



UADY
POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS
DE *M. pruriens* CON POTENCIAL INHIBIDOR DE
LA ENZIMA CONVERTIDORA DE
ANGIOTENSINA**

TESIS

**PRESENTADA POR
MARIEL SINAÍ GARRIDO BALAM**

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2017



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE
PÉPTIDOS DE *M. pruriens* CON POTENCIAL
INHIBIDOR DE LA ENZIMA
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

TESIS

PRESENTADA POR:

MARIEL SINAI GARRIDO BALAM

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2017



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 10 de agosto de 2017
Oficio Num.: PICQB/285/2017
Asunto: Autorización de impresión

La tesis Aislamiento y Purificación de Péptidos de *Mucuna pruriens* con Potencial Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina, presentada por la C. Mariel Sinái Garrido Balam, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes.

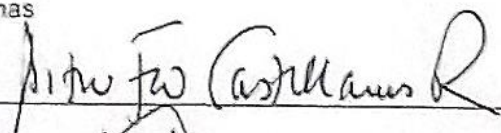


Dra. Maira Rubi Segura Campos
Directora de la Tesis

Sinodales:

Firmas


Dr. Arturo Francisco Castellanos Ruelas




Dra. Tania Isolina Coral Martínez



Dr. Víctor Hernández Escalante




Dra. Maira Rubi Segura Campos
Coordinadora del Posgrado Institucional en
Ciencias Químicas y Bioquímicas

AGRADECIMIENTOS

El conocimiento es algo que nunca terminamos de poseer ni tampoco de dominar, pero algo a lo que siempre tenemos que tener en cuenta. El conocimiento es una de las máximas fuentes de poder que tiene el hombre. Poseerlo por completo es imposible, mismo que dominarlo.

En esta nueva era, lo que hace formar a un excelente nutriólogo es el conocimiento que aplica a sus pacientes y poder ir más allá de su experiencia, el conocimiento nos hace responsables de saber lo que sabemos y saber que no sabemos lo que no sabemos.

Comienzo a plasmar en estas líneas parte importante de mi vida a lo largo de lo que he recorrido en esta brecha que me ha tocado caminar y poder afirmar que el conocimiento es parte primordial para mí desarrollo profesional como nutrióloga.

En cada una de las personas, Dios tiene un destino, aprendí que nada sucede antes ni después, todo sucede en el momento exacto destinado por mi padre Dios. Doy gracias a ese poder superior que actúa en mí en cada momento, estoy infinitamente agradecida por darme virtudes y defectos que me hacen ser única en este mundo. Al igual agradezco todas las bendiciones en especial la oportunidad de tener una hermosa hija de nombre Dariel Itzayana que ha llenado mi vida de felicidad y me ha alentado a seguir caminando hacia adelante para brindarle un mejor futuro.

Agradezco profundamente el apoyo incondicional de mi esposo David, todos me dicen que he tenido suerte de encontrarte en mi vida y les doy toda la razón. Me siento realmente dichosa de tener tu amor, agradecida con Dios y agradecida contigo por llenarme de alegría, de amor, de ternura y de todo lo bueno que hay en tu corazón. Gracias, mi amor, por apoyarme en este camino.

A mis padres Pedro y Paula. Queridos Papá y Mamá. Siempre han sido un ejemplo para mí. Gracias a ello estoy alcanzado mis metas con mucho orgullo. Les debo un eterno agradecimiento y mi retribución total por su gran amor.

A mis Hermanos. Que con su apoyo, comprensión y afecto moral, estuvieron siempre conmigo en los momentos más difíciles de mi formación, cuando necesité fuerzas y ánimo para poder afrontar el presente y continuar mis estudios.

A la Dra. Maira Rubí Segura Campos, le doy las gracias por su paciencia indomable y su capacidad de enfrentar todos los retos, me dio la confianza necesaria para que yo también creyera en mis posibilidades. Ha ido más allá de sus obligaciones a la hora de estar conmigo y ayudarme a mejorar mis notas, pero sobre todo en la comprensión de ciertos temas y momentos en mi vida. Muchas gracias querida asesora por su ayuda, ha sido fundamental para que abriera al fin los ojos y me decidiera a afrontar los retos.

A mis abuelos, suegra, cuñadas y gente que es parte de mi vida aunque no nos unan lazos de sangre. Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de

sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo. Con cariño y admiración.

Diana Sosa muchas gracias por tu apoyo incondicional, espero tener la dicha de verte graduada próximamente.

Si tuviera que hacer un listado para agradecer a todos mis amigos lo que hacen y han hecho por mí, creo que nunca acabaría. Así que lo resumo diciéndoles gracias por su valiosa amistad. Las locuras, las salidas y las conversaciones se vuelven memorables porque forman parte de mí vida. Gracias por comprenderme y por estar a mi lado en las buenas y en las malas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado al proyecto denominado: Investigación científica dirigida al desarrollo de derivados proteínicos de *Mucuna pruriens* con potencial actividad biológica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y obesidad con número 154307.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, en sus Facultades de Ingeniería Química y Química, así como a la Unidad de Investigación de Química con sede en Sisal, Yucatán de la Universidad Autónoma de México, por las instalaciones, equipos y reactivos que hicieron posible la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Sergio Rodríguez. Mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad. Ha sido muy importante su presencia en mi formación académica.

A mis revisores que con su ayuda se consolido este proyecto de investigación. Gracias por su apoyo incondicional, en especial a la Dra. Tania Coral, que siempre estuvo al pendiente de mi crecimiento y fomentó en mí la seguridad de aprender a conocer lo desconocido.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Ciencia de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Maira Rubí Segura Campos. La investigación formó parte del proyecto “Investigación científica dirigida al desarrollo de derivados proteínicos de *Mucuna pruriens* con potencial actividad biológica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y obesidad”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 154307. Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo de la beca concedida por el CONACYT con número de becario 703766.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo. El principal factor de riesgo es la Hipertensión Arterial (HTA). Así, la prevención y el control son de vital importancia. Por lo anterior, el objetivo fue evaluar la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) de derivados proteínicos de *M. pruriens* aislados y purificados. Brevemente, se hidrolizó secuencialmente el concentrado proteínico de *M. pruriens* con Pepsina–Pancreatina; se determinó el grado de hidrólisis (GH) y, se fraccionó por ultrafiltración. Posteriormente, se determinó el porcentaje de inhibición de la ECA de las fracciones ultrafiltradas, se seleccionó la fracción más activa. Se determinó su perfil por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se prefraccionó la fracción de 1-3kDa (F2) por extracción en fase sólida C18 fase reversa, se registró la fracción de 1-3 kDa elución Agua/Acetonitrilo 90-10 (F2_2) con mayor actividad. Se separó, mediante CLAR semipreparativa obteniendo tiempos de retención (t_R) de: 6 a 12min (F2_2_1); de 12 a 14min (F2_2_2) y de 14 a 25min (F2_2_3). La fracción F2_2_2 se seleccionó debido a su complejidad y actividad biológica. Posteriormente, se realizó la exclusión molecular y determinación del peso molecular empleando filtración en gel. Se realizó el IC_{50} de la fracción y se comparó con el captopril y lisinopril. Se logró recuperar el 71.29% de proteína en base seca, el GH fue de 34.85%, por lo que se clasifica como extensivo. La fracción final F2_2_2 (2.499mg/mL) aislada y purificada con t_R : 16.25 ± 1.48 registró el $48.57\% \pm 0.26$ de porcentaje inhibición de la ECA, IC_{50} de $713.578 \mu\text{g/mL} \pm 1.09$ y peso molecular de 1.394 kDa. En conclusión la actividad inhibitoria de la ECA existente de las fracciones aisladas y purificadas de *M. pruriens* son una alternativa para el diseño de nuevas herramientas terapéuticas para la prevención y tratamiento de la HTA.

Palabras clave: Hipertensión Arterial, Enzima Convertidora de Angiotensina, Cromatografía líquida de alta resolución, tiempos de retención, *M. pruriens*.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. The main risk factor is Arterial Hypertension (AHT). Prevention and control are of vital importance. The objective was to evaluate the inhibitory activity of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) of *M. pruriens* protein derivatives isolated and purified. Briefly, the *M. pruriens* protein concentrate was sequentially hydrolyzed with Pepsin-Pancreatin; the degree of hydrolysis (GH) was determined and, fractionated by ultrafiltration. Subsequently, the percentage of ACE inhibition of the ultrafiltrate fractions was determined, the most active fraction was selected. Its profile was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The fraction of 1-3kDa (F2) was prefractionated by C18 reverse phase solid phase extraction, the fraction of 1-3 kDa elution Water/Acetonitrile 90-10 (F2_2) with higher activity was recorded. It was separated by semipreparative HPLC obtaining retention times (t_R) of: 6 to 12min (F2_2_1); from 12 to 14min (F2_2_2) and from 14 to 25min (F2_2_3). The F2_2_2 fraction was selected because of its complexity and biological activity. Subsequently, molecular exclusion and molecular weight determination were performed using gel filtration. The IC_{50} of the fraction was performed and compared with captopril and lisinopril. It was possible to recover 71.29% protein on dry basis; the GH was 34.85%, reason why it is classified as extensive. The final fraction F2_2_2 (2.499mg/mL) isolated and purified with t_R : 16.25 ± 1.48 recorded $48.57\% \pm 0.26\%$ inhibition of ACE, IC_{50} of $713.578 \mu\text{g/mL} \pm 1.09$ and molecular weight of 1,394kDa. In conclusion, the inhibitory activity from the isolated and purified fractions of *M. pruriens* is an alternative for the design of new therapeutic tools for the prevention and treatment of hypertension.

Keywords: Arterial Hypertension, Angiotensin Converting Enzyme, High Resolution Liquid Chromatography, retention times, *M. pruriens*.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| Hipertensión | 3 |
| <i>Etiología</i> | 3 |
| <i>Definición y clasificación de la hipertensión</i> | 3 |
| <i>Causas de la hipertensión</i> | 4 |
| <i>Síntomas de la hipertensión</i> | 4 |
| <i>Diagnóstico y detección de la hipertensión</i> | 5 |
| <i>Hipertensión a nivel mundial</i> | 5 |
| <i>Hipertensión en Latinoamérica</i> | 6 |
| <i>Hipertensión en México</i> | 7 |
| <i>Hipertensión en Yucatán</i> | 9 |
| El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) | 9 |
| <i>Funcionalidad de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)</i> | 11 |
| <i>Inhibición de la ECA</i> | 11 |
| Péptidos bioactivos..... | 11 |
| <i>Absorción de péptidos inhibidores de la ECA</i> | 12 |
| <i>Péptidos inhibidores de la ECA identificados</i> | 13 |
| <i>Estructura de los péptidos inhibidores de la ECA</i> | 15 |
| <i>Estudios clínicos de los péptidos inhibidores de la ECA</i> | 17 |
| Métodos para medir la actividad IECA y selección de sustancias potenciales con actividad antihipertensiva..... | 24 |
| <i>Mucuna pruriens</i> | 25 |
| <i>Características generales</i> | 25 |
| <i>Péptidos derivados de Mucuna pruriens (Frijol terciopelo)</i> | 26 |
| <i>Composición de Mucuna pruriens</i> | 27 |
| Técnicas de separación | 33 |
| <i>Ultrafiltración</i> | 33 |
| <i>Técnicas cromatográficas</i> | 33 |
| <i>Cromatografía de exclusión molecular (Filtración en gel)</i> | 35 |
| <i>Cromatografía de fase reversa</i> | 36 |

| | |
|---|----|
| <i>Cromatografía de intercambio iónico</i> | 36 |
| OBJETIVOS | 39 |
| Objetivo general | 39 |
| Objetivos específicos..... | 39 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| Procedimiento experimental | 41 |
| Materiales..... | 43 |
| Métodos..... | 43 |
| <i>Obtención de harinas</i> | 43 |
| <i>Obtención de concentrado proteínico</i> | 43 |
| <i>Hidrólisis enzimática</i> | 43 |
| <i>Grado de hidrólisis</i> | 44 |
| <i>Fraccionamiento por ultrafiltración</i> | 45 |
| <i>Determinación de proteína por el método de Lowry</i> | 45 |
| <i>Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de acuerdo al método de Hayakari y col. (1978)</i> | 45 |
| <i>Determinación del perfil cromatográfico por CLAR analítico</i> | 47 |
| <i>Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE)</i> | 47 |
| <i>Aislamiento de la fracción con mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante CLAR semipreparativa</i> | 47 |
| <i>Separación por exclusión molecular en CLAR (Yarra SEC-2000)</i> | 48 |
| <i>Determinación del peso molecular por CLAR empleando filtración en gel</i> | 48 |
| DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 49 |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES | 51 |
| <i>Obtención de concentrado proteico</i> | 51 |
| <i>Hidrólisis enzimática</i> | 51 |
| <i>Fraccionamiento por ultrafiltración</i> | 52 |
| <i>Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de acuerdo al método de Hayakari y col. (1978)</i> | 53 |
| <i>Determinación del perfil cromatográfico por CLAR analítico</i> | 55 |
| <i>Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE, C18-U)</i> | 56 |
| <i>Aislamiento de la fracción con mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante CLAR semipreparativa</i> | 58 |
| <i>Separación por exclusión molecular en CLAR</i> | 59 |

| | |
|--|----|
| <i>Determinación del peso molecular por CLAR empleando filtración en gel</i> | 62 |
| CONCLUSIONES | 65 |
| PERSPECTIVAS | 67 |
| BIBLIOGRAFÍA | 69 |
| ANEXO I. ÍNDICE DE TABLAS | 91 |
| ANEXO II. ÍNDICE DE FIGURAS | 93 |
| ANEXO III. ABREVIATURAS | 95 |
| ANEXO IV. NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS | 97 |

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores que contribuyen a causar cardiopatías y accidentes cerebrovasculares, que en conjunto representan la causa más importante de muerte prematura y discapacidad. Los investigadores estiman que esta enfermedad provoca cada año casi 9.4 millones de muertes por enfermedades del corazón. También contribuye a aumentar el riesgo de insuficiencia renal y de ceguera. La HTA es un incremento crónico de la presión arterial sanguínea. En general, si la presión diastólica es > 90 mmHg y la presión sistólica es > 140 mmHg, puede decirse que esa persona es hipertensa (Arora y col., 2013). En los humanos existe un sistema hormonal denominado RAS (de sus siglas en inglés, Renin-Angiotensin System) que controla la presión sanguínea mediante la acción de una enzima denominada ACE-I (de sus siglas en inglés Angiotensin - I Converting Enzyme), la cual convierte la angiotensina I en angiotensina II, un poderoso vasoconstrictor que ocasiona que la presión sanguínea aumente (Arora y col., 2013). La disminución de la HTA es una de las principales medidas consideradas en la salud pública para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y enfermedades renales, incluso en fase terminal. Tradicionalmente, las drogas de síntesis tales como captopril y enalapril se han utilizado como inhibidores de la ECA a pesar de sus efectos secundarios, la ciencia y tecnología se ha dado la tarea de hallar nuevas fuentes de alimentos para la generación de péptidos bioactivos naturales que presenten actividades biológicas beneficiosas para la salud; sin embargo el tipo y la cantidad de éstos dependen de la fuente proteica utilizada, así como del grado y tipo de hidrólisis empleado. Diversas investigaciones indican que cualquier fuente de proteína ya sea animal o vegetal, es capaz de aportar péptidos funcionales. Hoy en día, existen fórmulas nutrimentales enriquecidas con péptidos resistentes a la digestión. México, tiene una amplia biodiversidad de plantas y alimentos incluyendo granos de leguminosas, que pueden ser factibles de emplear como materia prima para la generación de péptidos bioactivos altamente eficaces en la prevención y tratamiento de la HTA. Por lo anterior, se pretende aislar y purificar péptidos inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) presentes en los hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*).

ANTECEDENTES

Hipertensión

Etiología

Actualmente, la etiología de la HTA es poco clara, sin embargo hay avances en el conocimiento de la participación del endotelio vascular y sus productos, los nexos fisiopatológicos con otras entidades como la diabetes mellitus, la obesidad a través de la resistencia a la insulina y el papel de los distintos cationes, en el desarrollo de la hipertensión arterial sistémica (HAS) (WHO, 2013).

Definición y clasificación de la hipertensión

Tradicionalmente, se consideraba a la HTA como el proceso hemodinámico en el cual las resistencias al flujo sanguíneo se encuentran elevadas. Actualmente, se define como la pérdida del tono de vasodilatación del sistema circulatorio. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Sociedad Internacional de Hipertensión y el Comité para la Detección Evaluación y Tratamiento de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (CDETH), las cifras normales de la presión diastólica y sistólica son < 90mmHg y < 140 mmHg, respectivamente; cuando la presión arterial es mayor a estos rangos se denomina hipertensión arterial. En la Tabla 1 se presenta la clasificación (Guerra y col., 1995).

Tabla 1. Clasificación de la hipertensión arterial.

| | CDETH | | OMS | | Consenso Mexicano | |
|-----------------|------------------------------|------------|-----------|------------|-------------------|------------|
| | Sistólica | Diastólica | Sistólica | Diastólica | Sistólica | Diastólica |
| Óptima | < 120 | < 80 | | | < 140 | < 90 |
| Normal | < 130 | < 85 | < 140 | < 90 | 140-180 | 90-105 |
| Normal alta | 130-139 | < 85-89 | | | | |
| | Hipertensión arterial | | | | | |
| Estadio I | 140-159 | 90-99 | 140-180 | 90-105 | > 180 | > 105 |
| Estadio II | 160-179 | 100-109 | > 180 | > 105 | 140-160 | 90-95 |
| Estadio III | > ó =180 | > ó =180 | | > 160 | < 90 | |
| Estadio IV | | | | 140-159 | < 90 | |
| Subgrupo límite | | | 140-160 | 90-95 | | |
| HSA | | | > 160 | < 90 | | |
| HSA límite | | | 140-159 | < 90 | | |

En México, esta enfermedad ha sido caracterizada epidemiológicamente gracias a las encuestas nacionales de salud. Con esta información los tomadores de decisiones en salud pública pueden identificar acciones para prevenir, aumentar el diagnóstico oportuno y controlar esta patología.

Sin embargo, en México, existen varios tipos de HTA y los criterios para su diagnóstico se encuentran en la tabla mostrada a continuación.

Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de la hipertensión.

| Categoría | Presión sistólica (mmHg) | Presión Diastólica (mmHg) |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Presión arterial normal | 120-129 | 80-84 |
| Presión arterial frontera* | 130-139 | 85-89 |
| Hipertensión 1 | 140-159 | 90-99 |
| Hipertensión 2 | 160-179 | 100-109 |
| Hipertensión 3 | >180 | >110 |
| Hipertensión sistólica aislada | >140 | <90 |

Las personas con presión arterial frontera aún no tienen hipertensión pero tienen un alto riesgo de presentar la enfermedad (**NOM-030-SSA2-2009**).

Causas de la hipertensión

Numerosos factores relacionados con el comportamiento pueden contribuir a la HTA tales como el elevado consumo de sal y grasa, consumo insuficiente de frutas y hortalizas, uso nocivo de alcohol, sedentarismo, falta de ejercicio físico así como mal control del estrés. Las condiciones de vida y trabajo de las personas influyen drásticamente en estos factores de riesgo conductuales. Además, existen algunos factores metabólicos que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal y otras complicaciones de la HTA, como la diabetes, la hipercolesterolemia y el sobrepeso o la obesidad. El consumo de tabaco y la HTA interactúan para aumentar aún más la probabilidad de padecer enfermedad cardiovascular (WHO, 2013).

Síntomas de la hipertensión

La mayoría de los hipertensos no tienen síntomas. Está muy difundida la idea incorrecta de que las personas con hipertensión siempre tienen síntomas, pero la realidad es que la mayoría no los tiene. Algunas veces, la hipertensión provoca síntomas como cefalea, dificultad respiratoria, mareo, dolor torácico, palpitaciones o hemorragia nasal. Ignorar estos síntomas puede ser peligroso, pero tampoco se los puede interpretar

siempre como indicativos de HTA. La HTA es una grave señal de advertencia de la necesidad de modificar significativamente el modo de vida. Esta afección puede matar en silencio y es importante que todo el mundo se controle la tensión arterial (WHO, 2013).

Ignorar la HTA es peligroso porque esto aumenta la probabilidad de complicaciones potencialmente mortales. Cuanta más alta es la tensión arterial, mayor es la probabilidad de que tenga consecuencias para el corazón y los vasos sanguíneos de órganos importantes, como el cerebro o los riñones. Esto se conoce como riesgo cardiovascular y puede ser alto en personas con hipertensión leve y otros factores de riesgo, como tabaquismo, sedentarismo, dieta malsana, obesidad, diabetes, hipercolesterolemia, bajo nivel socioeconómico y antecedentes familiares de hipertensión (WHO, 2013).

Diagnóstico y detección de la hipertensión

La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de dispositivos asequibles y fiables que ofrecen la opción de realizar lecturas manuales (OMS 2003, Parati y col., 2010). Los dispositivos semiautomáticos permiten realizar mediciones manualmente cuando se agotan las baterías, un problema que no es frecuente en entornos con recursos limitados. Como el mercurio es tóxico, se recomienda eliminar progresivamente los dispositivos que lo usan y reemplazarlos por dispositivos electrónicos (OMS, 2003). Para utilizar dispositivos aneroides, como los esfigmomanómetros, es imprescindible calibrarlos cada seis meses y capacitar y evaluar a las personas que los usen.

Es preciso medir la tensión arterial durante algunos días antes de establecer el diagnóstico de hipertensión. La tensión se mide dos veces al día, preferiblemente por la mañana y por la tarde. Se toman dos mediciones consecutivas, con un intervalo mínimo de un minuto entre ambas y con la persona sentada. Las mediciones del primer día se descartan, y para confirmar el diagnóstico de HTA se toma el valor promedio de todas las restantes. Si la HTA se detecta pronto es posible minimizar el riesgo de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal (WHO, 2013).

Hipertensión a nivel mundial

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total (OMS, 2008). Entre ellas, las complicaciones de la HTA causan anualmente 9.4 millones de muertes (Lim y col., 2010). La HTA es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatía isquémica. El 51% de las muertes, por accidente cerebrovascular (OMS, 2008).

En 2008, en el mundo se habían diagnosticado de HTA aproximadamente el 40% de los adultos mayores de 25 años; el número de personas afectadas aumentó de 600 millones en 1980 a 1000 millones en 2008 (OMS, 2011).

La máxima prevalencia de HTA se registra en la Región de África, con un 46% de los adultos mayores de 25 años, mientras que la más baja se observa en la Región de las Américas, con un 35%. En general, la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados (35%) que en los países de otros grupos de ingresos, en los que es del 40% (OMS 2011, 2013).

Casi el 80% de las muertes por enfermedades cardiovasculares corresponden a países de ingresos bajos y medianos. Estos países son los que están en peores condiciones para hacer frente a las consecuencias sociales y económicas de la mala salud (OMS, 2013).

Hipertensión en Latinoamérica

Latinoamérica se encuentra en un momento de transición epidemiológica caracterizado por la coexistencia de enfermedades agudas infecciosas con enfermedades crónicas cardiovasculares (Berrios 1997). Las muertes de causa cardiovascular representan el 26% de todas las causas de muerte (Organización Panamericana de la Salud), pero el aumento en la prevalencia de los factores de riesgo puede conducir a un aumento epidémico de la mortalidad cardiovascular (Berrios 1997).

En las Américas, 144 millones de personas viven con hipertensión arterial (HTA). En la región de América Latina y el Caribe se estima que entre el 8 y 35% de su población adolece de HTA, lo que de alguna forma se confirma con el estudio realizado por la Sociedad Peruana de Cardiología en la ciudad de Lima en febrero del 2004, donde se muestra una prevalencia de HTA de 23%, con ligera diferencia entre hombres y mujeres, de 26 y 20%, respectivamente, tendencia que se observa también en otros estudios (Ayala y col., 2010).

Regiones de ingresos medianos y bajos, como la mayoría de los países latinoamericanos, tienen una carga de enfermedad cinco veces mayor que los países de altos ingresos, con acceso a menos del 10% de los recursos globales de tratamiento. Por ende, se debe dar prioridad a los que corren mayor riesgo de eventos fatales, porque la mayoría de los pacientes hipertensos no reciben ningún tratamiento. Debe prestarse atención especial a los individuos con condiciones de riesgo social, tales como las personas sin hogar, los pobres, deficientes en educación o desempleados (Sánchez y col., 2010).

Factores demográficos, como el envejecimiento poblacional, y sociales, como la desigualdad económica y el proceso de aculturación, condicionan una alta prevalencia

de hipertensión arterial. Alrededor de la mitad de los hipertensos desconocen su condición y sólo una baja fracción de los que reciben tratamiento están controlados (presión arterial menor de 140 y 90 mm Hg) (Tabla 3).

Tabla 3. Valores estimados de prevalencia, conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial en algunos países de Latinoamérica.

| País | Prevalencia % | Conocidos % | Tratados % | Controlados % |
|-----------|---------------|-------------|------------|---------------|
| Argentina | 28.1 | 54 | 42 | 14.3 |
| Brasil | 26.8 | 50 | 30 | 10 |
| Chile | 22,8 | 43 | 26.1 | 8.2 |
| Ecuador | 28.7 | 41 | 23 | 6.7 |
| México | 23.6 | 41 | 21 | 6.4 |
| Paraguay | 30,5 | 33.5 | 18.3 | 7.8 |
| Uruguay | 33 | 68 | 42 | 11 |
| Venezuela | 32.4 | 47 | 37 | 8.5 |

El envejecimiento poblacional representa un problema de diferente magnitud entre los países de la región, mientras Perú, Paraguay y Brasil tienen menos del 5% de personas mayores de 65 años, otros como Uruguay llegan hasta el 12%. El aumento de la población añosa determina un incremento en el número de hipertensos con un predominio de las formas sistólicas, de mayor riesgo cardiovascular y más difícil control. El envejecimiento se asocia además a un aumento de la comorbilidad general y cardiovascular (WHO, 2013).

Existe una gran diversidad de las características socioeconómicas en los países de América Latina, y esto se refleja en diferencias en las tasas de morbimortalidad cardiovascular. A diferencia de lo que ha ocurrido en los Estados Unidos y en Europa Occidental, en la mayoría de los países de América Latina, la tasa de mortalidad cardiovascular ha aumentado durante las últimas décadas del siglo XX y comienzos del siglo XXI, con la excepción de Argentina y Uruguay. Pero incluso en estos últimos países, la morbilidad cardiovascular y la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular se han mantenido sin cambios o han aumentado, especialmente la hipertensión arterial, la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes (WHO, 2005).

Hipertensión en México

En México, la HTA ha sido caracterizada epidemiológicamente gracias a las encuestas nacionales de salud. Con esta información se han tomado decisiones en salud pública, se ha logrado identificar acciones para prevenir, aumentar el diagnóstico oportuno y controlar esta patología. Se ha establecido en México la Norma Oficial Mexicana que tiene por objetivo establecer los procedimientos para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente, para el control de la

hipertensión arterial sistémica y con ello evitar sus complicaciones a largo plazo (NOM-030-SSA2-2009).

En México, la prevalencia actual de hipertensión arterial es de 25.5% y de éstos el 40.0% desconocía que padecía esta enfermedad. La proporción de adultos con diagnóstico previo de hipertensión arterial y cifras de tensión arterial controlada (<140/90 mmHg) es de 58.7%. Dentro de la proporción de adultos con diagnóstico previo de hipertensión arterial, el 79.3% reportó tener tratamiento farmacológico para controlar sus valores de tensión arterial. En los hombres la prevalencia de hipertensión arterial es de 24.9%, de los cuales el 48.6% ya conocían que tenían hipertensión antes de participar en la encuesta porque un médico previamente les había dado el diagnóstico. En las mujeres, la prevalencia de hipertensión arterial es de 26.1%, de las cuales el 70.5% ya había recibido previamente el diagnóstico médico de hipertensión (Hernández y col., 2016).

