



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

POTENCIAL ANTIDIABÉTICO Y EFECTO CITOTÓXICO *in vitro* DE HIDROLIZADOS
PROTEÍNICOS Y FRACCIONES PEPTÍDICAS ULTRAFILTRADAS OBTENIDOS DE
Phaseolus lunatus L. y *Vigna unguiculata* L.

TESIS

PRESENTADA POR

IBQ.. KARINA JIMÉNEZ MORALES

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

AÑO 2017



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**POTENCIAL ANTIDIABÉTICO Y EFECTO
CITOTÓXICO *in vitro* DE HIDROLIZADOS
PROTEÍNICOS Y FRACCIONES PEPTÍDICAS
ULTRAFILTRADAS OBTENIDOS DE
Phaseolus lunatus L. y *Vigna unguiculata* L.**

TESIS

PRESENTADA POR

IBQ. KARINA JIMÉNEZ MORALES

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

AÑO 2017

OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Agradecimientos académicos

A los Directores de Tesis, Dr. David Betancur Ancona y Dr. Luis Che Guerrero, por sus invaluable aportaciones en la conducción y desarrollo de este trabajo.

Al Comité Sinodal integrado por: Dr. Santiago Gallegos Tintoré (FIQ-UADY), Dra. Irma Aranda González (FM-UADY), Dra. Odri Marina Sosa Moguel (ITM) y Dra. Leydi Maribel Carillo Cocom (FIQ-UADY), por su contribución al enriquecimiento y mejoramiento de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de la tesis.

A los siguientes Laboratorios, por las facilidades otorgadas para la realización de la fase experimental de este trabajo:

Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán y laboratorios de apoyo de la misma Facultad.

Nutrición Acuícola, del Centro de Investigación de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional.

Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital Regional 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. David Betancur Ancona y Dr. Luis Chel Guerrero y formó parte del proyecto “Actividad biológica de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática de proteínas de frijoles Lima (*Phaseolus lunatus*) y Caupí (*Vigna unguiculata*)” con clave 153012 financiado por CONACYT-Ciencia básica.

Resumen

México es uno de los países con más alta prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) y actualmente es la segunda causa de muerte. En busca de alternativas alimentarias que contribuyan a su tratamiento, en este trabajo se investigó el potencial antidiabético de los hidrolizados de proteína y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. Se evaluó su grado de hidrólisis y la actividad inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. Sobre su inocuidad como posibles ingredientes alimentarios, se evaluó su citotoxicidad en células sanas Vero. Las harinas obtenidas de los granos de frijol se suspendieron en solución alcalina precipitando la proteína en su punto isoeléctrico. El concentrado proteínico se hidrolizó durante 90 min con un sistema de enzimas pepsina-pancreatina (P-P) o alcalasa-flavourzima (A-F). La proteína soluble de cada hidrolizado se ultrafiltró, obteniéndose cinco fracciones peptídicas (F) de tamaño >10, 5-10, 3-5, 1-3, <1 kDa. Las actividades inhibitorias sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa se evaluaron midiendo la liberación de azúcares reductores y de p-nitrofenol a 540 nm y 340 nm respectivamente, y sobre la DPP-IV, el compuesto 4-metil-coumaril-7-amida a $\lambda_{\text{exc}} = 360/\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. El perfil de aminoácidos se realizó por HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). La citotoxicidad se evaluó por el método de sulforrodamina. Se encontró que la F >10 obtenida a partir del hidrolizado de *V. unguiculata*, generado con el sistema A-F, tuvo la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa ($IC_{50} = 31.58$ e $IC_{50} = 0.633$ mg proteína/ml respectivamente). Y la fracción F 5-10 obtenida del hidrolizado de *P. lunatus*, generado con el sistema A-F, sobre la DPP-IV ($IC_{50} = 1.93$ mg proteína/ml). El aminoácido leucina se encontró en cantidades importantes en las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria. Ninguna de las fracciones ultrafiltradas tuvo actividad citotóxica sobre la viabilidad de la línea celular. La F >10 de *V. unguiculata* A-F y F 5-10 de *P. lunatus* A-F representan componentes de estudio con potencial antidiabético para integrarlos en alimentos funcionales destinados a pacientes con DMT2, una vez que se tenga evidencia científica *in vivo*.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	ANTECEDENTES.....	15
	La Diabetes Mellitus.....	15
	Alimentos funcionales.....	18
	Fuentes de proteína para la obtención de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.....	19
	Leguminosas.....	19
	Frijol lima (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) y Caupí (<i>Vigna unguiculata</i> L.).....	20
	Hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.	22
	Generalidades.	22
	Obtención de concentrados, hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.	24
	Hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con potencial antidiabético.....	31
	Enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y mecanismos de su inhibición para la regulación de glucosa en sangre.	35
	Enzima α -amilasa.....	35
	Enzima α -Glucosidasa.....	39
	Enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).....	42
	Citotoxicidad.....	45
	Generalidades.....	45
	Línea celular para ensayos de citotoxicidad.....	46
	Citotoxicidad de hidrolizados proteínicos o péptidos bioactivos.....	47
	Compuestos tóxicos de <i>P. lunatus</i> L. y <i>V. unguiculata</i> L.....	48
3.	OBJETIVOS.....	51
3.1.	Objetivo general.....	51
3.2.	Objetivos particulares.....	51
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.1.	Obtención de materia prima.....	55
4.2.	Obtención de las harinas.....	55
4.3.	Obtención de los aislados proteínicos.....	55
4.4.	Análisis proximal de las harinas y aislados proteínicos.....	56

4.5. Hidrólisis enzimática secuencial con alcalasa-flavourzima (A-F) y pepsina-pancreatina (P-P).....	57
4.6. Determinación del grado de hidrólisis.....	58
4.7. Obtención de fracciones peptídicas ultrafiltradas	60
4.8. Determinación del contenido de proteína de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas ultrafiltradas.....	61
4.9. Evaluación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.....	61
4.9.1. Inhibición de enzima α -Amilasa.	61
4.9.2. Inhibición de la enzima α -Glucosidasa.....	63
4.9.3. Inhibición de enzima Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV).	65
4.10. Perfil aminoácido de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas que presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre la enzima α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.	67
4.11. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la actividad citotóxica de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L.....	69
4.11.1. Cultivo celular.	69
4.11.2. Ensayo de citotoxicidad.	69
4.12. Análisis estadístico.	70
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
5.1. Composición proximal de las harinas de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L.	73
5.2. Obtención del aislado proteínico de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L.	74
5.3. Grado de hidrólisis de los hidrolizados proteínicos de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L.	74
5.4. Contenido de proteína de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas.	77
5.5. Inhibición enzimática de la enzima α -amilasa.....	78
5.6. Inhibición enzimática de la enzima α -glucosidasa.....	83
5.7. Inhibición enzimática de la enzima DPP-IV.....	89
5.8. Perfil de aminoácidos de los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria de las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, DPP-IV.....	95
5.9. Citotoxicidad de hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, DPP-IV.	100

6.	CONCLUSIONES.....	103
7.	REFERENCIAS.....	105
8.	ANEXO.....	121

1. INTRODUCCIÓN.

La diabetes mellitus caracterizada por un incremento de la glucosa en sangre, es una enfermedad que aqueja a un gran número de personas a nivel mundial. La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) absorbe el 95% de los casos y se distingue por presentarse en pacientes con resistencia, deficiencia o secreción defectuosa de insulina, generalmente adultos y con obesidad, aunque en la actualidad existe preocupación por el incremento de casos en niños y adolescentes. La DMT2 se asocia a daños a largo plazo, tales como enfermedades renales, cardiovasculares, pérdida de la vista, posibles infartos y daños al sistema nervioso, que conllevan a la incapacidad temporal o definitiva del paciente, así como a la necesidad de tratamientos crónicos costosos y a la afectación de la vida familiar y social. Se estima que para el año 2030 a nivel mundial los casos de DMT2 se incrementarán, siendo la séptima causa de mortalidad. Actualmente en México, la diabetes mellitus es la segunda causa de muerte.

Uno de los componentes de la dieta que tiene la mayor influencia en la concentración de glucosa en sangre son los carbohidratos, entre ellos los almidones y sus derivados. Aunado a esto la respuesta hiperglucémica puede tener diferentes orígenes, entre ellos se ha visto en pacientes con DMT2 que la actividad de la incretinas, hormonas promotoras de la secreción de insulina, se ve disminuida hasta en un 50 %. Por ello, la primera línea para su atención es recurrir a un estilo de vida saludable que incluya dieta balanceada incluso con reducción de carbohidratos, actividad física y reducción de grasa corporal para abatir la resistencia a la insulina; así como la posible adición de alimentos funcionales en la dieta que puedan tener un efecto benéfico para esta enfermedad más allá del nutricional. Investigaciones sobre esta enfermedad, realizadas mediante diferentes mecanismos *in vitro* han reportado que los hidrolizados de proteína tanto de origen vegetal como animal, fracciones peptídicas o péptidos bioactivos pueden regular los niveles de glucosa en sangre y presentan un gran potencial para ser incorporados como ingredientes de alimentos funcionales o en compuestos farmacéuticos, destinados a pacientes con DMT2.

En busca de alternativas alimentarias que contribuyan al tratamiento de la DMT2, en este trabajo se evaluó el potencial antidiabético de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas (obtenidas mediante ultrafiltración) de las leguminosas frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) y frijol caupí (*V. unguiculata* L.), obtenidos con los sistemas de enzimas alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina. Esto a través de la inhibición *in vitro* de las enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV. Ya que su inhibición representa una estrategia para retardar la hidrólisis de polisacáridos a oligosacáridos y liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo, así como para prolongar la vida media de las hormonas promotoras de la secreción insulina. De esta forma se aprovechó el uso de dos fuentes de proteína

vegetal, provenientes de leguminosas tropicales de la península de Yucatán (*P. lunatus* y *V. unguiculata*), las cuales son subutilizadas debido a que contienen factores antinutrimientales, principalmente en el caso de *P. lunatus*; y en el caso de *V. unguiculata* por su forma ya que, se trata de un frijol pequeño cuyo consumo predominantemente es sólo hervido. Además, dado que al trabajar con hidrolizados de proteína o fracciones peptídicas, se deben evaluar los posibles efectos adversos que estos puedan ocasionar al ser humano, debido al proceso por el cual son obtenidos, o por sus propias características fisicoquímicas resultantes, se evaluó su citotoxicidad *in vitro*.

2. ANTECEDENTES.

La Diabetes Mellitus.

