1998). La inflorescencia se usa como fuente del colorante rojo natural. Se considera que la importancia del amaranto debe retomarse, pues dado su valor nutritivo es un cultivo estratégico en la alimentación de los

mexicanos, tanto en cantidad como en calidad de su proteína, ya que supera a cereales de uso común como trigo, arroz, avena y maíz (Morales *et al.*, 2009). De acuerdo con Barba de la Rosa *et al.* (2008), el amaranto es un cultivo que produce semillas con alto valor nutricional y diversas propiedades, como niveles elevados de proteína total, así como del aminoácido lisina generalmente deficiente en otros cereales.

### 2.8.2. Producción del cultivo de amaranto.

En la actualidad la producción de amaranto se caracteriza por su alta concentración en la zona centro del país de México, en la tabla 6, se muestran los principales estados productores de amaranto. Puebla, Morelos, Estado de México, Tlaxcala y Ciudad de México, en conjunto aportan aproximadamente el 90% de la producción nacional de este grano. El otro 10% se encuentra distribuido en los estados de Oaxaca, Michoacán, Durango, Jalisco, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Sinaloa y Sonora (Aragón y Tapia 2009).

Tabla 6. Principales Estados de la Republica Mexicana productores de amaranto.

Ubicación	Sup. Sembra da	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
Distrito Federal	136	136	161.1	1.18	22,500.00	3,624.75
Morelos	100	100	130	1.3	14,933.67	1,941.38
Estado de México	156.5	156.5	305.83	1.95	12,534.18	3,833.33
Oaxaca	45	45	68.71	1.53	7,904.38	543.11
Puebla	1,967.00	1,967.00	2,143.40	1.09	5,500.80	11,790.42

San Luis Potosí	37.5	37.5	17.34	0.46	18,000.00	312.12
Tlaxcala	1,287.00	1,287.00	1,791.35	1.39	16,813.07	30,118.10
<b>Total</b>	<b>3,729.00</b>	<b>3,729.00</b>	<b>4,617.73</b>	<b>1.24</b>	<b>11,296.29</b>	<b>52,163.21</b>

Fuente: Sagarpa, 2013.

### 2.8.3. Composición química proximal del grano y la fracción vegetal de amaranto

En la tabla 7, se muestra la composición química proximal del grano y de la hoja de amaranto de la variedad *Amaranthus hypochondriacus* L.

Tabla 7. Química proximal del grano y de la hoja del amaranto (*A. Hypochondriacus* L.).

Materia prima	Componente					Referencia
	Proteína cruda	Extracto etéreo	Cenizas	Humedad	Fibra cruda	
Hoja	14.18	2.64	9.27	10.14	15.44	Morales <i>et al.</i> , 2009; Soriano <i>et al.</i> 2004;
Grano	13.9 – 17.3	6.1	3.3 – 4.1	11.1	2.6	Teutonico y Knorr 1985.

El componente principal del grano es el almidón, que representa entre el 50 % y el 66 % de su peso. Sin embargo, el aspecto que destaca el grano es su composición nutricional ya que su contenido proteínico es de 12 a 22 %, mayor que el trigo (12-14 %), el arroz (7-10 %) y el maíz (9-10 %). Además este contiene aminoácidos esenciales, como son la lisina, valina, metionina, fenilalanina y treonina (Marccone y Yada 1991). El amaranto tiene un alto contenido de lisina (3.2-6.4%) comparado con aquellos encontrados en los cereales más comunes (2.2- 4.5 %), y la concentración de aminoácidos azufrados (2.6 - 5.5 %) es mayor a la que presentan las legumbres como las arvejas, frijoles y soja (1.4 %) (Gorinstein

*et al.*, 1998). El contenido de lípidos es de (3.1 a 11.5 %). Finalmente la cantidad de fibras alimentarias encontrada en él es de (14.2%), donde el (8.1 %) corresponde a fibras insolubles y el (6.1 %) a las fibras solubles (Segura *et al.*, 1992).

Las principales fracciones de proteínas identificadas en el grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), son albúmina, globulina, glutelina y prolamina (Soriano *et al.*, 1992). La albúmina se ha descrito por algunos autores como la proteína más abundante del grano y está compuesta por dos tipos: albúmina 1 y 2, de acuerdo al orden de extracción (Segura *et al.*, 1994). Las globulinas de amaranto están principalmente constituidas por cantidades equivalentes de globulina 11S (Segura *et al.*, 1994; Chen y Paredes, 1997); y globulina-P, que también pertenece a la familia 11S, pero presenta gran tendencia a polimerizarse y posee menor solubilidad en soluciones salinas neutras. En mucha menor proporción se encuentra una globulina 7S (Barba de la Rosa *et al.*, 1992 y Martínez *et al.*, 1997). Las glutelinas de amaranto, se diferencian de las globulinas por ser solubles sólo a pH extremos presentan composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina-P (Abugoch 2006).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los radicales libres son moléculas que están en continua formación en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, un exceso de estos radicales libres pueden causar enfermedades cardiovasculares, reumáticas, cáncer y acelerar el envejecimiento en los seres humanos. Para prevenir éstas es recomendable el consumo de antioxidantes ya que, los antioxidantes son moléculas que reaccionan con los radicales libres combatiendo el estrés oxidativo. De ahí el interés de estudiar los antioxidantes.

Dentro de los antioxidantes naturales se encuentran los biopéptidos, estos pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática a partir de proteínas de diversas fuentes naturales. En los últimos años las investigaciones se han enfocado en proteínas de fuentes no convencionales de origen vegetal para la obtención de péptidos con actividad biológica. Tal es el caso del amaranto que es una fuente no convencional, cabe mencionar que el grano del amaranto ha sido estudiado por su alto contenido de proteína y por su particular balance de aminoácidos esenciales. Sin embargo durante la cosecha del grano (panoja), la mayor parte de la planta queda en el campo. Por cada tonelada de grano cosechada, se generan 6 toneladas de forraje; este residuo agrícola generalmente se deja en el campo como abono o se utiliza como alimento para ganado aún cuando tiene factores antinutricionales.

Debido a su composición química proximal, particularmente su contenido proteínico, el forraje de amaranto es un material de bajo costo que puede ser utilizado para generar un producto de valor agregado, específicamente péptidos con actividad antioxidante.

## 4. HIPÓTESIS

Los biopéptidos obtenidos por hidrólisis enzimática (Alcalasa® 2.4L y Flavourzyme®) de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) presentarán actividad antioxidante.

## 5. OBJETIVOS

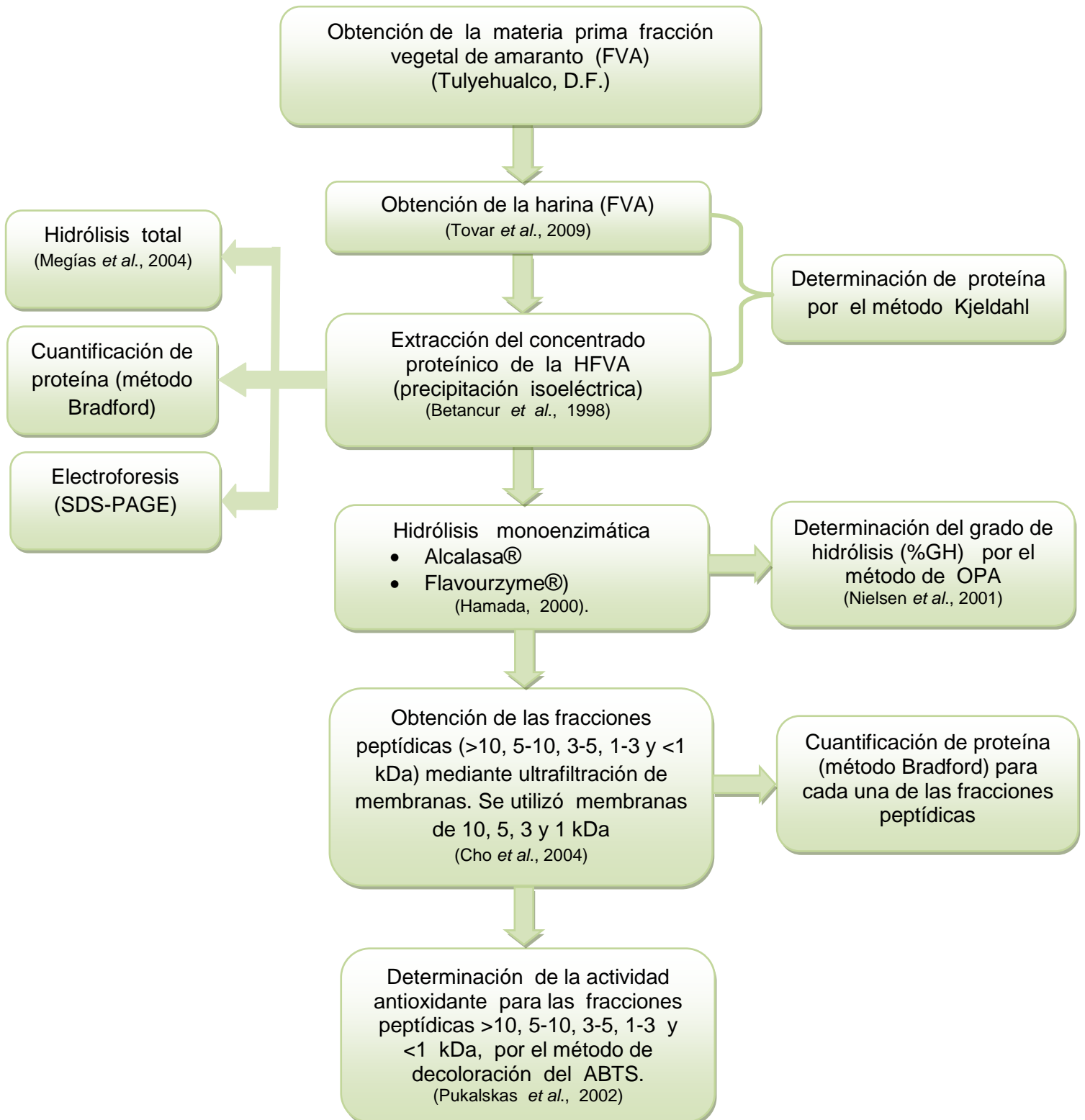
### 5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante de las 5 fracciones peptídicas (>10, 5-10, 3-5, 1-3 y <1 kDa) obtenidas por hidrólisis enzimática de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) a través de ensayos *in vitro*.

### 5.2. Objetivo específicos

- ✚ Extraer el concentrado proteínico a partir de la harina de la fracción vegetal del amaranto.
- ✚ Determinar el grado de hidrólisis del hidrolizado enzimático (Alcalasa® 2.4L y Flavourzyme®) del concentrado proteínico de la fracción vegetal del amaranto.
- ✚ Determinar la actividad antioxidante (*in vitro*) de las fracciones peptídicas (>10, 5-10, 3-5, 1-3 y <1 kDa). obtenidas por hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de la fracción vegetal del amaranto.

## 6. DIAGRAMA DE DESARROLLO EXPERIMENTAL.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Obtención de materia prima

En el presente trabajo se utilizó la FVA recolectada en Tulyehualco delegación Xochimilco, D.F.; en el periodo de octubre y noviembre de 2014. Posteriormente se procesó en los laboratorios: Químico Biológico, Taller de alimentos y Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. En la figura 2 se observa una imagen de las muestras recolectadas.