En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición MC 2016 (ENSANUT MC 2016), la prevalencia de hipertensión arterial por hallazgo de la encuesta fue 4.1 veces más baja en el grupo de 20 a 29 años de edad que en el grupo de 80 o más años de edad.

Por otro lado, la prevalencia de hipertensión arterial por diagnóstico médico previo fue 12.8 veces más baja en el grupo de 20 a 29 años de edad que en el grupo de 80 o más años de edad (Hernández y col., 2016).

En la ENSANUT 2016 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de hipertensión arterial entre las regiones geográficas ni entre las localidades rurales y urbanas.

La prevalencia de hipertensión arterial entre quienes fueron diagnosticados durante la encuesta y no sabían que tenían esta enfermedad (hallazgo), fue mayor en la ciudad de México (15.7%) que en la región norte (7.4%) o el centro del país (8.1%).

A pesar de que las prevalencias de hipertensión arterial definidas por hallazgo de la encuesta no son comparables entre la ENSANUT 2012 y la ENSANUT medio camino 2016, las prevalencias totales de hipertensión arterial y las prevalencias por tipo de localidad no son estadísticamente diferentes entre la ENSANUT 2012 y la ENSANUT medio camino 2016. Cuando se compararon las prevalencias de los años 2012 y 2016 de los adultos que habían recibido previamente el diagnóstico de hipertensión arterial, se observó que no hubo cambios significativos tanto en los hombres (2012:14.1% vs. 2016: 12.1%), como en las mujeres (2012:18.5% vs. 2016: 18.4%) (Hernández y col., 2016).

Hipertensión en Yucatán

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012 en Yucatán, reportó en comparación con los datos de la encuesta del 2006 en la prueba de diabetes e hipertensión, que hubo una tendencia al aumento en la detección para los grupos de mayor edad en los hombres. En la medición de tensión arterial existió una tendencia de mayor prueba de detección tanto en mujeres como en hombres, aunque la diferencia no fue significativa en esta fase del análisis. En comparación con los hallazgos nacionales, Yucatán se ubicó por encima en las pruebas de diabetes e HTA. Al igual que con lo observado en el ámbito nacional, Yucatán presentó incrementos importantes para los servicios de detección de HTA en los últimos años. En comparación con lo reportado en la ENSANUT 2006 para la entidad, una mayor proporción de personas acudió a la detección de hipertensión arterial, 17.3 y 33%, respectivamente (Rivera y col., 2012).

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

Las acciones principales del SRAA incluyen la de regular la presión arterial, el tono vascular y la volemia y, facilitar la transmisión simpática. El SRAA participa en la remodelación ventricular del infartado y del hipertenso, así como en la remodelación vascular (Campbell y col., 2008). En la figura 1. Se observa el grafico del SRAA.

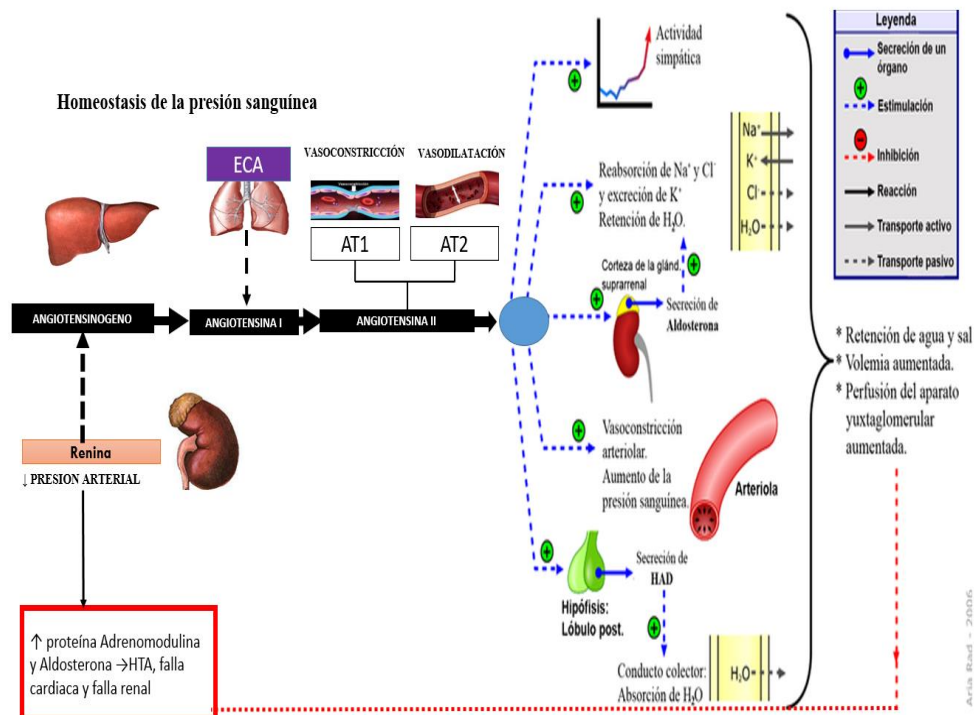


Figura 1. Sistema renina angiotensina aldosterona.

La renina es una proteasa aspártica sintetizada como un zimógeno inactivo producida en las células granulares del aparato yuxtaglomerular renal a partir de un precursor, la prorrenina. Actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, glucoproteína de 452 aminoácidos de la familia de las alfa-2-globulinas, sintetizado en el hígado y, lo transforma en el decapeptido denominado Angiotensina I (Ang I). Los estímulos principales de secreción de renina son: 1) la disminución de flujo de la arteria aferente del glomérulo renal; 2) la disminución de Na⁺ plasmático (sensada por la mácula densa, que es parte del aparato yuxtaglomerular renal); 3) estímulos simpáticos (estimulación beta-1adrenérgica de las células yuxtaglomerulares); 4) factores locales como las prostaglandinas, la dopamina, la adenosina, y el óxido nítrico (NO). La prorrenina tiene una baja actividad intrínseca de menos del 3% de la actividad de la renina completamente activada. La renina y la prorrenina están glicosiladas y tienen residuos de manosa-6-fosfato y se ligan al receptor IGF. El único sitio conocido de producción de renina son las células yuxtaglomerulares renales, siendo el riñón el productor de renina y prorrenina. También producen prorrenina las suprarrenales, los ovarios, los testículos, la placenta y la retina (Campbell 2008).

La Ang I es transformada en Angiotensina II (Ang II), octapéptido, por medio de una enzima dipeptidil-carboxipeptidasa ubicada en la membrana de las células endoteliales, llamada enzima convertidora de la Angiotensina (ECA).

En el organismo (sobre todo en los glóbulos rojos) existen aminopeptidasas, que inactivan a la Ang II, la que tiene una corta vida de aproximadamente un minuto. Estas peptidasas convierten a la Ang II en Angiotensina III (Ang III), que es un heptapéptido con el 50% de la actividad presora de la primera, y en el hexapéptido Angiotensina IV (Ang IV). La Ang I puede también ser convertida en el hexapéptido Ang (-1-7) por ciertas endopeptidasas tisulares tales como la endopeptidasa neutral (NEP) 24.11, NEP 24.15 y NEP 24.26 (De la Riva y col., 2000; De Mello y col., 2000; Ferrario y col., 199; Touyz 2000). La Ang II ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de renina. La Ang II es un péptido excitador del sistema nervioso simpático con efectos en diferentes focos que incluyen el hipotálamo y el bulbo, la médula espinal, los ganglios simpáticos, y las terminaciones nerviosas. La Ang II inhibe a función barorrefleja. A nivel central genera efectos sobre el volumen minuto (VM) y la presión arterial. La elevación de la Ang II y de la Aldosterona puede provocar una sobreexpresión del gen de la colágena sobre todo a nivel miocárdico, lo que puede ocasionar fibrosis cardíaca en ratas adultas (Zhou y col., 1996). Sin embargo, no se ha demostrado en su totalidad que la Aldosterona induzca fibrosis por efectos directos sobre los fibroblastos cardíacos en humanos (Kohler y col., 1996). No obstante, y aunque la elevación sérica de Aldosterona en pacientes con cardiomiopatía dilatada probablemente provoca fibrosis de tipo intersticial y perivascular a nivel miocárdico (Anthony y col., 1998), la hipertensión asociada al incremento de la Aldosterona no se puede correlacionar con hipertrofia del ventrículo izquierdo ni muestra fibrosis miocárdica como la encontrada en la

cardiomiopatía dilatada (Ramírez-Gil y col., 1998, MacFadyen y col., 1997). La Angiotensina II en sus efectos no hemodinámicos (mediados por ATI) puede producir hipertrofia ventricular izquierda y remodelación vascular (Bryan 2001).

Funcionalidad de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA es clave en la regulación de la presión arterial periférica. La ECA se ha asociado clásicamente con el sistema renina-angiotensina, el cual convierte la angiotensina-I en un potente vasoconstrictor, la angiotensina II. En el sistema kinin-kallikrein la ECA también degrada el vasodilatador bradiquinina y estimula la liberación de aldosterona en la corteza adrenal (Ondetti y col., 1977). La angiotensina-II es un potente vasoconstrictor y estimula la producción de aldosterona (hormona mineralocorticoide producida por la zona glomerular de la corteza suprarrenal) que a su vez activa la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales (a nivel del tubo colector), que son devueltos a la sangre. La retención de sodio y de agua produce un incremento de volumen sanguíneo que tiene como resultado un aumento de la tensión arterial (Brown, 1998; Folkow y col., 1961).

Inhibición de la ECA

La ECA es una exopeptidasa que libera dipéptidos desde el extremo c-terminal de varios sustratos de péptidos. La correlación estructura-actividad de diferentes péptidos inhibidores indica que la unión de estos a la ECA está fuertemente influenciado por el extremo C-terminal de la secuencia del sustrato. Aunque esta especificidad de sustrato aún no es claramente conocida, la ECA parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en cada una de las tres posiciones cercanas al C-terminal. Un factor importante al discutir sobre los péptidos inhibidores de la ECA aislados de proteínas de alimentos es la discrepancia entre la actividad inhibidora de los péptidos *in vitro* y su efecto antihipertensivo *in vivo* (Vercruysse y col., 2005; Arihara y Ohata, 2006).

Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos pueden ser generados a partir de las proteínas durante la digestión gastrointestinal. Las proteínas ingeridas son hidrolizadas por distintas enzimas digestivas, tales como la pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasas (Korhonen y Pihlanto 2003). Estas enzimas digestivas pueden generar péptidos con actividad inhibidora de la ECA en el tracto gastrointestinal (Arihara y col., 2001; Escudero y col., 2010). Muchos de los péptidos generados pueden provenir de las proteínas miosina, actina, tropomiosina y troponina tras el tratamiento con proteasa pancreática (Katayama y col., 2003). En otros casos, los péptidos bioactivos son generados en el propio alimento.

Las proteínas de los alimentos han sido apreciadas desde siempre por sus propiedades nutricionales y funcionales. Tradicionalmente, las propiedades nutricionales de las proteínas se asocian al contenido en aminoácidos, especialmente los esenciales. Sin embargo, recientemente se está investigando la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de las proteínas de los alimentos, con vistas a conocer mejor las propiedades nutricionales de dichos alimentos y también a utilizar dichos péptidos como ingredientes funcionales (Vercruyssen y col., 2005)

Los péptidos bioactivos han sido definidos como "compuestos derivados de los alimentos (genuinos o generados) que, además de su valor nutricional ejercen un efecto fisiológico en el organismo" (Vermeirssen y col., 2007). Dentro de la secuencia de la proteína original los péptidos se encuentran inactivos y deben ser liberados para convertirse en activos. Esto sucede durante el procesado del alimento y/o durante la digestión gastrointestinal, mediante hidrólisis enzimática. Los péptidos bioactivos tienen normalmente entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, aunque se han descrito también péptidos bioactivos de más de 20 residuos. Sus actividades dependen de su composición en aminoácidos y secuencia (Korhonen & Pihlanto, 2003).

Estos péptidos deben ser absorbidos intactos a través del intestino donde posteriormente entrarán en el sistema circulatorio para ejercer su efecto fisiológico, o puede ser también que su efecto sea local en el tracto digestivo (Erdman y col., 2008). Dependiendo de la secuencia en aminoácidos, los péptidos bioactivos han demostrado tener un amplio número de funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la antihipertensiva, antioxidante, opiáceo-antagonista, inmunomoduladora, antimicrobiana, prebiótica, antitrombótica e hipocolesterolemica, entre otras (Arihara, 2006). La carne ofrece una fuente muy valiosa de proteínas para la población y además ofrece un gran potencial como fuente de péptidos bioactivos. Las leguminosas contienen una serie de compuestos que tienen beneficios potenciales para la salud. Existe evidencia consistente de estudios epidemiológicos que demuestran que el consumo de leguminosas puede desempeñar un papel en la prevención de enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y sobrepeso (Documento en línea: <http://www.gln.org.au/legumes/legumes-health/>).

Absorción de péptidos inhibidores de la ECA.

Para que un péptido inhibidor de la ECA funcione *in vivo*, debe primeramente entrar intacto en el sistema circulatorio. Los péptidos pueden ser hidrolizados por enzimas del tracto digestivo así como también por peptidasas asociadas con la membrana de las vellosidades del intestino, el citoplasma o suero (Foltz y col., 2008; Sun y col., 2009). Hasta la fecha, hay estudios documentando la absorción intestinal *in vitro* de péptidos inhibidores de la ECA empleando las células Caco-2 (Vermeirssen y col., 2004). Este modelo es generalmente reconocido como apropiado para predecir la permeabilidad de las células del epitelio intestinal a fármacos (Cinq-Mars y col., 2007;

Bailey, 1996). Curiosamente, la ocurrencia de péptidos que demuestran actividad inhibidora de la ECA *in vitro* pero pobre actividad antihipertensiva *in vivo* puede ser explicada por la posible alteración de péptidos antes de alcanzar la diana de la enzima en el sistema circulatorio (Cinq-Mars y col., 2007; Fujita y col., 1995). Lo contrario también ha sido demostrado como verdadero, con péptidos que mostraron poca actividad inhibidora de la ECA *in vitro* y demostraron un significativo descenso de la presión sanguínea sistólica *in vivo*, posiblemente debido a una modificación del péptido en el intestino. Los péptidos inhibidores de la ECA y derivados de la leche como son IPP y VPP han sido sometidos a estudios de permeabilidad (Foltz y col., 2008). Ambos péptidos fueron rápidamente transportados a través del epitelio intestinal utilizando varios modelos. El péptido IPP evitó la digestión gastrointestinal y pudo entrar en el sistema circulatorio de los humanos de manera intacta (Foltz y col., 2007). Estudios relacionados con la administración oral de alimentos enriquecidos con IPP y VPP demostraron que estos alimentos disminuían la presión sanguínea sistólica en pacientes hipertensos (Seppo y col., 2003; Jauhiainen y col., 2005).

Lo aquí descrito demostraría que determinados péptidos inhibidores de la ECA son suficientemente bien absorbidos por el organismo para ser efectivos reduciendo la presión sanguínea de sujetos hipertensos. El objetivo para los investigadores es identificar los péptidos bioactivos *in vitro* que pueden entrar intactos en el sistema circulatorio y llegar activos al sitio diana.

Péptidos inhibidores de la ECA identificados

Los péptidos inhibidores de la ECA fueron descubiertos por primera vez en el veneno de serpiente (Ferreira y col., 1970) y desde entonces se han desarrollado numerosos inhibidores sintéticos de la enzima, siendo el Captopril el primero y más conocido. Este inhibidor junto con otros inhibidores sintéticos de la ECA presentan varios efectos secundarios tales como tos, defectos en el gusto y erupciones cutáneas (Quian y col., 2007). Estos efectos secundarios, junto con el hecho de que la hipertensión afecta a un tercio de la población mundial occidental y que es un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y la aparición de infarto cardiaco, han contribuido al esfuerzo por buscar péptidos con actividad inhibidora de la ECA, derivados de proteínas de alimentos para su empleo como agentes antihipertensivos en alimentos funcionales y nutraceúticos (López y col., 2006). Los péptidos inhibidores de la ECA son el grupo más estudiado de péptidos bioactivos originados a partir de proteínas de alimentos (Vercruyssen y col., 2005).

La mayor parte de los péptidos con actividad antihipertensiva derivados de proteínas alimentarias actúan inhibiendo la ECA. Cabe destacar que en la mayoría de las fermentaciones lácteas no se generan péptidos con inhibidores de la ECA, sin embargo, algunos de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA (IECA) y antihipertensiva más potentes identificados en proteínas alimentarias, fueron aislados

por el grupo del Dr. Yamamoto en una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* CP790 y *Saccharomyces cerevisiae*.

Cheung y Cushman (1973) encontraron que la inhibición de la ECA por parte de este tipo de péptidos es de tipo competitivo y que los inhibidores se ligan a la enzima de la misma manera que ésta se liga al sustrato; observaron que todos los inhibidores presentaron un residuo de Pro en la penúltima posición de la molécula del grupo C-terminal. Sin embargo, esto no es una regla general para establecer que los péptidos antihipertensivos deban su actividad a la presencia de éste aminoácido (Pro), ya que se han aislado e identificado secuencias aminoacídicas de diferentes péptidos que provocan la inhibición de la ECA, y han demostrado que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en su grupo C-terminal (HL, FR y AP) también determinan el efecto sobre la inhibición de la ECA (Cheung y col., 1980).

Maruyama y Suzuki (1987a) fueron los primeros en aislar un péptido inhibidor de la ECA (llamado CEI 12) a partir de un hidrolizado de caseína (dodecapeptido, $IC_{50}=77\mu M$). Posteriormente, otros péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de diferentes productos lácteos, sobre todo de productos lácteos fermentados.

Yamamoto y col., (1994) han demostrado que las leches fermentadas con *Lactobacillus helveticus* son las que más actividad inhibitoria de la ECA presentan, debido a la alta actividad proteolítica extracelular de esta cepa. Otros péptidos con actividades inhibitoras se han identificado en leches fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgaricus* o *Lactobacillus lactis* sp. *Cremoris* (Gobbetti y col., 2000) y en el kéfir, una leche fermentada preparada a partir de un caldo de cultivo que incluye bacterias acidolácticas, una cepa de *Saccharomyces kefir* y algunas especies bacterias acéticas, aunque en éste la actividad inhibitora de la ECA es baja (Kuwabara y col., 1995). Parece que los péptidos que se encuentran en el kéfir no son las principales sustancias involucradas en sus efectos antihipertensivos.

Oshima y col., (1979) aislaron por primera vez péptidos inhibidores de la ECA de un hidrolizado de gelatina mediante colagenasa, desde entonces se han encontrado fundamentalmente en proteínas de la leche, pescados y levaduras, así como también en proteínas de maíz y arroz (Vioque y col., 2000), huevo (Yoshii y col., 2001) y plasma sanguíneo de ganado vacuno (Tauzin y col., 2002). Pozo-Bayón y col., (2007) aislaron fracciones peptídicas de bajo peso molecular con actividad inhibitoria de la ECA en vinos blanco y rojo. Yang y col. (2003) aislaron cuatro nuevos péptidos de espinaca con actividad antihipertensiva probada en ratas espontáneamente hipertensas.

En la actualidad, se han obtenido péptidos antihipertensivos de cereales, leguminosas y otros vegetales, como por ejemplo péptidos de garbanzo obtenidos por hidrólisis con alcalase (Yust y col., 2003), del girasol con pepsina más pancreatina (Megías y col., 2004), de la colza con alcalase (Pedroche y col., 2004), tripsina,

quimiotripsina y carboxipeptidasa (Pedroche y col., 2002), de *Mucuna pruriens* obtenidos con Alcalase® y Flavourzyme®, individual y secuencialmente (Galicia 2010), así como hidrolizados de 120 min, obtenidos secuencialmente con Alcalase®-Flavourzyme® y pepsina–pancreatina (Segura Campos y col., 2013)

Los péptidos inhibidores de la ECA provenientes de alimentos pueden ser divididos en tres categorías dependiendo de su actividad inhibidora tras la pre-incubación o contacto previo con la ECA (Iroyukifujita y col., 2000).

El primer grupo de péptidos inhibidores de la ECA son conocidos como "verdaderos inhibidores". El valor IC₅₀ de estos péptidos no depende de su pre-incubación con la enzima. La segunda categoría de péptidos, conocida como péptidos de "tipo sustrato", son hidrolizados por la ECA resultando en una débil actividad inhibidora. Finalmente, la tercera categoría son los inhibidores "tipo pro-fármaco" ya que son convertidos en "verdaderos inhibidores" por la pre-incubación con la ECA o con proteasas del tracto digestivo. Estudios *in vivo* han demostrado que solo los péptidos pertenecientes al grupo de verdaderos inhibidores o pro-fármacos reducen la presión sanguínea sistólica de ratas espontáneamente hipertensas (Arihara y col., 2006).

Estructura de los péptidos inhibidores de la ECA

Para llevar a cabo la inhibición de la ECA es fundamental la secuencia del tripéptido C terminal que es por donde el péptido se une al sitio activo de la enzima (Ondetti y Cushman, 1982). La ECA prefiere sustratos e inhibidores competitivos con residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal, y presenta poca afinidad por péptidos con aminoácidos dicarboxílicos en este extremo o con aquellos que poseen el aminoácido Pro en penúltima posición. Sin embargo, la presencia del aminoácido Pro en última o en antepenúltima posición en ocasiones favorece la unión del péptido con la enzima (Cheung y col., 1980; Stevens y col., 1972). Se han descrito un gran número de péptidos derivados de proteínas alimentarias con actividad IECA que presentan Pro en su extremo C-terminal. Además, la presencia de los aminoácidos Arg, Lys o Leu en el extremo C-terminal también favorece la unión con la enzima (FitzGerald y col., 2004; Gómez Ruiz y col., 2004a; Kim y col., 2001).

Recientemente, se han empleado modernas técnicas bioinformáticas para poder establecer los requisitos estructurales que deben presentar los péptidos inhibidores de la ECA, son los denominados modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR). Estos estudios informáticos, son herramientas muy útiles que permiten predecir la actividad biológica de un determinado compuesto en relación con su estructura química. Así, mediante un modelo QSAR para péptidos de hasta 6 aminoácidos derivados de proteínas lácteas, se pudo concluir que había una relación entre la actividad IECA y la presencia de un aminoácido hidrofóbico o cargado positivamente en la última posición de la secuencia, sin embargo, no se encontró

ninguna relación entre la estructura del extremo amino terminal (N-terminal) y la actividad (Pripp y col., 2004). Los resultados de otro estudio QSAR para la predicción de la actividad IECA de di- y tri-péptidos derivados de proteínas alimentarias, muestran que dipéptidos con aminoácidos con cadenas hidrofóbicas y tripéptidos con un aminoácido aromático en el extremo C-terminal, un residuo cargado positivamente en posición intermedia y un aminoácido hidrofóbico en el extremo N-terminal, pueden ser potenciales inhibidores de la ECA (Wu y col., 2006). La longitud de la secuencia peptídica, así como la naturaleza de sus aminoácidos también van a determinar la actividad final. De este modo, péptidos que presentan el tripéptido C-terminal idéntico, poseen una actividad IECA muy diferente entre sí. Un ejemplo son los péptidos VRYL y VPSERYL, ambos identificados en un queso Manchego. Estos péptidos presentaban el mismo tripéptido C-terminal y sin embargo al evaluar su actividad IECA, el primero presentó un IC_{50} de 24.1 μ M y el segundo un IC_{50} de 249.5 μ M, siendo este último diez veces menos activo que el primero. Para comprobar si tenía importancia en la actividad IECA la sustitución del aminoácido Val por el aminoácido dicarboxílico en la cuarta posición del extremo C-terminal, llevaron a cabo la síntesis del péptido ERYL que resultó tener un IC_{50} de 200.3 μ M, es decir, una actividad IECA ocho veces inferior al VRYL. Esto pone de manifiesto el papel fundamental de la Val en la cuarta posición del extremo C-terminal para la actividad del péptido VRYL (Gómez-Ruiz y col., 2004a).

Los péptidos pueden adquirir distintas conformaciones, por lo que no sólo la secuencia aminoacídica sino su estructura final van a determinar su capacidad IECA. Las secuencias que contienen trans-Pro en su extremo C-terminal son mejores sustratos de la enzima que las que contienen cis-Pro. El cambio que se produce en la estructura del inhibidor dependiendo de que posea el isómero cis o trans de la prolina va a influir en su interacción con el sitio activo de la enzima. Gómez-Ruiz y col. (2004b), estudiaron la actividad IECA y caracterizaron estructuralmente mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y resonancia magnética nuclear, el pentapéptido DKIHP obtenido por dos procedimientos distintos de síntesis química. Los análisis mostraron que cuando el péptido era sintetizado por el método Fmoc la preparación contenía solamente la forma trans-Pro y mostraba una significativa actividad IECA, con un valor de IC_{50} de 113.18 μ M. Sin embargo, el péptido sintético obtenido por Bmoc presentó una actividad mucho menor que en el caso anterior (IC_{50} 577.92 μ M) y los análisis estructurales mostraron que la preparación del péptido contenía tres conformaciones distintas, dos con trans-Pro y una con cis-Pro (Gómez-Ruiz y col., 2004b). Los isómeros L y D de los aminoácidos en algunas posiciones de la secuencia peptídica también influyen en la estereoespecificidad de ECA. Así, la enzima muestra una gran afinidad por la estereoespecificidad del aminoácido que se encuentra en tercera posición empezando por el extremo C-terminal, pero muy baja estereoespecificidad por el residuo que se encuentra en cuarta posición desde el extremo C-terminal (Oshima y col., 1979). Por ejemplo, Maruyama y col. (1982), encontraron que el tripéptido D-VAP mostraba una baja actividad IECA (IC_{50} 550 μ M) mientras que la configuración L del mismo péptido

mostraba una potente actividad (IC_{50} 2 μ M), en cambio, la actividad IECA de las configuraciones del tetrapéptido L-FVAP y D-FVAP era prácticamente la misma, presentando un IC_{50} de 10 y 17 μ M, respectivamente.

Estudios clínicos de los péptidos inhibidores de la ECA

Como se ha comentado anteriormente, el modo de acción de la mayoría de péptidos inhibidores de la ECA es como sustrato competitivo de la enzima. La relación estructura-actividad de estos péptidos no ha sido aún confirmada debido a la variedad de propiedades y/o secuencias de aminoácidos de los péptidos inhibidores de la enzima (Li y col., 2004; Arihara y Ohata, 2006). Se ha sugerido que el factor que controla que los péptidos sean inhibidores de la ECA son los tres aminoácidos situados en el extremo C-terminal del péptido y que normalmente deben contener residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Se sabe que en las penúltimas posiciones, los residuos alifáticos (Val, Ile y Ala), básicos (Arg) y aromáticos (Tir, Fen) son preferidos, mientras que los residuos aromáticos (Trp, Tir, y Fen), prolina (Pro) y alifáticos (Ile, Ala, Leu y Met) favorecen la unión a la enzima cuando están situados en la última posición del extremo c-terminal del péptido (Fujita y Yoshikawa, 1999; Yokohama y col., 1992; Hayes y col., 2007). Esto es debido a la interacción de estos residuos con las tres zonas hidrofóbicas situadas en el centro activo de la ECA (Qian y col., 2007; Cushman y Cheung, 1971). La carga positiva asociada con la arginina o lisina en el extremo C-terminal también ha sido asociada con la actividad inhibidora de algunos péptidos (Hayes y col., 2007). En el caso de péptidos con más de tres aminoácidos, ha sido sugerido que la presencia de hidroxiprolina es importante para que el péptido se una a la enzima (Saiga y col., 2003). Otra característica común de los péptidos inhibidores de la ECA es la naturaleza hidrofóbica del extremo N-terminal (Wijesekara y Kim, 2010; Rho y col., 2009). De hecho, la hidrofobicidad del péptido es importante y así los péptidos hidrofílicos tienen una débil o no tienen actividad inhibidora por ser incompatibles con los sitios activos de la ECA, a diferencia de los péptidos hidrofóbicos que tienen gran afinidad por los sitios activos de la ECA (Matsui y col., 2006; Li y col., 2004; Maruyama y col., 1987), mostrando por tanto mayor poder de inhibición.