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizada por hiperglucemia, la cual se refiere a un elevado nivel de glucosa en sangre. Es resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambas (*American Diabetes Association*, 2010). La insulina es una hormona polipeptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, involucrada en el metabolismo de nutrimentos, principalmente en el de los glúcidos, la cual es necesaria para transportar la glucosa en la sangre hasta las células de tejidos. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con daños a largo plazo como disfunción o fallo de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios, cardiovasculares y disfunción sexual. Diversos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes, los cuales van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina hasta anomalías que resultan en la resistencia a la acción de la misma en los tejidos, dando lugar a un metabolismo anormal de carbohidratos, grasas y proteínas (*American Diabetes Association*, 2010).

La vasta mayoría de casos de diabetes están dentro de dos categorías, la Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) y tipo 2 (DMT2). En la DMT1 o también denominada “de comienzo juvenil” se encuentran aproximadamente el 5% de los casos. Se caracteriza por una destrucción de las células beta y se presenta generalmente en niños y adolescentes, ya que la velocidad de muerte de estas células es mayor que en los adultos; sin embargo, no se descarta su ocurrencia en población adulta, pero en menor grado. Los pacientes en esta categoría presentan una deficiencia absoluta de insulina y una de las primeras manifestaciones es la cetoacidosis (acumulación tóxica de cetonas en la sangre derivado del metabolismo de las grasas). Por otro lado, se ha observado que la obesidad no necesariamente está relacionada con este padecimiento. En la categoría de DMT2 o también llamada “de comienzo en el adulto” o “no insulino dependiente” se contempla aproximadamente el 95% de los casos de pacientes. Considera individuos adultos con resistencia a la insulina, relativa deficiencia, o secreción defectuosa de dicha hormona, sin necesidad de un tratamiento de insulina para sobrevivir. En esta categoría no ocurre destrucción de células beta, sin embargo, se ha observado que un gran porcentaje de pacientes son obesos. La obesidad por sí misma puede provocar un grado de resistencia a la insulina y la manifestación de cetoacidosis es rara en esta forma de diabetes. En ambas categorías hay una alta predisposición genética para manifestar el padecimiento, pero es aún mayor en la DMT2,

aunque cabe señalar que la genética no está claramente definida (*American Diabetes Association*, 2010).

El Instituto Nacional de Salud Pública de México menciona que se espera que la epidemia global de DMT2 incremente de 171 millones de casos en el año 2000 a 366 millones en el 2030, siendo una de las causas más frecuentes de demanda de atención médica, invalidez y mortalidad en población adulta de países en desarrollo y desarrollados. Villalpando et al. (2010) reportan que la tasa de mortalidad por DMT2 representa el 30% de la mortalidad total en adultos y la prevalencia de DMT2 general en individuos mayores a 20 años es una de las más alta a nivel mundial.

La diabetes durante mucho tiempo ha sido considerada como un trastorno del metabolismo de los carbohidratos debido a su característica distintiva de la hiperglucemia. Por ello el objetivo principal en su tratamiento es la regulación de la glucosa en sangre para lograr un nivel casi normal. La concentración de glucosa en sangre después de una comida se determina por la tasa de aparición de glucosa en el torrente sanguíneo (absorción) y su aclaramiento/desaparición de la circulación. La tasa de desaparición de este monosacárido está muy condicionada por la secreción de insulina y su acción sobre los tejidos diana (Feinman et al., 2015; Sheard et al., 2004)

El componente de la dieta que tiene la mayor influencia en la glucosa en sangre son los carbohidratos y en menor grado los lípidos y proteínas (Pacheco, 2015). La elevación de la glucosa en sangre está asociada a factores como la forma del carbohidrato, el tipo de alimentos que los contienen, el grado de procesamiento, estilo de preparación, coingesta con proteínas y grasas, entre otros. Por lo que un tipo específico de carbohidrato (Ej. almidón o sacarosa) de un alimento, no predice con precisión su efecto sobre la glucosa en sangre. No obstante, la mayoría de los expertos coinciden en que el consumo total de carbohidratos de una comida o bocadillo es un predictor relativamente fiable de la glucosa postprandial en la circulación sanguínea; por lo que el impacto y la importancia relativa que el tipo o la fuente de carbohidrato tiene sobre el nivel de glucosa continúa siendo un espacio de debate. Durante las dos últimas décadas, los investigadores han intentado definir y categorizar alimentos, que contienen carbohidratos, basados en su respuesta glucémica o su propensión a aumentar la concentración de glucosa en sangre emitiendo tablas y guías de nutrición (Feinman et al., 2015; Sheard et al., 2004).

Por lo tanto debido a que la respuesta metabólica anormal de la hiperglucemia, es debida a la secreción insuficiente de insulina, resistencia a la insulina, o una combinación de ambos y que los factores de riesgo para presentar DMT2 pueden ser, la dieta, la falta de actividad física, la cantidad de grasa en el cuerpo, el grupo étnico, la historia familiar, la genética, la edad, los factores asociados a la gestación y nacimiento, entre otros (LeRoith, 2012), la primera línea de atención para el tratamiento de la DMT2 es lograr un control glucémico adecuado mediante el ejercicio (reducción de masa

grasa), reducción de peso y dieta balanceada (*American Diabetes Association, 2010*) incluso con reducción de carbohidratos e inclusión de alimentos que tengan efectos benéficos a la salud más allá de los nutricionales (Oseguera-Toledo, González de Mejía, Reynoso-Camacho, Cardador-Martínez y Amaya-Llano, 2014). Cuando la primera línea de atención no es suficiente o falla, se comienza la terapia con fármacos. Entre los medicamentos, orales para la DMT2 (Tabla 1), se encuentran seis clases (Van de Laar, 2008):

Tabla 1. Resumen de clases de medicamentos para DMT2.

Clase	Fármaco	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
Biguanidas	Metformina	Incremento de receptores tisulares de insulina	Gastrointestinales
Sulfonilureas	Tolbutamida	Estimulación de tejido pancreático para secreción de insulina.	Endocrinos, dolor de cabeza, hipoglucemia, dermatológicas
Glinidinas	Repaglinida	Estimulación de liberación pancreática de insulina.	Gastrointestinales
Tiazolidinedionas	Pioglitazona	Disminución de la resistencia a la insulina en músculos y tejido adiposo	Cefalea, infecciones tracto respiratorio, sinusitis, mialgias, faringitis, trastornos dentales.
Inhibidores de Dipeptidil peptidasa IV	Sitagliptina	Inhibidor selectivo de DPP-4, aumento de incretinas y liberación de insulina	Hipoglucemia, Gastrointestinales
Inhibidores de α -glucosidasa	Acarbosa	Inhibidor competitivo de las alfa-glucosidasa. Retardo de la hidrólisis de carbohidratos.	Gastrointestinales

Autores como Feinman et al. (2015) comentan que siguen siendo inefectivas las recomendaciones actuales para controlar la epidemia de la diabetes, se siguen presentando errores en dietas bajas en grasa para mejorar la obesidad, riesgo cardiovascular o la salud general, y continúan los persistentes efectos secundarios de medicamentos para la diabetes. Por lo que, partiendo del principio básico de reducir la concentración de glucosa en sangre, impera la necesidad de hacer una revisión y recuperación de las directrices dietéticas bajas en carbohidratos que existen en la literatura, ya que una reducción de carbohidratos en la dieta tiene beneficios inmediatos y sin efectos secundarios. Esto conlleva a estudiar sobre alternativas alimentarias que puedan ayudar a combatir la DMT2 ya sea mediante la reducción de carbohidratos en la

dieta o bien mediante el bloqueo de su disponibilidad en el organismo o mediante mecanismos relacionados con la promoción de la secreción de insulina.

Oseguera-Toledo et al. (2014) mencionan que algunas proteínas, hidrolizados de proteína, péptidos bioactivos y aminoácidos de diversos alimentos pueden controlar los niveles de glucosa de una forma directa o indirecta, mediante diferentes posibles mecanismos, por lo que podrían representar una estrategia para el tratamiento de DMT2, como posibles ingredientes de alimentos funcionales.

A la fecha no existen comercialmente productos específicos para el tratamiento de la DMT2, elaborados a partir de hidrolizados proteínicos o péptidos bioactivos. El producto StarchLite® y sus múltiples marcas comerciales, elaborado a partir de inhibidores de α -amilasa, extraídos de *Phaseolus vulgaris*, es el que actualmente se comercializa y se encuentra clasificado como un producto seguro por la *Food Drug Administration* de Estados Unidos de América.

Alimentos funcionales.

A la fecha no hay una definición clara de los alimentos funcionales (González-Aguilar, González-Córdova, Vallejo-Córdova, Álvarez-Parilla y García, 2014). La denominación de “alimento funcional” tienen sus orígenes en los años ochenta en Japón cuando el término fue introducido en los reportes del “*Systemic Analysis and Development of Food Functions*” (Análisis sistemático y desarrollo de las funciones de los alimentos). En 1991, en Japón se estableció el concepto de “Alimentos para uso específico en la salud” (*Foods for Specified Health Use*, FOSHU). A partir de entonces, el concepto comenzó a evolucionar, y en consecuencia actualmente existe una variedad de definiciones.

Sin embargo, de todas las definiciones reportadas, se destaca que la diferencia de un alimento funcional de uno común es que, para denominar al primero, éste debe demostrar satisfactoriamente (con evidencia científica, *in vitro*, *in vivo* y en humanos) la atribución benéfica. Para que al ser consumido ofrezca la posibilidad real de mejorar la salud y/o prevenir ciertas enfermedades ya que, debido a la interacción entre constituyentes y elaboración de alimentos, así como por degradación o absorción en el intestino debe alcanzar, de forma cualitativa y cuantitativa, la concentración suficiente, para que sea fisiológicamente biodisponible y por lo tanto funcional.

La popularidad de los alimentos funcionales se ha incrementado debido a los diferentes beneficios atribuidos y científicamente comprobados de los compuestos bioactivos añadidos en su formulación como ingredientes funcionales. Los cuales son compuestos diversos, obtenidos de diferentes fuentes naturales, tales como compuestos fenólicos, vitaminas, carotenoides, fibra, ácidos grasos, así como péptidos bioactivos,

entre otros, que han demostrado tener efectos positivos a la salud en el organismo humano y en la reducción de enfermedades crónico-degenerativas. Estos ingredientes pueden adicionarse a un alimento para dar un beneficio extra, además representan una forma viable de sustitución de compuestos sintéticos empleados en la industria de alimentos, para incrementar su inocuidad y aceptación en el mercado (González-Aguilar et al., 2014).