Figura 2. Materia prima FVA.

### 7.2. Obtención de la harina de la FVA.

La FVA se sometió a un proceso de secado en horno a  $65 \pm 3$  °C (Scorpion scientific®, A62060), después se molió en una licuadora industrial de 4 L (modelo CB15 Waring laboratory®) y se tamizó 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 y se repitió este procedimiento 3 veces más (Tovar *et al.*, 2009). La harina desgrasada se colocó en una charola de aluminio y se dejó en una campana de extracción de gases para que se evaporara la acetona residual. Una vez seca, la harina se almacenó para estudios posteriores. A este material se le denominó “harina de la fracción vegetal del amaranto” (HFVA).

### **7.3. Extracción de proteínas.**

Para la extracción de las proteínas presentes en la HFVA se utilizó el método reportado por Betancur *et al.* (1998). Primero, se realizó una suspensión en agua destilada con la harina previamente desgrasada en una relación 6:1 v/p (agua/harina), se ajustó el pH a 11 con una solución de NaOH 1 N y se dejó agitando durante 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 recolectó 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°C en un horno (Scorpion scientific®, A62060). Transcurrido el tiempo de reposo (30 min) se decantó el sobrenadante, para obtener así el sedimento, y 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 en (Termocentrífuga Megapure de Thermo Scientific®). El precipitado, se resuspendió en 1 mL de agua destilada, después se pasó a un contenedor para congelarlo y liofilizarlo a -47°C y  $13 \times 10^{-3}$  mbar (Labconco FreeZone 4.5 Liter Dry System®). A este material se le denominó concentrado proteínico (CP). La concentración de proteína del CP se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (Anexo 3).

#### 7.4. Determinación de proteínas al CP de la FVA.

Se determinó el contenido de proteína cruda al CP mediante el método de Kjeldahl (método 933.05 A.O.A.C., 2000). Éste se calculó multiplicando el porcentaje nitrógeno (% N) por el factor de conversión de Kjeldahl ( $f_N$ ) para grano de amaranto, cuyo valor es de 5.85 (Scilingo *et al.*, 2002).

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

Por otro lado, para calcular el porcentaje de rendimiento en la extracción de proteínas se utilizó la siguiente fórmula (Domínguez 2009).

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

#### 7.5. Hidrólisis monoenzimáticas

Las hidrólisis monoenzimáticas del CP de la FVA, se llevó a cabo por el método reportado por Hamada (2000) haciendo algunas modificaciones por Gómez (2014). Se utilizaron dos enzimas de manera independiente; la primera fue una endoproteasa de *Bacillus licheniformes* (Alcalasa®) y la segunda una proteasa de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®) con actividades endo y exo. Cada reacción (40 mL) se realizó en un reactor enchaquetado utilizando un titulador automático (Mettler Toledo®, T50) equipado con un agitador y un electrodo para medir el pH. Para controlar la temperatura se utilizó un recirculador de agua (Labtech thermo circulador® modelo lcb\_6D). Para ambas enzimas, las mezclas de reacción contenían 2 % de proteína; mientras que la relación E/S fue de de 1:7 (p/p) y 1:1 (p/p), para Alcalasa® 2.4 L (buffer de Tris-HCl 50 mM a pH 8) y Flavourzyme (buffer de fosfato 50 mM a pH 7), respectivamente. A la mezcla de reacción se le ajustó el pH de acuerdo a la enzima utilizada y posteriormente se

les adicionó la enzima. La temperatura de reacción, con ambas enzimas, fue de 50 °C; y el pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 0.1 N. En cada mezcla de reacción se tomaron alícuotas para determinar el grado de hidrólisis (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min). La enzima presente en las alícuotas y en el hidrolizado se inactivó calentándolas por 20 min a 82 °C, posteriormente las muestras se centrifugaron a 10, 000 x g por 20 min a 4 °C, y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

#### **7.6. Hidrólisis total (ácida).**

La hidrólisis total del CP 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®), transcurrido el tiempo, el ácido se evaporó en una estufa de vacío (National Appliance Company® modelo 5851) a 90 °C durante 24 horas. El producto obtenido se guardó a temperatura ambiente para posteriormente determinar el grado de hidrólisis. La determinación se realizó por triplicado.

#### **7.7. Determinación del grado de hidrólisis (%GH).**

El GH se determinó por el método de OPA (ortofeniltaldehído) (Nielsen *et al.*, 2001). En un microtubo eppendorf de 2 mL se agregaron 1.5 mL del reactivo de OPA y 200 µL del hidrolizado diluido (1:100) con SDS al 1%. La mezcla se agitó durante 5 segundos, se dejó incubando en ausencia de luz por 2 minutos, se leyó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 340 nm. Las absorbancias obtenidas se utilizaron para determinar la concentración de grupos aminos libres presentes en los hidrolizados mediante la ecuación de la recta dada por la curva de calibración con L-serina (Anexo 1).

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

Para determinar el %GH, se utilizó la siguiente fórmula:

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

### **7.8. Electroforesis (SDS-PAGE)**

Se realizó de acuerdo con la técnica de Laemmli, (1970) con un gel de separación al 12% de la mezcla acrilamida bis-acrilamida y un gel de concentración al 4%, empleando un equipo Mini Protean Tetra Cell® (BIO-RAD®). Las muestras se diluyeron en una relación 1:2 (v/v) con buffer de carga. Los geles se corrieron a 150 V durante 120 min. Se utilizó marcador de bajo rango (BIO-RAD®, No. cat. 161-0305). Los geles fueron revelados utilizando tinción de plata. Los pesos moleculares de las proteínas desconocidas se calculó mediante la movilidad electroforética relativa (Rf) (Anexo 2). (Garfin 1990).

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

Los sobrenadantes de los hidrolizados obtenidos con cada enzima se fraccionaron mediante 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. Se emplearon cuatro membranas con diferentes cortes de peso molecular (MWCO): 10 kDa; 5 kDa; 3 kDa y 1 kDa. Como se muestra en la figura 3 se obtuvieron cinco fracciones peptídicas; > 10 kDa, 5-10 kDa, 3-5 kDa, 1-3 kDa y <1 kDa.

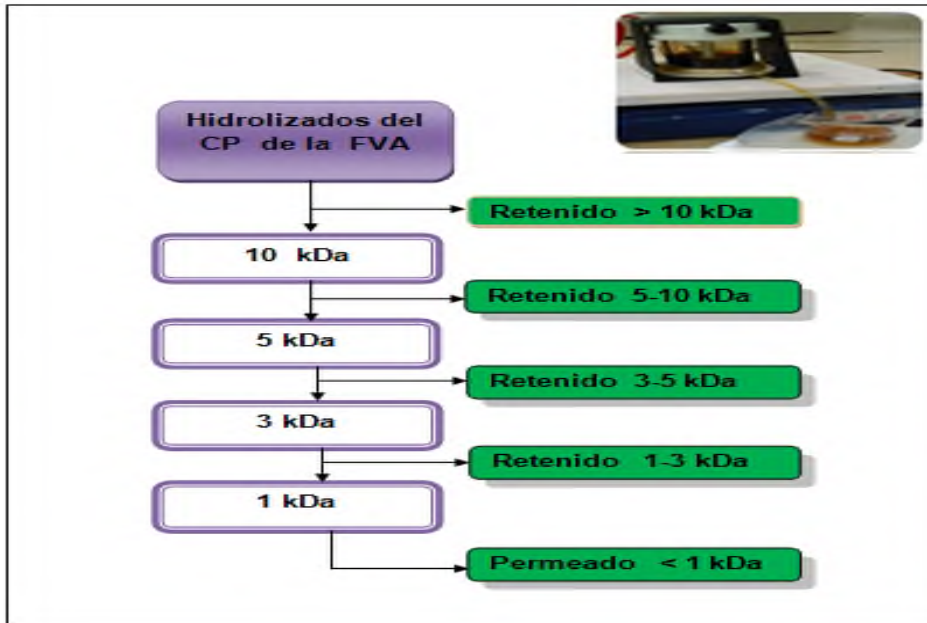


Figura 3. Diagrama de proceso de ultrafiltración con las 4 membranas.

### 7.10. Determinación de proteína en las fracciones peptídicas de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa® y Flavourzyme®.

Se determinó la proteína en las fracciones peptídicas, mediante el método de Bradford, (1976). En un tubo eppendorf de 2 mL, se colocaron 10  $\mu$ L de la muestra (fracción peptídica), 990  $\mu$ L de agua destilada y se le adicionó 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 de 595 nm (VE-5100UV SPECTROPHOTOMETER®. VELAB™). Se utilizó una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL con la que se realizó una curva estándar (Anexo 3), cuya ecuación se utilizó para interpolar las absorbancias obtenidas de cada muestra y así determinar la concentración de proteína.

### **7.11. Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas.**

A todas las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración se les determinó la actividad antioxidante, mediante el ensayo de la decoloración por el método de inhibición del radical 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>), propuesto por Pukalskas *et al.*, (2002). La preparación de los reactivos para la formación del radical ABTS<sup>•+</sup> se muestran en el (Anexo 4).

El radical ABTS<sup>•+</sup> se obtuvo mediante la reacción de 50 mL de ABTS 2 mM con 200 µl de persulfato de potasio 70 mM; esta mezcla se diluyó con buffer salino de fosfato (PBS) hasta obtener una absorbancia de  $0.800 \pm 0.030$  a una longitud de onda de 734 nm; este valor fue considerado como el blanco (AB). Se utilizó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (ácido 6-hidroxi- 2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico, TEAC), que es un antioxidante sintético de referencia, como estándar comparativo por lo que se realizó una curva de inhibición contra la concentración de trolox (0.5 - 2.5 mM) (Anexo 4).

### **7.12. Análisis estadísticos**

Todos los datos obtenidos se expresaron con la media y la desviación estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones de medias (método de Duncan), para determinar si hay diferencias significativas entre los tiempos de hidrólisis en cada enzima y en ambas enzimas. De igual manera se efectuó para comparar las fracciones peptídicas, utilizando alfa 0.05. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007 (versión 1). (Anexo 5).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Extracción de las proteínas en las harinas.

En la tabla 8, se muestran los resultados del contenido de nitrógeno en la harina desgrasada y en el CP de la FVA. Se observa que el porcentaje de proteína en la harina de la FVA fue de 14.4% y en el concentrado proteínico de 13.7%.

Tabla 8. Porcentaje de proteína en la HFVA y en el CP.