Las actividades biológicas de los péptidos están relacionadas con su composición de aminoácidos, secuencia, tamaño y configuración, Matsui y col. (2006) y Yamamoto y col. (1994) reportan que los péptidos inhibidores de la ECA por lo general contienen entre 2 y 12 aminoácidos. Sin embargo, Zhang y col. (2009) establecen que la mayoría de los péptidos derivados de proteínas de alimentos con capacidad inhibidora de la ECA tienen pesos moleculares relativamente bajos, generalmente dipéptidos a pentapéptidos que contienen generalmente residuos como Pro, Lys o residuos de aminoácidos aromáticos (Cheung y col., 1980; Kawakami- Kayahara y col., 1993; Suetsuna -Nakano y col., 2000). En la Tabla 4 se pueden observar productos que ofrecen alegaciones acerca de la reducción de la presión arterial en humanos, las dosis utilizadas y la presión arterial inicial de los sujetos en los estudios.

Tabla 4. Estudios clínicos con productos lácteos y péptidos que presentan efecto antihipertensivo en humanos.

| Producto | Componente activo (dosis) | Tensión arterial inicial de los sujetos | Efecto en la presión arterial sistólica |
|---|---------------------------------|---|--|
| Calpis (leche fermentada) | IPP (1,04 mg)VPP (1,42 mg) | Hipertensos | -9,4 mmHg (4 semanas) -14,1 mmHg (8 semanas) |
| Calpis (leche fermentada) | IPP (1,15 mg)VPP (1,98 mg) | Hipertensión media | -4,3 mmHg (2 semanas) -5,2 mmHg (4 semanas) |
| Péptido ameval (hidrolizado de caseínas) | IPP+VPP (1,8 mg) | Presión arterial normal | -6,3 mmHg (6 semanas) |
| | IPP+VPP (2,5 mg) | alta | -6,7 mmHg (6 semanas) |
| | IPP+VPP (3,6 mg) | Hipertensión moderada | -10,1 mmHg (6 semanas) |
| Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada) | IPP (2,25 mg)VPP (3-3,75 mg) | Hipertensión moderada | -14,9 mmHg (8 semanas) |
| Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada) | IPP(2,25m)VPP (33,75 mg) | Hipertensos | -6,7 mmHg (21 semanas) |
| Evolus/Kaiku Vitabrand (leche fermentada) | IPP (2,4-2,7 mg)VPP(2,4-2,7 mg) | Hipertensión moderada | -16 mmHg (8-10 semanas) -11 mmHg (5-7semanas) |
| Biozate 1 (hidrolizado de proteínas de suero) | 20 g de hidrolizado | Hipertensos | -11 mmHg (-7mmHg DBP) comparado con el control. |

Fuente: López Fandiño y col. (2006).

Se han demostrado efectos a largo plazo de los tripéptidos IPP y VPP los tripéptidos atenúan el desarrollo de la hipertensión en SHR (ratas espontáneamente hipertensas) después de una alimentación oral a largo plazo de 12 y 13 semanas (Sipola y col., 2001, 2002a). Al final del período de tratamiento de 12 semanas, la presión arterial sistólica fue 17 mmHg menor en el grupo que recibió leche fermentada *Lactobacillus helveticus* LBK-16H que contenía IPP y VPP en comparación con el grupo control que recibió agua y 12 mmHg más bajo en el grupo al que se le dieron los mismos tripéptidos en agua (Sipola y col., 2001). Se obtuvieron resultados similares en el estudio de 13 semanas. La leche fermentada que contenía tripéptidos IPP y VPP atenuó el desarrollo de la hipertensión (Sipola y col., 2002a). Los resultados de los estudios con animales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Estudios en animales sobre el efecto de los péptidos bioactivos derivados de la leche en la presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas.

| Duración | Producto | Dosis de péptido | mg / kg de peso corporal | Reducción de la presión arterial |
|-----------------------------------|---|---|---|----------------------------------|
| Experimentos a corto plazo | | | | |
| 10h | Hidrolizados de caseína | 15 | Reducción máxima -22 mmHg después de 6 h. | Yamamoto y col., 1994 |
| 24h | Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP y péptidos puros | IPP 0.3 y VPP 0.6 | Leche fermentada: reducción máxima -22 mmHg después de 6 h. IPP: reducción máxima -28 mmHg después de 8h. VPP: -32 mmHg después de 4 h. | Nakamura y col., 1995b |
| 24h | Lys - Val - Leu - Pro - Val - Pro - Gln a partir de β - caseína | 2 | Reducción máxima -32 mmHg después de 6 h | Maeno y col., 1996 |
| 24h | Ile-Pro-Ala de la proteína de suero | 8 | -31 mmHg. | Abubakar y col., 1998 |
| 24h | Tyr-Pro from yoghurt-like product | 1 | Efecto dependiente de la dosis, reducción máxima -27 mmHg después de 6 h. | Yamamoto y col., 1999 |
| 20min | α -Lactorfina | 0.1 | Efecto dependiente de la dosis. -23 mmHg frente al control. Reducción máxima después de 50-100 min. | Nurminen y col., 2000 |
| 8 h | Leche fermentada que contiene inhibidores de la ECA | No reportado | - 11 - (- 12) mmHg (presión arterial media) vs. control | Fuglsang y col., 2002 |
| 24h | Ala-Leu-Pro-Met | No reportado | Reducción máxima 21 mmHg después de 8 h. | Murakami y col., 2004 |
| Experimentos a largo plazo | | | | |
| 4 semanas | Hidrolizado triptico de caseína de leche | 2040 | -14 mmHg en comparación con el control. | Karaki y col., 1990 |
| 12 semanas | Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP y péptidos puros | Leche fermentada : IPP 3.5 y VPP 3.5. Péptido: IPP 2.2 y VPP 2.2. | Leche fermentada: -17 mmHg y tripéptidos puros -12 mmHg vs. Control. | Sipola y col. 2001 |
| 14 semanas | Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | IPP 1.3 y VPP 2. | -21 mmHg frente al control. | Sipola y col., 2002a |

IPP = Ile-Pro-Pro
SBP = presión arterial sistólica

SHR = ratas espontáneamente hipertensas
VPP = Val-Pro-Pro

En un ensayo clínico muy reciente con hidrolizado de caseína, la presión arterial sistólica y diastólica disminuyó más en el grupo caseína que en el grupo placebo (Cadee et al., 2007). En un estudio reciente de la leche con péptidos de suero, el producto de

prueba no redujo la presión arterial sistólica o diastólica (Lee y col., 2007). La leche fermentada por *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* y que contenía ácido γ -aminobutírico redujo la presión arterial durante un período de tratamiento de 12 semanas. La presión arterial sistólica disminuyó alrededor de 17 mmHg desde la línea de base, lo que fue significativamente mayor que la reducción en el grupo placebo. La presión arterial diastólica en el grupo de leche fermentada no difirió del grupo placebo (Inoue y col., 2003). En otro estudio de ocho semanas, la presión arterial sistólica fue significativamente menor en el grupo que recibió yogurt fermentado con dos cepas de *Streptococcus thermophilus* y dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* en comparación con el grupo que recibió yogurt fermentado con dos cepas de *Streptococcus thermophilus* y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*. También se obtuvo una disminución similar de la presión arterial sistólica en un grupo que recibió yogurt fermentado con dos cepas de *Streptococcus thermophilus* y una cepa de *Enterococcus faecium* (Agerholm-Larsen y col., 2000). Los resultados de los estudios se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Estudios clínicos sobre el efecto de los péptidos bioactivos derivados de la leche en la presión sanguínea sistólica y la presión sanguínea diastólica.

| Productos | Sujetos | Duración (semanas) | Dosis de péptidos Mg/d | Resultados | Referencia |
|---|----------------------|--------------------|------------------------|--|------------------------------|
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 30 | 8 | IPP 1.1 and VPP 1.5 | SBP -14 mmHg (p < 0,01) y DBP-7 mmHg (p < 0,05). Diferencias entre los grupos no reportados. | Hata y col. 1996 |
| Hidrolizado triptico de caseína | 18 | 4 | 200 | DBP - 7 mmHg. No hay grupo placebo | Sugai 1998 |
| Leche fermentada que contiene proteína de suero | 20 | 8 | Proteína de suero 8.8 | La PAS disminuyó frente al nivel basal (p <0,05). Diferencias entre los grupos no reportados | Kawase y col. 2000 |
| Yogur fermentado | 70 | 8 | No reportado | La PAS (p <0.05) disminuyó vs. Placebo. | Agerholm-Larsen y col. 2000. |
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 18 + 26 ^a | 8 | No reportado | SBP -12 mmHg. No hubo efectos en sujetos normotensos. | Itakura y col. 2001 * |
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 3 | 8 | IPP 1.52 y VPP 2.53 | PAS -14 mmHg y DBP - 7 mmHg, (p <0.05) vs placebo. | Kajimoto y col. 2001b * |

| | | | | | |
|---|--------------------|--------------------------------------|---------------------------|--|-------------------------|
| Tabletas que contienen tripéptidos IPP y VPP | 20 | 1 | IPP 11.5 y VPP 17.7 | PAS -3 mmHg y DBP -1 mmHg. | Kajimoto y col. 2001b * |
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 17 | 8 | IPP 2.25 y VPP 3 - 3.75 | PAS -7.3% (p = 0.05) y DBP -7.3% (p <0.05) versus placebo | Seppo y col. 2002. |
| Hidrolizado de aislamiento de proteína de suero | 30 | 6 | 20000 (20g) | SBP-11 mmHg and DBP -7 mmHg vs. Placebo. | Pins and Keenan 2003. |
| Leche fermentada que contiene péptidos SKVYP | 29 | 4 | No reportado | BP - 9 mmHg. Diferencias entre los grupos no reportados. | Ashar and Chand 2004. |
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 46 | 4 | PP 1.2 y VPP 2.0 | SBP -5 mmHg (p=0.039) y DBP -2 mmHg (p>0.05). | Mizushima y col. 2004 |
| El hidrolizado de caseína (péptido C12) | 10 | Dosis única | Péptido C12 máximo 200 | SBP -5mmHg y DBP -7 mmHg. | Townsend y col. 2004 |
| Leche fermentada que contiene tripéptidos IPP y VPP | 60/39 ^b | De 8-10 semanas 1+ Período de 5-7 | IPP 2.4-2.7 y VPP 2.4-2.7 | PAS -6,4 mmHg (p = 0,10) y DBP -1,5 mmHg (p = 0,41) frente a placebo (al final del período 2) | Tuomilehto y col. 2004 |
| Comprimidos que contienen leche fermentada en polvo, IPP y VPP | 40+40 ^c | 4 | P 4.7 y VPP 8.3 | En el grupo de presión arterial normal alta, PAS -3 mmHg (p = 0.27) y DBP -5 mmHg (p = 0.045) vs. Placebo. En el grupo de hipertensión leve, SPB -11 mmHg (p = 0,003) y DBP-7 mmHg (p = 0,055) vs. placebo | Aihara y col. 2005 |
| Tabletas que contienen IPP y VPP | 131 | 6 | IPP+VPP 1.8-3.6 | La PAS disminuyó dependiente de la dosis (máximo -13 mmHg) y frente al placebo (p = 0,001). La DBP disminuyó dependiendo de la dosis. | Mizuno y col. 2005 |

| | | | | | |
|---|----|----|------------------|--|----------------------|
| Hidrolizado de aislamiento de proteína de suero | 30 | 6 | 20000 (20g) | PAS -8,0 mmHg (p <0,05) y DBP -5,5 mmHg (p <0,05) frente a placebo. | Pins and Keenan 2006 |
| El hidrolizado de caseína (péptido C12) | 48 | 4 | C12 peptide 3800 | PAS -11 mmHg y DBP -7 mm Hg. Diferencias entre los grupos no reportados. | Cadee y col. 2007 |
| Leche con péptidos de suero. | 54 | 12 | 3250 | No hubo diferencias en los valores de la presión arterial en el grupo de péptidos. | Lee y col. 2007 |

^a18 Hipertensos y 26 sujetos normotensos.

^b60 Los sujetos participaron en el período 1 y 39 sujetos en el período 2.

^c40 Sujetos con alta presión arterial normal y 40 con hipertensión leve.

DBP = Presión arterial diastólica

IPP = Ile-Pro-Pro

SBP = Presión arterial sistólica

VPP = Val-Pro-Pro

Actualmente se han encontrado péptidos secuenciados con actividad biológica derivados de alimentos de origen animal y vegetal como se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Péptidos con actividad biológica derivados de alimentos.

| Efecto | Origen | Nombre/secuencia |
|----------------------------------|---------|--|
| Inhibidores de ECA /hipotensores | Soya | NWGPLV |
| | Pescado | LKP, IKP, LRP (derivado de sardina, bonito, atún, calamar) |
| | Carne | IKW, LKW |
| | Leche | Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP) Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP) |
| | Huevo | KVREGTTY Ovokinina (FRADHPPL) Ovokinina (2-7)(KVREGTTY) |

Fuente: Hartmann y Meisel (2007).

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la actividad inhibitoria de la ECA y el peso molecular de las fracciones peptídicas. Noh y Song (2001) establecen que el fraccionamiento de hidrolizados proteínicos utilizando membranas de corte molecular de 1000 Da es un método útil en la purificación de inhibidores potenciales de la ECA debido a que la mayoría de las sustancias reportadas con este tipo de actividad biológica presentan pesos moleculares menores o cercanos a ese peso molecular (Ma y col., 2006). Robert y col. (2004) utilizando fracciones peptídicas

procedentes de la hidrólisis de la caseína, así como Hernández y col. (2004) empleando fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de diferentes productos lácteos, observaron un comportamiento similar sobre la actividad inhibitoria de la ECA. Sun y col. (2004), señalan que péptidos de bajo peso molecular aislados de *G. lucidum* son los que presentan una mayor bioactividad; éste comportamiento también ha sido reportado por Miguel y col. (2007) en hidrolizados de huevo con pepsina quienes obtuvieron una mayor actividad inhibitoria de la ECA en las fracciones menores a 3 kDa al respecto.

Actualmente, la ciencia de los alimentos está promoviendo un nuevo concepto de nutrición que incluye a aquellos alimentos que presentan una potencialidad en el mejoramiento de la salud y disminuyen los riesgos de enfermedades en el cuerpo humano (Korhonen y col. 2002), por lo que, muchas industrias alimentarias han incluido en sus productos destinados para consumo humano ciertos nutrientes y componentes bioactivos extraídos de fuentes animales y vegetales, capaces de ofrecer garantías de salud a los consumidores. Entre los beneficios que ofrecen estos productos se encuentran aquellos que están enriquecidos con péptidos bioactivos que tienen la capacidad de disminuir la presión arterial en el ser humano, por lo que, ya existen en el mercado diversos productos como el Evolus™ siendo éste el primero en ser comercializado en Finlandia en el año 2000, el LH™ en Islandia, el Vita de Kaiku™ en España, el Emmi-Evolus™ en Portugal que básicamente son leches fermentadas por diferentes especies de lactobacilos que actúan sobre la caseína, el principal componente de la leche (Jauhiainen y col. 2002) y, el Calpis™ el cual es elaborado en Japón y se obtiene igual por fermentación mediante el uso de cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Hata y col., 1996).

En todos los casos anteriores la acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por VPP e IPP los cuales, purificados o como componentes de los productos hidrolizados, han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto (Rasmussen y col., 2005).

Con base a lo anterior, actualmente diversos investigadores se han dado a la tarea de aislar y purificar péptidos con actividad antihipertensiva de diferentes fuentes vegetales y animales, siendo la fuente vegetal la que está cobrando mayor importancia debido a que son materias primas que pueden obtenerse más fácilmente, tienen bajo costo y porque pueden presentar diversas actividades fisiológicas sobre el organismo humano, entre la cual destaca el efecto antihipertensivo.

Debido a lo anterior, el objetivo de esta revisión es dar a conocer el amplio panorama de los péptidos antihipertensivos y su posible uso en la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial en el ser humano.

Métodos para medir la actividad IECA y selección de sustancias potenciales con actividad antihipertensiva.

Existen varios métodos para medir la actividad IECA *in vitro* que se emplean para seleccionar potenciales sustancias con actividad antihipertensiva *in vivo*. La mayoría de estos estudios utilizan el péptido sintético HHL que al ser incubado con la ECA produce ácido hipúrico y el dipéptido HL siendo estos productos de la reacción posteriormente cuantificados por diversos métodos colorimétricos (Matsui y col., 1992; Chang y col., 2001), fluorimétricos (Friedland y Silverstein, 1976), por electroforesis capilar (Shihabi., 1999; Chang y col., 2001), por cromatografía de líquidos de alta eficacia (CLAR) (Shalaby y col., 2006).

Uno de los métodos más empleados para medir la actividad IECA es el desarrollado por Cushman y Cheung (1971), que se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico que se forma al incubar el sustrato HHL con la ECA en presencia de sustancias inhibitoras. Este método consta de varias etapas que incluyen la extracción con ácido hipúrico, evaporación, disolución en agua y medida de la absorbancia del ácido hipúrico a 228 nm. Más recientemente, se han puesto a punto otros procedimientos que no requieren una etapa previa de extracción del ácido hipúrico. Por ejemplo, Li y col., (2005), determinan directamente la cantidad de ácido hipúrico que se forma en la mezcla de reacción mediante una reacción colorimétrica. Otro método espectrofotométrico bastante utilizado es el desarrollado por Vermeirssen y col., (2002a), que utiliza como sustrato el tripéptido modificado Furanacriloil-fenilalalina-Glicina-Glicina y como enzima un extracto obtenido con acetona a partir de pulmón de conejo, lo cual reduce mucho los costes del ensayo. También ha sido publicado un método analítico que se basa en el acoplamiento simultáneo de CLAR con un ensayo bioquímico para medir la actividad IECA y con un detector de masas que permite la identificación de los péptidos inhibidores de la enzima (Van Elswijk y col., 2003). Este método proporciona de forma rápida información química y biológica de la muestra que se está analizando, sin embargo para su realización se requiere un equipamiento complejo y bastante caro. El método de fluorescencia desarrollado por Sentandreu y Toldrá (2006), emplea como sustrato de la ECA el compuesto o-Aminobenzoilglicilo-p-nitrofenilalanilprolina, y la medida del producto de la reacción, el grupo fluorescente o-Aminobenzoilglicilo, se realiza en un fluorímetro para placas multipocillo. Este nuevo método de fluorescencia no requiere una etapa previa de extracción del producto de reacción y presenta una gran ventaja respecto a los anteriores, ya que permite determinar la actividad IECA de un gran número de muestras en muy poco tiempo.

La actividad IECA puede variar dependiendo del método que se esté utilizando, debido a la utilización de sustratos diferentes, o en un mismo método si las condiciones son distintas o se emplea ECA de distintos orígenes. Existe por tanto, una necesidad de estandarizar las metodologías para determinar la actividad IECA *in vitro*, en concreto es

importante alcanzar niveles de actividad de la ECA similares para que los valores obtenidos sean comparables y reproducibles (Murray y col., 2004).

La actividad IECA se calcula normalmente con el valor del IC₅₀ (concentración necesaria de sustancia inhibitoria para inhibir el 50% de actuación de la ECA). Valores del IC₅₀ bajos se traducen en una potente actividad IECA ya que es necesaria una concentración muy pequeña de sustancia inhibitoria para disminuir la actuación de la enzima.

Mucuna pruriens

Características generales

México, tiene una amplia biodiversidad de plantas y alimentos incluyendo granos de leguminosas, ricos en proteínas y aminoácidos que por años han sido utilizados en la alimentación humana y animal por lo que pueden ser factibles de emplear como materia prima para la generación de biopéptidos potenciando con ello la producción agrícola y nuevas oportunidades para los productores del campo (Herrera y col., 2015).

Durante los siglos XVIII y XIX, la *Mucuna* fue cultivada ampliamente como hortaliza, se hervían y se comían tanto las vainas verdes como los frijoles maduros, con el tiempo fue sustituida por leguminosas más apetitosas, sin embargo todavía se la utiliza en los casos de hambruna y en platillos especiales en el nordeste de la India. En Guatemala y México, por al menos varios decenios, *M. pruriens* ha sido tostada y molida para obtener un sustituto del café; la semilla es muy conocida en la región como “Nescafe,” en reconocimiento de ese uso (Buckles y col., 1999). Las semillas del género *Mucuna* tienen potencial en la elaboración de alimentos nutrimentales por su alto contenido de proteína y otros elementos aprovechables resultando una alternativa factible para el establecimiento de cultivos comerciales con potencial en el desarrollo de nuevos productos (Vadivel y Janardhanan, 2005; Agbede y Aletor, 2005)

En Yucatán, México, las leguminosas son especies dominantes en la vegetación natural y en la milpa (Flores y col., 2001). Ellas representan junto con el maíz la base de la alimentación de las comunidades rurales de Yucatán. La producción del maíz, está destinada al consumo de más de un millón de campesinos mediante el sistema de milpa; su baja producción y disminución de un año a otro, se atribuye a la competencia de maleza (Caamal y col., 2001) y a la fertilidad del suelo, la cual disminuye de un ciclo a otro (Weisbach y col., 2002).

En la península de Yucatán existe una gran variedad de fuentes proteínicas consideradas componentes nutrimentales potencialmente importantes en la dieta del ser humano debido a su considerable aporte de proteínas y carbohidratos, como por ejemplo

el piñoncillo (*Jatropha curcas*) y las leguminosas caupi (*Vigna unguiculata*), frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol terciopelo (*M. pruriens*), entre otros. Se ha incrementado el uso de *M. pruriens* como abono verde y de cobertura en el sistema de milpa y como consecuencia, ha aumentado la disponibilidad de *M. pruriens* en la zona, reportándose producciones de 0.7 a 1.25 ton/ha de semilla, esto en cultivos mixtos con maíz bajo las condiciones climatológicas propias de la región (Segura y col., 2013).

El género *Mucuna*, perteneciente a la familia Fabaceae, abarca tal vez 100 especies de leguminosas anuales y perennes; es autógama y, por lo tanto, es rara la contaminación natural. En las zonas tropicales hay más o menos una docena de *Mucuna* spp. que probablemente representan una fragmentación del cultigen asiático, y existen numerosas cruces e híbridos. Las especies más comunes incluyen *M. deeringiana* Merrill, *M. utilis* Wallich (frijol terciopelo de Bengala), *M. pruriens* (L.) DC, *M. nivea*, *M. Hassjoo* (frijol terciopelo de Yokohama), *M. aterrima* Holland (frijol terciopelo de Mauricio y Bourbon), *M. capitata* y *M. diabólica* (Buckles y col., 1999). Los ciclos biológicos varían entre 100 y 300 días hasta la cosecha de la vaina (Buckles y col., 1999).

M. pruriens es una planta de ciclo anual tipo arbusto o enredadera que puede medir hasta 1 m de altura y 15 m de longitud. Sus hojas son grandes, trifoliadas, oviformes o romboides, con flores de color púrpura o blanco. Sus vainas cilíndricas, largas o lineales están cubiertas con densos pelos aterciopelados (Figura 2) (Brunner, 2011). Las semillas son negras y brillantes cuando maduran, de 1.2 a 1.5 cm de largo y de 0.9 a 1.1 cm de ancho con hilio blanco levantado a la mitad de la semilla. Cada vaina contiene de tres a cinco semillas. Las semillas de *Mucuna pruriens* (ver Figura 3) son comúnmente moteadas (Fao.org, 23/12/2016).



Figura 2. Vaina de *Mucuna pruriens*



Figura 3. Semillas de *Mucuna pruriens*

Péptidos derivados de Mucuna pruriens (Frijol terciopelo).

El uso de *M. pruriens* o frijol terciopelo como cultivo de cobertura, es una buena opción en el mejoramiento de la fertilidad del suelo, por su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico y mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del mismo. En este sentido, el frijol terciopelo también reduce la erosión, aumenta la actividad

biológica en el suelo, controla la presencia de maleza y plagas, además de ser una leguminosa altamente utilizada como alimento o forraje (Castillo y col. 2010).

Las semillas de *Mucuna pruriens* se utilizan para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso, mental y reproductivo, así como la depresión y la infertilidad masculina (Motta, 2013). Algunos estudios han mostrado potencial actividad antioxidante de extractos alcohólicos de *Mucuna pruriens* (Longhi, 2007).

Se sabe que unos de los compuestos fenólicos principales de las semillas de *Mucuna pruriens* es la levodopa (aproximadamente 5%), por tal motivo es utilizado como un medicamento para mejorar los síntomas del Parkinson debido a su alto contenido de levodopa (L-Dopa) natural (Vadivel, 2008; Chikagwa y col., 2009).

Actualmente, existen diferentes presentaciones en que se comercializa la *Mucuna pruriens*, de las cuales las tres más representativas son: en polvo, gotas o cápsulas (ver Figura 4), para ser uso de éstos es necesario tener cuidado con las diversas fórmulas y concentraciones (González, 2014).



Figura 4. Principales presentaciones de *Mucuna pruriens*.

Composición de Mucuna pruriens

Se ha demostrado que *Mucuna pruriens* tiene un alto potencial agrícola, con rendimientos de semilla hasta 1000 kg/ha, incluso en condiciones tropicales adversas. Este grano tiene un alto contenido de almidón (515 g/kg) y proteína (279 g/kg) (Segura y col., 2015).

Las leguminosas del género *Mucuna* son de gran interés debido al elevado valor nutricional y su bajo costo. Aunque esta leguminosa es subutilizada, tiene una demanda alta como producto vegetal con alto valor nutracéutico en industrias de alimentos y farmacéuticas (Bhat y col., 2007).

Las semillas de este género tienen alto contenido de proteína, carbohidratos y fibra, bajos niveles de lípidos, minerales adecuados y los aminoácidos requeridos. Éstas, tienen baja humedad y cenizas, pero alta cantidad de aminoácidos esenciales como Ile, Leu, Phe, Tyr y Lys, mientras que los aminoácidos limitantes son Met y Cys (Chaparro y col., 2009).

A continuación, se presentan las diferentes composiciones proximales de distintos géneros de *Mucuna* (ver Tabla 8).

Tabla 8. Composición proximal de algunas especies del género *Mucuna*.

| Especies | Proteína Cruda (%) | Grasa Cruda (%) | Fibra Cruda (%) | Cenizas (%) | Carbohidratos (%) |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>M. cochinchinensis</i> | 38.4 | 9.6 | 6.8 | 3.3 | 44.8 |
| <i>M. deeringiana</i> | 38.2 | 8.7 | 5.7 | 3.4 | 45.2 |
| <i>M. monosperma</i> | 23.5 | 14.3 | 6.7 | 3.2 | 52.2 |
| <i>M. prurins</i> | 32.4 | 5.7 | 7.8 | 3.6 | 50.6 |
| <i>M. utilis</i> | 26.4 | 4.1 | 6.3 | 3.7 | 59.5 |
| <i>M. (black)</i> | 24.5 | 6.9 | 4.2 | 3.6 | 64.8 |

Chaparro y col., 2009.

Las leguminosas del género *Mucuna* son fuente importante de minerales (ver Tabla 9), de las cuales los principales minerales son: potasio, fósforo, y calcio, aunque también pueden presentar concentraciones bajas de sodio, hierro, zinc, cobre y manganeso (Chaparro y col., 2009).