Fuentes de proteína para la obtención de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.

Existen diversas fuentes de proteína, las cuales pueden ser de origen animal y vegetal, dentro de estas últimas se encuentran, entre otras, las leguminosas.

Leguminosas.

Las leguminosas son un grupo de plantas con flores y semillas encerradas en un fruto, usualmente llamado vaina, pertenecen a la familia de las fabáceas o *leguminosae*. El humano ha domesticado varias especies, como la soya, haba, frijol, chícharos, garbanzo, lentejas, entre otros. Generalmente se consumen como semillas secas y en algunos casos como semillas inmaduras o vainas (Kigel, 1995). Desde un punto de vista nutricional son importantes debido a su alto contenido de proteína, que puede ser desde los 200 a los 400 g/kg, el cual es más alto que el de otras plantas (o vegetales) como los cereales que pueden rondar entre los 70 y 140 g/kg. Son una fuente importante de alimento a nivel mundial tanto para consumo humano como animal (Chel-Guerrero, Scilingo, Gallegos Tintoré, Dávila y Añón, 2007). Particularmente en países en desarrollo donde representan una buena fuente de proteína de bajo costo en ausencia de proteína de origen animal. Las leguminosas, además de ser ricas en proteína, son una importante fuente de carbohidratos, algunos minerales como calcio y hierro y algunas vitaminas. Se ha reportado que contienen cantidades adecuadas de lisina (mayores que en los cereales), pero son deficientes en aminoácidos azufrados (metionina, cisteína) y triptófano (Iqbal, Khalil, Ateeq y Khan, 2006).

Se ha reconocido que las proteínas de origen animal son de mejor calidad que las de origen vegetal, no obstante, las proteínas provenientes de las leguminosas, a pesar que son deficientes del aminoácido metionina, se consideran de una calidad aceptable. La calidad de la proteína, depende tanto de la proporción de aminoácidos indispensables (lisina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) que contiene en relación con los requerimientos para el organismo humano, como de la biodisponibilidad de los mismos (Badui, 2006; Duranti y Gius, 1997). La biodisponibilidad se refiere a la capacidad de incorporar los aminoácidos de la dieta a

las estructuras corporales, la cual puede verse afectada por una mala digestión o una absorción incompleta. Ya que existen diversos factores que ocasionan baja biodisponibilidad de los aminoácidos, tal como inaccesibilidad de las proteínas a las proteasas, ya sea por su conformación, por la fijación de metales o lípidos por las proteínas que dificultan su digestión; por la presencia de factores antinutricionales (por ejemplo la presencia de inhibidores de tripsina), por el tamaño y el área superficial de la proteína, así como por el procesamiento al que se haya sometido previamente (Badui, 2006; Duranti y Gius, 1997). Aunque existe una gran cantidad (miles) de especies de leguminosas, algunas no son consumidas frecuentemente debido principalmente a sus componentes antinutricionales, dejando sólo para consumo alrededor de 10 especies (Chel et al., 2007).

Debido a que las proteínas de origen animal como de carne, leche y huevo, son en general de mayor costo que las de origen vegetal, además que algunos de los problemas asociados por ejemplo a la proteína de leche son la aparición de alergias, y a la de carne, padecimientos como cáncer, enfermedades metabólicas y cardiovasculares (González-Aguilar et al., 2014), se ha incrementado en el mundo el interés por la investigación de fuentes de proteínas vegetales (Chel-Guerrero, Pérez-Flores, Betancur-Ancona y Dávila-Ortiz, 2002) para la obtención de hidrolizados proteínicos o péptidos bioactivos con actividad biológica para diversos fines. Entre las leguminosas que tienen un alto contenido de proteína, se encuentran el frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) y frijol caupí (*Vigna unguiculata* L.) (Chel et al., 2007; Prinyawiwatkul, McWatters, Beuchat y Phillips, 1996).

Frijol lima (Phaseolus lunatus L.) y Caupí (Vigna unguiculata L.).

El frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) conocido también como “ib” en México ha sido objeto de estudio desde 2002 como una fuente promisoría de alto contenido de proteína y ha sido ampliamente caracterizado y utilizado para la obtención de hidrolizados proteínicos. Es cultivado en América Latina, en el sur de Estados Unidos, Canadá, México, y otras regiones del mundo, conforme a lo reportado por Betancur-Ancona, López-Luna y Chel-Guerrero (2003). En México se distribuye principalmente en Baja California Sur, Sinaloa, Tamaulipas, Campeche, Chiapas, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2010). Es una leguminosa tolerante a la sequía con rendimientos reportados de hasta 1,500 kg /Ha. El frijol lima se cultiva ampliamente en las zonas tropicales de México, siendo la península de Yucatán la región donde se tiene mayor cantidad de variedades domesticadas (Dzul-Tejero, Coello-Coello y Martínez-Castillo, 2014).

Sus semillas se consideran una fuente de proteína subexplotada por ser una condición común entre las proteínas vegetales y principalmente por la presencia de

factores antinutricionales como toxinas y algunos glicósidos cianogénicos que han limitado su uso, no obstante, se han propuesto métodos para su destoxificación. De acuerdo a Chel et al. (2007) las semillas de *Phaseolus lunatus* L. tienen un alto contenido de proteína y un alto contenido de carbohidratos, bajos niveles de grasa y fibra como se observa en la Tabla 2. También tienen un alto contenido de minerales tales como K, Zn, Ca y Fe, y bajos niveles de Na y P (Oshodi y Adeladun, 1993). El frijol lima se considera una prometedora fuente de hidrolizados de proteína para su incorporación como ingredientes en sistemas alimentarios industriales debido a su composición de aminoácidos, la cual contribuye a la promoción de propiedades biofuncionales, tecnológicas y nutricionales (Polanco-Lugo, Dávila-Ortiz, Betancur-Ancona y Chel-Guerrero, 2014).

Tabla 2. Composición proximal de *Phaseolus lunatus* L. (Chel et. al., 2007) y *Vigna unguiculata* L. (Prinyawiwatkul et al., 1996).

Componente	<i>Phaseolus lunatus</i> L.		<i>Vigna unguiculata</i> L.	
Proteína	(210-260 g/kg)	21-26%	(241-254 g/kg)	24.1-25.4 %
Carbohidratos	(550-640 g/kg)	55-64%	(608-664 g/kg)	60.8-66.4%
Grasa	(10-23 g/kg)	1.0-2.3 %	(11-30 g/kg)	1.1 a 3.0 %
Fibra	(32-68 g/ kg)	3.2-6.8 %	(50-69 g/ kg)	5.0-6.9%
Cenizas	*	*	(34-39g/kg)	3.4 - 3.9%

*No reportado

El frijol caupí (*Vigna unguiculata* L.) es una leguminosa altamente adaptada, tolerante al estrés, versátil y nutritiva. En cultivos forrajeros ha crecido en regiones climáticas templadas y calientes de África, Asia y América (Ehlers y Hall, 1997), es un importante cultivo en Brasil y México, particularmente en las zonas tropicales y subtropicales del sureste (Segura, Chel y Betancur, 2010). En revisiones previas Freitas, Texteira y Ferreira (2004) mencionan que el caupí es un importante cultivo en muchas áreas del mundo, siendo una importante leguminosa por su gran aporte de proteína a la dieta, destinado tanto para consumo humano como animal y como fuente para la preparación de extractos e hidrolizados por su contenido de proteína (Segura et al., 2010). El perfil nutricional del caupí es similar al frijol común, sin embargo, el caupí tiene niveles más altos de ácido fólico y niveles bajos de factores antinutricionales que producen flatulencia (Ehlers y Hall, 1997). Prinyawiwatkul et al. (1996) reportaron una composición proximal del caupí de un promedio de 8 fuentes con un contenido de proteína, grasa, fibra, cenizas y carbohidratos como el mostrado en la Tabla 2; además mencionan que es una fuente rica de niacina y tiamina y otras proteínas solubles, así como de minerales como calcio, magnesio, potasio y fósforo, es altamente consumido en África en comparación con muchas otras regiones donde se consume poco.

A pesar de su potencial como una fuente rica de proteína y de energía económica es subutilizado en Estados Unidos de América y otros países industrializados por su inconveniente forma cuando es usado como ingrediente para preparaciones alimentarias por lo cual tiende a ser consumido únicamente como un producto hervido, no obstante, a pesar de ello existe un gran interés por su uso en otras formas. El caupí es una leguminosa rica en ácido glutámico, aspártico, leucina y lisina, pero bajo en aminoácidos azufrados como metionina, presenta bajo contenido de grasa y no tiene colesterol, presenta alto contenido de ácidos grasos insaturados como linoleico, linolénico y sus componentes antinutricionales principalmente son algunos inhibidores de proteasas, alérgenos como las lectinas, taninos y fitatos que también pueden eliminarse mediante remojo o cocción (Chan y Phillips, 1994; Freitas et al., 2004).

Hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.

Generalidades.

Las proteínas son el principal componente estructural de células y tejidos, necesarias para el crecimiento y desarrollo del cuerpo humano, para el mantenimiento y reparación de tejidos, así como por su acción catalítica y como constituyentes esenciales de hormonas. Son también componentes principales de los alimentos desde un punto de vista nutricional y funcional, ya que son constituyentes de fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales. Por otro lado, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos, y en algunos casos influyen en características funcionales, tales como absorción de agua o aceite, formación de emulsiones, geles y espumas (Vioque et al., 2000).

Desde los noventa el estudio de las proteínas de los alimentos, ha recibido gran atención, no sólo desde el punto de vista funcional y nutricional (Vioque et al., 2000) sino también por su actividad biológica. Por tal motivo diversas investigaciones se encuentran enfocadas en producir hidrolizados proteínicos, fracciones peptídicas y péptidos bioactivos, con una acción potencial específica que puedan mejorar la salud, al ser añadidos a alimentos funcionales y consumidos como parte de la dieta (Meisel, 2001).