Materia prima	Porcentaje de proteína	
	Harina	CP
FVA	14.4 ± 1.2	13.7 ± 0.3

Los datos son el promedio de dos repeticiones

En este trabajo se utilizó la fracción vegetal de amaranto (FVA) compuesta de tallos y hojas que quedaron en el campo después de la cosecha del grano, este material se considera un residuo agroindustrial. El cultivo se localizó en la Delegación Milpa Alta de la Ciudad de México. De acuerdo a los resultados, el contenido de proteína en la harina de la FVA fue menor al reportado por Gómez (2014), quien obtuvo 24.75 %, cabe mencionar que el material que utilizó este autor fue recolectado en la etapa reproductiva, además de que fue cultivado y cosechado en Loma Bonita, Oaxaca. De igual manera, Morales *et al.*, (2009) reportaron un contenido de 21.6% de proteína en la hoja. Por otro lado, el contenido de proteína de este estudio fue similar al reportado por Soriano *et al.*, (2004) y López *et al.*, (2014), quienes obtuvieron 14.18% y 15.49% de proteína en la hoja, respectivamente. Por otro lado, Arce (2011) determinó el contenido de proteína en las diferentes partes de la planta del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.): hoja, tallo y dos tipos de rastrojo; RT (compuesto de hoja,

tallo e inflorescencia) y RC (compuesto de hoja, tallo, inflorescencia y grano). Los resultados para RT fueron de 8.8%, RC 14.1%, tallo 1.8% y para la hoja fue de 19.6%. El contenido de proteína que reportaron Alfaro *et al.*, (1987) en el tercer corte fue igual al de este trabajo. Ellos realizaron tres cortes 25, 40 y 60 días después de la emergencia de las plántulas. Así que, el contenido de proteína en el primer corte fue 29.5%, en el segundo de 22.7% y en el tercer corte 14.4%. Esto significa que entre mayor tiempo haya transcurrido a partir de la emergencia de las plantulas, el contenido de proteína disminuye. Es decir, los valores del contenido de proteína pueden variar de acuerdo a las etapas fisiológicas y sección de la planta, así como la localización del cultivo. Todos estos datos reportados fueron analizados en base seca.

En cuanto al método de extracción de proteínas de la HFVA se obtuvo un rendimiento de 95.14%, este fue similar al reportado por Gómez (2014), quien utilizó la misma técnica que en este estudio (precipitación isoeléctrica). Debido al alto porcentaje de rendimiento, este método es el más adecuado para el aislamiento de proteínas a partir HFVA comparado con otros métodos reportados. Por ejemplo, Cordero *et al.*, (2005) realizaron aislados de proteínas del grano de amaranto por precipitación isoeléctrica y por formación de micelas, obteniendo un rendimiento de 56.4% y 15.9% respectivamente. Mientras que Castel *et al.*, (2012) reportaron rendimientos de 73.1% y 52.5% cuando realizaron precipitación isoeléctrica y ultrafiltración para la obtención de concentrados de proteínas del grano de amaranto. Por su parte, Rodríguez *et al.*, (2005) reportaron un rendimiento del 60% en aislados de lupino (*Lupinus campestris*) por micelación; mientras que Paredes y Ondorica (1986), obtuvieron un rendimiento de 46% en un aislado de semillas de una variedad de girasol utilizando el método de micelación y precipitación isoeléctrica.

## 8.2. Identificación de proteínas de los CP de la FVA y (SDS-PAGE).

En la figura 4 se puede observar el perfil electroforético desnaturalizante de las muestras del CP de la FVA se les determinó. Los pesos moleculares de las bandas que se aprecian en el gel se calcularon por la movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ).

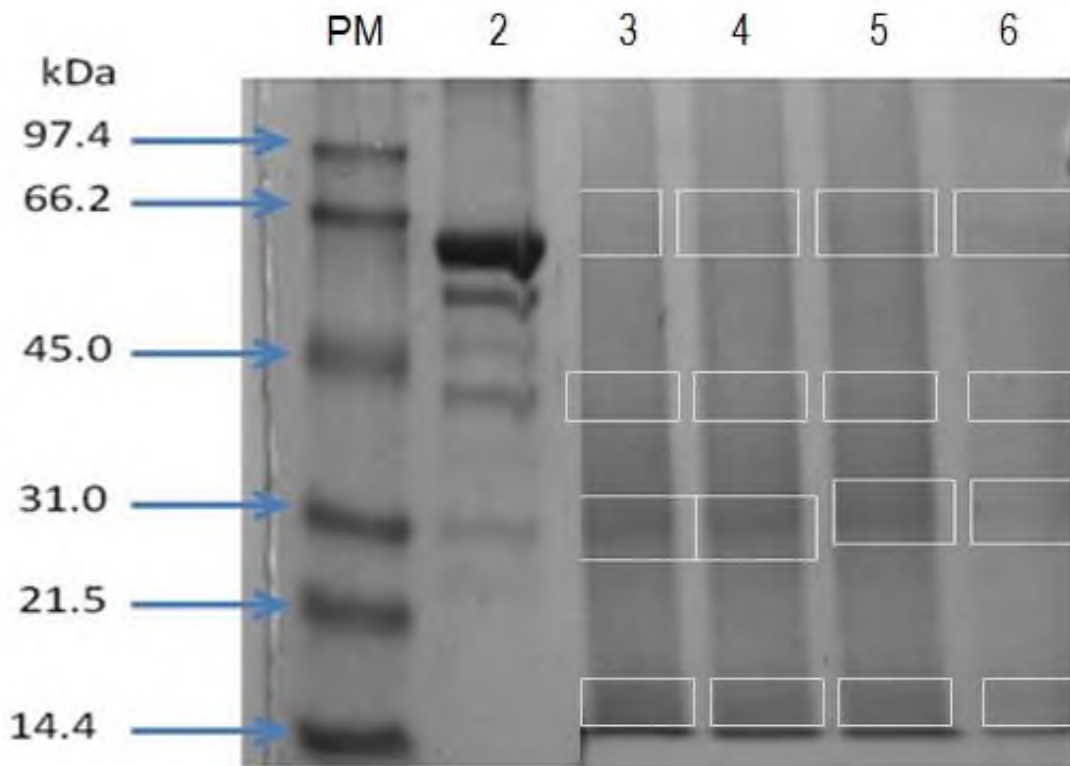


Figura 4. Perfil electroforético del CP de la FVA; carril 1: marcador de PM (bajo rango), carril 2: BSA, Carriles 3, 4, 5 y 6 son replicas del CP de la FVA.

Las 4 bandas que se aprecian en los carriles 3, 4, 5 y 6 en el gel (Figura 4) corresponden a pesos moleculares aproximados de 61.9, 42.3, 23.9 y 14.38 kDa; estos podrían corresponder a las subunidades de la albúmina como fue observado por Konishi *et al.*, (1991), quienes encontraron cuatro bandas con pesos

moleculares de 56, 36, 26 y 22 kDa. Ellos realizaron dos extracciones secuenciales a partir de las proteínas del grano de amaranto y describen dos tipos de albúmina: albúmina 1, que fue extraída con agua y soluciones salinas; y albúmina 2, extraída solamente con agua. Por otro lado, Tovar *et al.*, (2009) reportaron que la albúmina presente en el grano de amaranto tuvo un perfil electroforético con bandas de pesos moleculares de 45, 36, 26, 22 y 17 kDa; mientras que Ortiz (2013) reportó para la albúmina 1 del grano de amaranto bandas de pesos moleculares de 56, 48, 34, 20 y 17 kDa. Otros autores que también utilizaron el método de precipitación isoeléctrica para realizar el aislamiento de las proteínas reportaron perfiles electroforéticos con bandas similares a las de este estudio. Por ejemplo, Castel *et al.* (2012) encontraron bandas de pesos moleculares de 56.4 a 26.2 kDa, bandas menores de 87.9 a 21.5 kDa y bandas definidas entre 20 y 14 kDa para el CP del grano de amaranto (*A. mantegazzianus*). Por otra parte, Búcaro y Bressani (2002); y Gorinstein *et al.* (2002), utilizando diferentes metodologías para la extracción de proteínas en el grano de amaranto reportaron mayor proporción albúminas, seguidas de globulinas y glutelinas. Finalmente, Gómez (2014) obtuvo un perfil con cuatro bandas con pesos moleculares aproximados de 52.73, 35.87, 27.86 y 18.81 kDa a partir de un CP de la FVA. Es importante mencionar que hay una carencia de información respecto al perfil electroforético de las proteínas presentes en las hojas de amaranto, por lo que este trabajo, junto con el de Gómez (2014) serían precursores en esta área.

### 8.3. Hidrólisis enzimática

Los resultados de las hidrólisis monoenzimáticas con Alcalasa® y Flavourzyme® del CP de la FVA se muestran en la figura 5. Los porcentajes del grado de hidrólisis fueron de 12.64% y 16.31%, respectivamente.

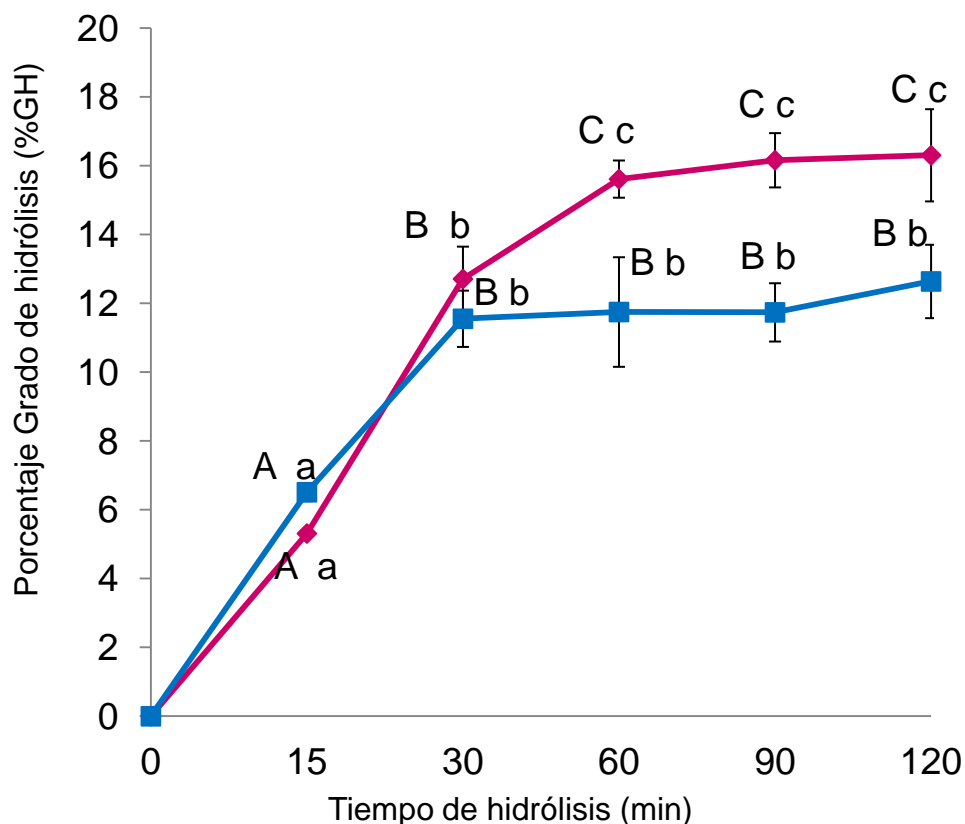


Figura 5. Hidrólisis enzimática del CP de la FVA hidrolizados con Flavourzyme® (♦) y Alcalasa® (■). Las letras minúsculas diferentes en la misma curva indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las enzimas. Estos datos fueron el promedio de dos repeticiones.