Tabla 9. Composición mineral (mg/100g) en especies *Mucuna*.

| Elemento | <i>M. deeringiana</i> | <i>M. pruriens</i> | <i>M. cochinchinensis</i> | <i>M. rajada</i> | <i>M. utilis</i> |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Na | 3.86 | 47.8 | 2.24 | 2.40 | 52.5 |
| K | 361 | 835 | 407 | 410 | 778 |
| Ca | 408 | 304 | 293 | 258 | 393 |
| Mg | 72.6 | 208 | 50 | 59.6 | 174 |
| P | 607 | 119 | 568 | 601 | 98.4 |
| Fe | 17.6 | 16.4 | 14.7 | 8.62 | 13.4 |
| Cu | 0.98 | 1.8 | 0.78 | 0.95 | 1.2 |
| Zn | 6.08 | 2.3 | 2.11 | 2.18 | 6.7 |
| Mn | 0.35 | 1.8 | 0.26 | 0.43 | 3.9 |

Adebowale y col., 2005.

Al igual que con todas las leguminosas, el género *Mucuna* contiene componentes antinutricionales (ver Tabla 10). En particular, el frijol de terciopelo (*M. pruriens*) contiene el aminoácido no proteico L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), así como otros componentes como son: fenoles, taninos e inhibidores de tripsina (TIA), lo que limita su consumo directo en alimentos (Segura y col., 2015).

Tabla 10. Factores antinutricionales (g/100g) en especies de *Mucuna*.

| Factores antinutricionales | <i>M. deeringiana</i> | <i>M. pruriens</i> | <i>M. conchinchinensis</i> | <i>M. rajada</i> |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------------|
| Fenoles totales | 4.34 | 7.75 | 6.53 | 6.23 |
| Taninos | 0.03 | 0.05 | 0.04 | 0.07 |
| Inhibidores de tripsina (TIA) | 18.5 | 24.2 | 23.6 | 26.1 |
| L-Dopa | 3.87 | 4.99 | 6.11 | 5.35 |

Adebowale y col., 2005

M. pruriens es una leguminosa, cuyos hidrolizados y fracciones peptídicas han demostrado efectos hipotensores, hipolipemiantes y antioxidantes importantes en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Herrera y col., 2014). Las semillas de frijol terciopelo tienen una composición química muy homogénea. Sus componentes más abundantes son el almidón (44 a 59%), proteína (23 a 38%) y algunas variedades de lípidos (2 a 14%). Del contenido total de proteínas presentes, el 70% son globulinas, 10% albúminas y 20% de pequeñas cantidades de glutelinas y prolaminas. Las semillas presentan un alto contenido de aminoácidos esenciales siendo la Cys y la Met los residuos aminoacídicos limitantes (Adebowale y col., 2005).

El alto contenido de lisina en la proteína de las especies de *Mucuna* es un atributo nutrimental destacable que les permite ser consideradas como fuentes de proteína suplementaria significativa, ya que la Lys no es sintetizada por el organismo de los animales (Chaparro y col., 2009).

En este sentido, cabe destacar que el contenido de aminoácidos de las especies de *Mucuna* se encuentra dentro de los valores de ingesta recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), siendo mayor el valor en algunos casos. De su contenido de ácidos grasos, se reporta un 28% de ácido palmítico y linoleico, siendo los dos componentes lipídicos de mayor concentración en esta especie; así mismo un importante contenido de minerales, sobresaliendo elementos como potasio, calcio, fósforo y magnesio (Kamatchi y col., 2010).

En la tabla 11 se observa la composición de aminoácidos (mg/g proteína cruda) de algunas especies del género *Mucuna*.

Tabla 11. Composición de aminoácidos (mg/g proteína cruda) de algunas especies del género *Mucuna*.

| Aminoácido | <i>M. pruriens</i> | <i>M. eeringiana</i> | <i>M. cochinchinensis</i> | <i>M. rajada</i> | FAO/WHO 1985 |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| No esenciales | | | | | |
| Alanina | 63.9 | 82.5 | 84.5 | 67.8 | NR* |
| Arginina | 90.6 | 90.5 | 82.7 | 75.9 | NR |
| Aspargina y ácido aspártico | 171 | 126 | 137.4 | 108 | NR |
| Cisteína | Trazas | 9.3 | 8.4 | Trazas | NR |
| Glutamina y ácido glutámico | 155.5 | 180 | 165 | 151 | 19.0 |
| Glicina | 50.5 | 49.7 | 52.2 | 33.8 | NR |
| Histidina | 35.3 | 46.6 | 27.8 | 39.5 | 34.0 |
| Prolamina | 151 | 161 | 145 | 150 | NR |
| Serina | 41.5 | 63.5 | 35.8 | 22.6 | NR |
| Tyr | 70.9 | 85.5 | 65.5 | 66.8 | NR |
| Esenciales | | | | | |
| Isoleucina | 92.3 | 97.2 | 96.0 | 87.3 | 40.0 |
| Leucina | 90.8 | 90.8 | 91.4 | 87.8 | 70.0 |
| Lisina | 46.4 | 66.5 | 55.7 | 34.6 | 58.0 |
| Metionina | Trazas | 12.7 | 9.2 | 9.6 | 25.0 |
| Fenilalanina | 80.8 | 62.1 | 86.7 | 79.4 | 60.0 |
| Treonina | 44.4 | 61.9 | 50.8 | 52.3 | 40.0 |
| Triptófano | 22.3 | 23.0 | 24.8 | 34.6 | 60.0 |
| Valina | 58.3 | 75.9 | 71.0 | 68.1 | 50.0 |
| Aminoácidos esenciales | | | | | |
| Totales (%) | 39.8 | 40.1 | 42.2 | 44.0 | NR |

*NR: No Registrado. Fuente: Chaparro y col. (2009)

Por otra parte, también se han encontrado compuestos no nutritivos tales como inhibidores de proteasas, compuestos fenólicos, taninos, lectinas, ácidos fítico, saponinas y glucósidos cianogénicos. Muchos de estos compuestos interfieren con la biodisponibilidad de nutrientes y poseen un efecto neurotóxico, cuando son consumidos en grandes cantidades; sin embargo, la mayoría de estos compuestos son termolábiles; por lo cual requieren de un proceso de cocción en agua antes de ser consumidos (Betancur y col., 2008).

Así, *M. pruriens*, sembrada en el sureste mexicano, ha demostrado ser una buena fuente de proteína (23-38%) y por lo tanto de péptidos con actividad biológica a través de la hidrólisis enzimática, resultando una alternativa en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades metabólicas asociadas al sobrepeso y la obesidad (Segura y col., 2013).

Por sus potenciales nutrimentales y terapéuticos, las semillas de leguminosas tropicales como *M. pruriens* resultan una alternativa viable para la alimentación y salud humana. Las proteínas de esta leguminosa no solo son fuente alterna de aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos para el organismo, sino que, como consecuencia de su digestión, además de aminoácidos libres, son fuente de péptidos biológicamente activos (Carvajal y col., 2010).

Estudios demuestran que los péptidos generados de *M. pruriens* son farmacológicamente activos y capaces de disminuir la presión arterial. Inclusive dichos resultados, han propuesto la incorporación de estos hidrolizados a determinados alimentos como una alternativa al tratamiento de la hipertensión (Galicia y col., 2013; Herrera y col. 2014) reportaron una importante actividad antioxidante equivalente a Trolox para hidrolizados de *M. pruriens* con pepsina- pancreatina, equivalente a 102.8 mM/mg, a diferencia de los obtenidos con Alcalase-Flavourzyme, cuyo equivalente en Trolox fue de 49.0 mM/mg. Se estudiaron fracciones de diferente peso molecular, y se encontró que aquellas fracciones de tamaño menor a 1 kDa tenían una actividad antioxidante mayor que aquellas de mayor tamaño (Herrera y col., 2014). Dichos autores también reportaron un efecto inhibitor de la agregación plaquetaria del 33.33 y 31.72% en fracciones peptídicas de *M. pruriens* > 10 kDa de hidrolizados de Alcalase-Flavourzyme y pepsina- pancreatina, respectivamente, lo cual indicó actividad antitrombótica moderada y similar a la presentada por fármacos como la aspirina e indometacina. Herrera y col., (2014) y Segura y col., (2014) reportaron un efecto de inhibición del 50% de actividad de la ECA, para hidrolizados de *M. pruriens* obtenidos con pepsina a 10 min de hidrólisis (2.63 mg/mL) y una actividad antioxidante de 3.42 mM/mg TEAC para este mismo hidrolizado a diferencia del registrado con pancreatina a 120 min de hidrólisis (3.43 mM/mg TEAC) (Segura y col., 2014).

Estudios *in vivo*, también reportaron una actividad hipotensora importante. Evaluando el efecto hipotensor en ratas normotensas, se encontró que el mayor porcentaje de reducción de presión sistólica y diastólica se obtiene de hidrolizados de pepsina- pancreatina a dosis de 5 mg/kg, vía intraperitoneal (Herrera y col., 2014). Así mismo, también se ha evaluado el efecto hipolipemiante y se ha encontrado que las fracciones peptídicas < 1kDa en concentraciones de 10 mg/kg por vía peritoneal, presentaron mayores efectos hipocolesterolémicos e hipertriglicéridémicos, incluso comparables con los arrojados por la pravastatina en las mismas dosis, en ratas diabéticas inducidas con aloxano (Herrera y col., 2014). Lo anterior, pone de manifiesto la importancia biológica de los péptidos de *M. pruriens*.

Sin embargo, la digestión es un proceso complejo que incluye procesos químicos y mecánicos que degradan las macromoléculas de los alimentos a moléculas de menor peso molecular absorbibles para el intestino. Particularmente, la digestión proteica inicia en el estómago con la pepsina y el ácido clorhídrico del jugo gástrico y

concluye en el duodeno por acción de las proteasas presentes en el jugo pancreático, por ende, la digestión es una barrera potencial para que los péptidos tengan una aplicación real al alcanzar los tejidos donde habrán de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Durante el proceso natural de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos con potencial bioactivo o liberarlos del seno de su proteína de origen donde se encontraban inactivos, presentando propiedades especiales una vez liberados. Algunos estudios han demostrado que algunos fragmentos de péptidos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis y son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y alcanzar intactos la circulación sanguínea. Lo anterior, solo es posible si el péptido atraviesa las barreras potenciales de la activación o inactivación que pudieran hacerle perder su acción (Segura y col., 2010).

Mao y col. (2007) concluyen que, a menor peso molecular, mayor es la actividad inhibidora de la ECA de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de un hidrolizado de caseína (> 10kDa = 23 %, 6 - 10 kDa = 29.2 %, < 6 kDa = 85.4 %). Así mismo, hidrolizados fraccionados por ultrafiltración de *P. vulgaris* y su relación con la actividad inhibitoria de la ECA, para un sistema secuencial Alcalase-Flavourzyme y Pepsina-Pancreatina mostraron un mayor efecto inhibitorio conforme disminuyó el tamaño molecular de las fracciones, registrándose la mayor bioactividad en la fracción < 1kDa de ambos sistemas (Ruiz y col., 2010), comportamiento semejante se observó en las fracciones peptídicas resultantes por ultrafiltración de *M. pruriens* obtenidas. De los resultados encontrados al evaluar las bioactividades de los hidrolizados y las fracciones ultrafiltradas de *M. pruriens*, realizado por Herrera en la tesis doctoral "Actividad biológica de derivados proteínicos de *Mucuna pruriens* con potencial en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y obesidad", se eligió para purificar por RP-HPLC, la fracción peptídica < 1kDa obtenida con el sistema secuencial Pepsina-Pancreatina por presentar la mayor actividad inhibitoria.

El incremento de la actividad inhibitoria de la ECA para el hidrolizado peptídico obtenido secuencialmente con Pepsina-Pancreatina (19.5 µg/mL), posiblemente se debió a la presencia de residuos aminoacídicos hidrofóbicos como Ala, Leu e Ile con valores de 4.09, 2.43 y 4.27%, respectivamente, en mayor cantidad con respecto a Alcalase-Flavourzyme, ya que según Fitzgerald y Meisel, (2000) la ECA parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que contengan residuos de aminoácido hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) en las tres últimas posiciones de la región C-terminal. El hidrolizado proteínico de *M. pruriens* obtenido con Pepsina-Pancreatina, así como las fracciones ultrafiltradas y purificadas por RP-HPLC, sugieren el uso de esta leguminosa como fuente natural de péptidos bioactivos con potencial uso nutracéutico. Adicionalmente, la composición aminoacídica, particularmente de los hidrolizados, las fracciones ultrafiltradas y purificadas posibilita el uso de esta leguminosa en la alimentación parental (Herrera y col., 2015).

Técnicas de separación

El análisis de péptidos requiere un fraccionamiento previo para simplificar la muestra y eliminar sustancias que están presentes en el extracto y que puedan interferir. Los métodos de separación se basan en diferentes principios como el fraccionamiento por tamaño (ultrafiltración, cromatografía de exclusión molecular), la carga o la polaridad (electroforesis y cromatografía).

Ultrafiltración

La actividad biológica de los péptidos está relacionada con su peso molecular (Berot y col., 2001). Con la ultrafiltración es posible aislar la fracción peptídica de interés según su tamaño molecular, aunque también se puede usar como medio para concentrar extractos de péptidos. La selectividad de estas membranas depende del tamaño y la carga de las moléculas (Rautenbach y Gröschl, 1990). Los efectos del pH y la fuerza iónica descritos en varios estudios (Mullet y col., 1999; Cheang and Zydney, 2004) revelaron que la separación de péptidos por membranas está principalmente basada en los efectos de la carga.

Técnicas cromatográficas

La separación mediante cromatografía de líquidos (CL) permite separar tanto péptidos como proteínas en función de sus propiedades fisicoquímicas, así como concentrar la muestra en columna, eliminar sales, detergentes y componentes no volátiles de la muestra. Los métodos cromatográficos más comunes en la separación de péptidos y proteínas utilizan sistemas de CL de alta resolución, rendimiento o alta presión (CLAR), que permiten separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones fisicoquímicas con la columna cromatográfica. Los tipos cromatográficos más utilizados son los siguientes: exclusión molecular, intercambio iónico, cromatografía en fase reversa y afinidad. Como hemos mencionado anteriormente, la CL puede ser utilizada como método previo de fraccionamiento, sin embargo su utilización de forma acoplada a determinados equipos de Masas (EM). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM, ha supuesto un auge en la caracterización y cuantificación de determinados proteomas. Actualmente, gracias al gran poder de resolución, reproducibilidad y compatibilidad con los equipos de MS, la mayoría de las separaciones cromatográficas se realizan en equipos de CLAR, utilizando columnas capilares de fase reversa (~75 μm). Este tipo de cromatografía consigue una buena separación de mezclas complejas de péptidos o proteínas, y ha sido la más utilizada en infinidad de estudios de proteómica Bottom-Up clásica. Las nuevas columnas de titanio (Larsen y col., 2005), las columnas recubiertas de anticuerpos (α fosfotirosina; α fosfoserina/treonina) (Blagoev y col., 2003) o con iones metálicos inmovilizados (IMAC, Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) (Ficarro y col., 2002), están permitiendo el enriquecimiento y la detección específica de

péptidos fosforilados. Asimismo, las columnas recubiertas con lectinas consiguen un mejor enriquecimiento y detección de gliocopéptidos (Kaji y col., 2003). La separación cromatográfica utilizando columnas monolíticas, además de lograr separaciones de péptidos y proteínas más eficientes, permiten la detección de modificaciones post-traduccionales (PTMs) con mayor rendimiento y de forma ultrarrápida (Hosoya y col., 2006). Aunque la CL monodimensional de péptidos y proteínas es la más utilizada, actualmente las técnicas high-throughput (de alto rendimiento o productividad) están demandando nuevas mejoras y desarrollos que permitan una mayor resolución y un menor tiempo de análisis. Así, la CL multidimensional está suponiendo una gran mejora en la resolución de mezclas complejas de péptidos (Link y col., 1999), y constituye habitualmente la base de los estudios Shotgun. Típicamente, la CL multidimensional involucra dos separaciones ortogonales como el intercambio catiónico (SCX) y fase reversa (RP), que pueden estar en línea o no, aunque para algunas aplicaciones especiales se pueden utilizar columnas de afinidad o de exclusión molecular para la primera dimensión. La aproximación híbrida, la tecnología multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT) elimina las separaciones de gel (Washburn y col. 2001), en la que en una misma columna se han hibridado dos separaciones cromatográficas consecutivas, está siendo aplicada en infinidad de laboratorios. El principio básico de esta metodología es la utilización de una nanocolumna integrada por material necesario para la primera separación (SCX), seguida de material para la segunda separación (RP). Este procedimiento presenta una serie de ventajas, ya que presenta una excelente sensibilidad, las pérdidas peptídicas son mínimas, el número de péptidos identificados para a una misma proteína es mayor, permite la identificación de miles de proteínas en un solo experimento, es fácilmente automatizable y logra una cuantificación muy precisa, cuando se emplean técnicas de marcaje isotópico estable (Gygi y col., 1999). Aunque la idea parezca sencilla, ya que el trabajo con péptidos puede ser más fácil que con proteínas enteras, no es menos cierto que la mezcla de péptidos que se genera en los análisis tipo Shotgun, es de por sí una muestra demasiado compleja para su interpretación y análisis. Si cabe aún, más compleja puede llegar a ser, si en la muestra están presentes proteínas todavía no secuenciadas y descritas en las bases de datos. Por consiguiente, esta aproximación se hace prácticamente imposible. Todavía existe poca variedad de tecnologías cromatográficas que logren una adecuada separación de proteínas enteras antes de su análisis mediante MS. Entre ellas, se destaca, el isoelectroenfoque (IEF) capilar (Yang y col., 1998; Jensen y col., 1999a) y la cromatografía líquida en fase reversa (Li y col., 1999; Lee y col., 2002). Su aplicación normalmente es en una sola dimensión, directamente acopladas a equipos de MS de alta resolución, como es el caso de la resonancia de ciclotrón del ion transformado de Fourier (FTICR). Sin embargo se han realizado intentos multidimensionales offline, mediante la utilización de geles de IEF preparativos (Zhu y col., 2003). Actualmente, se han incorporado nuevas mejoras, como la CL de ultra eficiencia (UPLC, Cromatografía líquida de ultra rendimiento), que reduce el tiempo de análisis y aumenta considerablemente la sensibilidad, velocidad y resolución de proteínas intactas. Es

adecuada para aquellas situaciones, en las que se requiere una ultra sensibilidad como pueden ser estudios con cantidades limitadas de muestra (Shen y col., 2002).

Cromatografía de exclusión molecular (Filtración en gel)

La cromatografía de filtración en gel es una forma de cromatografía de partición utilizada en gran medida para la separación de moléculas en base a sus diferentes pesos moleculares. De una manera ideal en filtración en gel, solo los efectos estéricos contribuyen al comportamiento de elución de las moléculas de soluto. Las moléculas grandes nunca penetran en la fase estacionaria, por lo que su desplazamiento a través de la columna es rápido siendo las primeras que eluyen. Mientras que las moléculas intermedias o pequeñas, si pueden atravesar los poros del gel, siendo su movimiento más lento. Por lo tanto las moléculas durante la filtración en gel fluyen en orden decreciente según su tamaño molecular (Gel filtración 1997).

El objetivo de filtración en gel es obtener la mayor resolución posible de las moléculas de soluto. Por tanto, la elección de la columna así como el flujo de elución son muy importante en esta técnica; cuanto mayor sea la columna y menor el flujo, mayor será la resolución. El principal inconveniente es el tiempo de separación y la dilución de la muestra. Columnas de una longitud de 100 cm y un diámetro de 1-2.5 cm son las más utilizadas.

La cromatografía de filtración en gel no se utiliza como primer paso en la purificación de proteínas debido a su baja capacidad, pero es frecuentemente usada como uno de los pasos finales o para evaluar la pureza de una preparación. Otras aplicaciones de la cromatografía de filtración en gel dentro de los laboratorios y en la industria, es su utilización para el fraccionamiento y separación de moléculas, determinación de peso moleculares y de polímeros, determinación de constantes de equilibrio, separación de células y partículas, etc. (Gel filtración 1997).

Un gel es un sistema heterogéneo en el cual una fase líquida continua, usualmente agua, está contenida dentro de los poros de una fase estacionaria. El material ideal de la matriz en gel filtración debe ser inerte con respecto a las moléculas que se quieren separar. Sin embargo pueden ocurrir interacciones del material empaquetado con las moléculas biológicas con lo cual la molécula eluiría más tarde de lo que se esperaría por su peso molecular. Otras interacciones de naturaleza iónica pueden ser eliminadas incrementando la fuerza iónica del buffer utilizado.

La matriz o gel más utilizado está formada por enlaces cruzados de poliacrilamida con agarosa, dextrano o combinaciones de estos. Una de los primeros geles utilizados en análisis de peptonas fue Sephadex (Farmacia), cuya matriz está formada por conexiones cruzadas de dextrano y epiclorohidrina. El gran número de grupos hidroxilo que presenta hace que sea una matriz extremadamente hidrófila. Los

diferentes G-tipos de Sephadex (G10, G15, G25, G50 etc.) se diferencian en el grado de conexiones cruzadas, en su capacidad de hinchamiento lo cual conlleva a obtener un grado de fraccionamiento diferente según el G-tipo utilizado. Sephadex G-25 tiene un rango de fraccionamiento que va desde 1000 a 5000 Da (Gel filtración 1997).

Cromatografía de fase reversa

La cromatografía de fase reversa es la técnica más utilizada para analizar extractos peptídicos, ya que permite separarlos en base a diferencias de hidrofobicidad, lo que está directamente relacionado con la composición en aminoácidos de los péptidos. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es apolar mientras que la fase móvil es polar. Existen muchos tipos de columnas de fase reversa; las más utilizadas consisten en un soporte de sílice con cadenas n-alquil enlazadas con grupos octadecil (C18) y octil (C8). Las típicas fases móviles que se emplean en este tipo de separaciones son el acetonitrilo como fase orgánica y una fase acuosa compuesta generalmente de un 0.1% de ácido trifluoroacético o ácido fórmico en agua (Sforza y col., 2006). Para conseguir una separación óptima de los péptidos se suele realizar una elución en gradiente en la que se aumenta la hidrofobicidad de la fase móvil. Los péptidos se reparten entre fase móvil y estacionaria en base a su polaridad, y como resultado los más polares eluyen en primer lugar y los hidrofóbicos quedan retenidos en la columna y tardan más tiempo en eluir. La detección de los péptidos puede realizarse a diferentes longitudes de onda (214, 254 o 280 nm), aunque si el sistema cuenta con un detector de diodos es posible obtener el espectro completo de absorción para cada péptido. La gran eficacia que se obtiene con esta técnica permite la obtención de los denominados mapas peptídicos (Colilla y col., 1991) a partir de digestiones proteicas o de extractos de péptidos en general. La eficacia de esta técnica permite el aislamiento de péptidos para su estudio o identificación posterior (Recio y col., 2000; Fogaça y col., 2004), así como el seguimiento de su evolución durante los procesos en los que existe proteólisis tal y como ocurre en el caso del jamón curado o el queso (Rodríguez-Núñez y col., 1995; Michaelidou y col., 2003).

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria o intercambiador iónico, y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria (Harris, 2006, p.641).

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos etapas: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del buffer con el material por los sitios de unión (Harris, 2006, p.647).

Con base a lo anterior, en el presente estudio se aislará y purificarán los péptidos inhibidores de la ECA presentes en los hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo (*M. pruriens*).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la actividad inhibitoria de la ECA de péptidos aislados y purificados presentes en los hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo (*M. pruriens*).

Objetivos específicos

- Aplicar métodos cromatográficos para aislar y purificar las fracciones peptídicas ultrafiltradas de *M. pruriens* derivadas de la hidrólisis proteínica con Pepsina-Pancreatina.
- Evaluar la actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones peptídicas de *M. pruriens* purificadas por métodos cromatográficos.
- Determinar el peso molecular por CLAR empleando filtración en gel del pico de la fracción aislada y purificada de *M. pruriens*, con mayor % de inhibición de la ECA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento experimental

En la Figura 5 se presenta el diagrama general de la metodología. Se procesaron semillas de *Mucuna pruriens* adquiridas en el sureste Mexicano, para obtener un concentrado proteico, a partir del cual a su vez se obtuvo un hidrolizado empleando el sistema enzimático pepsina-pancreatina, durante 90 min. Dicho hidrolizado se sometió a un fraccionamiento por ultrafiltración utilizando cuatro membranas con diferente corte de peso molecular para obtener cinco fracciones peptídicas; al hidrolizado y fracciones peptídicas derivadas de éste, se les determinó la actividad inhibitoria de la ECA. Se realizó el fraccionamiento biodirigido de la fracción activa, se determinó el perfil por CLAR analítico, se prosiguió con la separación por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE C18-U); a las fracciones obtenidas se les determinó la actividad inhibitoria de la ECA para seleccionar la fracción con mayor bioactividad, dicha fracción se aisló mediante CLAR semipreparativa y se realizó la separación por Exclusión molecular. Finalmente, se obtuvo el peso molecular por filtración en gel (Utilizando estándares) de la fracción *Mucuna pruriens*.

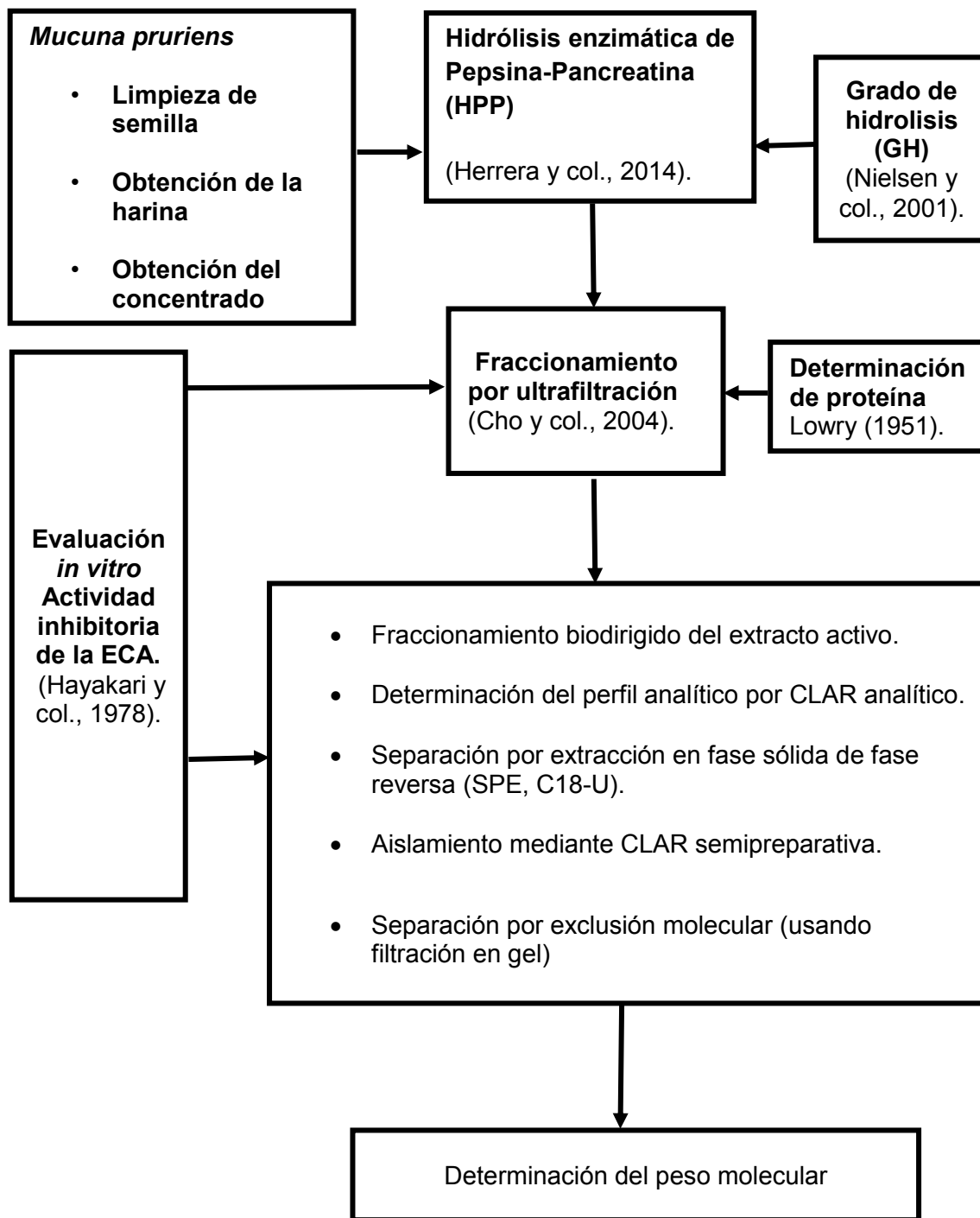


Figura 5. Diagrama general de la metodología.