La hidrólisis de la proteína es una forma efectiva de modificar sus propiedades funcionales, ya que se potencian diversas características como, baja viscosidad, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad (Benítez, Ibarz y Pagan 2008), capacidad espumante y emulsificante (Betancur et al., 2009), que les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales. Además de su uso en la modificación tecnológica y funcional, los hidrolizados de proteína

producidos enzimáticamente han tenido otras aplicaciones tales como, la reducción de la alergenicidad, la producción de péptidos bioactivos, la formulación de productos farmacéuticos y sustancias para aplicaciones clínicas (Betancur et al., 2009). Meisel (2001) menciona que cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional puede ser empleada para generar hidrolizados y péptidos con actividad biológica, lo cual permite potenciar el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas. La esencia de la hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres (Vioque, Clemente, Pedroche, Del Mar Yust y Millán, 2001). Los péptidos bioactivos están encriptados en la estructura primaria de la proteína de origen animal o vegetal como secuencias de aminoácidos inactivos, pero pueden liberarse por fermentación, procesamiento de alimentos, proteólisis catalizada por enzimas *in vitro* o por el tracto digestivo, mostrando mayor bioactividad que no se expresaba cuando se tenía la secuencia original de la proteína (Pedroche et al., 2003).

El grado de hidrólisis (GH) es la propiedad fundamental de un hidrolizado que determina en gran medida las características del mismo, así como su posible uso y está determinado por la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación, las condiciones fisicoquímicas tales como el pH, la temperatura, la naturaleza de la enzima, tipo de actividad y especificidad de ésta (Benítez et al., 2008, Vioque et al., 2001). Los hidrolizados con bajo grado de hidrólisis entre el 1% y el 10% se emplean para la mejora de las propiedades funcionales de los alimentos, los de un grado de hidrólisis variable para su uso como saborizantes y los hidrolizados extensivos (superior al 10%) para uso en alimentación especializada (Benítez et al., 2008). Éstos últimos tienen la capacidad de formar soluciones con muy baja viscosidad incluso a altas concentraciones, sin sabor y con buenas propiedades funcionales de formación de espuma y de emulsión (Betancur et al., 2009). Los hidrolizados extensivos también se pueden emplear como suplementos proteínicos o en dietas médicas (Pedroche et al., 2003; Vioque et al., 2001). En los destinados a dietas médicas, se alcanza el máximo de especialización en el hidrolizado, en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto (Vioque et al., 2001).

Sarmadi e Ismail (2010) mencionan que, con base en las propiedades estructurales y secuencias de aminoácidos, los hidrolizados proteínicos y péptidos con actividad biológica pueden tener efecto biológico antihipertensivo, inmunomodulador, opioide, antimicrobiano o antitrombótico. La gama de actividades biológicas está relacionada a las propiedades de hidrofobicidad o carga y capacidad de enlazar microelementos, que les permite actuar como hormonas o neurotransmisores a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización con acción sobre el metabolismo, controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, ejerciendo efectos sobre el sueño, dolor, apetito, efecto de las vías del estrés sobre el sistema nervioso central, ejerciendo sus efectos a nivel local o en diversos órganos una

vez que han ingresado al sistema circulatorio (Iwaniak y Minikiewicz, 2007). Entre los péptidos bioactivos potencialmente benéficos para la DMT2 que se han investigado, destacan los derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas de diferente origen. Estos péptidos suelen contener de dos a 20 aminoácidos y pueden expresar su función en el tracto intestinal o dentro del cuerpo después de haber sido absorbidos (Korhonen y Pihlanto, 2003). Escudero, Aristoya, Nishimurab, Ariharab y Toldrá (2012) mencionan que la presencia de péptidos con actividad biológica en hidrolizados proteínicos de origen vegetal incrementaría su valor, ya que una vez demostrada su actividad, resistencia a la digestión y absorción *in vivo*, podrían usarse como potenciales ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales.

Obtención de concentrados, hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas.

Desde el comienzo de los setentas, la industria de los alimentos ha desarrollado diversos procedimientos para la elaboración de productos utilizando proteínas de origen animal y vegetal, para la obtención tanto de concentrados o aislados proteínicos de alta calidad, así como procedimientos de hidrólisis enzimática de proteínas y fraccionamiento para generar nuevos ingredientes alimentarios con características funcionales y nutricionales bien definidas (Pedroche et al., 2003) o con actividad biológica.

- *Concentrados proteínicos.*

Para la obtención de concentrados proteínicos de origen vegetal, un método muy utilizado es el fraccionamiento húmedo, aunque pueden emplearse también la extracción en seco (Schutyser, Pelgrom, Goot y Boom, 2015). El fraccionamiento húmedo se ha aplicado para diversas leguminosas y tiene el beneficio de aprovechar por completo el uso del grano, ya que se obtienen los aislados proteínicos, así como las fracciones ricas en fibra y almidón. Betancur-Ancona, Gallegos-Tintoré y Chel-Guerrero (2004) emplearon el fraccionamiento húmedo para optimizar la obtención de aislados proteínicos de *P. lunatus*. Este método está basado en solubilizar la proteína en una solución alcalina y precipitarla a su punto isoeléctrico. Los productos resultantes se clasifican de acuerdo al contenido de proteína en: Concentrados proteínicos (<65%) y aislados proteínicos (65-90%) (Pedroche et al., 2003).

- *Hidrolizados proteínicos.*

Entre las estrategias empleadas para obtener hidrolizados proteínicos con actividad biológica, destacan la hidrólisis con enzimas comerciales (Tabla 3), los procesos de fermentación, la digestión gastrointestinal *in vivo* y la síntesis química basada en la secuencia de péptidos, cuya actividad ya ha sido estudiada (Meisel, 2001).

Tabla 3. Ejemplos de proteasas comercialmente disponibles (Benítez et al., 2008; Bolaños, Lutz y Herrera, 2003; Merz, 2015; Morel, 2000; Ramírez Ortiz, 2015; Vasudevan y Sreekumari, 2012).

Tipo de proteasa		Nombre	Fuente	T(°C)	pH	Sitio de acción catalítica
<i>Serinproteasa</i>	Animal	Tripsina		30-60	7-9	. *Lis (o Arg)...
		Quimotripsina	Porcino, bovino	45-55	8-9	. *Trp (o Tir, Fe, Leu)...
		Elastasa			6-8	. *Ala...
	Bacteriana	Subtilisin. Carlsberg. Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	. *AAhf...
		Subst. BPN Subtilisin Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	
<i>Cisteinproteasas</i>	Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	. *Fe (o Val, Leu).
		Bromelaína	Piña	20-65	5-8	AAhf
		Ficina	Látex de Ficus		5-8	
<i>Aspartatoproteasas</i>	Animal	Pepsina	Porcino, bovino	25-37	1-4	.Fe (o Tir, Leu)*-Trp
		Quimosina	Becerro		4-6	(o Fe, Tir)
	Fúngica	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu*...
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40-50	3-6	Similar a la pepsina
<i>Metaloproteasas</i>	Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas Bacillus		7-8	*Carbonilo de AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
	Bacteriana	Neutrasa	<i>amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7.5	.Fe, Leu, Val*...
		Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>		7-9	.Ile, Leu, Val, Fe*

Continuación Tabla 3.

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	T(°C)	pH	Sitio de acción catalítica
<i>Preparaciones enzimáticas</i>					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima	Papaína cruda	Fruto de la papaya		5-9	Amplia especificidad
Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	37	7-9	Muy amplia especificidad
Mezcla de serin-aspartato- y metalo proteasas	Veron P. Sumicina LP.				
Mezcla de endo-y exo-proteasas, actividad en pH alcalino y neutro	Biocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
	Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	Muy amplia especificidad
Mezcla de aspartatoproteasas, metaloproteasas y carboxipeptidasas	Flavourzima	<i>Aspergillus oryzae</i>	4-8	10-55	Amplia

*Indica sitio de acción de las proteasas sobre el sustrato

AAhf indica aminoácidos hidrofóbicos

Las proteínas hidrolizadas con procesos químicos, utilizando ácidos o álcalis, se pueden oxidar o se pueden destruir o modificar algunos aminoácidos, reduciendo así la calidad de la proteína (Betancur et al., 2009). El método más elegido en la industria alimentaria es el uso de enzimas proteolíticas (Potier y Tomé, 2008) ya que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas, funcionales y sensoriales de las proteínas nativas sin afectar su valor nutricional (Betancur et al., 2009).

Particularmente la pepsina y la pancreatina son enzimas usadas principalmente para promover la digestibilidad de las proteínas. La pepsina (EC 3.4.23.1) utilizada en la industria de alimentos, es una enzima (endoproteasa) de origen animal (bovino o porcino), cuya especificidad es la hidrólisis preferencial entre residuos hidrofóbicos aromáticos como fenilalanina (tirosina o leucina) y triptófano (o fenilalanina, tirosina). La pancreatina (CAS. 8049-47-6, EC 232-468-9) es una preparación de enzimas digestivas, obtenida de páncreas de porcino (o bovino), conformada por las endopeptidasas: tripsina, quimotripsina, elastasa y una exopeptidasa, la carboxipeptidasa. La tripsina hidroliza enlaces peptídicos que están precedidos por lisina o arginina; la quimotripsina muestra preferencia por aminoácidos como fenilalanina, triptófano, tirosina y leucina; la elastasa rompe en donde haya alanina o glicina, formando así péptidos que son fragmentados en sus carbonos terminales por la carboxipeptidasa para formar aminoácidos, ya que ésta última cataliza la hidrólisis del enlace peptídico C-terminal de péptidos cualquiera que sea su longitud de la cadena o identidad del residuo del aminoácido C-terminal (Müller-Esterl, 2008).

Las enzimas pepsina y pancreatina se han empleado de forma individual o secuencial para la obtención de hidrolizados de proteína, y en algunos casos se ha empleado en forma secuencial para simular el proceso de digestión gastrointestinal (Velarde-Salcedo, 2013). Algunos investigadores (Megías et al., 2004; Mojica, Chen y Mejía 2015; Polanco-Lugo et al., 2014; Segura et al., 2010; Velarde-Salcedo et al., 2013) han empleado en forma secuencial estas enzimas para la producción de hidrolizados y péptidos bioactivos a partir de proteínas vegetales, reportando la obtención de hidrolizados extensivos con grados de hidrólisis que van desde un 16 a un 60%, dando lugar a una mezcla de péptidos de diferente tamaño con potencial antidiabético (al inhibir enzimas como la DPP-IV, α -amilasa y α -glucosidasa), potencial antioxidante o efecto hipotensor. Dichos autores han empleado diferentes tiempos de hidrólisis desde 90 min, 1 h, 2, 3 y 4 h de hidrólisis. Megías et al. (2004) al trabajar con hidrolizados de proteína de girasol para obtener péptidos inhibidores de ECA, observaron que la actividad de la pepsina es rápida durante los primeros minutos y produce péptidos bioactivos, pero posteriormente su actividad se hace más lenta, lo cual se refleja en una disminución de la bioactividad de los péptidos, no obstante, al paso de 45 min la actividad de los péptidos bioactivos vuelve a incrementar. Observaron que la adición de pancreatina en forma secuencial favorece desde el inicio en que es adicionada, un grado de hidrólisis mayor que cuando se trabaja sólo con pepsina, permitiendo obtener por un tiempo más

prolongado, péptidos bioactivos, encontrando dentro de los primeros 60 min, péptidos con la máxima actividad inhibitoria. Segura et al. (2010) reportaron que, con 90 min de hidrólisis, al trabajar con *V. unguiculata*, se obtuvo un grado de hidrólisis similares que los reportados por otros autores al trabajar por 3 h.