En los primeros 30 min el porcentaje de GH se incrementó rápidamente con ambas enzimas. Posteriormente, con Alcalasa® se observó que entre los 30 y 120 min alcanzó su valor máximo (12.64 %) y no hubo diferencia significativa entre los valores de %GH obtenidos en ese intervalo de tiempo. Por otro lado, con

Flavourzyme® se observó una desaceleración en la hidrólisis entre los 30 y 60 minutos, posterior a ese intervalo de tiempo y hasta los 120 minutos de reacción no hubo diferencia significativa entre los valores del % GH. En la tabla 9 se muestran los resultados del %GH obtenidos en este trabajo y los reportados en la bibliografía para proteínas de fuentes vegetales hidrolizadas, principalmente, con Alcalasa® y Flavourzyme®. Se observa que hay una amplia diferencia entre los valores del % de GH obtenidos al hidrolizar proteínas vegetales con éstas enzimas, esto puede deberse a que se utilizaron diferentes métodos para su determinación, además la relación E/S y el tiempo de reacción también son distintos. Con Flavourzyme® se obtuvo un mayor % de GH en comparación con Alcalasa®, esto pudo deberse a que esta enzima tiene actividades endo y exo peptidasas, incrementando la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Este mismo efecto fue reportado durante la hidrólisis de glicina de soya cuando se comparó la potencialidad entre Flavourzyme® y un preparado proteolítico de *Streptomyces griseus* (Medrano y del Catillo 2011).

A pesar de que los porcentajes del GH fueron menores a muchos de los reportados en la literatura, estos se obtuvieron en menos tiempo. Esto puede ser muy conveniente porque en otros estudios se ha reportado que se requieren de tiempos de hidrólisis de hasta 18 h para obtener péptidos antihipertensivo, y superiores a 24 h para obtener péptidos antioxidantes (Tovar y col., 2009; Ortiz y Soriano, 2010).

Tabla 9. Comparación del % de GH de diferentes fuentes proteínicas hidrolizados con Alcalasa® y Flavourzyme®.

Fuente de proteína	Enzima	Proteína	Relación E/S (AU/g)	Método	Tiempo de hidrólisis	%GH	Referencia
FVA	Flavourzyme®	albúmina	50 LAPU/g	OPA	2 h	16.31%	En este trabajo
	Alcalasa®		1:7	OPA	2 h	12.64%	
Grano del amaranto	Alcalasa®	albúmina 1	0.8	TNBS	1 h	12%	Tovar <i>et al.</i> , (2009)
			0.8		24 h	57%	
		globulina	0.8		1 h	5%	
			0.8		27 h	38%	
Grano del amaranto	Alcalasa®	albúmina 1	0.4	TNBS	1 h	5.40%	Soriano y Escalona, 2015
			1.2		18 h	62.30%	
		globulina	0.4		1 h	2.50%	
			1.2		15 h	26%	
Canola	Alcalasa®		0.3		1 h	20.60%	Cumby <i>et al.</i> , 2008
	Flavourzyme®		50 LAPU/g		1 h	6.33%	
	Flavourzyme® y Alcalasa®		0.3 AU/g - 50 LAPU/g		3 h	18.9%	
Glutelina de cebada	Alcalasa®		0.12	TNBS	0.5 h	12.70%	Xia <i>et al.</i> , 2012
	Flavourzyme®		40 LAPU/g		0.5 h	15%	
Frijol	Alcalasa®-Flavourzyme®		0.3 AU/g - 50 LAPU/g	OPA	0.7 h	43.01%	Ruiz <i>et al.</i> , (2011)
	Pepsina-pancreatina		1:10		1 h	26.15%	
FVA	Alcalasa®		1:20	OPA	0.5 h	26.97%	Gómez, (2014)

#### 8.4. Determinación de la actividad antioxidante.

En la figura 6, se muestra la actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas del hidrolizado con Flavourzyme®. Se observa que todas las fracciones peptídicas tuvieron actividad antioxidante. Las fracciones >10, 3-5 y 1-3 kDa mostraron diferencias significativas entre ellas, mientras que las fracciones de 5-10 y <1 kDa no mostraron diferencias significativas y fueron las fracciones con mayor actividad.

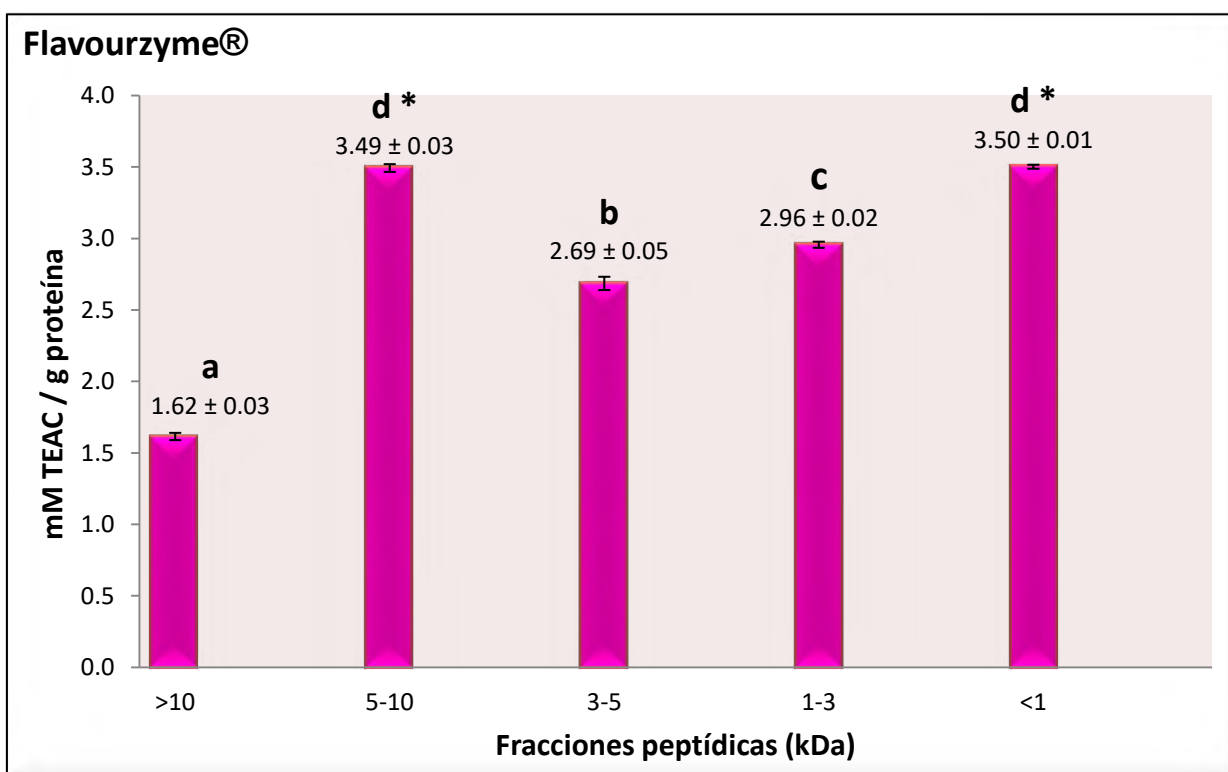


Figura 6. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Flavourzyme®. Las letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones.

Por otro lado, en la figura 7 se muestra la actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas del hidrolizado obtenido con Alcalasa®. Se observa que todas las fracciones tuvieron actividad antioxidante, y fueron significativamente

diferentes entre ellas, siendo la fracción <1 kDa la que obtuvo mayor actividad antioxidante.

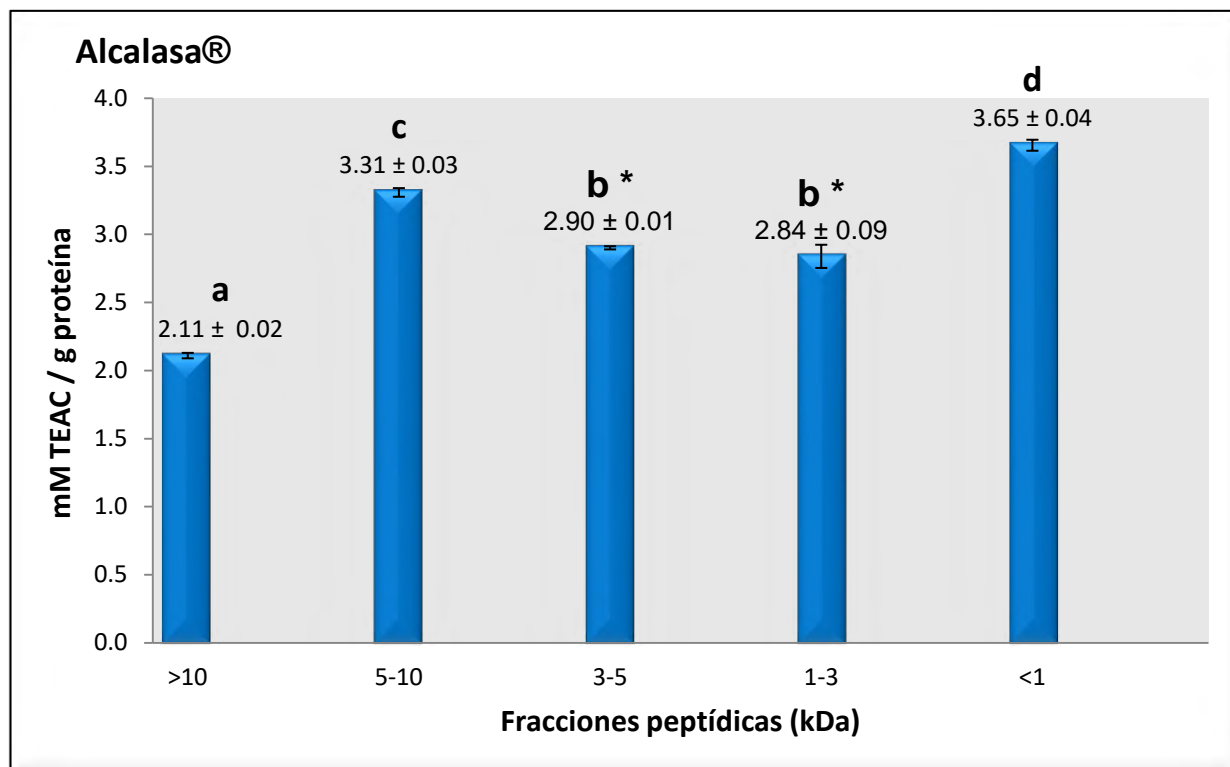


Figura 7. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Alcalasa®. Las letras diferentes indican diferencias significativa (P<0.05). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones.

En la figura 8 se muestra la comparación de la actividad antioxidante entre las fracciones peptídicas obtenidas con Alcalasa® y Flavourzyme®. Las fracciones >10, 5-10, 3-5 y 1-3 kDa mostraron diferencias significativas entre las enzimas, mientras que las fracciones <1 kDa con las dos enzimas y la fracción 5-10 kDa con Flavourzyme® no hubo diferencias significativas. La fracción de 3- 5 kDa con Alcalasa® y la fracción de 1-3 kDa con Flavourzyme® no mostraron diferencia significativa entre ellas. Pero de todas las fracciones la de mayor actividad

antioxidante fueron las fracciones 5-10 y <1 kDa independientemente de la enzima.