Materiales

El desarrollo experimental del presente estudio se efectuó con granos de frijol terciopelo (*M. pruriens*) como materia prima adquirida de ejidos productores de la península de Yucatán.

Métodos

Obtención de harinas

Los granos de frijol terciopelo se limpiaron manualmente para eliminar impurezas; se trituraron con un molino de discos, se descascarillaron y se molieron hasta obtener una harina capaz de pasar a través de un tamiz de malla 60.

Obtención de concentrado proteínico

Se empleó la metodología de Lqari y col., (2002). Se pesó 20g de harina de *M. pruriens*; se le agregó 200mL de una solución de hidróxido de sodio (0.2% p/v y pH 12), se agitó por 1 hora. Seguidamente, se centrifugó a 8000 x g por 20 min, el sobrenadante se recuperó, mientras que con el precipitado se realizó dos lavados más siguiendo la metodología antes descrita. Los sobrenadantes se juntaron para después ajustar el pH a 4.0, después se centrifugó a 8000 x g por 20 min. Por último se congeló la muestra precipitada y se liofilizó en un liofilizador Labconco. Posteriormente, se desengraso el concentrado a través de una extracción. La grasa se midió por pérdida de peso de la muestra o por cantidad de muestra removida Nielsen (1998).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se efectuó empleando el método reportado por Herrera y col., (2014), utilizando un sistema enzimático Pepsina-Pancreatina (PP) de manera secuencial durante 90 min. Los parámetros de hidrólisis del sistema Pepsina-Pancreatina fueron: concentración de sustrato 4%, relación enzima sustrato 1/10 p/v, temperatura de 37°C, pH 2 para pepsina y pH 7.5 para pancreatina. El tiempo de reacción fue de 90 min. Durante los primeros 45 min, la hidrólisis se efectuó con la suspensión de Pepsina a las condiciones de hidrólisis mencionadas; seguido de la hidrólisis con Pancreatina, los siguientes 45 min. La hidrólisis se detuvo colocando las muestras en un baño de agua a 80°C durante 20 min y finalmente se centrifugó a 11 200 x g por 20 min con la finalidad de obtener la porción soluble.

Grado de hidrólisis.

Se determinó empleando la técnica de ortoftalaldialdehído (OPA) propuesta por Nielsen (2001), la cual está basada en la determinación de grupos aminos libres. Se preparó una solución madre de L – serina en agua destilada (1.004 mg/mL), para ello se pesaron 50.2 mg de L – serina en 50 mL de agua desionizada. De dicha solución se tomó 150 µL y se añadió 1500 µL de agua desionizada con la finalidad de preparar una solución estándar de serina 1:10. Se realizó una curva de calibración, empleando como estándares diferentes volúmenes en µl obtenidos de la dilución 1:10 de la solución del aminoácido L – serina (Tabla 12) y 1.5 mL del reactivo OPA (reactivo de color).

Tabla 12. Curva de calibración del estándar L-serina

| | H ₂ O (µL) | Testigo: L-serina (µL) |
|-------------------|-----------------------|------------------------|
| Blanco | 200 | 0 |
| Estándar 1 | 150 | 50 |
| Estándar 2 | 100 | 100 |
| Estándar 3 | 50 | 150 |
| Estándar 4 | 0 | 200 |

El reactivo de OPA, se preparó de la siguiente manera: con 100 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS), 3.81 g de tetraborato de sodio y 75 mL de agua destilada. Por otra parte se disolvió 80 mg de OPA en 2 mL de etanol al 98%. Se mezclaron las soluciones anteriores, se agregó 88 mg de DTT, y se aforó a 100 mL con agua destilada. El reactivo de OPA y el testigo (L – serina en agua destilada) se agitaron en un vórtex durante 5 s y las absorbancias fueron leídas a 340 nm, después de 2 min.

Una vez obtenida la curva de calibración de L – serina, se procedió a evaluar el grado de hidrólisis de los hidrolizados del frijol *M. pruriens*, obtenidos con PP. Se prepararon 1000 µL al 1% (p/v) de los hidrolizados en agua desionizada, después se realizaron diluciones 1:10 y 1:3 y se agregó 1.5 mL del reactivo OPA. Esta solución se agitó durante 5 s en vórtex y se determinó la absorbancia a 340 nm después de 2 min. Las absorbancias obtenidas se emplearon para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración de L – serina y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100$$

Dónde:

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

h_{total} = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *M. pruriens*.

Fraccionamiento por ultrafiltración.

Las fracciones solubles de los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron con el sistema secuencial pepsina-pancreatina, fueron sometidas a un fraccionamiento por ultrafiltración (UF) de acuerdo a la metodología propuesta por Cho y col. (2004), utilizando el equipo de ultrafiltración de alto rendimiento (Modelo 2000, Milliporo, Billerica, EE.UU.) utilizando membranas de 1, 3, 5 y 10 kDa de material polietersulfona. Estas fracciones se pasaron a través de cada una de las membranas iniciando con el poro más grande (10 kDa) colectando de manera separada el retenido y el permeado de los mismos. El resultado de la ultrafiltración fueron fracciones peptídicas con diferentes pesos moleculares (>10, 5-10, 3-5, 1-3 y <1 kDa) para el sistema.

Determinación de proteína por el método de Lowry

Se utilizó el método de Lowry (1951); un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añadió un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer. Se pesó 10 mg del aislado proteínico en base seca y se disolvió en 1 mL de agua destilada. Se tomó 100 μ L de muestra diluida, se añadió 100 μ L de NaOH 2 N, se agitó en vórtex 5 segundos, seguidamente se calentó a 100°C durante 10 min. Se enfrió a temperatura ambiente. Se agregó 1mL de reactivo complejo, se agitó y reposó 10 min en la oscuridad. Se agregó 100 μ L de folin y agitó en vórtex 5 segundos. Se dejó reposar 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se leyó a 750 nm la absorbancia. Para la determinación de proteínas se construyó una curva de calibración. La recta de calibrado se determinó usando un patrón de albúmina bovina con una concentración de 1000 mg/L que se diluyó para obtener concentraciones en el intervalo 50 - 400 mg/L. Se aplicó una regresión lineal donde se representó la función exponencial de los valores de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína en mg/L. Una vez medidas las absorbancias de las muestras siguiendo el procedimiento indicado se determinó la concentración de proteínas a partir de la recta de calibrado y teniendo en cuenta el factor de dilución.

Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de acuerdo al método de Hayakari y col. (1978).

Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA a los derivados proteínicos de *M. pruriens* de acuerdo al método de Hayakari y col. (1978) en la cual la ECA hidroliza el Hipuril – L – Histidil – L – Leucina hasta ácido hipúrico e His – Leu. Este método se basa en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con TT (2, 4,6-tricloro-triasina). A 20 μ L de solución de ECA (100 mU/mL) se adicionó 40 μ L de péptido inhibidor y se incubó a 37°C por 5 min. Posteriormente, se añadió 100 μ L de HHL (hipuril histidil leucina) preparado a una concentración de 0.3% en un mezcla de buffer de fosfato de potasio 40 μ mol y buffer de cloruro de sodio 300 μ mol previamente ajustados a pH 8.3 con HCl o

NaOH 1 M; y se incubó a 37°C por 45 min. La reacción se detuvo por la adición de 360 µL de solución TT en dioxano (3% p/v) y 720 µL buffer de fosfato 0.2 M (pH 8.3). Finalmente, se centrifugó a 10,000 x g por 10 min. Del sobrenadante se obtuvo la absorbancia a 382 nm. Esta actividad biológica se determinó por triplicado al hidrolizado y sus fracciones peptídicas siguiendo las condiciones establecidas en la Tabla 13.

Tabla 13. Orden de adición de reactivos para la inhibición de la ECA-I.

| Reactivos | A | B | C |
|--|-------------|-------------|------------|
| | Muestra(µL) | Control(µL) | Blanco(µL) |
| ECA-I (incubada a 37 °C) | 20 | 20 | 20 |
| Solución de TT/dioxano al 3% | No | No | 360 |
| Hidrolizado | 40 | No | No |
| Incubar por 5 min a 37 °C | Sí | No | No |
| Solución HHL 0.3% (incubada a 37 °C) | 100 | 100 | 100 |
| Incubar y agitar suavemente 45 min a 37 °C | Sí | Sí | Sí |
| Solución de TT/dioxano al 3% | 360 | 360 | No |
| Mezcla de buffer | No | 40 | 40 |
| Buffer de fosfato 0.2 M | 720 | 720 | 720 |

Agitar durante 15 s y centrifugar a 10 000 x g durante 10 min. Tomar 1 mL del sobrenadante y leer la absorbancia a 382 nm.

El valor de IC₅₀ de la fracción bioactiva purificada final, los estándares de captopril y lisinopril, se definieron como la concentración de péptidos requeridos para inhibir en un 50% la actividad de la ECA y se determinaron por análisis de regresión del porcentaje de inhibición de la ECA (%) contra la concentración de péptidos.

El porcentaje de actividad inhibitoria de la ECA y la concentración de la fracción peptídica bioactiva y los estándares necesarios para inhibir en un 50% la actividad de la ECA (IC₅₀) se determinaron con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Act} = (A - B)/(A - C) \times 100.$$

Donde A representa la absorbancia en presencia de la muestra y ECA, B la absorbancia del control y C la absorbancia de la reacción blanco.

$$IC_{50} = (50 - b)/m$$

Donde b es la intersección y m es la pendiente obtenida de la ecuación de la recta.

Determinación del perfil cromatográfico por CLAR analítico

Las fracciones separadas por peso molecular que demostraron ser activas se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), empleando un equipo CLAR binario Varian 211 con una columna de fase reversa LUNA C18 (100 Å, 5 µm, 250x4.6 mm); como fase móvil se emplearon mezclas de acetonitrilo:agua con 0.1% de ácido trifluoroacético en un gradiente de 0 a 50% de acetonitrilo en 30 min de corrida; las condiciones del detector registraron temperatura de nebulización de 40°C, temperatura de evaporación de 70°C; flujo de nitrógeno de 1 mL/min y detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), y ultravioleta (UV) a 325nm.

Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE)

A fin de prefraccionar y eliminar las sales presentes en la fracción de 1-3 kDa (F2) con mayor actividad biológica, se realizó una extracción en fase sólida utilizando un cartucho C18-U Phenomenex Strata®, el cual previamente se lavó con 5 mL de MeOH y acondicionó con 5 mL de agua destilada. Luego, se aplicaron 2 mL de muestra (200 mg disueltos en agua grado HPLC) de la fracción activa, para enseguida eluir mediante un gradiente de 5 mL de: 1) agua 100%, 2) Agua: AcN 95:5%, 3) Agua: AcN 90:10%, 4) Agua: AcN 80:20% y Agua: AcN 50:50%. Para cada fracción, se procedió a su liofilización, pulverización, cálculo de rendimiento y evaluación biológica. Se puede observar en la tabla 14 las eluciones realizadas a la fracción de 1-3 kDa (F2).

Tabla 14. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción con mayor actividad biológica después de la separación por CLAR analítico.

| Fracción | Elución correspondiente | Fase móvil (mL) |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Fracción de 1-3 kDa (F2) | Muestra | 2 |
| | H ₂ O 100 % | 5 |
| | H ₂ O:AcN 95:05 % | 5 |
| | H ₂ O:AcN 90:10 % | 5 |
| | H ₂ O:AcN 80:20 % | 5 |
| | H ₂ O:AcN 60: 40 % | 5 |
| | H ₂ O:AcN 50:50 % | 5 |

La fracción con mayor actividad biológica se reprodujo, se analizó su perfil cromatográfico mediante CLAR C18 y se reanudo la separación.

Aislamiento de la fracción con mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante CLAR semipreparativa.

Para aislar la fracción con mayor actividad inhibitoria de la ECA obtenida de la separación por extracción en fase sólida de fase reversa, se generó una solución de la

muestra (10 mg/100 μ L) la cual fue inyectada (20 μ L por inyección) en un sistema de CLAR utilizando el siguiente método: se utilizó una columna LUNA (C18, fase reversa, 5 μ m C8 100 Å, LC Column 30 x 2 mm, Phenomenex, Inc., USA). Como fase móvil agua (A): acetonitrilo (B), en un gradiente de 0 a 15 % B en 8 min y de 15 a 35 % B en 25 min, para regresar a la condición inicial 5 min después (100 % A). Detector de U.V. a 325 nm. Se colectaron los volúmenes de elución que en el cromatograma registraron señales significativas en los t_R : 6-12 min (F1), 12-14 min (F2) y 14-25 min (F3), posteriormente se les realizó a las fracciones la prueba de inhibición de la ECA eligiendo la fracción con mayor bioactividad.

Separación por exclusión molecular en CLAR (Yarra SEC-2000)

La separación se realizó para obtener cortes moleculares más finos de la fracción con mayor actividad biológica (F2_2_2, minuto: 16-18) obtenida de la colecta de las fracciones provenientes de CLAR semipreparativa, empleando una columna Yarra SEC-2000 (1-300 kDa, 145 Å, 3 μ m, 300 x 7.8 mm) por CLAR, empleando un equipo CLAR binario Varian 211, bajo flujo isocrático de agua/AcN 90:10 por 30 min, con lectura a 325 nm.

Determinación del peso molecular por CLAR empleando filtración en gel

Se utilizó una columna Yarra SEC-2000 por CLAR, empleando un equipo CLAR binario Varian 211, bajo flujo isocrático empleando como fase móvil una disolución amortiguador de fosfatos 0.2 M con pH de 8.3. Se preparó con 610 mL Na_2HPO_4 /390 mL NaH_2PO_4 , pH 7 (detector de UV a 215 nm).

Se emplearon como estándares la glicina (0.1312 KDa, Sigma-Aldrich, G2879) y bacitracina (1.422 KDa, Sigma-Aldrich, B0125), cada uno en soluciones de 4 mg/mL, de los cuales se inyectaron al sistema 20 μ L independientemente; además de un análisis más con la mezcla de los tres para determinar si existían interacciones entre ellos que afectarían la separación. La determinación se realizó al relacionar el peso molecular en función del tiempo de retención y compararlo con el de la muestra.

DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se procesaron mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Los datos obtenidos de la hidrólisis del concentrado proteínico y de las actividades biológicas de las fracciones aisladas y purificadas se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía y comparación de medias para establecer las diferencias ($p < 0.05$) entre las muestras evaluadas. Todos estos análisis se efectuaron utilizando los paquetes computacionales Statgraphics Plus Versión 5.1, de acuerdo a los métodos señalados por Montgomery (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención de concentrado proteico

En el presente estudio, el concentrado proteico de *M. pruriens*. Exhibió un $71.29\% \pm 0.46$ de proteína en base seca, muy por arriba de lo reportado por Segura y col., (2008), Galicia y col., (2013), Herrera y col (2014b) y Martínez y col., (2017) (42, 38, 48 y 46.03%, respectivamente) y, guarda similitud a lo reportado en otros alimentos tales como el grano de *Canavalia ensiformis* (71%) (Betancur, y col., 2008) y a lo reportado por Torruco (2008) para *Phaseolus lunatus* (71.8%). Sin embargo, se observó menor porcentaje respecto al garbanzo (83%), girasol (97%) (Vioque, y col., 2001), frijol mungo (*Vigna radiata*) (82%) (Guerra, 2014) y salvado de arroz (75%) (Bravo, y col., 2013). Estas diferencias de contenidos de proteína hallados en *M. pruriens*, con respecto a los reportados por otros investigadores, se debieron al proceso de desengrasado del concentrado proteínico, sin embargo es importante considerar las condiciones de cultivo, especie, madurez del grano, composición original de la materia prima así como las condiciones del método empleado en la obtención del concentrado proteico (Betancur y col., 2009).

Hidrólisis enzimática

El proceso más habitual utilizado en la obtención de biopéptidos, es la hidrólisis enzimática debido a que asemeja al proceso digestivo, haciéndose una forma ideal para metabolizar las proteínas, de fácil condición de operación, control de proceso y que conserva la calidad de la proteína así como su valor biológico (Segura y col., 2013). Para que un péptido posea actividad biológica, la hidrólisis de sus enlaces peptídicos debe representar más de un 10% de su proteína original. En este estudio, el grado de hidrólisis (GH) del hidrolizado proteico con pepsina pancreatina (HPP) de *M. pruriens* fue de $34.85\% \pm 0.06$. Esto permite clasificar al hidrolizado de tipo “extensivo” o con un alto grado de hidrólisis (>10%), lo cual de acuerdo con Vioque y col., (2006), se esperaría que dicho hidrolizado presente actividad biológica y pueda ser potencialmente utilizado en alimentación especializada, ya sea como suplemento proteico o para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos.

El grado de hidrólisis de HPP de *Mucuna pruriens* obtenido en el presente estudio ($34.85\% \pm 0.06$), en comparación con otros (Figura 6) resulto, menor al reportado por Herrera y col., (2014) de 40.15% obtenido secuencialmente con PP durante 90 min con *Mucuna pruriens* y Segura y col., (2010) con un 35.7% de grado de hidrólisis obtenido secuencialmente con PP durante 90min en *V. unguiculata*. Sin embargo, es mayor a lo reportado por Martínez y col., (2017) que obtuvo el $20.46\% \pm 2.09$ de GH con *Mucuna pruriens*; Castillo y col., (2015), que obtuvo un GH de 21.36% con *Mucuna pruriens* y, Segura – Campos y col. (2013) quienes reportan un grado de hidrólisis de 24.78% al hidrolizar igual concentrado proteínico de *M. pruriens* durante 120min con PP. En comparación con otras variedades de leguminosas también fue mayor con respecto a lo reportado por Tello y col., (2010) quienes obtuvieron un 32.16% utilizando PP en *P. lunatus* durante 60min; Tovar (2011) al hidrolizar enzimáticamente frijol terciopelo con PP de manera secuencial (32.49%) y Marrufo (2008) al hidrolizar un concentrado proteínico de *J. curcas* con PP 90 min (21.1%).

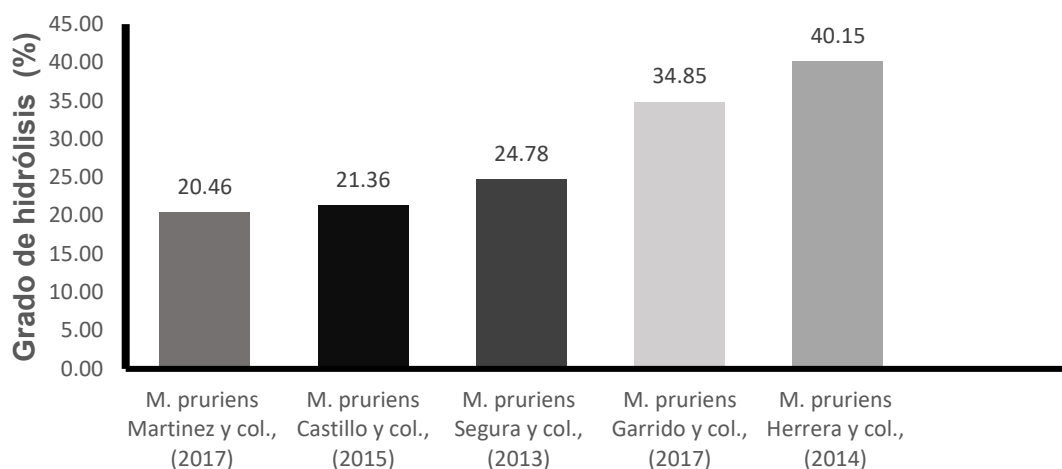


Figura 6. Comparación de estudios realizados de grado de hidrólisis de *M. pruriens*.

El valor elevado de este sistema secuencial con PP, se debió probablemente a la acción combinada de las enzimas, es decir, que su acción proteolítica fue potencialmente mayor, ya que ambas son endoproteasas que actúan sobre enlaces peptídicos que contienen aminoácidos aromáticos. Este sistema ha sido empleado en varios trabajos (Tello y col., 2010; Betancur y col., 2010; Vermeirssen y col., 2004), ya que su acción hidrolítica genera péptidos que pudieran ser capaces de atravesar el tracto gastrointestinal en forma intacta y ejercer sus actividades biológicas (Segura, 2010).

Fraccionamiento por ultrafiltración

De acuerdo con Berot y col. (2001) la actividad biológica de los péptidos está relacionada con su peso molecular. Con la ultrafiltración es posible aislar la fracción peptídica de interés funcional según su tamaño molecular, aunque también se puede usar como medio para concentrar extractos de péptidos.

La porción soluble del hidrolizado del sistema enzimático PP, se fraccionó por ultrafiltración, obteniéndose cinco fracciones peptídicas de diferente corte de peso molecular: > 10, 5 – 10, 3 – 5, 1 – 3 y < 1 kDa.

El contenido de proteína de las fracciones obtenidas de HPP osciló entre 0.327 y 2.044mg/mL (Figura 7).

En este sistema el contenido de proteína disminuyó de manera proporcional al peso molecular de las membranas empleadas en la concentración de las fracciones del hidrolizado proteínico, observándose la mayor cantidad de proteína en la fracción >10 kDa y la menor en la fracción <1 kDa, resultando similar a lo reportado por Herrera (2014) quien obtuvo entre 0.088 y 1.813mg/mL de proteína en fracciones de *M. pruriens* obtenidas de HPP al igual que Ruiz (2010), al hidrolizar frijol endurecido secuencialmente durante 90min con el mismo sistema enzimático y obtener fracciones peptídicas con un contenido proteínico entre 0.1663 y 1.6192mg/mL así como Segura (2010) al hidrolizar

secuencialmente 90 min *V. unguiculata* y obtener fracciones con un contenido proteínico entre 0.1094 y 1.1671mg/mL.

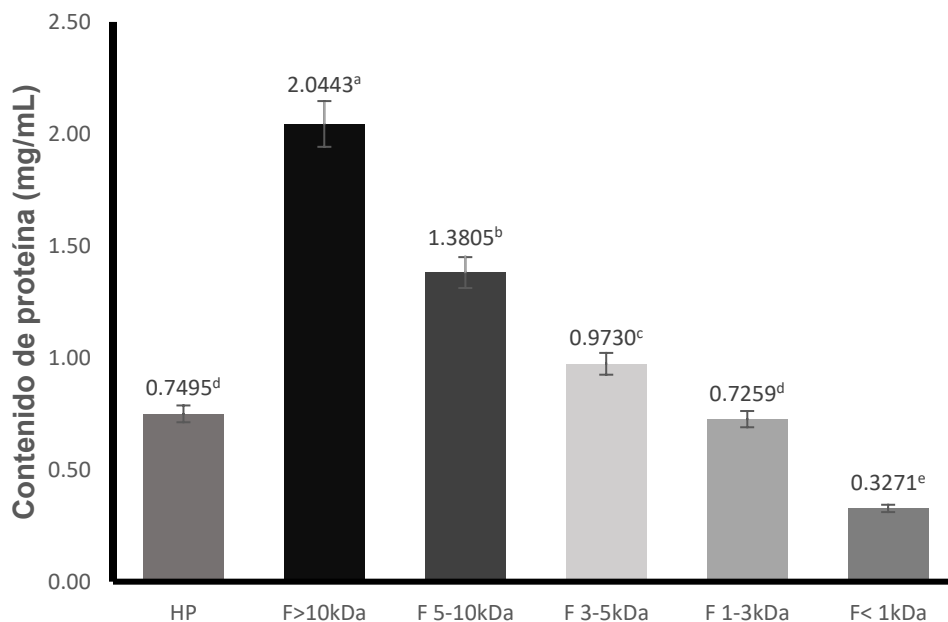


Figura 7. Contenido de proteína (mg/mL) del hidrolizado proteico (HP) y las fracciones ultrafiltradas peptídicas de *M. pruriens* (F). Obtenidas por el método de Lowry. Resultados expresados medias \pm DS (n=3). ^{a-e}Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05).

Considerando que generalmente los péptidos con actividad biológica suelen tener entre 3 y 20 aminoácidos (Pihlanto-Leppälä, 2000) y la mayoría de los que presentan actividad inhibitoria de la ECA son de pequeño tamaño (tripéptidos y dipéptidos), resulta adecuado efectuar una etapa de preconcentración de los péptidos antes de llevar a cabo la fase analítica. En este estudio la ultrafiltración permitió obtener fracciones enriquecidas con péptidos de tamaños específicos; es decir, las membranas de menor corte de peso molecular generaron fracciones ultrafiltradas constituidas con péptidos de secuencias cortas, los cuales de acuerdo con la literatura suelen presentar mayor bioactividad, por ejemplo, antihipertensiva (Gómez-Ruiz y col., 2004, Hernández-Ledesma y col., 2005, Pihlanto-Leppälä y col., 2000).

Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de acuerdo al método de Hayakari y col. (1978).

Se evaluó la actividad inhibitoria del hidrolizado de pepsina pancreatina y las 5 fracciones obtenidas del fraccionamiento por ultrafiltración. En la Tabla 15, se observan las concentraciones de las muestras evaluadas.

Tabla 15. Ajuste de la concentración de proteína de las muestras diluidas en mezcla de buffer de fosfato de potasio 40 μmol y buffer de cloruro de sodio 300 μmol previamente ajustados a pH 8.3 con HCl o NaOH 1 M.

| Muestra | mg/mL de proteína | μL muestra | μL mezcla de buffer |
|-----------|-------------------|-----------------------|--------------------------------|
| HP | 0.7495 | 5 | 195 |
| F>10kDa | 2.0443 | 2 | 198 |
| F 5-10kDa | 1.38050 | 3 | 197 |
| F 3-5kDa | 0.97300 | 4 | 196 |
| F 1-3kDa | 0.72590 | 6 | 194 |
| F< 1kDa | 0.3271 | 12 | 188 |

Se registró mayor actividad inhibitoria de la ECA en la fracción mayor de 10kDa, seguida por la fracción de 1-3 kDa (Figura 8).