La alcalasa y la flavourzima son también enzimas comerciales utilizadas en el procesamiento de alimentos. La alcalasa (EC 3.4.21.62) obtenida de *Bacillus licheniformis* es ampliamente utilizada para la hidrólisis de proteínas en la industria y la investigación, es una endoproteasa con amplia especificidad por enlaces peptídicos y preferencia por residuos grandes no cargados (*Integrated relational Enzyme database* [IntEnz], 2016), residuos hidrofóbicos (Benítez et al., 2008) y también se ha visto que escinde en aminoácidos del lado carboxil de ácido glutámico, metionina, leucina, tirosina, lisina y glutamina (Rocha, Hernández, Chang y de Mejía, 2014). La alcalasa se ha utilizado para hidrólisis de proteínas debido a que ha demostrado una gran actividad proteolítica en la producción de péptidos con actividades biológicas, antiinflamatorias, antioxidantes, hipotensoras y para la regulación de la glucosa (Li-Chan, Hunag, Jao, Ho y Hsu, 2012; Oseguera-Toledo, de Mejía y Amaya-Llano, 2015; Ren et al., 2016; Segura et al., 2010; Torruco-Uco, Chel-Guerrero, Martínez-Ayala, Dávila-Ortiz y Betancur-Ancona, 2009). Se han obtenido hidrolizados extensivos y obtención de péptidos desde 400 Da a 1-2 kDa, con potencial antidiabético, que inhiben enzimas como la DPP-IV, α -amilasa y α -glucosidasa (Oseguera-Toledo et al., 2015; Ren et al., 2016).

La flavourzima (CAS 9014-01-1, EC 232-752-2) es un complejo de exopeptidasa-endoproteasa (Betancur et al., 2009) que es vendida como un preparado industrial derivado de *Aspergillus oryzae* que hidroliza tanto enlaces internos como externos de la cadena de proteína. La información sobre su composición es escasa; pero recientemente en una caracterización exhaustiva del preparado de flavourzima, se ha reportado que está conformada por ocho enzimas clave (Merz et al., 2015): Dos aminopeptidasas (que liberan aminoácidos N-terminal preferentemente donde haya leucina), dos dipeptidil peptidasas (que liberan dipéptidos N-terminales con preferencia en prolina), dos neutroproteasas (que rompen en residuos hidrofóbicos preferentemente), una alcalinoproteasa (que hidroliza proteínas con una amplia especificidad, pero no hidroliza enlaces de péptidos) y una α -amilasa (no proteasa que hidroliza enlaces glucosídicos) (IntEnz, 2016). La flavourzima es usada para la hidrólisis de proteínas en varias aplicaciones industriales y de investigación; se ha utilizado para hidrólisis de proteínas de algunas leguminosas como caupí y garbanzo (Pedroche et al., 2002; Segura et al., 2010) en forma secuencial con la alcalasa. Como su nombre sugiere, la producción de compuestos activos de sabor de varias fuentes de proteínas es su mayor aplicación (Merz et al., 2015). Se ha investigado que su uso en forma individual o secuencial con la alcalasa produce altos grados de hidrólisis y disminuye el sabor amargo que se produce en algunos productos durante la hidrólisis (Betancur et al., 2009) debido a residuos hidrofóbicos. Por su capacidad de generar compuestos activos de

sabor y de ser una enzima con amplia especificidad por las endo y exoproteasas que la conforman, al emplearla en conjunto con la alcalasa se ha reportado la obtención de péptidos bioactivos con actividad hipotensora (Pedroche et al., 2002; Ruiz-Ruiz, Dávila Ortiz, Chel-Guerrero y Betancur-Ancona, 2010). Se ha reportado que el uso secuencial de proteasas alcalasa-flavourzima ha permitido la obtención de hidrolizados extensivos en hidrolizados de proteína de girasol, más que utilizando dichas enzimas en forma individual (Villanueva, Clemente, Bautista y Millán, 1999). Pedroche et al. (2002) reportaron con hidrolizados de proteína de garbanzo, la obtención de péptidos bioactivos con máximas actividades de inhibición de ECA empleando un tiempo de hidrólisis con alcalasa-flavourzima de 90 min y después de este tiempo descendió la actividad. Con el empleo de la alcalasa y flavourzima en forma individual se han logrado obtener algunos péptidos con potencial antidiabético o hipotensor.

El uso secuencial de proteasas permite la obtención de hidrolizados proteínicos extensivos con altos grados de hidrólisis en un periodo de tiempo razonable a diferencia del empleo con una sola enzima (Ruiz-Ruiz et al., 2010). Además con base en la revisión bibliográfica realizada sobre los hidrolizados y fracciones peptídicas con potencial antidiabético citada más adelante, se observa que empleando en algunos casos la enzimas pepsina-pancreatina y alcalasa o flavourzima, se ha generado la producción de inhibidores de las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV a partir de hidrolizados extensivos y de las fracciones peptídicas generalmente de tamaño pequeño (<1-3 kDa), por lo que es conveniente emplear la enzimas pepsina, pancreatina y alcalasa, flavourzima en forma secuencial para garantizar grados de hidrólisis altos, que potencien la liberación de péptidos bioactivos, además que con el sistema alcalasa-flavourzima se tiene el beneficio de reducir sabores amargos, a un tiempo de hidrólisis de 90 min ya que con este tiempo se ha visto que se pueden obtener péptidos biológicamente activos trabajando a valores de pH y temperatura óptima de las enzimas.

- *Fracciones peptídicas ultrafiltradas.*

La mayoría de los productos obtenidos a base de proteína se purifican antes de que puedan ser utilizados. Las necesidades de llevar a cabo esta etapa suelen ser: la obtención de altas purzas, el enriquecimiento de la concentración de proteínas o fracciones, la eliminación de las impurezas, el cumplimiento de especificaciones del producto, entre otros (Saxena, Tripathi, Kumar y Shahi, 2009). Las proteínas e hidrolizados proteínicos pueden fraccionarse en diferentes grupos según sus propiedades físicas y químicas similares, mediante una variedad de diferentes métodos como ultracentrifugación, cromatografía de exclusión de tamaño, de interacción hidrofóbica, en fase reversa, de intercambio iónico, de afinidad, por electroforesis en gel (Adhikari, Manthena, Sajwan, Kota y Roy, 2010; Bougatef et al., 2010; Issaq, Conrads, Janini y Veenstra 2002) o por ultrafiltración.

Algunos hidrolizados proteínicos que han mostrado tener actividad biológica como inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, o para regular la glucosa en sangre, suelen fraccionarse para separarse, con base al tamaño molecular y/o a los péptidos bioactivos formados. En diversos trabajos, la obtención de fracciones peptídicas, se ha obtenido mediante procesos de ultrafiltración utilizando membranas con cortes de peso molecular (MWCO, *Molecular weight cut-off*, en Daltons) de 10.000 Da (10 kDa), 5000 Da (5 kDa), 3000 Da (3 kDa) y 1000 Da (1 kDa) (Cho, Unklesbay, Hsieh y Clark, 2004; Choi, Sabikhi, Hassan y Anand, 2012; Ruiz-Ruiz, Dávila-Ortíz, Chel-Guerrero y Betancur-Ancona, 2013).

Para la concentración de proteínas, las membranas se han utilizado tradicionalmente para la separación basada en tamaño con altos rendimientos, e incluyen procesos como la microfiltración, la clarificación, filtración estéril y ultrafiltración (Saxena et al., 2009). Con estos procesos de membrana, se puede realizar la filtración de soluciones biológicas que contiene proteínas, péptidos, aminoácidos, sales y otros compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas. Entre las aplicaciones que contempla el uso de membranas, se incluyen la concentración de proteínas de suero durante la producción de una variedad de productos lácteos, la filtración de vino o la purificación de soluciones de aguas. Se han utilizado tradicionalmente para separar especies de tamaño diferente, como las proteínas de las células, caldos de fermentación, células escombros y la separación de componentes de bajo peso molecular a partir de proteínas. De tal forma que la ultrafiltración se ha convertido en el método de rutina para la separación/fraccionamiento de proteínas (Saxena et al., 2009). En comparación con métodos cromatográficos, las técnicas de separación con membrana ofrecen ventajas de menor costo, facilidad y factibilidad de escalamiento para la producción comercial, siendo una de sus principales desventajas el ensuciamiento en la membrana debido a la absorción de proteínas durante la filtración.

Particularmente, la ultrafiltración ha sido el método preferido y ampliamente utilizado para la concentración de proteínas incluso reemplazando a la cromatografía de exclusión por tamaño, ya que las membranas suelen ser de diversos polímeros sintéticos, con alta estabilidad térmica y resistencia química. En comparación con métodos de concentración mediante procesos térmicos, métodos de decantación, filtración, centrifugación y diversas aplicaciones de cromatografía, la ultrafiltración resulta en un método atractivo para el área de alimentos por su facilidad de implementación, flexibilidad del módulo, tamaño compacto según su diseño, ofreciendo ventajas de automatización. Por lo que se suele emplearla como una de las primeras etapas de purificación para concentrar la proteína y facilitar posteriores procesos de separación (Barragán, 1999). En el área alimentaria ofrece ventajas de seguridad, competitividad y manejo relativamente sencillo (Saxena et al., 2009).

La ultrafiltración convencional se limita a la separación de solutos que difieren hasta en 10 veces su tamaño. La elección de la membrana se guía por lo general por el peso molecular de corte (MWCO), que se define como el peso molecular equivalente de la proteína más pequeña que exhibe aproximadamente un rechazo del 90%. Los módulos de ultrafiltración ofrecen la separación física de las corrientes retenidas y las filtradas, un soporte mecánico para la membrana (de ser necesario), acceso para la limpieza y transferencia de masa.

Hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con potencial antidiabético.