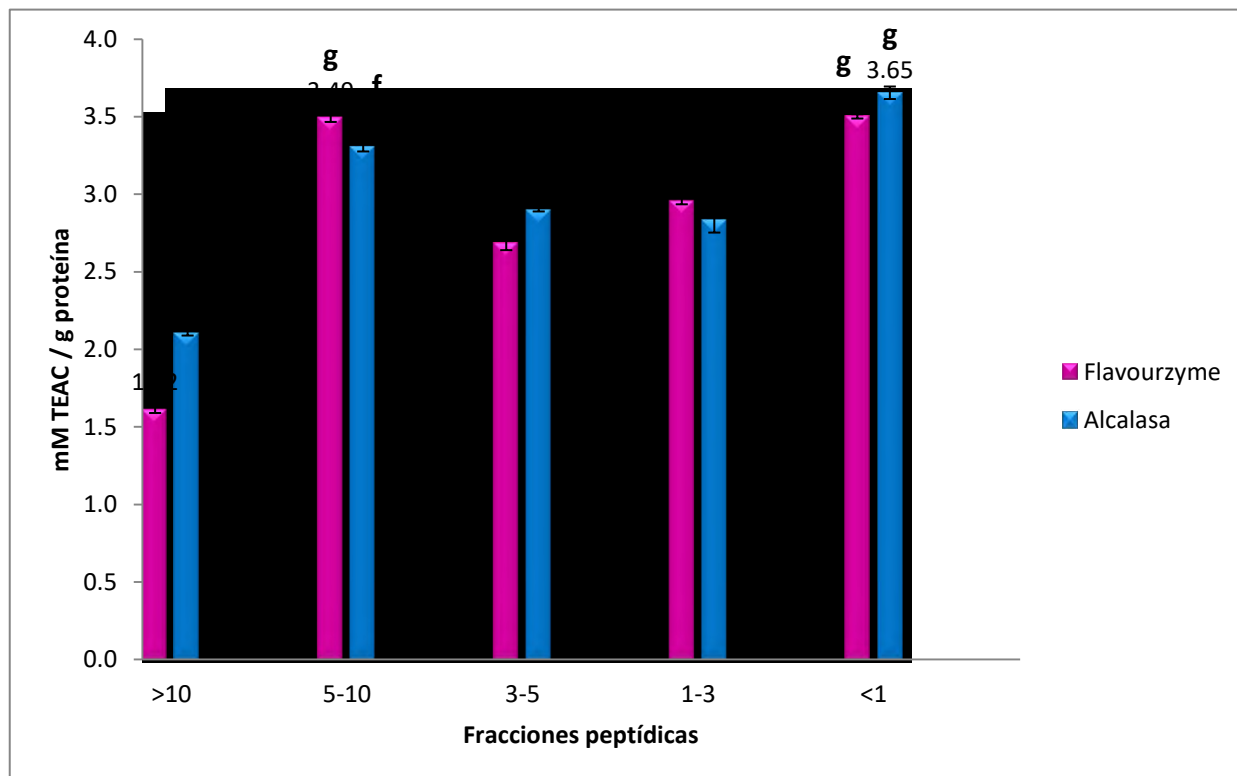


Figura 8. Actividad antioxidante de las cinco fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis de las proteínas de la FVA con Alcalasa® o Flavourzyme®. Las letras diferentes indican diferencias significativa ( $P < 0.05$ ). Estos datos fueron el promedio de tres repeticiones.

Las cinco fracciones peptídicas, obtenidas con ambas enzimas, fueron capaces de eliminar los radicales ABTS; es decir, estos péptidos pueden convertir a los radicales libres en moléculas más estables y podrían coadyuvar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Diferentes autores han reportado la actividad antioxidante en distintas unidades de medición por ejemplo; porcentaje de inhibición (% I), concentración de péptidos que inhiben el 50% de la actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) y la capacidad antioxidante

equivalente al trolox (TEAC). Por lo tanto, es difícil hacer una comparación entre los valores obtenidos en este trabajo con los reportados por otros autores. A pesar de esto, existen varios reportes que, al igual que en este trabajo, observaron que las fracciones de menor tamaño poseen mayor actividad antioxidante (Tabla 10). Ruiz *et al.*, (2011), a partir de las proteínas del frijol difícil de cocer y utilizando un sistema enzimático secuencial (Alcalasa®-Flavourzyme® y Pepsina-pancreatina) reportaron que la fracción de <1 kDa, en ambos hidrolizados, tuvo los valores más altos de mM TEAC/ mg de proteína. Por otra parte, Xia *et al.* (2012) evaluaron la actividad antioxidante de péptidos derivados del gluten de cebada obtenidos con Alcalasa®. De las tres fracciones producidas (>10 kDa, 10–1 kDa, <1 kDa), la primera mostró mayor actividad para captar DPPH y poder reductor; mientras que la última fue más eficiente en quelar iones Fe<sup>2+</sup> y OH. Asimismo, Zhang *et al.*, (2014), a partir de proteínas de patata dulce hidrolizadas con Alcalasa® obtuvieron cuatro fracciones peptídicas siendo la fracción menor a 3 kDa la que obtuvo mayor actividad de barrido OH<sup>-</sup> y mayor capacidad quelante de Fe<sup>2+</sup>. Igualmente, Li *et al.*, (2008) obtuvieron péptidos a partir de hidrolizado de proteína de garbanzo con Alcalasa®, siendo los péptidos de bajo peso molecular los que mostraron mayor actividad de eliminación de radical hidroxilo. En cuanto a péptidos antioxidantes obtenidos a partir de amaranto, Tironi y Añón (2010) mostraron la presencia de péptidos antioxidantes en hidrolizados del aislado proteínico del grano de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*) y en las fracciones proteicas de éste, albúmina, globulina y glutelina; teniendo la mayor actividad ésta última. También observaron que un mayor grado de hidrólisis (30 %), obtenido con la hidrólisis extendida, incrementó la actividad antioxidante debido a la presencia de péptidos menores a 0.5 kDa. Es importante mencionar, que no existen reportes en la literatura sobre péptidos obtenidos a partir de proteínas de hojas de plantas, incluido el amaranto. Por lo que este trabajo es un precedente para futuras investigaciones en este tópico. Además, la ventaja de los resultados en este estudio pone de manifiesto el potencial de la fracción vegetal del amaranto (FVA) para la obtención de un producto de valor agregado con amplia aplicación en la industria.

Tabla 10. Comparación de la actividad antioxidante de péptidos de diferentes fuentes vegetales determinada con diferentes metodologías.

Fuente	Enzima	% GH	Metodología para la determinación de la actividad antioxidante	Fracciones	Valores obtenidos	Referencia
FVA	Flavourzyme®	16.31%	ABTS (mM TEAC/g proteína)	<1 kDa	3.50	En este trabajo
	Alcalasa®	12.64%	ABTS (mM TEAC/g proteína)	<1 kDa	3.65	
Frijol	Flavourzyme®-Alcalasa®	43.01%	ABTS (mM TEAC/g proteína)	<1 kDa	888.43	Ruiz <i>et al.</i> , (2011)
	Pepsina-Pancreatina	26.15%	ABTS (mM TEAC/g proteína)	<1 kDa	1, 985.50	
Papa dulce	Alcalasa®		Capacidad quelante de Fe <sup>2+</sup> (%)	<3 kDa	82.27	Zhang <i>et al.</i> , (2014)
			Radical hidroxilo (OH•) (%)	<3 kDa	59.74	
Soja	Flavourzyme®	18.80%	FRAP (mM eq. ácido ascórbico)	>50 kDa	1.009	Moure <i>et al.</i> , (2006)
		36.60%	Poder reductor (mM eq. ácido ascórbico)	>50 kDa	0.400x10 <sup>-3</sup>	
		63.40%	Radical hidroxilo (OH•) (%)	30 y 50 kDa	69.75	
		42.10%	ABTS (mM Trolox eq.)	>50 kDa	6.64	

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

### 9.1. Conclusiones.

- ❖ El residuo agroindustrial que se genera después de la cosecha del grano (FVA) es una fuente viable para la obtención de proteínas.
- ❖ El perfil electroforético del concentrado proteínico de la FVA mostró bandas de proteínas que podrían, mayoritariamente, ser albúmina de acuerdo al peso molecular de esas bandas.
- ❖ Las enzimas utilizadas fueron eficientes para hidrolizar las proteínas presentes en el concentrado proteínico de la FVA.
- ❖ Todas las fracciones peptídicas, obtenidas con ambas enzimas, presentaron actividad antioxidante, sin embargo, la fracción de <1 kDa fue la de mayor actividad independientemente de la enzima.
- ❖ Este trabajo es un antecedente y pone de manifiesto el potencial de la fracción vegetal del amaranto (FVA) para la obtención de péptidos con actividad antioxidante.

### 9.2. Perspectiva.

- Optimizar la relación enzima/sustrato (E/S) que favorezca la obtención de mayor actividad antioxidante.
- Determinar la actividad antioxidante de los péptidos de la FVA por diferentes métodos (ORA, DPPH, FRAD, radical hidroxilo y metal quelante).
- Evaluar el contenido y secuencia de aminoácidos en cada fracción peptídica y relacionarla con su actividad.
- En función de la composición de aminoácidos de las fracciones con mayor actividad evaluar sus aplicaciones potenciales (alimentos o cosméticos).

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

**Abugoch, L. E. (2006).** Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*). Tesis doctoral. UNLP.

**Allen, R.G. y Tresini, M. (2000).** Oxidative stress and gene regulation. *Free radical Biology and Medicine*. 28(3): 463-499

**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.

**Arce-Vásquez, M. B. (2011).** Obtención de compuestos bifuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

**Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes L.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.

**Barba de la Rosa A. P., Fomsgaard I. S., Laureen B., Mortensen A. G., Ivera M. L., Silva S. C., Mendoza H. A., González C. J. y De León R. A. (2008).** "Amaranth (*Amaranthus hypochomdriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potencial impact on its nutraceutical quality". *Journal of Cereal Science*. v.49, p.117-121.

**Betancur, A. D., Pérez, F.V. Y Chel, G.L. (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.

**Bing Z. S., Wang Z. y Ying X. S. (2009).** Purification and characterization of a Radical scavenging peptide from rapeseed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 86, 959-966.

**Búcaro, M. E. y Bressani, R. (2002).** Distribución de la proteína en fracciones físicas de la molienda y tamizado del grano de amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52: 167-171.

**Brand, W. W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995).** "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30. Ojha H., Mishra K., Chaudhury N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*; 130:1036–1043.

**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.

**Cai, Y., Sun M., Wu H., Huang R. y Corke H. (1998).** Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:2063-2070.

**Castellani O. F. (2000).** Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto. Tesis doctoral. UNLP.

**Castel, V., Andrich, O., Netto, M. F., Satiago, G. L. y Carrara, R. C. (2012).** Comparison between isoelectric precipitation and ultrafiltration processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates at pilot plant scale. *Journal of Food Engineering* 112:288–295

**Céspedes, T. y Sanchez, D. (2000).** Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular (Revista Cubana de Cardiología). 14 (1): 55-60.

**Cordero-de-los-Santos, M. Y., Osuna, J. A., Borodaneenko, A. y Paredes, L. O. (2005).** "Physicochemical and Functional Characterisation of *Amaranthus hypochondriacus* Protein Isolates Obtained by Isoelectric Precipitation and Micellisation." *Food Science and Technology International*. v. 11, n. 4, p. 269-280.

**Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. y Shahidi, F. (2008).** Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144–148.