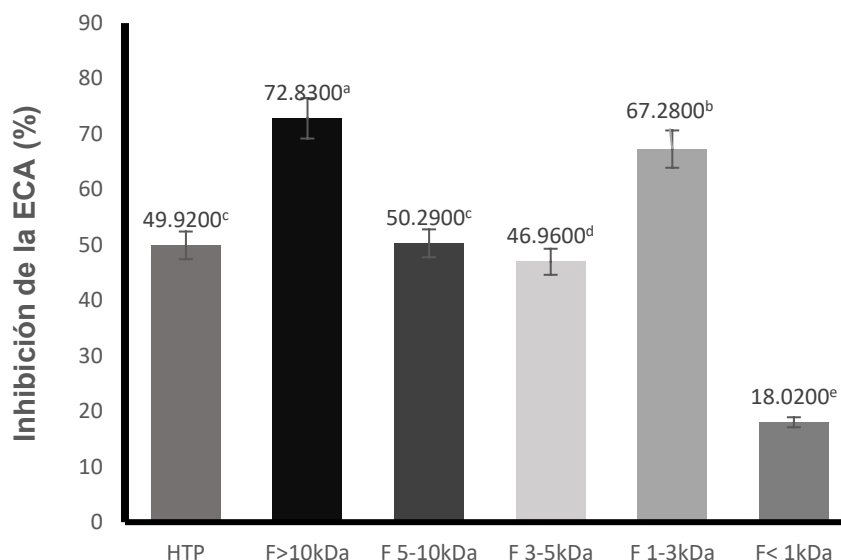


Figura 8. Valores del porcentaje de inhibición de la ECA de las fracciones ultrafiltradas de HPP. Resultados expresados medias \pm DS (n= 3). ^{a-e}Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05).

La actividad inhibitoria de la ECA siempre es analizada de manera *in vitro*, lo cual implica que se efectúa a una concentración constante de la enzima en presencia de un intervalo de concentraciones del péptido analizado y de un fármaco inhibidor sobre sustratos sintéticos constituidos por di y tri péptidos amino substituidos, tales como la dansiltriglicina (Elbl y Wagner, 1991), el hipuril-L-histidil-L-leucina (Nakamura y col., 1995) o el 2-furanacrilol-L-fenilalanil-L-glicil-L-glicina (Vermeirssen y col. 2003),

haciendo la detección vía espectrofotométrica, fluorométrica o cromatográfica. El tipo de inhibición y la constante de inhibición (K_i) se determinan utilizando curvas tipo Lineweaver–Burk (Tsai y col., 2008).

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre la actividad inhibitoria de la ECA y el peso molecular de las fracciones peptídicas. Noh y Song (2001) establecen que el fraccionamiento de hidrolizados proteínicos utilizando membranas de corte molecular de 1000 Da es un método útil en la purificación de inhibidores potenciales de la ECA debido a que la mayoría de las sustancias reportadas con este tipo de actividad biológica presentan pesos moleculares menores o cercanos a ese peso molecular (Ma y col., 2006). Robert y col. (2004) utilizando fracciones peptídicas procedentes de la hidrólisis de la caseína, así como Hernández y col. (2004) empleando fracciones peptídicas obtenidas de la hidrólisis de diferentes productos lácteos, observaron un comportamiento similar sobre la actividad inhibitoria de la ECA. Sun y col. (2004), señalan que péptidos de bajo peso molecular aislados de *G. lucidum* son los que presentan una mayor bioactividad; éste comportamiento también ha sido reportado por Miguel y col. (2007) en hidrolizados de huevo con pepsina quienes obtuvieron una mayor actividad inhibitoria de la ECA en las fracciones menores a 3 kDa. A este respecto, Mao y col. (2007) concluyen que a menor peso molecular, mayor es la actividad inhibidora de la ECA de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de un hidrolizado de caseína ($> 10\text{kDa} = 23\%$, $6 - 10\text{kDa} = 29.2\%$, $< 6\text{kDa} = 85.4\%$). Así mismo, hidrolizados fraccionados por ultrafiltración de *P. vulgaris* y su relación con la actividad inhibitoria de la ECA, para un sistema secuencial AF y PP mostraron un mayor efecto inhibitorio conforme disminuyó el tamaño molecular de las fracciones, registrándose la mayor bioactividad en la fracción $< 1\text{kDa}$ de ambos sistemas (Ruiz, 2010), en el presente estudio se observó en las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de *M. pruriens* que las fracciones con mayor actividad inhibitoria de la ECA se encuentran en las fracciones 1-3 kDa y $>10\text{kDa}$.

Determinación del perfil cromatográfico por CLAR analítico

Las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de *M. pruriens* con mayor actividad inhibitoria de la ECA fueron la fracción $> 10\text{kDa}$ (F1) con el 72.83% de actividad inhibitoria de la ECA y la fracción de 1-3 kDa (F2) con 67.28% de actividad inhibitoria de la ECA. Sin embargo, por ser un estudio biodirigido que tiene como propósito la purificación de péptidos, se seleccionó F2 para continuar la purificación. La fracción F2 previamente seleccionada se analizó por CLAR analítico. Se observaron diferentes tamaños de picos en distintos tiempos de retención (t_R) por lo que se podría sugerir la existencia de péptidos con potencial actividad biológica (Figura 9). La complejidad del cromatograma entre 2-27 min sugiere la presencia de péptidos. Se eliminó de la fracción F2 las sales y analitos de interferencia empleando un cartucho C18 por extracción en fase sólida. Se realizó la prueba de bioactividad a la muestra sin sales y analitos de interferencia, observándose el $60\% \pm 1.31$ de porcentaje de inhibición de la ECA. Estudios realizados por Imen y col. (2015) reportaron el perfil por CLAR de hidrolizados de proteína con proteasas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* el cual reveló un gran número de picos relacionados con la abundancia de péptidos generados, y algunos de éstos mostraron además actividad inhibitoria de la ECA.

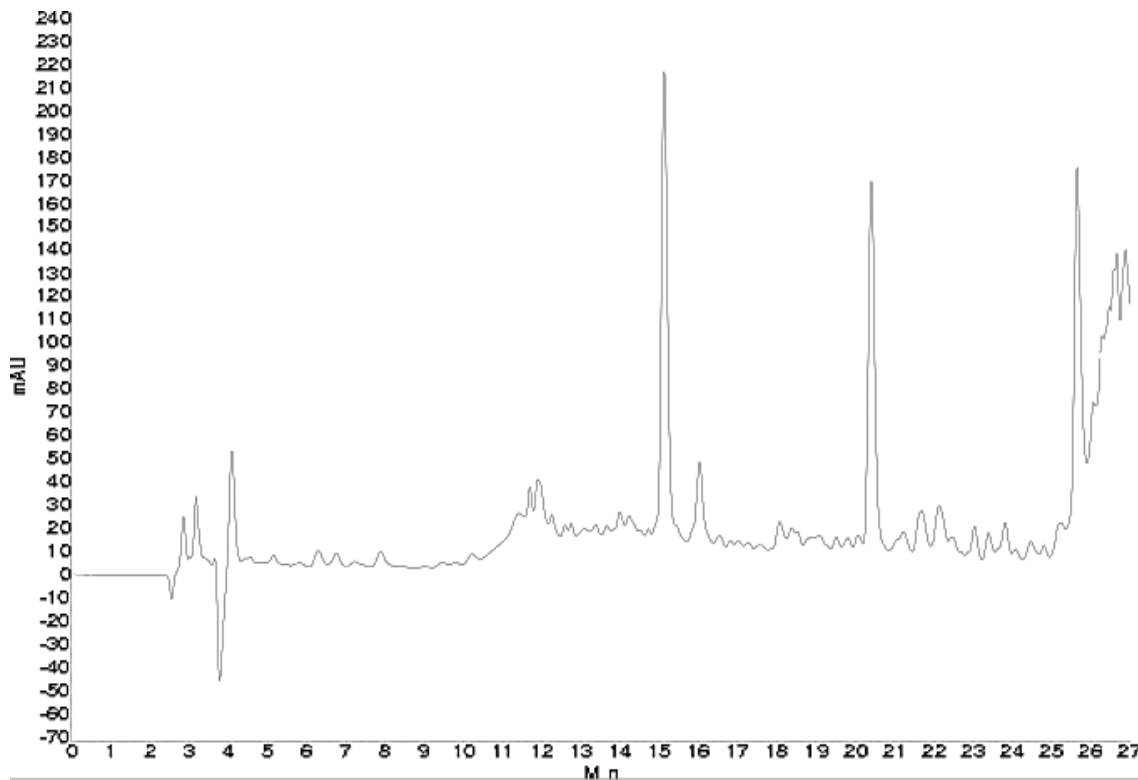


Figura 9. Cromatograma de la fracción completa de 1-3 kDa (F2).

Separación por extracción en fase sólida de fase reversa (SPE, C18-U).

Se eliminó de la fracción completa de 1-3 kDa (F2) interferencias, logrando evitar que no causen problemas para la detección y cuantificación de analitos de interés, seguidamente se separó por SPE C18 a través de eluciones mediante un gradiente de 5 mL observados en la primera columna de la tabla 16, lo que permitió, por una parte eliminar las sales en la fracción y por otra, prefraccionar mediante polaridad.

Se evaluó la actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas por SPE C18 de la fracción F2 (F2_1, F2_2, F2_3, F2_4 y F2_5) registrando mayor actividad la subfracción F2_2, seguida por la subfracción F2_1 ($44.805\% \pm 0.27$) y F2_3 (58.333 ± 0.60). Las cinco fracciones separadas mostraron diferencia estadística significativa siendo el rango de porcentaje de inhibición entre $9.574 \pm 1.23\%$ y $58.333 \pm 0.60\%$. Para determinar el porcentaje de inhibición de las fracciones se utilizó $200\mu\text{g}$ de proteína/mL.

En la Tabla 16 se observa el rendimiento de la fracción eluida a diferentes concentraciones de Agua: AcN. Se observan pérdidas de muestra debido a la baja retención de analitos polares. Para la fracción F2 se observa que el 84.633% de la fracción eluye con un 100% de agua, debido a la presencia de sales. Por lo anterior, las demás fracciones no suman más del 15.36% de la fracción original. La evaluación biológica demostró que la mayor actividad se registró en la elución 90:10 ($58.33\% \pm 1.23$). Así, la fracción F2_2 fue analizada por CLAR (Figura 10) para evaluar su complejidad química.

Tabla 16. Rendimiento y evaluación biológica de fracciones obtenidas por SPE C18 de la fracción F2.

| Fase móvil (5 mL) | Cantidad | Rendimiento | Inhibición ECA |
|----------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Elución Agua: Acetonitrilo | (mg) | % | % |
| 95: 05 (F2_1) | 11.9±0.26 ^d | 1.98±0.24 ^c | 44.805 ^b ±0.27 |
| 90:10 (F2_2) | 21.7±0.12 ^b | 3.61±0.48 ^b | 58.333 ^a ±0.60 |
| 80:20 (F2_3) | 27.8±0.39 ^a | 4.63±0.32 ^a | 24.107 ^d ±1.0 |
| 60:40 (F2_4) | 19.8±0.02 ^c | 3.33±0.26 ^b | 28.571 ^c ±0.56 |
| 50:50 (F2_5) | 11±0.16 ^d | 1.83±0.13 ^c | 9.574± ^e 1.23 |

*Se utilizó 600mg de muestra del cual 507mg no se retuvieron en la columna correspondiente a moléculas polares. Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia estadística significativa entre las cantidades que se obtuvieron, el rendimiento y el % de inhibición de las fracciones separadas por SPE C18. Los datos son expresados en media±DS (n=3). ANOVA p<0.05.

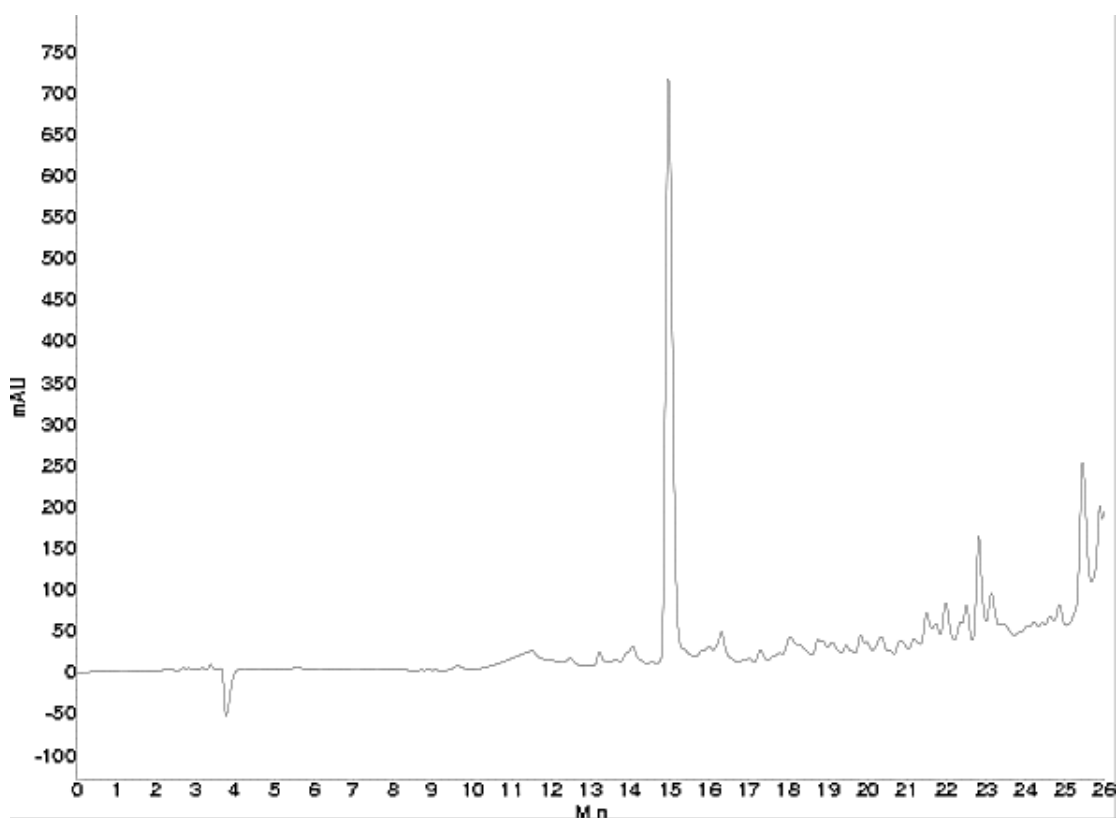


Figura 10. Cromatograma de la fracción F2_2 (fracción de 1-3 kDa, elución Agua: AcN 90:10), obtenida de SPE C18.

Analizando los resultados y comparando los tiempos de retención (t_R) y los porcentajes de inhibición de la ECA *in vitro* previamente registrados en la Tabla 16 y Figura 10, se decidió seguir purificando a la subfracción F2_2 debido a que presentó el mayor porcentaje de actividad inhibitoria de la ECA.

Aislamiento de la fracción con mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante CLAR semipreparativa.

Se aisló y colectó la fracción F2_2 la cual registró mayor actividad inhibitoria de la ECA; la colecta se llevó a cabo de acuerdo a los siguientes t_R : 6-12min (F2_2_1), 12-14 min (F2_2_2) y 14-25 min (F2_2_3), respectivamente (Figura 11).

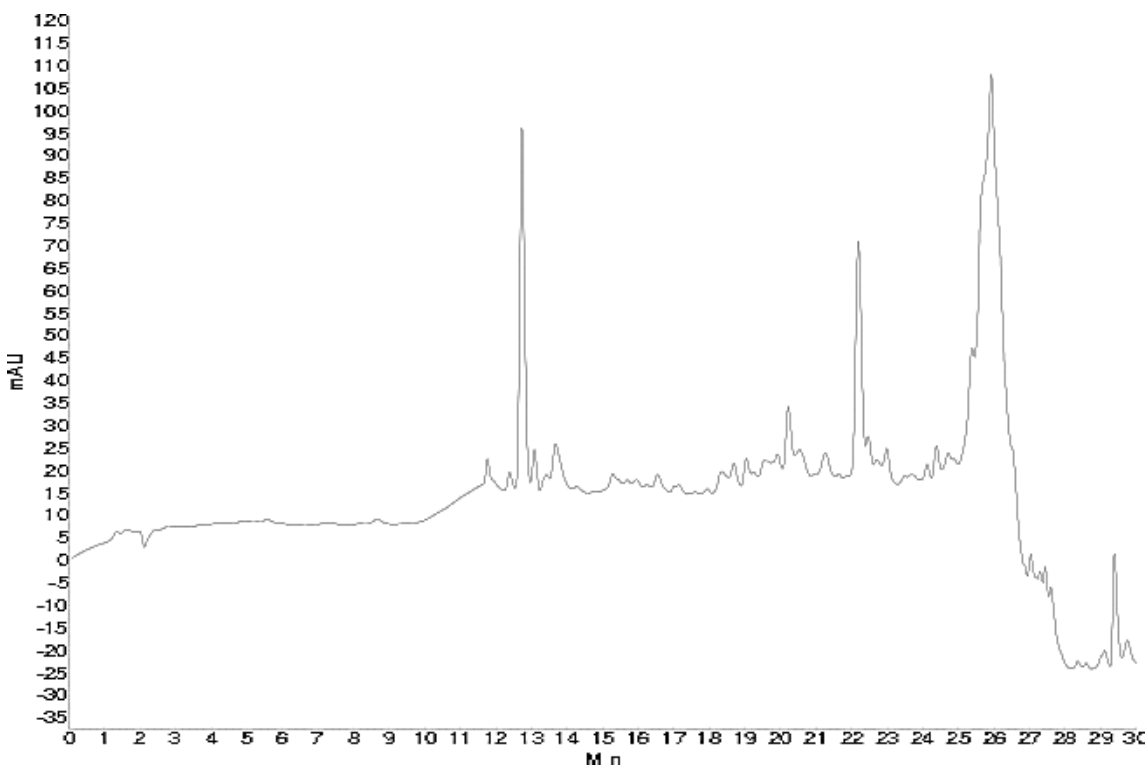


Figura 11. Cromatograma de la Fracción F2_2, analizada por CLAR semipreparativa.

La colecta de subfracciones obtenidas por CLAR semipreparativa se obtuvo separando los volúmenes de elución que se observan en el cromatograma de la Figura 10. Se registraron señales cromatográficas en los tiempos 6-12, 12-14 y 14-25 min. El principal objetivo de colectar muestra a través de CLAR semipreparativa fue para continuar purificando y evaluando la bioactividad de las subfracciones. Las fracciones que eluyeron antes de los 6 min no fueron recolectadas porque se ha reportado en la literatura que al efectuar la purificación en estas mismas condiciones, las fracciones que eluyen al principio no presentan actividad de inhibición de ECA, o bien, las inhibiciones han sido bajas comparadas con las fracciones que van eluyendo posteriormente y que son, precisamente, fracciones con mayor porcentaje de hidrofobicidad. Esta peculiaridad ha sido observada en la purificación de hidrolizados de garbanzo (Pedroche y col., 2002b), en hidrolizados de colza (Pedroche y col., 2004b) y en hidrolizados de girasol

(Megías y col., 2004). Se ha sugerido que esto es debido a que los péptidos inhibidores de ECA son ricos en aminoácidos hidrofóbicos (Meisel, 1999), que provocan mayores tiempos de retención en una columna cromatográfica hidrofóbica (Yust y col., 2003).

Se realizó la prueba de bioactividad a las subfracciones eluidas en diferentes t_R , de 6-12min (F2_2_1), 12-14min (F2_2_2) y 14-25min (F2_2_3), con la finalidad de seguir el proceso de separación, obteniendo los resultados reportados en la Figura 12. Se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 fracciones obtenidas con un nivel del 95.0% de confianza. La media de la bioactividad para cada subfracción fue de $4.0\% \pm 0.2^c$ para la F2_2_1; $48.57\% \pm 0.26^b$ para F2_2_2 y $55.55\% \pm 1.38^a$. Se seleccionó a la subfracción eluida en el menor tiempo, con actividad biológica del $t_R = 13.00 \pm 1.41$ (F2_2_2), esto con el fin de obtener una sola señal con actividad biológica significativa.

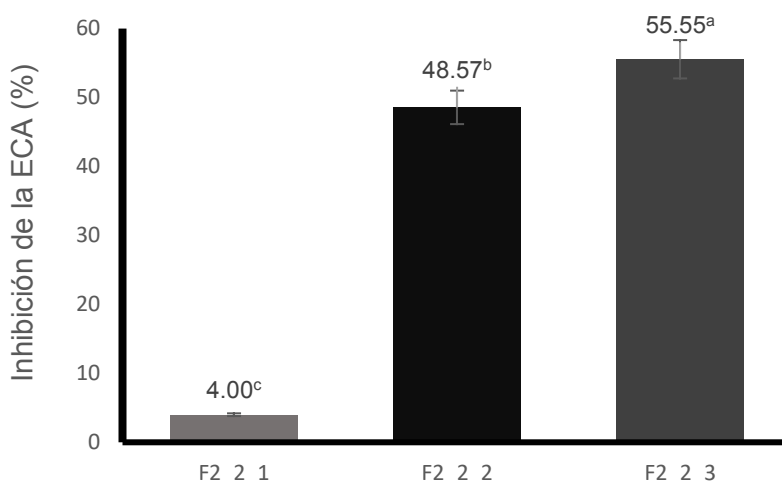


Figura 12. Porcentaje de inhibición de la ECA de las subfracciones F2_2_1, F2_2_2 y F2_2_3 obtenidas de SPE C18 y colectados a través de CLAR semipreparativa. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

Separación por exclusión molecular en CLAR.

La subfracción aislada previamente en la etapa semipreparativa (F2_2_2), fue analizada por filtración en gel con una columna Yarra-2000, con un rango de trabajo de 1 a 300 kDa que permitió observar la presencia de un pico prominente observado en el t_R de 15.20-17.30 min (16.25 ± 1.48) de la muestra F2_2_2 (Figura 13). La decisión de llevar a cabo la separación de la fracción F2_2_2 por peso molecular se tomó como medida para acotar más finamente el rango de tamaño de las moléculas; es decir, primero se consideró obtener pocas fracciones que pudiesen ser evaluadas, para, posteriormente, con la fracción activa, realizar un nuevo corte que diera un indicio más claro del peso molecular real, ya que aquí el corte se hace en una fracción donde los pesos esperados se restringen a un intervalo de 1 a 3 kDa.

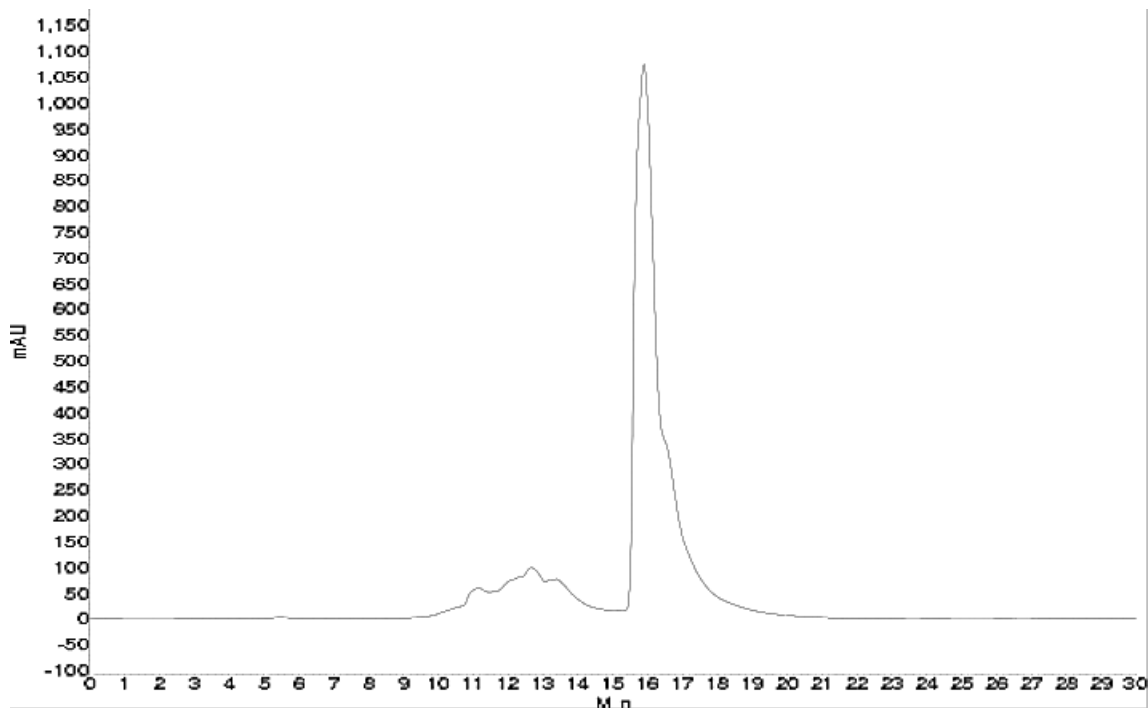


Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de la fracción F2_2_2.

Se evaluó la actividad inhibitoria del pico aislado F2_2_2 (2.499mg/ml) t_R : 16.25 ± 1.48 registrando $48.57\% \pm 0.26$ de porcentaje inhibición de la ECA. Se comparó con el % del valor de inhibición de los fármacos cardioprotectores estándares captopril y lisinopril. Se determinó el IC_{50} de la inhibición de la ECA del captopril ($10.85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.680$) y lisinopril ($12.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.66$) con respecto al IC_{50} de la fracción previamente aislada y purificada F2_2_2 ($713.578 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 1.09$). Lo anterior, indicó que el pico aislado F2_2_2 tiene menor actividad en comparación con los fármacos evaluados, por lo que se tendría que utilizar mayor cantidad de la muestra para obtener la concentración igual o similar del IC_{50} obtenido con el captopril y el lisinopril por lo que el potencial del captopril sigue siendo el de mayor efectividad (Figura 14).

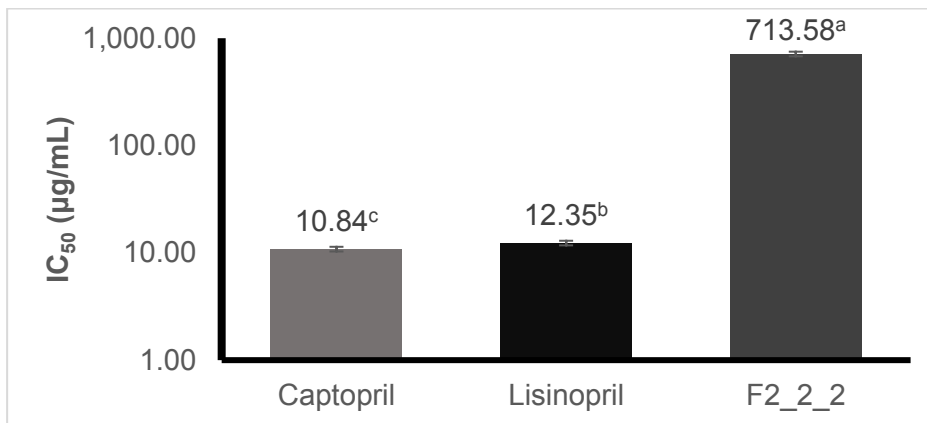


Figura 14. Valores de IC_{50} de los estándares cardioprotectores (captopril y lisinopril) comparados con el IC_{50} de la muestra. ^{a-c}Letras diferentes indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

El análisis estadístico indicó que si existió diferencia significativa entre los valores de IC₅₀ de los estándares cardioprotectores y la muestra. En un estudio realizado por Susmita y col., (2013) reportó que la inhibición de ECA (%) por lisinopril es de 99.29% a 13 µg/mL con respecto a diferentes contenidos totales de fenoles y flavonoides de 19 frutos estudiados obtenidos por purificación.

Herrera y col., (2014) reportó la purificación por CLAR fase reversa de la fracción < 1kDa obtenida con el sistema PP, la cual generó fracciones peptídicas con una mayor actividad inhibitoria de la ECA en comparación con el hidrolizado total y las demás fracciones ultrafiltradas. Los valores de IC₅₀ oscilaron entre 2.7 y 6.2 µg/mL; no se observó un incremento del efecto inhibitorio de la ECA conforme eluyeron las fracciones peptídicas, similar a lo reportado por Segura (2010) en sus estudios con *V. unguiculata* con Flavourzyme® al obtener la fracción 4-2 con tiempo de retención entre 4 y 7 min con mayor bioactividad entre las fracciones evaluadas por Herrera y col., (2014). Los resultados obtenidos en éste estudio si mostraron una relación directa entre los t_R de 15.20-17.30 min (16.25±1.48) de la muestra F2_2_2 y la actividad inhibitoria de la ECA (48.57%±0.26) tal como mencionan Pedroche y col. (2002; 2004) y Megías y col., (2006) en sus estudios con garbanzo, colza y girasol, respectivamente quienes encontraron que los péptidos con un mayor tiempo de retención en una columna en fase reversa son los que registran una mayor actividad inhibitoria de la ECA por constituirse principalmente de aminoácidos hidrofóbicos.