Oseguera-Toledo et al. (2014) mencionan que se ha demostrado que algunas proteínas, hidrolizados de proteína, fracciones peptídicas o péptidos bioactivos y aminoácidos de origen vegetal pueden controlar los niveles de glucosa directa o indirectamente, mediante mecanismos como la inhibición de las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), la secreción de incretinas e insulina, el incremento de la captación de la glucosa en los tejidos para su utilización y evitar su acumulación extracelular, así como mediante la disminución en la producción de glucosa, tal como se muestra en la Tabla 4, donde se observan algunos hidrolizados de proteína, fracciones peptídicas o péptidos bioactivos obtenidos de diferentes fuentes de proteína, que han demostrado por diferentes mecanismos tener potencial antidiabético.

Algunas investigaciones sobre hidrolizados, fracciones peptídicas y péptidos bioactivos se han realizado a partir de fuentes de proteína de origen animal y origen vegetal, en los que se ha demostrado que dichos componentes tienen el potencial para inhibir las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Por lo que se ha establecido que, estos compuestos pueden ofrecer la posibilidad para su incorporación dentro de alimentos funcionales o productos farmacéuticos (Lacroix y Li-Chan, 2013; Lee et al., 2011; Matsui, Yoshimoto, Osajima, Oki y Osajima, 1996).

Tabla 4. Ejemplos de hidrolizados, fracciones peptídicas y péptidos bioactivos con potencial antidiabético (Mojica et al. 2015; Oseguera-Toledo et al., 2014; Oseguera-Toledo et al., 2015; Velarde-Salcedo et al., 2013).

Fuente de proteína	Enzima empleada para hidrolizar la proteína	Secuencia de aminoácidos con potencial para regular la glucosa	Mecanismo de acción probado	Modo (modelos <i>in vitro</i>)
Amaranto	Tripsina 7, pancreatina	Hidrolizados * STHASGFFFFHPT, STNYFLISCLLFVLFNGCMGEG, GLTEVWDSNEQEF, TIEPHGLLLPSFTSAPELIYIEQ GNGITGMMIPGCPETYESGSQQFQGGEDE	Inhibición de DPP-IV	Ensayo enzimático
Proteína de soya	Pepsina y pancreatina	Péptidos *	Captación de glucosa en células musculares.	Captación de glucosa en miocitos L6
Linaza	Tripsina y pronasa	Fracciones peptídicas*	Captación de glucosa en células musculares	Captación de glucosa en miocitos L6
Frijol común precocido	Pepsina-pancreatina	Hidrolizados [FATGT, QRRLLRRK, KLLRRLQ, LAPPG, REYLLVAQ, LRENNKLMLELK, RLLKLRQ, LSERRMLLRKEKQAQ]	Inhibición de α -amilasa, α -glucosidasa Inhibición de DPP-IV	Ensayo enzimático
Caupí germinado	Alcalasa	Hidrolizados [TTAGLLE]	Inhibición de DPP-IV	Ensayo enzimático
Frijol común (Pinto Durango)	Alcalasa Bromelaina	Hidrolizados y fracciones <1 kDa [LLSL, QPEG, NEGEAH] Hidrolizados y fracciones <1 kDa y 1–3 kDa	Inhibición de α -amilasa, DPP-IV Inhibición de α -amilasa, α -glucosidasa, DPP-IV Incremento de la secreción de insulina estimulada por glucosa en células iNS-1-E	Ensayo enzimático

Continuación Tabla 4.

Fuente de proteína	Enzima empleada para hidrolizar la proteína	Secuencia de aminoácidos con potencial para regular la glucosa	Mecanismo de acción probado	Modo (modelos <i>in vitro</i>)
Salvado de arroz desgrasado	Umamizima, G, Bioprasa SP	LP, IP	Inhibición de DPP-IV	Ensayo enzimático
	Alcalasa	Hidrolizados [LLSL] y fracciones <1 kDa [LSLL]	Estimulación de captación de glucosa, Inhibición de DPP-IV	En células
Frijol común (Negro)	Bromelaína	Hidrolizados[LLSL] fracciones <1 kDa [LLSL]	Estimulación de captación de glucosa, Inhibición de DPP-IV	En células
		Fracciones <1 kDa [FFL]	Inhibición de DPP-IV	Ensayo enzimático

*Secuencia no disponible

Mojica et al. (2015) reportaron que los hidrolizados de proteína de frijol *P. vulgaris* de diferentes variedades, obtenidos con pepsina-pancreatina, tuvieron actividad inhibitoria de la α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV, resultando los inhibidores más potentes, los hidrolizados de la variedad rojo y navy. Por otro lado, Ngoh y Gan (2016) en una investigación realizada con un hidrolizado de proteína de frijol pinto (*P. vulgaris*), obtenido mediante hidrólisis con protamex (proteasa de *Bacillus sp*) encontraron que la fracción peptídica ultrafiltrada menor a 3 kDa, mostró la mayor inhibición de la enzima α -amilasa respecto a otras fracciones. Los péptidos presentes en dicha fracción con mayor inhibición fueron PPHMLP, PLPWGAGF, PPHMGGP, PLPLHMLP y LSSLEMGS LGALFVCM. Yu, Yin, Zhao, Liu y Chen (2012) reportaron en una investigación de un hidrolizado de albumina de huevo, obtenido con alcalasa, que el péptido purificado KLPGF mostró la mayor actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa y α -glucosidasa, concluyendo que dicho péptido puede ser un buen candidato para posteriores investigaciones como compuesto antidiabético. Oseguera-Toledo et al. (2015), reportaron en un estudio con hidrolizados de proteína de *P. vulgaris*, obtenidos con alcalasa o bromelaína, que tanto los hidrolizados, así como las fracciones peptídicas de tamaño menor a 1 kDa mostraron la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV respecto a otras fracciones. Posteriormente mediante una simulación computacional de los péptidos hallados en los hidrolizados y las F<1 kDa, encontraron que los péptidos LLSL, QQEG, FFL se enlazaron con la α -amilasa y DPP-IV y el NEGEAH a la α -amilasa debido a interacciones con el sitio catalítico.

Por otro lado, Lacroix y Li-Chan (2013) en una investigación con hidrolizados de proteína de suero, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina y lactoferrina, obtenidos mediante hidrólisis con pepsina, reportaron que estos compuestos pueden tener efectos benéficos sobre la regulación de la glucemia ya que, fueron capaces de inhibir la enzima α -glucosidasa y DDP-IV. Otros autores han reportado la producción de hidrolizados de proteína de músculo de sardina (Matsui et al., 1996), de capullo de seda (Lee et al., 2011) como inhibidores de la α -glucosidasa, coincidiendo en algunos casos que las mejores inhibiciones de enzima se obtuvieron en fracciones peptídicas de tamaño <1 a 3 kDa.

En un estudio publicado por Rocha et al. (2014) con hidrolizados de proteína de *V. unguiculata*, obtenidos por hidrólisis con alcalasa, reportaron actividad inhibitoria sobre la enzima DPP-IV, y después de ser hidrolizados con pepsina-pancreatina encontraron que mediante una simulación de unión molecular el péptido TTAGLLE se enlazó a la α -amilasa en una forma que bloqueaba su sitio activo. Por otro lado, en estudios realizados por Li-Chan et al. (2012) se reportó que los hidrolizados obtenidos con alcalasa, bromelaína y flavourzima a partir de proteína de gelatina de piel de salmón, presentaron actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV. Siendo el hidrolizado obtenido con flavourzima el que mostró mayor actividad inhibitoria. Aunado a estos resultados, cuando fraccionaron dicho hidrolizado, obtuvieron que la fracción peptídica menor a 1 kDa tuvo

la mayor actividad inhibitoria sobre dicha enzima y posteriormente cuando separaron por cromatografía esta fracción, hallaron la presencia de los péptidos GPAE y GPGA de 372 y 300.4 Da respectivamente, en una de las fracciones obtenidas con mayor actividad inhibitoria. De dicha investigación concluyeron que estos péptidos podrían ser utilizados como ingredientes de alimentos funcionales para el manejo de la DMT2.

Velarde-Salcedo et al. (2013) reportaron que los hidrolizados de proteína de amaranto, obtenidos por digestión con tripsina y pancreatina, presentaron actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV. Y mediante una simulación de unión molecular observaron que algunos péptidos STHASGFFFFHPT, STNYFLISCLLFVLFNGCMGEG, GLTEVWDSNEQEF, TIEPHGLLLPSFTSAPELIYIEQ GNGITGMMIPGCPETYESGSQ QFQGGEDE fueron capaces de unirse a la DPP-IV en diferentes sitios. Otros estudios han reportado la producción de inhibidores de DPP-IV a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas como de salvado de arroz (Hatanaka et al., 2012), jamón seco curado (Gallego, Aristoy y Toldrá, 2014), jugo de cocción de atún (Huang, Jao, Ho y Hsu, 2012) y caseína (Nongonierma y Fitzgerald, 2013), coincidiendo en su mayoría que las fracciones peptídicas entre 1 a 2 kDa presentan altas inhibiciones.

A la fecha no se han encontrado estudios realizados con hidrolizados y fracciones peptídicas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* de las que se haya evaluado su potencial para inhibir la enzima α -amilasa y α -glucosidasa. En la generación de inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa, son más las investigaciones realizadas, a partir de otros compuestos no proteínicos de origen vegetal, tales como extractos de plantas, o extractos de inhibidores de α -amilasa naturales de frijol común.

Enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y mecanismos de su inhibición para la regulación de glucosa en sangre.

Existe diversas enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos con diferentes mecanismos para la regulación de la glucosa en sangre, dentro de las cuales se encuentra la α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.

Enzima α -amilasa.

El almidón es un polisacárido que forma parte de la dieta humana que proporciona energía para el crecimiento y el desarrollo del organismo. En su forma nativa, se le encuentra en diversos tejidos vegetales como polen, hojas, tallos, raíces, tubérculos, bulbos, rizomas, frutas y semillas. Se extrae en forma pura a partir de una variedad de fuentes como trigo, arroz, papa, cebada, avena, guisantes, tapioca y principalmente en maíz. Los animales consumen almidón en su forma nativa, a través

de granos de cereales. Sin embargo, los seres humanos lo consumen exclusivamente a partir de cereales, tubérculos y raíces cocidos y mediante diversos productos como pan, pastas, galletas, entre muchos otros, encontrándose en su forma digerible. El almidón se adiciona a la alimentación humana en muchas formas modificadas, como agentes espesantes, gelificantes, entre otros usos, para proporcionar textura e inevitablemente energía (calorías). Los almidones nativos son tanto indigeribles como incapaces para contribuir a la estructura de muchos alimentos, por esta razón se modifican química, enzimática o físicamente para adquirir propiedades deseables para aplicaciones específicas y producir una diversidad de productos como pastas, geles digeribles, dextrinas con diversos usos en la industria de alimentos, jarabe de glucosa, maltodextrinas, glucosa cristalina (dextrosa) y maltosa (Tester, Karkalas y Qi, 2004).