- Cheng, Y., Chen, J. y Xiong, Y. L. (2010).** Chromatographic separation and tandem MS identification of active peptides in potato protein hydrolysate that inhibit autoxidation of soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8825–8832.
- Chen H. M. M., K.; Yamauchi, F. (1995).** "Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean b-Conglycinin." *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43:574-578.
- 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.
- Criado, C. y Moya, M. (2009).** *Vitaminas y antioxidants*. Madrid: Saned.
- De Mejia, E., y De Lumen, B.O. (2006).** Soybean bioactive peptides a new horizon in preventing chronic diseases. *Sexuality, Reproduction and Menopause*. 4(2), 91-95.
- Domínguez-Magaña, M. A. (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.
- Draeos, Z. D. (2010).** Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinic in Dermatology*. 28: 400-408.
- Dorado M. C., Rugerio V. C., Rivas A. S. (2003).** Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revisión Facultad de Medicina, UNAM*. Vol.46 No.6
- Finkel, T. y Holbrook, N.J. (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*; 408: 239-247.
- 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.
- Gallegos, S., Torres, C., Martínez, A.L., Solorza, J., Alaiz, M., Girón, J., y Vioque, J. (2011).** Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. proteína hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91, 1618-1624.

- Garfin D.E. (1990).** One dimensional gel electrophoresis. Methods in enzymology. vol 182. Academic Press.
- Gibbs, B. F., Zougman A., Masse R. y Mulligan C. (2004).** Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Research International. 37:123-31.
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado, L. E., Haruenki, R., Weisz, M. y Trakhtenberg, S. (2002).** Characterisation of pseudocereal and cereal protein by protein and amino acid analyses. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 886-891.
- Gómez-Gómez, A. L. (2014).** Obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. Tesis de Ingeniero en Alimentos.
- Gobetti, M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A. y Di Cagno R. (2002).** Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. Crit Rev Food Sci Nutr. 42:223---39.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fliess, A.; Shnitman, I.; Paredes-Lopez, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi, H. (1998).** "Computacional análisis of the Amino Acid Residue Sequences of Amaranth and Some Other Proteins". Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. V. 62.10:1845-1851.
- Halliwell, B. y Gutteridge, .M.C. (1999).** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publication 3rd ed.
- Halliwell, B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Journal devoted to physiology, biochemistry, cellular and molecular biology, genetics, biophysics, and environmental biology of plants. 141, 312-322.
- 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.

- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., y Aluko, R. E. (2013).** Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5, 219–227.
- Heistad, D.D. (2006).** Oxidative stress and vascular disease. *The American journal of Medicine*. 26: 689–695.
- Hoover, R., y RorkeSCy, A.M (1991).** Isolation and Characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Starch. *Journal of Food Biochemistry*. 15:117-136.
- Huang, D., O.U.B. and Prior, R.L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
- Hwang, J.Y., Shyu, Y.S., Wang Y.T. y Hsu, C.K. (2010).** Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. *Food Science and Technology*. 43; 285–290.
- Kim, H.J., Kyung, J.J., Byung, P.Y., Chong, G.C., Jae, S.C. y Hae, Y.C. (2002)** Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 123:1589-1595.
- Katalinic, v., Modun, D., Music, I. y Boban, M. (2005).** Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*; 140: 47-52.
- Kim S. K., Byun H. G., Park P. J. y Shahidi F. (2001).** Angiotensin I. converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal Agriculture. Food Chemistry*. 49:2992-7.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y. Azumaya, J. y Nakatani, N. (1991).** Extraction of two anbumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and putative localization in the grain. *Agricultural and Biological Chemistry*. 11: 2745-2750.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006).** "Bioactive peptides: Production and functionality. Review." *International Dairy Journal* 16: 945-960.

- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003).** Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*. 9:1297-308.
- Kudo, K., Onodera, S., Takeda, Y., Benkeblia, N., y Shiomi, N. (2009).** Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract. *Journal of functional foods*, 1,170–176.
- Laemmli, UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680–685.
- Lopez, M. O. A., Lopez, M. A. y Palou, E. (2014).** Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*. 53-55-59.
- Li, Y. H., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. M., y Liu, J. (2008).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*. 106, 444–450.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A. Babakov, A., Krause, E., Beinert, M., Grishin, E.y Egorov, T. (2005).** An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*. 66 2426-2431.
- Ma, Y., Xiong, Y.L., Zhai, J., Zhu, H., y Dziubla, T. (2010).** Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of Buckwheat protein. *Food Chemistry*. 118, 582-588.
- Mañkinen, S., Johannson, T., Gerd, E. V., Pihlava, J. M., y Pihlanto, A. (2012).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant properties of rapeseed hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4, 575–583.
- Maldonado, O., Jiménez, E.N., Guapillo, R.B., Ceballos, G.M. y Méndez, E. (2010).** Free radicals and their role in chronic-degenerative diseases. *Centro de Investigaciones Biomédicas-Doctorado en Ciencias Biomédicas-UV*.
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., y Chamani, J. (2012).** A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4: 278–286.
- Megías, C., Yust, M. M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón, C.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.

**Morales, G., Vázquez, N. y Bressani, R. (2009).** El amaranto. Características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. 1ª Edición. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. 15-233.

**Moseley R., Waddington R.J. y Embery G. (1997).** Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease; 1362: 221-231

**Moskovitz J, Yim, B.M. y Chock, B.P. (2002).** Free radicals and disease. Archives of Biochemistry and Biophysics. 397: 354-359.

**Moure, A., Domínguez, H. y Parajó, J.C. (2006).** Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry. 41. 2. 447-456.

**Mulero, J., Zafrilla, P., Martínez, C.A., Leal, M. y Abellán, J. (2011).** Péptidos bioactivos. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. 23(5):219-227.

**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.

**Orsini-Delgado, M. C., Tironi, V. A. y Añón, M.C. (2011).** Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. LWT 44-1752-1760.

**Ortiz-Hernández A. 2013.** Efecto de biopéptidos antioxidantes derivados de la albúmina 1 del grano de amaranto en el estrés oxidativo *ex vivo* para piel humana. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. Monographs in Biochemistry. 2a. edición. Logmans, Green and Co., Nueva York.

**Pihlanto, A. (2000).** Bioactive peptides derived from bovine serum proteins: opioid peptides and ACE inhibitors. Trends in Food Science and Technology. 11.347-356.

**Pihlanto, A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal. 16:1306-1314.

**Prior R., Wu X. y Schaich K. (2005).** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53. 10. p. 4290-4302.

**Pulido, R., Bravo, L., y Saura, C.F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48. 3396-3402.

**Paredes-López, O. y Ondorica F.C. (1986).** Production of safflower protein isolates: Composition, yield and protein quality. Journal of Science and Food Agriculcture 37:1104-1109.

**Pukalskas, A., Teris A., Van Beek, Rimantas, P., Venskutonis, Jozef P.H., Linssen, Albertus van Veldhuizen, y Aede de Groot. (2002).** Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloe odorata*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50. 2914-2919.

**Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E., Futter M., Garcia-Arencibia M., Green-Thompson Z.W.,Jimenez-Sanchez M, Korolchuk V.I., Lichtenberg M., Luo S., Massey D.C., Menzies F.M., Moreau K., Narayanan U., Renna M., Siddiqi F.H., Underwood B.R. y Winslow A.R.,(2010).** Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiological Reviews. 90.1383–1435.

**Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y. y Kim, S.K. (2005).** Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International, 38, 175-82.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. (1999).** Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26:1231–1237.

**Rizzello C. G., Coda R., De Angelis M., Di Cagno R., Carnevali P., Gobbetti M. (2009).** Longterm fungal inhibitory activity of wáter-soluble extract from Amaranthus spp. Sedes during storage of gluten-free and wheat flour breads. International Journal of Food Microbiology. 131-189-196.

**Rodriguez, A. S. L., Martinez, A. L., Millán, F. y Dávila, O.G. (2005).** Composition and Functional Properties of Lupinus campestris protein Isolates. Plant Foods for human Nutrition. 60:99-107.

- Roginsky V., Barsukova T., Loshadkin D. y Evgeny P. (2003).** Substituted p-hydroquinones as inhibitors of lipid peroxidation. En: Chemistry and physics of lipids. Vol. 125.1. p. 49-58.
- Ruiz-Ruiz, J., Dávila, O.G., Chel, G.L. y Betancur, A.D. (2011).** angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*. 37:26–35
- Sánchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8.3.121-137.
- SAGARPA (2013).** Cierre de la producción agrícola por estado. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/).
- Samaranayaka, G.P. y Li-chan, E.C.Y. (2011).** Food derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3.229-254.
- Sauer, J. D. (1967).** The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical*. 37: 561-616.
- Segura-Nieto M., Vázquez, S.N., Rubio, V.H., Olguín, M.L. E., Rodríguez, N.C. E. y Herrera, E.L. (1992).** Characterization of amaranth (*Amaranthus hypocondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40. 1553-1558.
- Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A.P.; Paredes-López, O. (1994).** “Biochemistry of amaranth proteins”. In: *Amaranth: Biology Chemistry and Technology*. Cap. 5:75-106.
- Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S., y 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 and Technology*, 27(3): 337-346.
- 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.

- Soriano, S. J. y Escalona, B. H. (2015).** Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. *Journal Food Scientists and Technologists*. 52(4):2073–2082
- Shahidi, A. y Zhong, B. (2008).** Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*. 91:914-931.
- Stadtman, E. y Levine, R. (2003).** Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 25: 207-218.
- Sabbione A. C., Scilingo A. (2010).** Actividad antitumoral y antitrombótica de proteínas de amaranto modificadas por hidrólisis enzimática. XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Santa Fe, Argentina.
- Teutonico, R. A. y Knorr, D. (1985).** Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol*. 39:49-60.
- Tironi, V.A. y Añón, M.C. (2010).** Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*. 43. 315–322.
- Torruco-Uco, J.G. (2009).** Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivos obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Instituto Politécnico Nacional. Tesis Doctor en ciencias en alimentos.
- Tovar P. E. G., Guerrero C. L., Farrés G. A. y Soriano, S.J. (2009).** Angiotensin converting enzyme inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 116: 437-444.
- Vecchi, B. y Añón, M.C. (2009).** ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*. 70.864-870.
- Wang, W. y Gonzalez de Mejia , 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.
- Wayner, Burton, Ingold y Locke (1985).** Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. 187.33–37.

- Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M. y Chen L. (2012).** Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry* 134:1509–1518
- Zamora, J.D. (2007).** Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de nutrición.* 34:1.
- Zuleta, A., Esteve, M. y Frigola A. (2009).** ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry.* 114: 310-316.
- Zhu, K. X., Zhou, H. M., y Qian, H. F. (2006).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry.* 41.1296–1302.
- Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., y Yao, H. (2010).** Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography. *Food Chemistry.* 119:226-234.
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X., y Xiong, Y.L. (2008).** Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of Alcalasa®- treated zein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56:2714-2721.
- Zhang, T., Li, Y., Miao y Jiang, B. (2011).** Purification and characterization of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer orietium L.*) protein hydrolysates. *Food Chemistry.* 128.28-33.
- Zhang, Z., Huang, C.S., Shi, X.L., Leonard, S.S., Lanciotti, R. y Butterworth, L., (2001).** Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 392:311–320.
- Zhang, M., Tai-Hua, M., y Min-Jie, S. (2014).** Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of functional foods.* 7. 191–200.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1

#### Curva estándar de L-Serina

Tabla 11. Preparación del reactivo OPA.