Las fracciones peptídicas purificadas en este estudio presentaron una menor actividad inhibitoria de la ECA comparado con Herrera y col. (2015) y Quist y col., (2009) quienes hallaron tres fracciones peptídicas colectadas por CLAR fase reversa entre 60 y 78 min con valores de IC₅₀ entre 7.93 y 65.86 µg /mL en un hidrolizado con PP a partir de proteína de cacahuete; un comportamiento diferente se observó al comparar los resultados obtenidos por Yang y col., (2003) quienes obtuvieron cuatro secuencias aminoácidas, MRWRD, MRW, LRIPVA y IAYKPAG por CLAR fase reversa, colectadas entre 20 – 40 min en el hidrolizado con Pepsina-Pancreatina a partir de la proteína rubisco aislada de espinaca con valores de inhibición de 2.1, 0.6, 0.38 y 4.2 µgM, respectivamente.

Las actividades biológicas de los péptidos están relacionadas con su composición de aminoácidos, secuencia, tamaño y configuración (Matsui y Matsumoto, 2006). Yamamoto y col. (1994) indican que los péptidos inhibidores de la ECA por lo general contienen entre 2 y 12 aminoácidos. Por otro lado, Zhang y col., (2009) establecen que la mayoría de los péptidos derivados de proteínas de alimentos con capacidad inhibitoria de la ECA tienen pesos moleculares relativamente bajos, generalmente dipéptidos a pentapéptidos. Como se mencionó anteriormente dichos péptidos inhibidores de ECA contienen generalmente residuos como Pro, Lys o residuos de aminoácidos aromáticos (Cheung y col., 1980; Kawakami y Kayahara, 1993; Suetsuna y Nakano, 2000).

En este estudio la actividad de la ECA podría estar influenciada por la presencia de residuos de aminoácidos hidrófobos en el C-terminal. Escudero (2013), encontró en extractos de jamón curado español purificados por CLAR fase reversa una fracción peptídica AAATP con un valor de IC₅₀ para la actividad inhibitoria de la ECA de 100 µg. Sin embargo por los diferentes procesos cromatográficos que se utilizaron secuencialmente en la muestra, los resultados del % de inhibición disminuyeron

gradualmente perdiendo sinergismo entre los aminoácidos hidrofóbicos y se necesita concentraciones mayores de la fracción colectada por CLAR- semipreparativa para obtener el IC_{50} con respecto a medicamentos cardioprotectores utilizados como estándares con IC_{50} menores y con la misma efectividad.

El monitoreo del proceso de purificación de las fracciones se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida-SDS y NanoDrop Microvolume obteniendo 0.534mg/mL de residuos aminocidicos correspondientes a las fracciones pépticas analizadas a A205.

Determinación del peso molecular por CLAR empleando filtración en gel.

La separación de F2_2_2 empleó filtración en gel en un flujo isocrático de agua/TFA: AcN (90:10) con la intención de evitar el uso de sales para su elución. Sin embargo, para determinar el tamaño molecular con precisión, la muestra fue analizada con flujo isocrático de amortiguador de fosfatos 0.2 M, para evitar interacciones con la fase estacionaria. Para determinar el peso molecular se utilizó la columna con estándares de bajo peso molecular: Glicina (0.1312 kDa, Sigma-Aldrich, G2879) y bacitracina (1.422 kDa, Sigma-Aldrich, B0125). Los tiempos de retención de cada uno de los estándares y la muestra se observan en las figuras 15, 16 y 17.

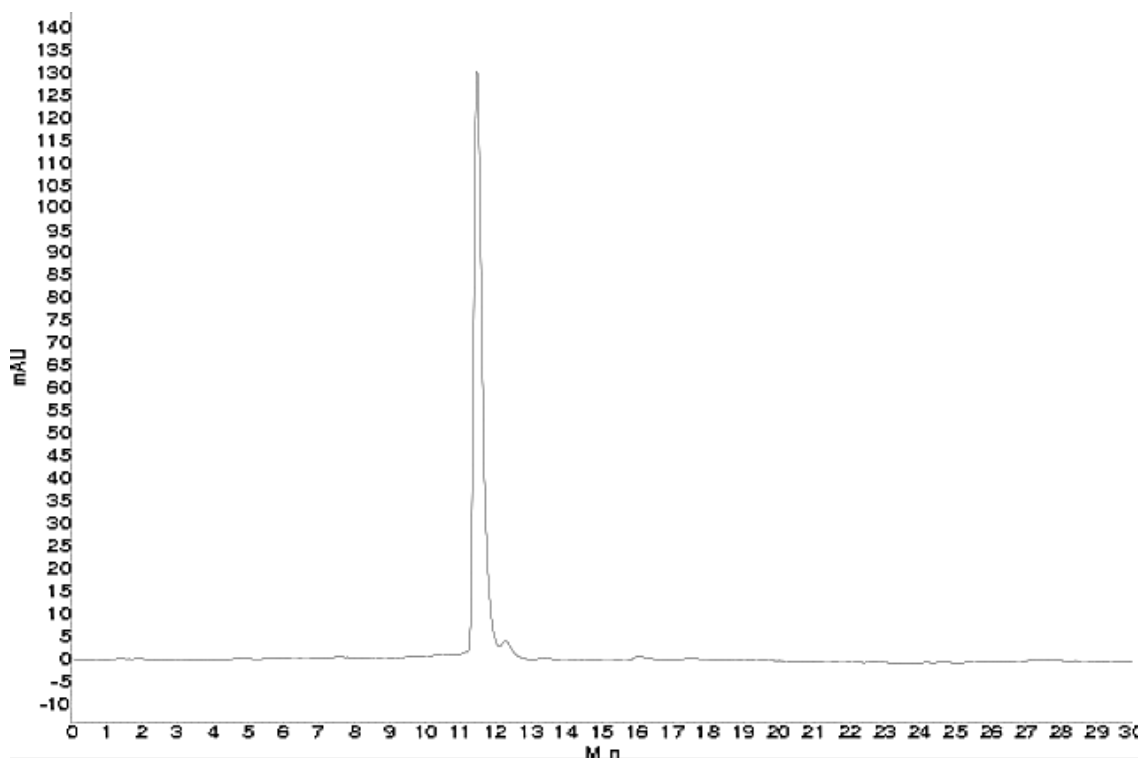


Figura 15. Cromatograma de exclusión molecular del estándar Glicina (0.1312 kDa, Sigma-Aldrich, G2879).

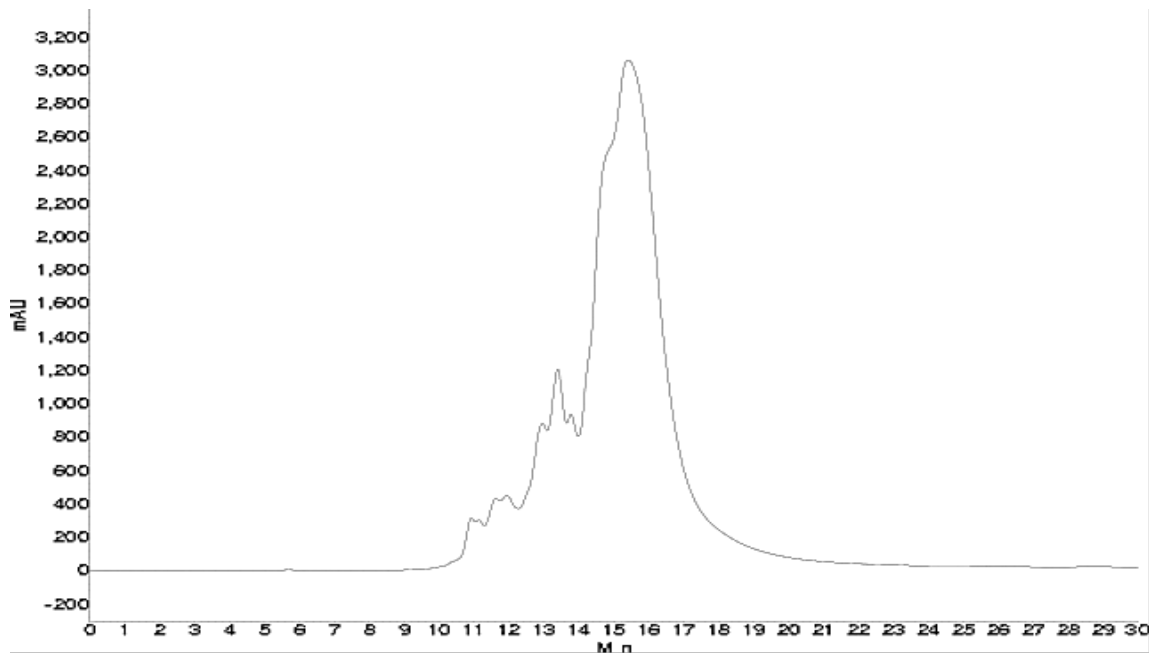


Figura 16. Cromatograma de exclusión molecular del estándar bacitracina (1.422 KDa, Sigma-Aldrich, B0125).

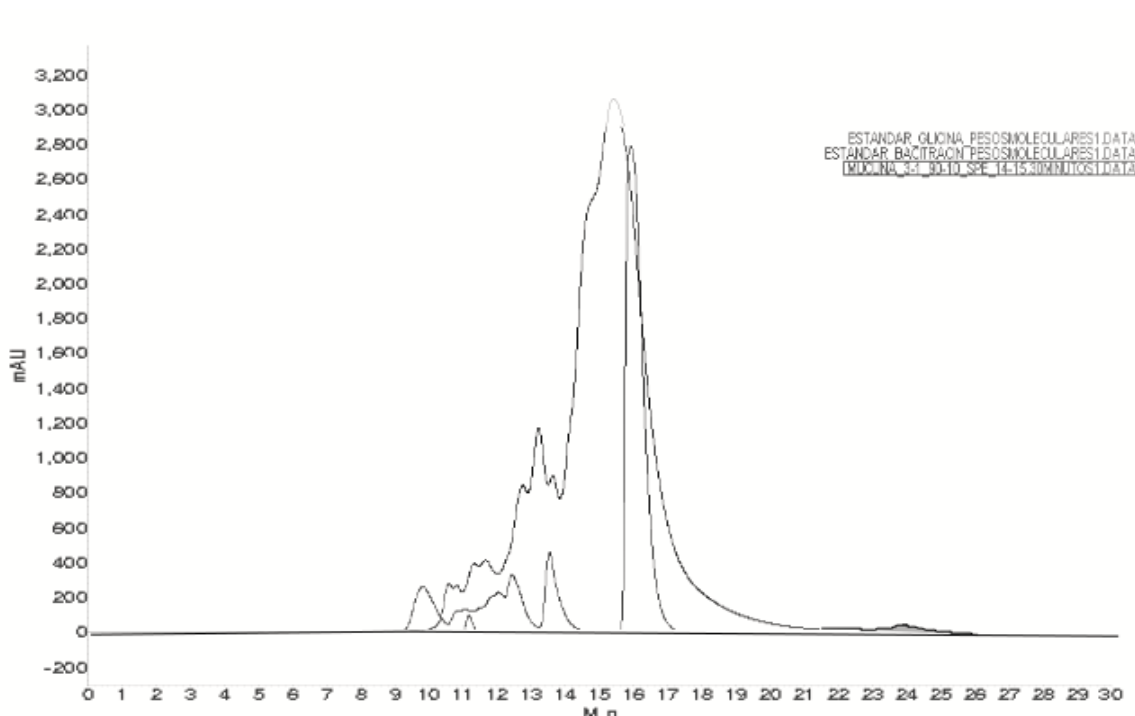


Figura 17. Cromatograma de los estándares y la muestra analizada.

El peso molecular de la fracción F2_2_2 t_R de 15.20-17.30 min (16.25 ± 1.48) y porcentaje de inhibición de $48.57\% \pm 0.26$ fue aproximadamente de 1.394 kDa. Esta masa corresponde a 14-15 residuos de aminoácido, considerando 110 Da/residuo de aminoácido.

CONCLUSIONES

1. Se logró recuperar el 71.29% de proteína en base seca en la obtención del concentrado proteínico a partir del desengrasado del concentrado a través del Método de Soxhlet. El GH obtenido en el hidrolizado proteínico fue de 34.85%, por lo que se clasifica como extensivo o con un alto grado de hidrólisis. Lo anterior, sugiere su uso en alimentación especializada, ya sea como suplemento proteico o para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. La fracción ultrafiltrada de 1 a 3 kDa con 67.28% de inhibición de la ECA fue biodirigida para aislar y purificar por diferentes métodos cromatográficos.

2. Se aisló y purificó la fracción bioactiva de 1 a 3 kDa (F2). Al finalizar los procedimientos cromatográficos se consiguió mantener la actividad biológica de la fracción aislada y purificada (F2_2_2). Se concluyó que se tendría que utilizar mayor cantidad de la muestra para obtener la concentración igual o similar del IC₅₀ obtenido con el captopril y el lisinopril. Sin embargo la utilización de péptidos inhibidores de la ECA aislados y purificadas de *Mucuna pruriens* representan una opción ideal para la sustitución de diversas familias de fármacos antihipertensivos de los cuales se ha demostrado científicamente los efectos secundarios, tolerancia e impacto sobre la calidad de vida.

3.- Se determinó el peso molecular del pico aislado de la fracción con mayor porcentaje de actividad por CLAR empleando filtración en gel dando el valor aproximadamente de 1.394 kDa. Esta masa corresponde a 14-15 residuos de aminoácidos, considerando 110 Da/residuo de aminoácido.

PERSPECTIVAS

Los péptidos bioactivos con actividad biológica aislados y purificados de *M. pruriens* ejercen un importante papel en la regulación y la modulación de la HTA. Se sugiere su uso potencial como nutracéutico e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular.

El presente estudio pone de manifiesto la presencia de actividad inhibitoria de la ECA en fracciones de *M. pruriens* sometidas a diferentes procesos cromatográficos. Sin embargo, aún falta evaluar aspectos como la secuenciación, codificación y síntesis de las fracciones para la obtención de mayor biodisponibilidad y procesos de eliminación a través de estudios farmacológicos.

La obtención de la secuenciación y síntesis de las fracciones de *M. pruriens* con actividad inhibitoria de la ECA, podría utilizarse en el futuro para la elaboración de alimentos que promuevan un nuevo concepto de nutrición que incluyan alimentos que controlen la presión arterial, disminuyan los riesgos de la HTA y sus complicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Itoh, T., Kawai, Y. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal Dairy Sci* 1998; 81: 3131-8.

Adebowale, Y., Adeyemi, A., Oshodi, A. (2005). Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*, 89(1), 37–48.

Agbede, J. y Aletor, V. (2005). Studies of the chemical composition and protein quality evaluation of differently processed *Canavalia ensiformis* and *Mucuna pruriens* seed flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 89–103.

Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, AS., Manders, M., Astrup, A., Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 288-97.

Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., Nakamura, Y., Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 257-65.

Anthony, S., Eugene, Braunwald., Kurt, J., Jean, D., Joseph, B., Dennis, L., Stephen, L., Dan, L., Longo, Harnnson. *Principios de Medicina Interna* editorial McGraw-Hill - Interamericana, 14a edición, 1998.

Arihara, K. (2006) Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219-229.

Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Science*, 57, 319-324.

Arihara, K., Ohata, M. (2006). Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In *Advanced Technologies for Meat Processing*; Toldrá F., Ed.; Springer: New York, NY, USA, pp. 245-274.

Arora, K., Chauhan A., ACE inhibitors: a comprehensive review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, (2013) 4, 532-533.

Ashar, M., Chand, R., Fermented mlk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft* 2004; 59: 363-66.

Ayala, K., Condezo, K., Juárez, J., impacto del seguimiento farmacoterapéutico en la calidad de vida relacionada a la salud de pacientes con hipertension arterial. *Ciencia*

e Investigación 2010; 13(2): 77-80. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Edición impresa: ISSN 1561-0861 Edición electrónica: ISSN 1609-9044.

Bailey, C.A., Bryla, P., Malick, A.W. (1996). The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advance Drug Delivery Reviews*, 22, 85-103.

Berot, S., Popineau, Y., Compoin, J. P., Blassel, C., and Chaufer, B. (2001). Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Application*, 753, 29–35.

Berrios, X., (1991): Non transmissible chronic disease. A preventive approach. *Rev Med Chil* 1991; 119(3):338-43.

Berrios, X., (1997) Tendencia temporal de los factores de riesgo de enfermedades crónicas: ¿La antesala silenciosa de una epidemia que viene? *Rev Med Chil* 1997; 125:1405-7. 33.

Bertrand-Harb, C., Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M. y Haertlé, T. (2002). Thermal modifications of structure and co-denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung-Food* 46, 283-289.

Betancur, D., Gallegos, S., Delgado, A., Pérez, V., Castellanos, A. Chel, L. (2008). Some physicochemical and antinutritional properties of raw flours and protein isolates from *Mucuna pruriens* (velvet bean) and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 816–823.

Betancur, D., Martínez, R., Corona, A., Castellanos, A., Jaramillo, E., y Chel, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*.44. 128-137.

Bhat, R., Sridharand, K. y Tomita, K. (2007). Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). *Food Chemistry*., Vol. 103 pp. 860-866.

Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S.E., Nielsen, M., Foster, L.J., Mann M. 2003. A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat. Biotechnol.* 21: 315-318.

Bravo, M., Suquilanda, M. (2013). Obtención de concentrado proteico por hidrólisis enzimática a partir del salvado de arroz de variedades ecuatorianas.

Brown, N.J., Vaughan, D.E. (1998). Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, 97, 1411-1420.

Brunner, B., Beaver, J., Flores, L. (2011). *Mucuna*. Proyecto de agricultura orgánica. Departamento de cultivos y ciencias agroambientales.

Bryan, Williams., MD Angiotensin II and the Pathophysiology of Cardiovascular Remodeling *Am J Cardiol* 2001, 87(Suppl) 10C-17C.

Buckles, D., Triomphe, B. & Sain, G. (1999). Los cultivos de cobertura en la agricultura en laderas. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). México. Burr, M. L. (1994). Antioxidants and cáncer. *Journal of human nutrition and dietetics*, 7, 409–416.

Caamal-Maldonado, J. A., Jiménez-Osornio, J. J., Torres-Barragán, A. & Anaya, A. L. (2001). The use allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. *Agronomy Journal*. 93, 27–36

Cadee, JA., Chang, CY., Chen, CW., Huang, CN., Chen, SL., Wang, CK. Bovine casein hydrolysate (c12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects. *Am J Hypertens* 2007; 20: 1-5.

Campbell DJ Critical view of prorenin an (pro) renin receptor research. *Hypertension* 2008; 51:1259-64.

Carvajal, J. I. (2010). Digestibilidad in vitro prececal y cecal de plantas forrajeras tropicales para la nutrición en cerdos. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia.

Castillo, E. (2014). Inhibición del sistema renina angiotensina por fracciones peptídicas de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*). Tesis maestría. Universidad Autónoma de Yucatán

Castillo, E., Betancur, D., Segura M. (2015). *Mucuna pruriens* proteins with potential to inhibit renin-angiotensin system. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 10, 123-131.

Castillo-Caamal, J. B., Caamal-Maldonado, J. A., Jiménez-Osornio, J. J. M., Bautista-Zúñiga, F., Amaya-Castro, M. J. & Rodríguez-Carrillo, R. (2010). Evaluación de tres leguminosas como coberturas Asociadas con maíz en el trópico subhúmedo. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 39–50.

Chaparro, P., Aristizábal, D., Gil, H. (2009). Composición y factores antinutricionales de las semillas del género *Mucuna*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 62(1), 4843–4853.

Chaparro, S., Aristozábal, I. y Gil, J. (2009). Composición y factores antinutricionales de las semillas del género *Mucuna*., Vol. 62 pp. 4843-4853.

Cheang, B., Zydney, L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*. 231: 159–167.

Chel-Gerrero, L.; Pérez Flores, V.; Betancur-Ancona, D.; Dávid- Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 584-591.

Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. & Cushman, D. W. (1980). Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Importance of the COOH-Terminal Dipeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401–407.

Chikagwa, S., Adesogan, A., Sollenberger, L., Badinga, L., Szabo, N. y Littell, R. (2009). Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*. 1. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Anim. Feed Sci. Technol.*, New York, Vol.148, pp. 34-50

Cho, M. J., Unklesbay, N., Hsieh, F. & Clarke, A. D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5895–5901.

Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D., Li-Chan, E.C.Y. (2007). Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in Pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 410-419.

Colilla, F.J., Yadav, S.P., Brew, K., Mendez, E. (1991). Peptide maps at picomolar levels obtained by reversed-phase high-performance liquid-chromatography and precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate -Microsequencing of phenylthiocarbamyl peptides. *Journal of Chromatography*, 548, 303-310.

Cushman, D. W., Pluscec, J., Williams, N. J., Weaver, E. R., Sabo, E. F., Kocy, O., Cheung, H. S., y Ondetti, M. A. (1973). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, 29, 1032-1035

Cushman, D.W., Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648.

De la Riva I. Control de la presión arterial. En *Fisiología Humana*, Edit. por Horacio E. Cingolani y Alberto B. Houssay. 7ma Edición. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 2000

De Mello, W.C., Danser, A.H.J.: Angiotensin II and the heart. On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35:1183-88

Duke, J.A. 1981. *Handbook of legumes of world economic importance*. Plenum Press, Nueva York, NY, EUA.

Elbl, G., Wagner, H. (1991). A new method for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorophorelabelled substrate, dansyltriglycine. *Planta Medica*, 57, 137–141.

Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., Schroder, H. (2006). The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *Journal of Nutrition*, 136, 2148-52.

Escudero, E., Mora, L., Fraser, P., Aristoy, M., Arihara K. & Toldrá, F. (2013). Purification and identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham *Journal of Proteomics*, 78, 499–507.

Escudero, E., Sentandreu, M.A., Arihara, K., Toldrá, F. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2895-2901.

Fao.org. (23/12/2016). *Mucuna pruriens* (L.) DC var. *utilis* (Wight) Burck. URL: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/Pf000054.HTM>

Ferrario, CM., Brosnihan, KB., Diz, DI., Jaiswal, N., Khosla, MC., Milsted, A., Tallan, EA: Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 1991; 18(suppl III):III126-133

Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jaraca* venom. *Biochemistry*, 9, 2583-2593.

Ficarro S.B., McClelland M.L., Stukenberg P.T., Burke D.J. Ross M.M., Shabanowitz J., Hunt D.F., White F.M. 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 20: 301-305.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A. y Walsh D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *American Society for Nutritional Sciences*, supplement, 980S-988S

Fitzgerald, R. J.; Meisel, H. 2000. Milk Protein-Derived Peptide Inhibitors of Angiotensin-I Converting Enzyme. *British Journal of Nutrition* 84, S33-S37.

Flores, S. J. (2001). *Leguminosae* (Florística, Etnobotánica y Ecología). *Etnoflora yucatanense*. Fascículo No. 18. Yucatán, México. p320

Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 191-200.

Folkow, B., Johansson, B., Mellander, S. (1961). The comparative effects of angiotensin and noradrenaline on consecutive vascular sections. *Acta Physiologica Scandinavica*, 53, 99-104.

Foltz, M., Cerstiaens, A., van Meensel, A., Mols, R., van der Pijl, P.C., Ducahteau, G.S.M.J.E., Augustijns, P. (2008). The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*, 29, 1312-1320.

Foltz, M., Meynen, E.E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T., Kloek, J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *The Journal of Nutrition*, 137, 953-958.

Friedland, J., Silverstein, E., Am, J., *Clin, Pathol* (1977). Aug; 68(2):225-8. Sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme with the natural substrate angiotensin I.

Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, NC. (2002) Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3566-9.

Fujita, H., Yokohama, K., Yasumoto, R., Yoshikawa, M. (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22, S304-S305.

Fujita, H., Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44, 123-127.

Galicia Martinez, S., Torruco Uco, J., Negrete Leon, E., Cadena Pino, M.L., Acevedo Fernandez, J.J., Angeles Chimal, J. s., Santa- Olalla Tapia, J., Petricevich López V.I (2013) Actividad de los hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* en modelos *in vivo* que revierten enfermedades incluidas dentro del syndrome metabolico. En m. Segura Campos, L. Chel Gerrero & D. Betancur Ancona. Bioactividad de peptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 155-173).

Galicia, M. S. (2010). Evaluación de la actividad antihipertensiva *in vivo* de hidrolizados proteínicos de la leguminosa *Mucuna pruriens*. Facultad de Ingeniería Química de la UADY.

Gel Filtration. Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals 5^a ed. Upsala: Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1997.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. Production of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *App Environ Microbiol*. 2000; 66:3898-904

Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004a). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1054,

Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I. y Belloque, J. (2004b). ACE-Inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [β -CN f(47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *J. Agric. Food chem.*, 52, 6315-6319.

González, R. (2014). *Mucuna* contra Parkinson; Tratamiento con Levodopa Natural. Granada, Amasón, 1 Ed. pp 91-92.

Guerra, C. (2014). Péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas y antioxidante obtenidos de hidrolizados de frijol mungo (*Vigna radiata*).

Guerra, Ra. Temas de Medicina Interna "Hipertensión Arterial". Tomo I. México. Ed. Interamericana McGraw-Hill 1995: 320.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17: 994-999.

Hambling, S.G., Mc Alpine, A.S. y Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. En: *Advanced Dairy Chemistry, volume 1: Proteins*. Fox, P.F. (Eds.), Elsevier Inc. London, pp. 141-190.

Harris, Daniel, C. "Análisis Químico Cuantitativo" Métodos Cromatográficos. Reverte (2006) ISBN 9788429172249 744 pags.
<http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>.

Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. a placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin nutr* 1996; 64: 767-71.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Tokano, T. 1996. A Placebo-Controlled Study of the Effect of a Sour Milk on Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 64, 767-771.

Hayakari, M., Kondo, Y. & Izumi, H. (1978). A rapid and simple espectrophotometric assay of Angiotensin-Converting Enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84, 361–369.

Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2007). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptides functions. *Journal of Biotechnology*, 2, 435-449.

Hayes, M., Stanton, C., Slattery, H., O'Sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4658-4667.

Hernández, A. M., Rivera, D. J., Shamah, L. T., Cuevas, N. L., Gómez, A. L. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016), financiamiento de la Secretaría de Salud del proyecto No. RPCINYS/1603 y financiamiento complementario de Bloomberg Philanthropies y del Instituto Nacional de Salud Pública. 31 de octubre de 2016.

Hernández, L. B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504–1510.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from beta-lactalbumin and alpha-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC–MS/MS: *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 588–593.

Herrera, F. (2015) Tesis en opción al grado de doctor en ciencias químicas y bioquímicas. Actividad biológica de derivados proteínicos de *Mucuna pruriens* con potencial en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y obesidad. Universidad Autónoma de Yucatán.

Herrera, F., Betancur, D., Segura, M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*. 29. 10- 20.

Herrera, F., Ruiz, J., Acevedo J., Betancur., Segura, M. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*.

Herrera, F., Ruiz, J., Santaolalla, J., Acevedo, J., Betancur, D., Segura, M. (2014). Hypolipidemic effects and antithrombotic activity of *Mucuna pruriens* protein hydrolysates and peptide fractions. *Food Research International*. [Manuscrito en revision].