Por lo anterior el almidón se considera la principal fuente de carbohidratos en la dieta humana (LinAmy et al., 2012). El cual está conformado (Figura 1) por una mezcla de amilosa, un polisacárido no ramificado de unos 100 a 1000 residuos de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos α -(1→4) y amilopectina, un polisacárido ramificado de la amilosa con enlaces α -(1→4) en las cadenas lineales de residuos de D-glucosa y enlaces glicosídicos α -(1→6) en las ramificaciones (Horton, Moran, Scrimgeour, Perry y Rawn, 2008). Durante la alimentación, la digestión del almidón (Figura 1) comienza en la boca por la acción de la amilasa salival. Conforme transcurre el tiempo de la digestión, la acidez inactiva la α -amilasa salival y la longitud promedio de la cadena del almidón se reduce de varios miles de residuos de glucosa a menos de ocho o nueve unidades. La digestión continúa en el intestino delgado bajo la influencia de la α -amilasa pancreática, que es similar a la de la saliva, la cual degrada el almidón a una mezcla del disacárido maltosa, el trisacárido maltotriosa y oligosacáridos conocidos como dextrinas (Figura 1). Estos oligosacáridos serán posteriormente hidrolizados a monosacáridos para ser absorbidos en el intestino y transportados a la circulación sanguínea para su distribución y utilización en los tejidos del organismo (Feduchi, Romero, Yáñez, Blasco y García-Hoz, 2011; Ferreira, et al., 2010).

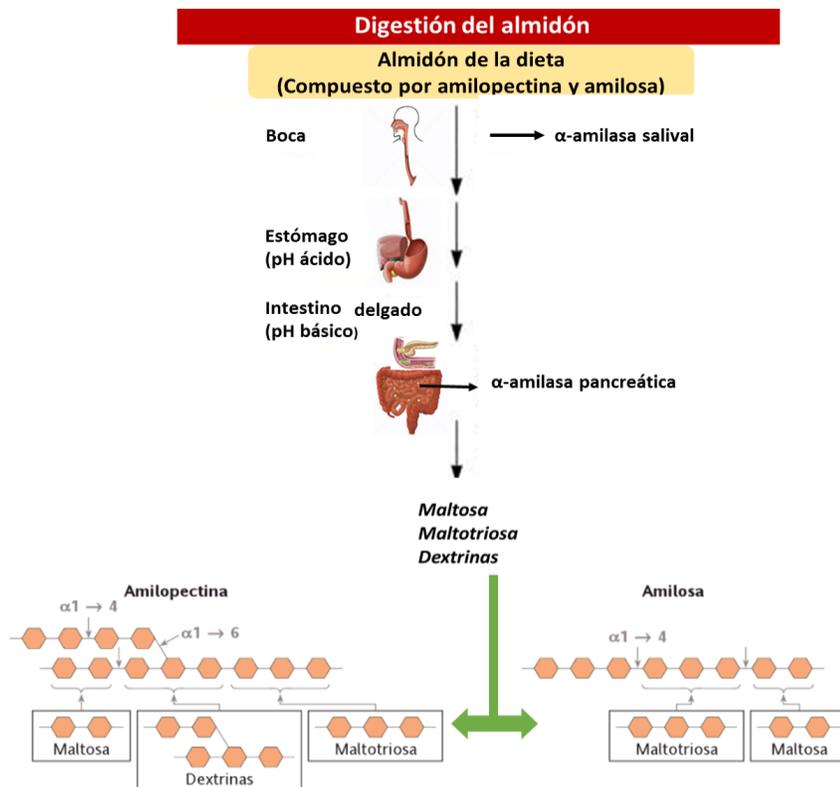


Figura 1. Acción de la α -amilasa sobre la digestión del almidón (Feduchi et al., 2011).

La digestión del almidón en el ser humano se lleva a cabo por la acción de la α -amilasa (EC 3.2.1.1; 1- α -4-D-glucano hidrolasa) que es un enzima que actúa sobre el almidón, el glucógeno y otros oligosacáridos relacionados, de una forma aleatoria para formar azúcares simples (oligosacáridos). Esta enzima se produce principalmente en las glándulas salivales (glándulas parótidas) y en el páncreas (Horton et al. 2008). En los animales el pH óptimo de la α -amilasa es de 6.7 a 7.2. Es una enzima que pertenece a la clasificación de las hidrolasas cuya especificidad es la hidrólisis de enlaces glicosídicos internos α -(1 \rightarrow 4) de polisacáridos mayores a tres residuos de glucosa (IntEnz, 2016).

La estructura tridimensional de la α -amilasa ha sido reportada para varias especies y se indica que está compuesta por tres dominios estructurales A, B, y C. Con su sitio activo en el dominio A, en una depresión en forma de "V" localizada en el N-terminal central, que comprende un barril (β/α)₈ y los aminoácidos carboxílicos Asn 197, Glu 233 y Asp 300. El dominio A sirve su vez como un andamio para el dominio B, el más pequeño en donde se une el ion calcio, el cual da estabilidad a la estructura terciaria. El dominio C está conformado por una estructura β -aniparalela que puede dar

protección contra otras enzimas digestivas (Mahmood, 2014; Qian, Haser, Buisson, Duee y Payan, 1994).

La inhibición de la α -amilasa, retarda la disponibilidad oligosacáridos que serán convertidos en la glucosa, retardando consecuentemente su absorción intestinal, por lo que esta acción representa una estrategia para el tratamiento de DMT2 (Oseguera-Toledo et al., 2014). Motivo por el cual cada vez más investigadores se encuentran interesados en la búsqueda de inhibidores efectivos de esta enzima, a partir de diferentes fuentes (Yu et al., 2012) tales como los hidrolizados de proteína o fracciones peptídicas a partir de proteínas de origen vegetal.

Algunos investigadores indican que la inhibición de la α -amilasa sucede debido a que los péptidos contenidos en los hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas compiten con el sustrato natural y se enlazan directamente al sitio catalítico de la enzima provocando su inhibición (Oseguera-Toledo et al., 2015, Yu et al., 2012).

O bien los péptidos interactúan o se enlazan con el dominio activo de la α -amilasa, restringiendo los requerimientos estructurales, afectando el grado de acoplamiento del sustrato por la enzima. Generándose una superficie de interacción más pequeña para el sustrato, de tal forma que el intermediario glicosil-enzima no se puede formar debido a una barrera para el desplazamiento de la α -amilasa sobre el sustrato, provocando en consecuencia una baja actividad de la misma. Lo anterior ha sido reportado por Ngho y Gan (2016). en una investigación realizada con péptidos inhibidores de la α -amilasa obtenidos de *P. vulgaris* (frijol pinto) quienes sugirieron que la inhibición pudo estar determinada primordialmente por el bajo número de subsitios para el acoplamiento del almidón o modificación estructural del sitio activo. Esto basado en que el mecanismo propuesto de la actividad de la α -amilasa es el de “corredizo” (Mazur y Nakatani, 1993). En el que la enzima se mueve a lo largo del sustrato sin disociación y la interacción entre el almidón y la enzima es preferentemente débil y ocurre vía enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, e interacciones con grupos aromáticos de la cadena. Utilizando así un mecanismo catalítico de doble desplazamiento en el cual se forma un intermediario glicosil-enzima que es hidrolizado posteriormente por catálisis ácido-base (Mahmood, 2014).

Ngho, Lim y Gan (2017) así como Ngho y Gan (2016) también indican que los péptidos inhibidores de la α -amilasa identificados en sus investigaciones con *P. vulgaris*, se enlazaron a aminoácidos de la α -amilasa que no necesariamente tienen una alta participación en la reacción catalítica, de tal forma que se enlazan a la enzima, produciendo una forma alterada de ésta que deshabilita el enlazamiento entre la enzima y el sustrato natural.

Mojica et al. (2015) mencionan que en la inhibición son claves el tipo y la secuencia de aminoácidos en el potencial de interacción entre los grupos funcionales de los péptidos inhibidores con los aminoácidos en el sitio catalítico de la enzima. Pues en el caso de la inhibición competitiva, ésta ocurre cuando las fracciones peptídicas se posicionan con los aminoácidos del sitio catalítico mediante interacciones que dependen de las distancias y grupos funcionales en las cadenas (como puentes de hidrógenos, enlaces polares, interacciones hidrofóbicas, entre otras).

Machius, Vértesy, Huber y Wiegand (1996) reportaron en una investigación con un polipéptido inhibidor de la α -amilasa de 9000 Da, el tendamistat, que la inhibición de la enzima pudo deberse a un comportamiento que implicó que los diferentes segmentos de este polipéptido hayan interactuado en una forma cooperativa con la enzima. En donde es posible que esta modifique su conformación para acomodar al tendamistat u otros inhibidores de origen proteínico, dando lugar así a la inhibición. Ya que se observó que dicho inhibidor tuvo interacciones que involucraron cuatro diferentes regiones a lo largo de la hendidura de la α -amilasa entre los dominios A y B, donde el segmento I del tendamistat (que contiene Tir, Trp, Arg, Tir) se enlazó directamente a la región del sitio activo. Bloqueando así los cinco centros de enlazamiento de residuos de glucosa. Y otros segmentos del inhibidor se enlazaron a otros subsitios de enlazamiento de glucosa, así como a residuos en la α -amilasa que están más alejados del sitio activo, en la superficie de la hendidura.

Enzima α -Glucosidasa.

En los humanos, cuatro enzimas son las responsables para completar la degradación del almidón en glucosa (Ferreira et al., 2010), molécula capaz de ingresar al torrente sanguíneo por transportadores específicos. Las primeras enzimas son la α -amilasa salival y pancreática que se mencionaron en el apartado anterior y posteriormente la isomaltasa y maltasa (α -glucosidasa) (Ferreira et al., 2010).