REACTIVO OPA	Para 200mL
Tetra borato de sodio	7.620 g
SDS	200 mg
Disolver en 150 mL de H <sub>2</sub> O deionizada, antes de continuar	
O-ftalaldehído	160 mg disueltos en 4mL de etanol
DTT 99%	176 mg
Completar el volumen hasta 200 mL.	
MANTENER EN AUSENCIA DE LA LUZ POR NO MAS DE 2 SEMANAS.	

Tabla 12. Curva estándar L-Serina (50mg/500mL).

CURVA ESTANDAR DE L-SERINA						
H <sub>2</sub> O destilada	Estandar L-serina	Reactivo OPA	stock serina (0.1 mg/mL)	Ab 1	Ab 1	promedio de Ab
200 µL	-----	1.5 mL	0	0	0	0
150 µL	50 µL	1.5 mL	50	0.153	0.145	0.149
100 µL	100 µL	1.5 mL	100	0.337	0.318	0.328
50 µL	150 µL	1.5mL	150	0.502	0.493	0.498
0	200 µL	1.5 mL	200	0.687	0.722	0.705

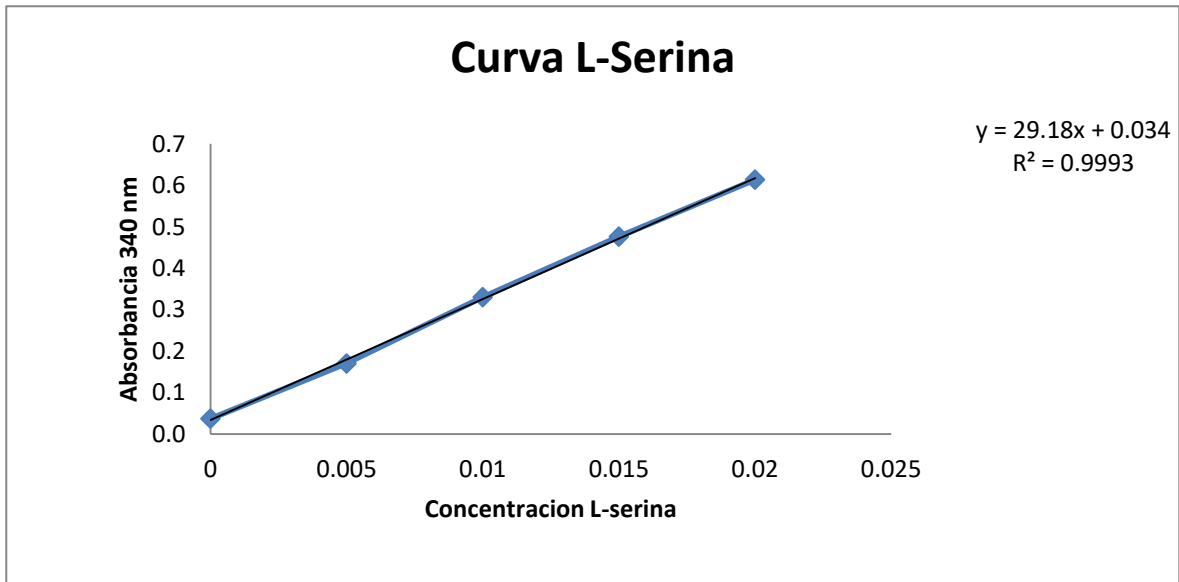


Figura 9. Curva estándar de L-Serina

El grado de hidrólisis (% GH) se calcula usando la siguiente fórmula (Dominguez 2009).

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

Donde:

Grupos amino libres en el hidrolizado se obtienen por el método de OPA.

Grupos amino libres en el hidrolizado ácido se obtienen por hidrólisis total con HCl.

La hidrólisis total se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Megías *et al.*, (2004)

\*Preparar HCl 6N el mismo día de uso.

1. Pesar 4 mg de proteína (de acuerdo al contenido de proteína/g de cada muestra).
2. Agregar 6 mL de HCl 6N.
3. Bombear N gaseosos dentro de los tubos por 15 s para sustituir la atmósfera. Tapar bien.
4. Incubar por 24 h a 110 °C.
5. Enfriar los tubos a temperatura ambiente.
6. Una vez que se enfriaron abrir los tubos y evaporar el ácido en una estufa de vacío a 90°C.
7. Resuspender las cenizas en 2 ml de SDS 1% dar un pulso en el vortex y centrifugar a 1500 rpm por 15 min a 4°C.
8. Recuperar el sobrenadante y almacenar a 4°C hasta su uso.
9. Determinar los aminoácidos libres mediante la técnica de OPA. Si es necesario diluir 1:10 con SDS 1%.

\* Cada muestra se realiza por duplicado.

Pasos para la lectura de absorbancia de las muestras en el espectro y determinar el grado de hidrólisis.

- ❖ Encender el espectro 10 min antes.
- ❖ En un tubo eppendorf de 2.0 mL agregar 200µL de agua desionizada.
- ❖ Agregar 1.5mL del reactivo de OPA (mantener protegido de la luz).
- ❖ Mezclar 5 segundos cuidadosamente
- ❖ Incubar protegido de la luz por **2 min EXACTAMENTE.**

- ❖ Ajustar a 340 nm
- ❖ Repetir usando 200µL del estándar y registrar la absorbancia.
- ❖ Repetir para cada muestra y asegurarse de que las absorbancias se encuentran en el rango de la curva estándar o por debajo de la absorbancia obtenida del estándar. Si es necesario diluir 1:100 en SDS 1%
- ❖ Interpolar los valores de absorbancia en la curva de L-serina de acuerdo a la ecuación de la recta obtenida.

## Anexo 2.

En la tabla 13 se muestra la determinación del peso molecular de una proteína desconocida, mediante SDS-PAGE. La movilidad electroforética relativa (**Rf**) es inversamente proporcional al logaritmo del PM.

Tabla 13. Movilidad electroforética relativa (Rf) del marcador de PM.

log PM	Marcador (PM kDa)	Distancia que migra una determinada proteína	Distancia que migra el frente del gel	Rf
1.1584	14.4	1	7.5	0.133
1.3324	21.5	2.3		0.307
1.4914	31	3.2		0.427
1.6532	45	4.8		0.640
1.8209	66.2	6.1		0.813
1.9886	97.4	6.7		0.893

En la figura 10 se muestra la grafica de la curva de referencia con estándares de PM conocido, donde se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar y así obtener los pesos moleculares de las proteínas incógnitas.

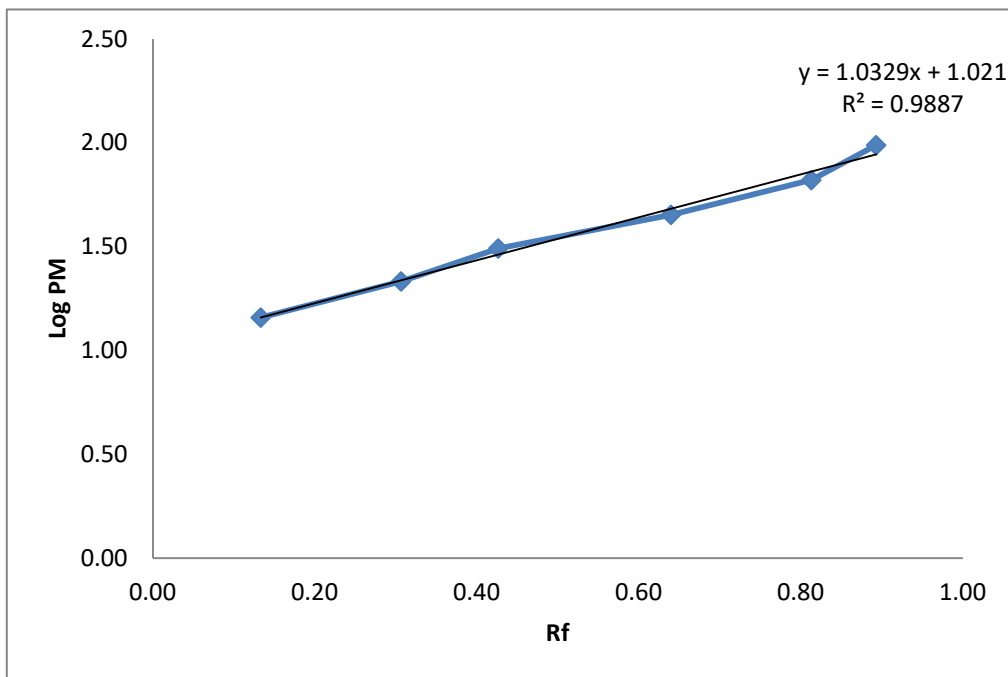


Figura 10. Curva de referencia para estimación del peso molecular de proteínas.

### Anexo 3.

#### Determinación de proteína total (Bradford1976)

En la Tabla 14, se muestra las concentraciones de albúmina que se utilizaron para la curva estándar, en la cual las absorbancias obtenidas sirvieron de referencia para la cuantificación de proteína en las fracciones peptídicas de los hidrolizados con Alcalasa® y Flavourzyme®.

Tabla 14. Curva estándar para la determinación de proteína total (Bradford 1976).

Curva estándar de albúmina				
albúmina mg/mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio de las Abs
0	0.335	0.335	0.335	
0.001	0.028	0.011	0.033	0.024
0.003	0.062	0.065	0.076	0.068
0.005	0.114	0.117	0.12	0.117
0.01	0.25	0.247	0.226	0.241
0.02	0.44	0.469	0.453	0.454

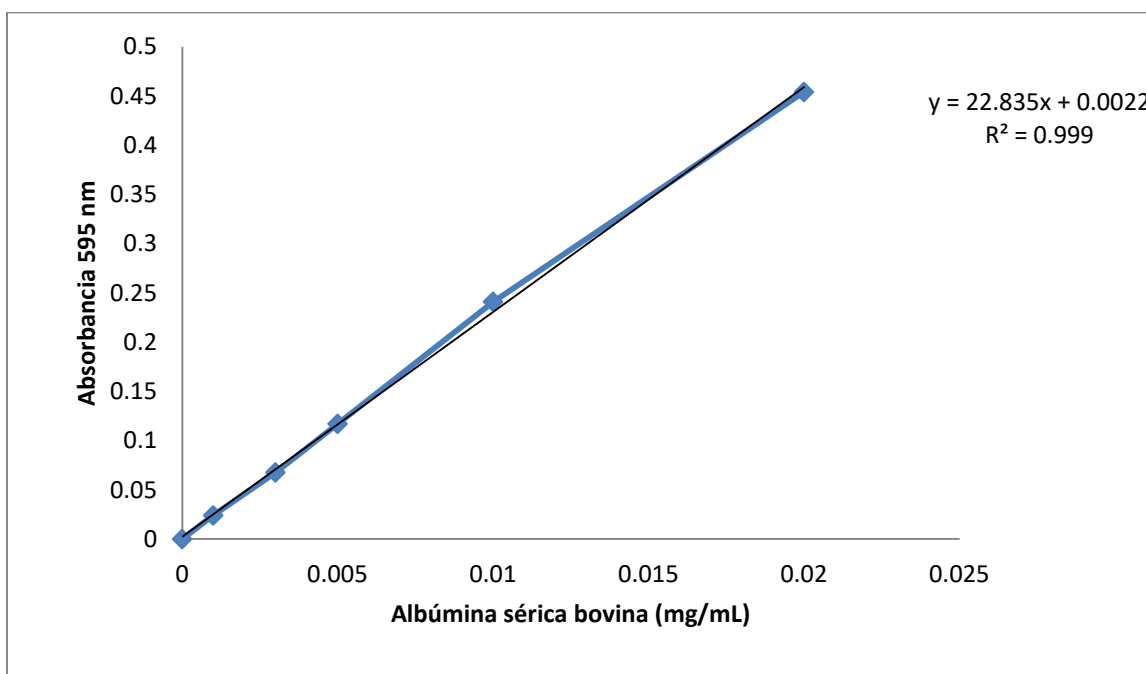


Figura 11. Gráfica de la ecuación de la recta de albúmina.