Hosoya K., Hira N., Yamamoto K., Nishimura M., Tanaka N. 2006. High-performance polymerbased monolithic capillary column. *Anal. Chem.* 78: 5729-5735.

Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Praise, E., Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II – Induced Hypertension *Circulation* 2001, 104 346-351.

Imen, L. M., Ahmed, B., M-Concepción, A., Moncef, N., Fidel, T. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, et al. Blood-pressure lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 490-5.

Iroyukifujita, H., Eiichiyokoyama, K., Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65, 564-569.

Itakura, H., Ikemoto, S., Tereda, S., Kondo, K. The effect of sour milk on blood pressure in untreated hypertensive and normotensive subjects. *J Jap Soc Clin Nutr* 2001; 23: 26-31.

Jang, A., Jo, C., Kang, K.S., Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107, 327-336.

Jauhiainen, T., Korpela, R., Mäyrä-Mäkinen, A. 2002. VALIO: Information About the Evolus® Fermented Milk. Printed by Lars Eriksen. Finland, pp 1-15.

Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyrönpalo, S., Rasmussen, M., Korpela, R. (2005). *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *American Journal of Hypertension*, 18, 1600-1605.

Jensen, P. K., Paša-Tolić, L., Anderson, G. A., Horner, J. A., Lipton, M. S., Bruce J. E., Smith, R. D. 1999a. Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71: 2076-2084.

Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Hirabayashi J., Kasai K., Takahashi N., Isobe T. 2003. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* 21: 667-672.

Kajimoto, O., Nakamura, Y., Yada, H., Miriuchi, S., Hirata, H., Takahashi, T. Hypotensive effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension. *J Jap Soc Nutr Food Sci* 2001b; 54: 347-354.

Kamatchi, B., Ramasamy, V. (2010). Nutritional and anti-nutritional potential of three accessions of itching bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC var. *pruriens*): an under-utilized tribal pulse. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61. 497- 511.

Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol C* 1990; 96: 367-71.

Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M. (2003). Purification and characterization of an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from porcine troponin C. *Animal Science Journal*, 74, 53-58.

Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Kodama, Y., Kawamura, Y., Muguruma, M. (2004). Inhibitory profile of nonapeptide derived from porcine troponin C against angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 771-775.

Kawakami, A., Kayahara, H. (1993). Synthesis of Leu-Lys-Tyr derivatives and their interaction with angiotensin converting enzyme. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 46, 425-428.

Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., Hosono, A. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 2000; 83: 255-63.

Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. Y. y Fereidoon, S. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food*

Kohler, E., Bertschin, S., Woodth, T., Resink, T., Eme, P. Does aldosterone-induced cardiac fibrosis involve direct effects on cardiac fibroblasts? *J Vasc Res* 1996 Jul-Aug, 33(4) 315

Korhonen, H. J. (2009). Bioactive milk proteins and peptides: From science to functional applications. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 64, 16-25.

Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides. Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.

Kuwabara, Y., Nagai, S., Yoshimitsu, N., Nakagawa, I. Watanabe Y, Tamai Y. Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *J Ferm Bioengg*. 1995; 80:294-5.

Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P., Jørgensen, T. J. (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell Proteomics* 4: 873-886.

Lee, S. W., Berger, S. J., Martinović, S., Pasa-Tolić, L., Anderson G. A., Shen Y., Zhao, R., Smith, R. D. (2002). Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5942-5947.

Lee, Y. M., Skurk, T., Hennig, M., Hauner, H. Effect of a milk drink supplemented with whey peptides on blood pressure in patients with mild hypertension. *Eur J Nutr* 2007; 46: 21-7.

Legumbres y Salud 2011-2017. Consejo de Nutrición de Granos y Legumbres. Todos los derechos reservados. <http://www.gln.org.au/legumes/legumes-health/>

Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H. & Le, G. W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 37, 219-224.

Li, G.H., Le, G.W., Shi, Y.H., Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24, 469-486.

Li, W., Hendrickson, C. L., Emmett, M. R., Marshall, A. G. 1999. Identification of intact proteins in mixtures by alternated capillary liquid chromatography electrospray ionization and LC ESI infrared multiphoton dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71: 4397-4402.

Lim, SS., Vos, T., Flaxman, A. D., Danaei, G. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380(9859):2224-60.

Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M., Yates, J. R. 3rd. 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 17: 676-682.

Longhi, J. (2007). Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba., pp.66.

López-Fandino, R., Otte, J., van, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277-1293.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., and Millán, F. (2002). Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.*, 76, 349-356.

Ma, M. S., Bae, I. Y., Lee, H. G. & Yang, C. B. (2006). Purification and identification of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chemistry*, 96, 36–42.

MacFadyen, R., Barr, C., Struthers, A. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, unproves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients *Cardiovasc. res.* 1997, 35 30-34.

Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1316-21.

Mao, X., F. Ren, Y. Li, Q. Nan & J. Song (2007) Comparison of the lymphoproliferation activity of yak milk casein hydrolysates hydrolyzed by endorecrido. microbial-derived and animal-derived proteinase, J. Food Biochem., 31: 289-99.

Marrufo, E. D. M. (2008). Evaluación de la actividad biológica de hidrolizados proteínicos de *Jatropha curcas* L. Tesis maestría en ciencias alimentarias. Facultad de Ingeniería Química de la UADY. Mérida, Yucatán, México.

Martínez, E. (2017). Tesis en opción al grado de maestría en ciencias químicas y bioquímicas. Evaluación de la actividad antioxidante, protectora y antiinflamatoria del hidrolizado proteico y fracciones peptídicas de *Mucuna pruriens*. Antes y después de un proceso de simulación digestiva gastrointestinal. Universidad Autónoma de Yucatán.

Maruyama, S., Mitachi H., Tanaka H, Tomizuka N, Suzuki H. (1987a). Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. Agric. Biol. Chem., 51, 1581-1586.

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1987b).

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H. (1987). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of s1-casein. Agricultural and Biological Chemistry, 51, 2557-2561.

Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. y Suzuki, H. (1985). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein .2. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. Agric. Biol. Chem., 49,

Maruyama, S., Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the triptic hydrolysis of casein. Agric. Biol. Chem., 46, 1393-1394

Matsui, T., Matsufuji, H., Osajima, Y. (1992). Colorimetric measurement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. Biosci. Biotech. Biochem., 56, 517-518.

Matsui, T., Matsumoto, K., Mahmud, T.H.K., Arjumand, A. (2006). Antihypertensive peptides from natural resources. In Advances in Phytomedicine; Elsevier: Oxford, UK, Volume 2, pp.255-271.

Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F. & Vioque, J. (2006). Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides using immobilized ACE. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 7120– 7124.

Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2004). Purification o fan ACE Inhibitory Peptide alter Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. J Agric. Food Chem. (52):19281932.

Meisel, H., Bockemann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:207-215.

Michaelidou, A., Katsiari, M.C., Kondyli, E., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. (2003). Effect of a comercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Daily Journal*, 13, 179-189.

Michaelidou, A., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Kondyli, E. and Alichanidis, E. (2003) Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *Int Dairy J* 13, 743–753.

Miguel, M., Alonso, M., Salaices, M., Aleixandre, A. & López-Fandiño, R. (2007). Antihypertensive, ACE inhibitory and vasodilator properties of an egg White hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion, *Food Chemistry*, 104, 163–168.

Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr* 2005; 94: 84-91.

Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens* 2004; 17: 701-6.

Motta, E., Pinto, N., Duque, A., Mendes, R., Bellozi, P. y Scio, E. (2013). Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC., Vol. 15, pp. 264-272.

Muller, A., Daufin, G., and Chaufer, B. (1999). Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science*, 153: 9–21.

Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y., Negishi, H. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci* 2004; 87: 1967-74.

Murray, FitzGerald, R. J., B. A. y Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *American Society for Nutritional Sciences*, supplement, 980S-988S

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. & Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors of angiotensing I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253–1257.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci* 1995b; 78: 1253-7.

Nielsen, S., *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1998.

Noh, H., Song, K. B. (2001). Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenanthe javanica*. *Agricultural and Chemical Biotechnology*, 44, 98–99.

NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertension arterial sistémica.

Nurminen, M. L., Sipola, M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä, A., Piilola, K., Korpela, R. Alpha-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2000; 66: 1535-43.

Ondetti, M. A. y Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 283-308.

Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196, 444-444.

Organización Mundial de la Salud. *Affordable Technology: Blood Pressure Measuring Devices for Low Resource Settings*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2003.

Organización Mundial de la Salud. *Global Health Observatory Data Repository* [base de datos en línea]. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2008 (<http://apps.who.int/gho/data/view.main>). Consultado el 11 de febrero de 2013.

Organización Mundial de la Salud. *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2011.

Organización Mundial de la Salud. *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2007*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2008.

Oshima, G. y Nagasawa, K. (1979). Stereospecificity of peptidyl dipeptide hydrolase (angiotensin I-converting enzyme). *J. Biochem.*, 86, 1719-1724.

Parati, G. A new solar-powered blood pressure measuring device for low-resource settings. *Hyper tension*, 2010, 56; 1047-1053.

Pedroche, J., Yust, M. M., Megías, C., Lqari, H., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F. and Vioque, J. (2004b). Utilisation of rapeseed protein for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*. 354-358.

Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)inhibitory activity. *J Sci Food Agric* 2002; 82: 960-5.

Pedroche, J.; Yust, M.M.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Mateo, C.; Guisán, J.M.; Millán, F. (2002b) Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 711-718.

Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67, 53–64.

Pins, J. J., Keenan, J. M. The antihypertensive effect of a hydrolyzed whey protein isolate supplement (Biozate 1): A pilot study. *FASEB J* 2003; 17 suppl.: A1110.

Pozo-Bayón, M. A.; Alcaíde, M. J.; Polo, M. C.; Pueyo, E. 2007. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Compounds in White and Red Wines. *Food Chemistry* 100, 43-47.

Pripp, A. H., Isaksson, T., Stepaniak, L. y Sorhaug, T. (2004). Quantitative structure activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *Eur.*

Qian, Z. J., Je, J. Y., Kim, S. K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8398-8403.

Quist, E. E., Phillips, R. D., & Saalia, F. K. (2009). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of proteolytic digests of peanut (*Arachis hypogaea* L.) flour. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 694-699.

Ramírez G. J., Delcayre, C., Robert, V., Wassef, M., Trouve, P. Mougnotn, Charlemagne D, Lechat P in vivo left ventricular function and collagen expression in aldosterone/salt induced hypertension *J Cardiovasc Pharmacol* 1998 Dec, 32(6) 927-34.

Rasmussen, M. 2005. Clinical studies with Evolus®. In Special simposium: Foods & Functionals: Research, results, partnership and progress. pp 1-36.

Rautenbach, R. and Gröschl, A. (1990). Separation potential of nanofiltration membranes. *Desalination* 77, 73–84.

Recio, I., Floris, R., Visser, S. (2000). Bioactive peptides from food proteins: A new isolation method. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 11, 9-11.

Rho, S.J., Lee, J.S., Chung, Y.I., Kim, Y.W., Lee, H.G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44, 490-493.

Rivera, D. J., Gutiérrez, P., Franco, J., Aurora, S., Levy, T., Cuevas, N. Lucía. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT). Resultados nacionales. Primera edición. D.R Instituto Nacional de salud pública. ISBN 978-607-511-037-0

Rodríguez-Núñez, E., Aristoy, M.C., Toldrá, F. (1995). Peptide generation in the processing of drycured ham. *Food Chemistry*, 53, 187-190.

Ruiz, R. J. C. (2010). Actividad biológica de péptidos obtenidos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Instituto politécnico Nacional.

Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuda, S.I., Morimatsu, F., Nishimura, T. (2006). Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 942-945.

Sánchez, R., Ayala M., Baglivo, H., Velázquez, C., Burlando G., Kohlmann, O. Guías Latinoamericanas de Hipertensión Arterial. *Rev Chil Cardiol* v.29 n.1 Santiago 2010; 29:117-144.

Segura, M. (2010). Purificación y caracterización de péptidos bioactivos obtenidos a partir de *Vigna unguiculata*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Yucatán, Merida.

Segura, M., Chel, L., Betancur, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience.

Segura, M., Espadas, C., Chel, L., Betancur, D. (2013). ACE-I inhibitory peptide fractions from enzymatic hydrolysates of velvet bean (*Mucuna pruriens*). 4. 767- 773.

Segura, M., López, S., Castellanos, A., Bentancur, D. y Chel, L. (2015). Physicochemical and Functional Characterization of *Mucuna pruriens* Depigmented Starch for Potential Industrial Applications., Vol.5 pp. 1-10.

Segura, M., Tovar, T., Chel, L., Betancur, D. (2014). Functional and bioactive properties of Velvet bean (*Mucuna pruriens*) protein hydrolysates produced by enzymatic treatments. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 8. 61-69.

Sentandreu, M. A., Toldra, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.*, 97, 546-554.

Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 326-330.

Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T., Korpela, R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK16H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 2002; 57: 124-7.

Sforza, S., Galaverna, G., Schivazappa, C., Marchelli, R., Dossena, A., Virgili, R. (2006). Effect of extended aging of parma dry-cured ham on the content of oligopeptides and free amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9422-9429.

Shalaby, S. M. Effects of garlic (*allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006, 12, 2, p.200

Shalaby, S. M., Zakora, M. y Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J.*

Shen Y., Zhao R., Berger S.J., Anderson G.A., Rodríguez N., Smith R.D. 2002. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. *Anal. Chem.* 74: 4235-4249.

Shihabi, Z. K. (1999). Analysis of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 853, 185-188.

Sipola, M. Effects of milk products and milk protein-derived peptides on blood pressure and arterial function in rats. Institute of Biomedicine, Pharmacology. Helsinki: University of Helsinki, 2002.

Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res* 2002a; 69: 103-11.

Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. Longterm intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 745-54.

Sipola, M., Finckenberg, P., Vapaatalo, H., Pihlanto-Leppälä, A., Korhonen, H., Korpela, R. Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2002b; 71: 1245-53.

Stevens, R. L., Micalizzi, E. R., Fessler, D. C. y Pals, D. T. (1972). Angiotensin I converting enzyme of calf lung. Method of assay and partial purification. *Biochem.*, 11, 2999-3007.

Suetsuna, K., Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 450-454.

Sugai R. ACE inhibitors and functional foods. *Bulletin of the IDF* 1998; 336: 17-20.

Sun, H., Liu, D., Li, S., Qin, Z. (2009). Transepithelial transport characteristics of the antihypertensive peptide, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 293-298.

Sun, J., He, H. & Xie, B. J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 52, 6646–6652.

Susmita, D., Bratati, D. E. (2013). Evaluation of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory potential of some underutilized indigenous fruits of West Bengal using an in vitro model *Fruits*, 2013, vol. 68, p. 499–506. © 2013 Cirad/EDP Sciences All rights reserved. DOI: 10.1051/fruits/2013092. www.fruits-journal.org Received 1 October 2012. Accepted 8 February 2013

Tauzin, J., Miclo, L. y Gaillard, J. L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine alpha (S2)-casein. *FEBS Lett.* 531, 369-374.

Tello, R., Ruiz, J., Chel, L. & Betancur, D. (2010). Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México. Cap18: 233–238.

Torruco, J. (2008). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Instituto Politécnico Nacional.

Touyz, R. M., Schiffrin .EL Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacolog Rev* 2000; 52:639-72.

Tovar, B. T. (2011). Tecnofuncionalidad y biofuncionalidad de hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo *Mucuna pruriens*. Facultad de Ingeniería Química de la UADY.

Townsend R. R., Mcfadden, C. B., Ford, V., Cadee, J. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial of casein protein hydrolysate (C12 peptide) in human essential hypertension. *am J Hypertens* 2004; 17: 1056-8.

Tsai, J. S., Chen, J. L. & Pan, B. S. (2008). ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry*, 43, 743–747.

Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M. L., Mikkola, L. Effect of ingesting sour milk fermented by *Lactobacillus helveticus* bacteria on blood pressure in subjects with mild hypertension. *J Hum Hypertens* 2004; 18: 795-802.

Vadivel, V., Janardhanan, k. (2005). Nutritional and antinutritional characteristics of seven south Indian wild legumes. *Plant Foods for human Nutrition*, 60(2), 69–75.

Vadivel, V., Pugalenti, M. (2008). Removal of antinutritional/ toxic substances and improvement in the protein digestibility of velvet bean seeds during various processing methods *J. Food Sci. Technol., India.*, Vol.45., pp.242-246.

Van Elswijk, D. A., Diefenbach, O., Van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R. y Van der Greef, J. (2003). Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography-biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1020, 45-58.

Vercruyse, L., Van Camp, J., Smaghe, G. (2005). Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8106-8115.

Vermeirssen, V., Camp, J. V. y Verstraete, W. (2002a). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys.*, 51, 75-87.

Vermeirssen, V., Camp, J.V., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Vermeirssen, V., Camp, J.V., Verstraete, W. (2007). Bioavailability of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L. & Verstraete, W. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5680–5687.

Vioque, J. (2006). Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides using immobilized ACE. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7120–7124.

Vioque, J., Sánchez, R., Pedroche, J., Mar, M., Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas y aceites*. 52. 127- 131.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. & Millán, F. (2000). Péptidos Bioactivos en Proteínas de Reserva. *Grasas y Aceites*, 51(5), 361–365.

Washburn, M. P., Wolters, D., Yates J.R.3rd. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19: 242-247. Wasinger.

Weisbach, C., Tiessen, H. & Jiménez–Osornio, J. J. (2002). Soil fertility during shifting cultivation in the tropical karst soils of Yucatan. *Agronomie*, 22, 253–263. WHO

Wijesekara, I., Kim, S.K. (2010). Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry. *Marine Drugs*, 8, 1080-1093.

World Health Organization. Información general sobre la hipertensión en el mundo WHO/DCO/WHD/2013.2 (www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).

World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report. Geneva: World Health Organization; 2005. Page 1-13. (cited 2012 Sep 10). Available from: http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en/ 8. Organización Panamericana de la Salud.

Wu, J. P., Aluko, R. E. y Nakai, S. (2006). Structural requirements of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 732-738.

Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus-helveticus* CP790. *J.*

Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy sci* 1994; 77: 917-22.100

Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPn4. *J Dairy sci* 1999; 82: 1388-93.

Yang L., Lee C.S., Hofstadler S.A., Pasa-Tolic L., Smith R.D. 1998. Capillary isoelectric focusing/electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for protein characterization. *Anal. Chem.* 70: 3235-3241.

Yang, Y., Marczak, D. E., Yokoo, M., Usui, H., Yoshikawa, M. 2003. Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4897-4902

Yokohama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 1541-1545.

Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H. & Itani, T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128, 27-33.

Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. y Millán, F. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestión of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry; Elsevier* (81):363-369.

Zhang, J., Zhen, Z., Zhang, W., Zeng, T. & Zhou G. (2009). Effect of intensifying hightemperature ripening on proteolysis, lipolysis and flavor of Jinhua ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 834-842.

Zhou, G., Kandala, J. C., Tyagi, S. C., Katwa, L. C., Weber, K. T. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts *Mol Cell Biochem* 1996 Jan 26; i54 (2) 171-8.

Zhu, K., Kim, J., Yoo, C., Miller, F.R., Lubman D.M. 2003. High sequence coverage of proteins isolated from liquid separations of breast cancer cells using capillary electrophoresis-time-of-flight MS and MALDI-TOF MS mapping. *Anal. Chem.* 75: 6209-6217.

ANEXO I. ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Clasificación de la hipertensión arterial. | 3 |
| Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de la hipertensión. | 4 |
| Tabla 3. Valores estimados de prevalencia, conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial en algunos países de Latinoamérica. | 7 |
| Tabla 4. Estudios clínicos con productos lácteos y péptidos que presentan efecto antihipertensivo en humanos. | 18 |
| Tabla 5. Estudios en animales sobre el efecto de los péptidos bioactivos derivados de la leche en la presión sanguínea sistólica en ratas espontáneamente hipertensas. | 19 |
| Tabla 6. Estudios clínicos sobre el efecto de los péptidos bioactivos derivados de la leche en la presión sanguínea sistólica y la Presión sanguínea diastólica. | 20 |
| Tabla 7. Péptidos con actividad biológica derivados de alimentos. | 22 |
| Tabla 8. Composición proximal de algunas especies del género <i>Mucuna</i> . | 28 |
| Tabla 9. Composición mineral (mg/100g) en especies <i>Mucuna</i> . | 28 |
| Tabla 10. Factores antinutricionales (g/100g) en especies de <i>Mucuna</i> . | 29 |
| Tabla 11. Composición de aminoácidos (mg/g proteína cruda) de algunas especies del género <i>Mucuna</i> . | 30 |
| Tabla 12. Curva de calibración del estándar L-serina | 44 |
| Tabla 13. Orden de adición de reactivos para la inhibición de la ECA-I. | 46 |
| Tabla 14. Fracciones obtenidas de la separación de la fracción con mayor actividad biológica después de la separación por CLAR analítico. | 47 |
| Tabla 15. Ajuste de la concentración de proteína de las muestras diluidas en mezcla de buffer de fosfato de potasio 40 μ mol y buffer de cloruro de sodio 300 μ mol previamente ajustados a pH 8.3 con HCl o NaOH 1 M. | 54 |
| Tabla 16. Rendimiento y evaluación biológica de fracciones obtenidas por SPE C18 de la fracción F2. | 57 |

ANEXO II. ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Sistema renina angiotensina aldosterona. | 9 |
| Figura 2. Vaina de <i>Mucuna pruriens</i> | 26 |
| Figura 3. Semillas de <i>Mucuna pruriens</i> | 26 |
| Figura 4. Principales presentaciones de <i>Mucuna pruriens</i> . | 27 |
| Figura 5. Diagrama general de la metodología. | 42 |
| Figura 6. Comparación de estudios realizados de grado de hidrólisis de <i>M. pruriens</i> . | 52 |
| Figura 7. Contenido de proteína (mg/mL) del hidrolizado proteico (HP) y las fracciones ultrafiltradas peptídicas de <i>M. pruriens</i> (F). Obtenidas por el método de Lowry. Resultados expresados medias±DS (n=3). ^{a-e} Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05). | 53 |
| Figura 8. Valores del porcentaje de inhibición de la ECA de las fracciones ultrafiltradas de HPP. Resultados expresados medias±DS (n= 3). ^{a-e} Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05). | 54 |
| Figura 9. Cromatograma de la fracción completa de 1-3 kDa (F2). | 56 |
| Figura 10. Cromatograma de la fracción F2_2 (fracción de 1-3 kDa, elución Agua: AcN 90:10), obtenida de SPE C18. | 57 |
| Figura 11. Cromatograma de la Fracción F2_2, analizada por CLAR semipreparativa. | 58 |
| Figura 12. . Porcentaje de inhibición de la ECA de las subfracciones F2_2_1, F2_2_2 y F2_2_3 obtenidas de <i>SPE C18</i> y colectados a través de CLAR semipreparativa. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05). | 59 |
| Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de la fracción F2_2_2. | 60 |
| Figura 14. Valores de IC ₅₀ de los estándares cardioprotectores (captopril y lisinopril) comparados con el IC ₅₀ de la muestra. ^{a-c} Letras diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05). | 60 |
| Figura 15. Cromatograma de exclusión molecular del estándar Glicina (0.1312 kDa, Sigma-Aldrich, G2879). | 62 |
| Figura 16. Cromatograma de exclusión molecular del estándar bacitracina (1.422 KDa, Sigma-Aldrich, B0125) | 63 |
| Figura 17. Cromatograma de los estándares y la muestra analizada. | 63 |

ANEXO III. ABREVIATURAS

| | |
|---|------------------|
| Ácido clorhídrico | HCl |
| Ácido trifluoroacético | TFA |
| Actividad inhibitoria de la ECA | IECA |
| Acetonitrilo | AcCN |
| Agua | H ₂ O |
| Angiotensina I | Ang I |
| Angiotensina II | Ang II |
| Angiotensina III | Ang III |
| Angiotensina IV | Ang IV |
| campo eléctrico | FD |
| Concentración de péptido que inhibe en un 50% la actividad de la enzima convertidora de angiotensina. | IC ₅₀ |
| constante de distribución | Kd |
| Constante de inhibición | Ki |
| cromatografía de líquidos | LC |
| cromatografía de líquidos acoplado a masas | LC-MS |
| Cromatografía de líquidos de alta resolución | CLAR |
| Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa | RP-HPLC |
| Cromatografía líquida de alta resolución | HPLC |
| Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas | LC-HRMS |
| Dalton | Da |
| Desorción por láser asistida por matriz | MALDI |
| desorción por plasma | PD |
| Disociación inducida por colisión | CID |
| Dodecil sulfato de sodio | SDS |
| Electrospray | ESI |
| Encuesta Nacional de Salud y Nutrición | ENSANUT |
| Endopeptidasa neutral | NEP |
| Enzima convertidora de Angiotensina | ECA-I |
| Estructura del extremo amino terminal | N-terminal |
| Fracciones ultrafiltradas | FU |
| Grado de hidrólisis | GH |
| Grados centígrados | °C |
| Gravedad | g |
| Hidrolizado Pepsina – Pancreatina | HPP |
| Hidróxido de sodio | NaOH |
| Hipertensión arterial | HTA |
| hipertensión arterial sistémica | HAS |
| Hipuril histidil leucina | HHL |
| Índice de masa corporal | IMC |
| Ion calcio | Ca ⁺² |
| Ion hidrogeno | H ⁺ |
| Kilodalton | kDa |
| Kilogramo | Kg |
| L-3,4-dihidroxifenilalanina | L-Dopa |

| | |
|--|------------------|
| la ionización por bombardeo con átomos rápidos | FAB |
| Micro molar | μM |
| Microgramo | μg |
| Microlitro | μl |
| Miligramo | mg |
| Mililitro | mL |
| Milímetros de mercurio | MmHg |
| Milimolar | Mm |
| Min | Min |
| Modelos de relación estructura-actividad cuantitativos | QSAR |
| Molar | M |
| Nanometro | nm |
| Normal | N |
| Número de enlaces peptídicos hidrolizados | H |
| Número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa | h_{tot} |
| Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura | FAO |
| Organización mundial de la salud | OMS |
| Ortofenilaldehído | OPA |
| Óxido nítrico | NO |
| Pepsina – Pancreatina | PP |
| Peso volumen | p/v |
| Potencial de hidrogeno | pH |
| Presión arterial | PA |
| Presión arterial diastólica | DBP |
| Presión arterial sistólica | SBP |
| Renin-Angiotensin System | RAS |
| Separación por extracción en fase sólida de fase reversa | SEFS, C18-U |
| Sistema renina angiotensina | SRA |
| Sistema Renina Angiotensina Aldosterona | SRAA |
| Sociedad Internacional de Hipertensión y el Comité para la Detección Evaluación y Tratamiento de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica | CDETH |
| Sodio | Na+ |
| Técnica de ortoftalaldialdehído | OPA |
| Tiempo de retención de la fase móvil | t_0 |
| Tiempo de retención del soluto. | tR |
| Voltaje de capilar | Kv |
| Volumen | V |
| volumen de elución | Ve |
| volumen de exclusión | V 0 |
| volumen minuto | VM |
| World Health organization | WHO |

ANEXO IV. NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS

| Aminoácido | Código de una letra | Código de tres letras |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| Ácido Aspártico | D | Asp |
| Ácido Glutámico | E | Glu |
| Serina | S | Ser |
| Histidina | H | His |
| Glicina | G | Gly |
| Treonina | T | Thr |
| Arginina | R | Arg |
| Alanina | A | Ala |
| Prolina | P | Pr |
| Tirosina | Y | Tyr |
| Valina | V | Val |
| Metionina | M | Met |
| Cisteína | C | Cys |
| Isoleucina | I | Ile |
| Triptófano | W | Trp |
| Leucina | L | Leu |
| Fenilalanina | F | Phe |
| Lisina | K | Lys |