## Anexo 4.

Se determinó la actividad antioxidante mediante la metodología propuesta por Pukalskas *et al.*, (2002).

Se preparó una solución 2 mM de ABTS (2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfónico) disolviendo 0.0515 g de ABTS en 50 ml de PBS 0.01 M (buffer salino de fosfatos) el cual se preparó con 0.7098 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1347 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.0908 g de NaCl y 0.0749 g de KCl disueltos en 500 ml de agua bidestilada, ajustando el pH a 7.4 con NaOH 1.0 M. El radical catión  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se obtuvo al mezclar 50 ml de la solución de ABTS con 200  $\mu\text{l}$  de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 70mM (esta solución permaneció en un cuarto oscuro a temperatura ambiente 16-17 h antes de su uso). El radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  se diluyó en buffer PBS hasta alcanzar una absorbancia de  $0.8 \pm 0.030$  medida a una longitud de onda de 734 nm.

Se realizó una curva estándar de Trolox, disolviendo inicialmente en microtubos de 2 ml, 990  $\mu\text{l}$  de radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  diluido y 10  $\mu\text{l}$  de solución Trolox a 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mM (agitando en un vortex). Posteriormente, se colocó dicha solución en una celda de cuarzo y se determinó la absorbancia a 734 nm para cada concentración de trolox exactamente después de 6 min. Se calculó el porcentaje de inhibición, se graficó la concentración de Trolox vs % Inhibición y se obtuvo la ecuación de la línea de tendencia ( $y = mx + b$ ). Las muestras se ajustaron a una concentración final de 0.5mg/mL. La medición de la actividad antioxidante de las muestras se efectuó mezclando 10  $\mu\text{l}$  de las fracciones y 990  $\mu\text{l}$  de radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  en microtubos de 2 ml, para posteriormente determinar la absorbancia a 734 nm en una celda de cuarzo dejándolo a un tiempo fijo 6 min. El porcentaje de inhibición de los estándares ( $\%I_E$ ) y de la muestra ( $\%I_M$ ), así como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\%inhibición = (AB-AA)/AB*100$$

Donde:

**AB = Absorbancia del blanco.**

**AA = Absorbancia de la muestra.**

La capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$TEAC = (\%Im-b)/m$$

Donde:

**% Im = Porcentaje de Inhibición de la muestra.**

**b = Punto de intersección.**

**m = Pendiente de la recta.**

En la tabla 15, se muestra las absorbancias de cada concentración de trolox para así obtener el porcentaje de inhibición y se realizó la ecuación de la recta.

Tabla 15. Curva estándar de Trolox.

Conc. Trolox (mM)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio Abs de la muestra	% Inhibición
Blanco	<b>0.802</b>				
0.5	0.656	0.651	0.656	<b>0.654</b>	18.21
1.0	0.525	0.522	0.522	<b>0.523</b>	34.63
1.5	0.383	0.422	0.369	<b>0.391</b>	51.08
2.0	0.262	0.259	0.253	<b>0.258</b>	67.75
2.5	0.119	0.123	0.151	<b>0.131</b>	83.63

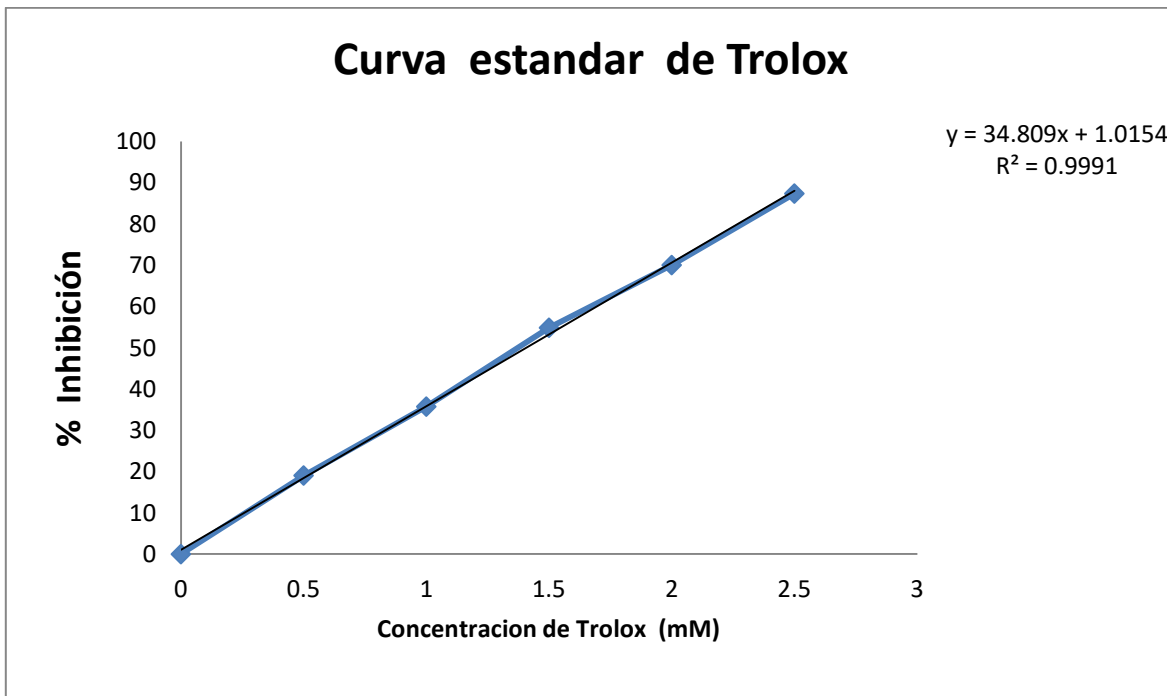


Figura 12. Gráfica de la ecuación de la recta de la curva estándar de Trolox.

## Anexo 5.

### Análisis estadísticos

Análisis de varianza. En las tablas se muestra las medias entre los grupos.

Tabla 16. Comparación de tiempos de hidrólisis con Flavourzyme.

Enzima	Tiempo de hidrólisis	Cantidad	Medias	Diferencia de grupos
Flavourzyme®.	0	4	0	15F, 30F, 60F, 90F, 120F.
	15	4	5.3125	0F, 30F, 60F, 90F, 120F
	30	4	12.71	0F, 15F, 60F, 90F, 120F
	90	4	15.6125	0F, 15F, 30F
	60	4	16.1625	0F, 15F, 30F
	120	4	16.3075	0F, 15F, 30F

Tabla 17. Comparación de tiempos de hidrolisis con Alcalasa.

Enzima	Tiempo de hidrólisis	Cantidad	Medias	Diferencia de grupos
Alcalasa®	0	4	0	15 A, 30 A, 90 A, 60 A, 120 A.
	15	4	6.515	0 A, 30 A, 90 A, 60 A, 120 A.
	30	4	11.5525	0A, 15 A
	90	4	11.74	0A, 15 A
	60	4	11.75	0A, 15 A
	120	4	12.6375	0A, 15 A

Tabla 18. Comparación de tiempo de hidrólisis entre Flavourzyme y Alcalasa.

Enzima	Tiempo de hidrólisis	Cantidad	Medias	Diferencia de grupos
Flavourzyme®, Alcalasa®	0A	4	0	15F, 15A, 30A, 60A, 90A,120 A, 30F, 60F, 90F, 120F.
	0F	4	0	15F,15 A,30 A, 60 A,90 A,120 A,30F,60F,90F,120F.
	15F	4	5.3125	0A,0F,30 A,90 A,60 A,120 A,30F,60F,90F,120F.
	15A	4	6.513	0A,0F,30 A,90 A,60 A,120 A,30F,60F,90F,120F.
	30A	4	11.5225	0A,0F,15F,15 A,60F,90F,120F
	90A	4	11.74	0A,0F,15F,15 A,60F,90F,120F
	60A	4	11.75	0A,0F,15F,15 A,60F,90F,120F
	120A	4	12.6375	0A,0F,15F,15 A,60F,90F,120F
	30F	4	12.71	0A,0F,15F,15 A,60F,90F,120F
	60F	4	15.6125	0A,0F,15F,15 A,30 A,90 A,60 A,120 A,30F.
	90F	4	16.1625	0A,0F,15F,15 A,30 A,90 A,60 A,120 A,30F.
	120F	4	16.3075	0A,0F,15F,15 A,30 A,90 A,60 A,120 A,30F.

Tabla 19. Diferencias entre fracciones peptídicas con Flavourzyme.

<b>Fracciones peptídicas (kDa)</b>	<b>Grupo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Medias</b>	<b>Diferencia de grupos</b>
>10 (F1)	F1F	3	1.615	F3F, F4F, F2F, F5F
3-5 (F3)	F3F	3	2.6886	F1F, F4F, F2F, F5F
1-3 (F4)	F4F	3	2.9566	F1F, F3F, F2F, F5F
5-10 (F2)	F2F	3	3.4933	F1F, F3F, F4F
<1 (F5)	F5F	3	3.5023	F1F, F3F, F4F

Tabla 20. Diferencias entre fracciones peptídicas con Alcalasa.

<b>Fracciones peptídicas (kDa)</b>	<b>Grupo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Medias</b>	<b>Diferencia de grupos</b>
>10 (F1)	F1A	3	2.1094	F4A, F3A, F2A, F5A
1-3 (F4)	F4A	3	2.8384	F1A, F2A, F5A
3-5 (F3)	F3A	3	2.9010	F1A, F2A, F5A
5-10 (F2)	F2A	3	3.3079	F1A, F4A, F3A, F5A
<1 (F5)	F5A	3	3.6545	F1A, F4A, F3A, F2A

Tabla 21. Comparación de fracciones peptídicas entre ambas enzimas.

Fracciones peptídicas (kDa)	Grupo	Cantidad	Medias	Diferencia de grupos
>10 (F1)	F1F	3	1.615	F1HA,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA.
>10 (F1)	F1A	3	2.1094	F1HF,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA
3-5 (F3)	F3F	3	2.6886	F1HF,F1HA,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA.
1-3 (F4)	F4A	3	2.8384	F1HF,F1HA,F3HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA.
3-5 (F3)	F3A	3	2.9010	F1HF,F1HA,F3HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA.
1-3 (F4)	F4F	3	2.9566	F1HF,F1HA,F3HF,F2HA,F2HF,F5HF,F5HA.
5-10 (F2)	F2A	3	3.3079	F1HF,F1HA,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HF,F5HF,F5HA.
5-10 (F2)	F2F	3	3.4933	F1HF,F1HA,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA
<1 (F5)	F5F	3	3.5023	F1HF,F1HA,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA
<1 (F5)	F5A	3	3.6545	F1HF,F1HA,F3HF,F4HA,F3HA,F4HF,F2HA