La α -glucosidasa pertenece a la clasificación de las enzimas hidrolasas, las cuales catalizan las reacciones de hidrólisis de diferentes sustratos, tales como los oligosacáridos para producir unidades de α -D-glucosa. Está presente en una amplia gama de seres vivos como microorganismos, hongos, plantas y animales (Krasikov, Karelov y Firsov, 2001). La especificidad por el sustrato y sus propiedades dependen en gran medida de la fuente de donde haya sido obtenida (Kim, Kim, Nam y Kurihara, 2008). Una vez que la α -amilasa ha hidrolizado el almidón y generado maltosa, maltotriosa y dextrinas, éstas últimas que son oligosacáridos de 4 a 9 residuos de glucosa con enlaces α -(1 \rightarrow 4) y ramificaciones α -(1 \rightarrow 6) son hidrolizadas por la isomaltasa que hidroliza enlaces α -(1 \rightarrow 6). La maltosa y la maltotriosa serán hidrolizadas por la α -glucosidasa (o maltasa) para generar residuos de glucosa. De esta manera se producen unidades de

glucosa que serán posteriormente absorbidas para su correspondiente transporte y distribución en el organismo (Figura 2).

La α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) está presente en el ser humano en el cepillo borde del intestino delgado, realizando funciones anabólicas, como la degradación de carbohidratos en la etapa final de la digestión (Ferreira et al., 2010). Su especificidad es principalmente la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 4) de oligosacáridos para liberar glucosa, aunque también puede hidrolizar enlaces (1 \rightarrow 6) pero muy lentamente. La α -glucosidasa también se encuentra como EC 3.2.1.3, enzima lisosomal que hidroliza enlaces α -(1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 6) del glucógeno liberando glucosa libre (Kakavanos, Hopwood, Lang, Meikle y Brooks, 2006). A pesar que las isomaltasas no pertenecen a ninguna de las familias de las glucosil hidrolasas, se llegan a considerar también como α -glucosidasas (Krasikov et al., 2001).

Aunque la glucosa puede ser absorbida en intestino delgado, la maltosa, los trisacáridos y las dextrinas generados de la hidrólisis del almidón no. Las células epiteliales absorbentes que revisten las vellosidades intestinales producen un número de otras enzimas entre ellas la α -glucosidasa “en el borde cepillo” para permitir la digestión y subsecuente absorción de tales materiales y de disacáridos derivados de otras fuentes (Figura 2). Consecuentemente la hidrólisis de algunos carbohidratos ocurre en la superficie de las células epiteliales en el intestino delgado más que en el lumen del intestino (Tester et al., 2004). Las enzimas del “borde cepillo” incluyen también la sacarasa que libera glucosa y fructosa de la sacarosa, la lactasa que libera glucosa y galactosa de la lactosa, enzimas que no son relevantes para el metabolismo del almidón (Figura 2) pero que son de importancia para la digestión de otros disacáridos de la dieta (Feduchi et al., 2011; Tester et al., 2004).

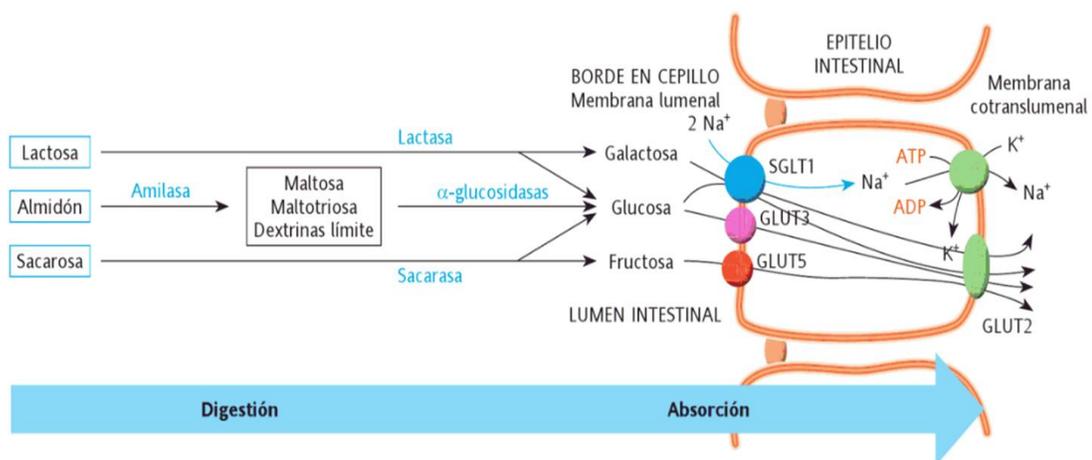


Figura 2. Enzimas y productos implicados en la digestión de carbohidratos (Feduchi et al., 2011).

Se ha visto en estudios con α -glucosidasas de *Sacharomyces cerevisiae* (McCarter y Withers, 1996) que α -glucosidasa se trata de una exoenzima. Cuya estructura tridimensional es similar a la de las amilasas y otras glicohidrolasas de la familia 13, que conserva un sitio activo en forma de hendidura con la región catalítica (Asp 214, y Glu 276) en el barril (β/α)₈ en el dominio A, así como características relacionadas de los tres dominios A, B, C, (Krasikov et al., 2001), que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -glicosídicos terminales de oligosacáridos, liberando residuos de α -glucosa del extremo no reductor de sustratos como di o trisacáridos (Krasikov et al., 2001, Yoon, Mukerjee y Robyt 2003). En su estructura, se ha encontrado que cuenta con tres subsitios para el enlazamiento de unidades de glucosa importantes para la actividad catalítica (Yao, Mauldin y Byers, 2003).

Van de Laar (2008) menciona que los inhibidores de las α -glucosidasa retrasan la absorción de carbohidratos reduciendo la hiperglucemia postprandial; tienen un papel en el estado prediabético reduciendo la progresión de la diabetes, complicaciones vasculares crónicas y la obesidad. Por ello la inhibición de la α -glucosidasa que disminuye la disponibilidad de la glucosa que será absorbida en el intestino, al evitar que se liberen residuos de este monosacárido, resulta en una estrategia para el tratamiento de DMT2 (Matsui et al., 1996; Yu et al., 2012) en conjunto con la inhibición de la α -amilasa.

En la actualidad permanece desconocido el mecanismo por el cual los péptidos bioactivos inhibidores de la α -glucosidasa interactúan con esta. Algunos autores han encontrado en sus investigaciones, que las interacciones podrían ser del tipo hidrófobas proteína-proteína, y dependen de los grupos funcionales en las cadenas proteínicas, pudiéndose darse interacciones del tipo: enlaces de hidrógeno, enlaces polares, enlaces interacciones hidrófobas, entre otras (Lacroix y Li-Chan, 2013; Mojica et al., 2015). Por lo que es determinante para los péptidos inhibidores de la α -glucosidasa el tipo de aminoácido y la secuencia en que estos se encuentran para interactuar con el sitio catalítico (Mojica et al., 2015) u otros sitios de la enzima.

Respecto a los medicamentos comercialmente disponibles para el tratamiento de DMT2, conocidos como inhibidores de la α -glucosidasa (AGIS), éstos son una clase única de antidiabéticos. Estos fármacos orales derivados de bacterias son inhibidores de la enzima que no tienen un mecanismo de acción pancreático, trabajan para reducir la hiperglucemia postprandial y proveen de un beneficio cardiovascular incuestionable. Los (AGIS) fueron inicialmente aislados a partir de cultivos bacterianos o sus derivados: acarbosa de *Actinoplanes*, miglitol, un derivado semisintético de la 1-desoxinojirimicina, de *Bacillus* y *Streptomyces sp.*, y voglibosa, validamicina A, un producto de *Streptomyces hygroscopicus*. Mientras que la acarbosa fue desarrollado por primera vez en Alemania, y posteriormente aprobado en todo el mundo.

Dentro de los fármacos existentes en el mercado se encuentran: la acarbosa (Glucobay®) que inhibe la maltasa, sucrasa, glucoamilasa y la amilasa pancreática; el miglitol (Glyset®) que difiere de la acarbosa en que no inhibe la amilasa pancreática y la voglibosa (Volix®) que es más débil que la acarbosa y tampoco inhibe la amilasa pancreática; siendo el primero el más prescrito. Los efectos secundarios predominantes de estos fármacos son los gastrointestinales (Van de Laar, 2008). La acarbosa inhibe las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, en tanto que la voglibosa y el miglitol solo inhiben las enzimas que hidrolizan disacáridos, pero no la α -amilasa (Kalra, 2014).

Enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

Muchos de los tratamientos para la DMT2 están enfocados en el uso de análogos de GLP-1 (péptido similar al glucagon-1), receptores agonistas GLP-1 e inhibidores de DPP-IV (Dipeptidil peptidasa IV). El GLP-1 y GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) son hormonas incretinas que estimulan la liberación de insulina del páncreas en una forma glucosa-dependiente. Ambos péptidos son sustratos naturales para la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) siendo rápidamente degradados *in vivo* sobre linfocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos resultando en una pérdida de su actividad insulínica. Por ello los inhibidores de DPP-IV protegen a las incretinas de esta enzima degradadora, incrementando así la vida media de la actividad de dichas hormonas (Power, Nongonierma, Jakeman y FitzGerald, 2014) (Figura 3a).

La DPP-IV conocida también como adenonisa desaminasa de enlaces de proteína o CD26 (EC 3.4.14.5) es una aminopeptidasa ubicua, expresada en la superficie de varios tipos de células incluyendo linfocitos, monocitos y en tejidos del páncreas, riñón, hígado y tracto gastrointestinal. Tiene una especificidad de sustrato relativamente estricta y principalmente rompe dipéptidos conteniendo prolina o alanina del N-terminal del polipéptido sustrato (Figura 3 b). Estudios de su cinética han demostrado que las velocidades de rompimiento ocurren a pH entre 7.5 y 8.5 a 37°C (Power et al., 2014).

La estructura de la DPP-IV consta de una unidad de dos monómeros unidos mediante un doble eje, con dos dominios (el β -hélice y α/β hidrolasa) entre los cuales se encuentra la tríada catalítica (Ser 630, His740 y Asp708) al interior de la estructura de la enzima, en una cavidad en forma de un bolsillo hidrofóbico, cuyo acceso se puede dar por dos puertas. La puerta grande que es la preferida por los sustratos naturales y por la cual sólo péptidos alargados o incluso proteínas desdobladas pueden acceder al sitio activo de la enzima (Aertgeerts et al., 2004; Power et al., 2014). O la puerta pequeña que es una forma de embudo como un túnel situado en el dominio el β -hélice. La estructura de la DPP-IV contiene dos residuos E (glutamato) esenciales para la actividad enzimática y reconocimiento del N-terminal del sustrato y su anclaje al sitio catalítico, un

subsitio S1 (para el acomodo e interacción con residuos de prolina o alanina) y S2 (para reconocimiento de otros residuos hidrofóbicos largos y aromáticos) (Aertgeerts et al., 2004; Power et al., 2014; Velarde-Salcedo et al., 2013).

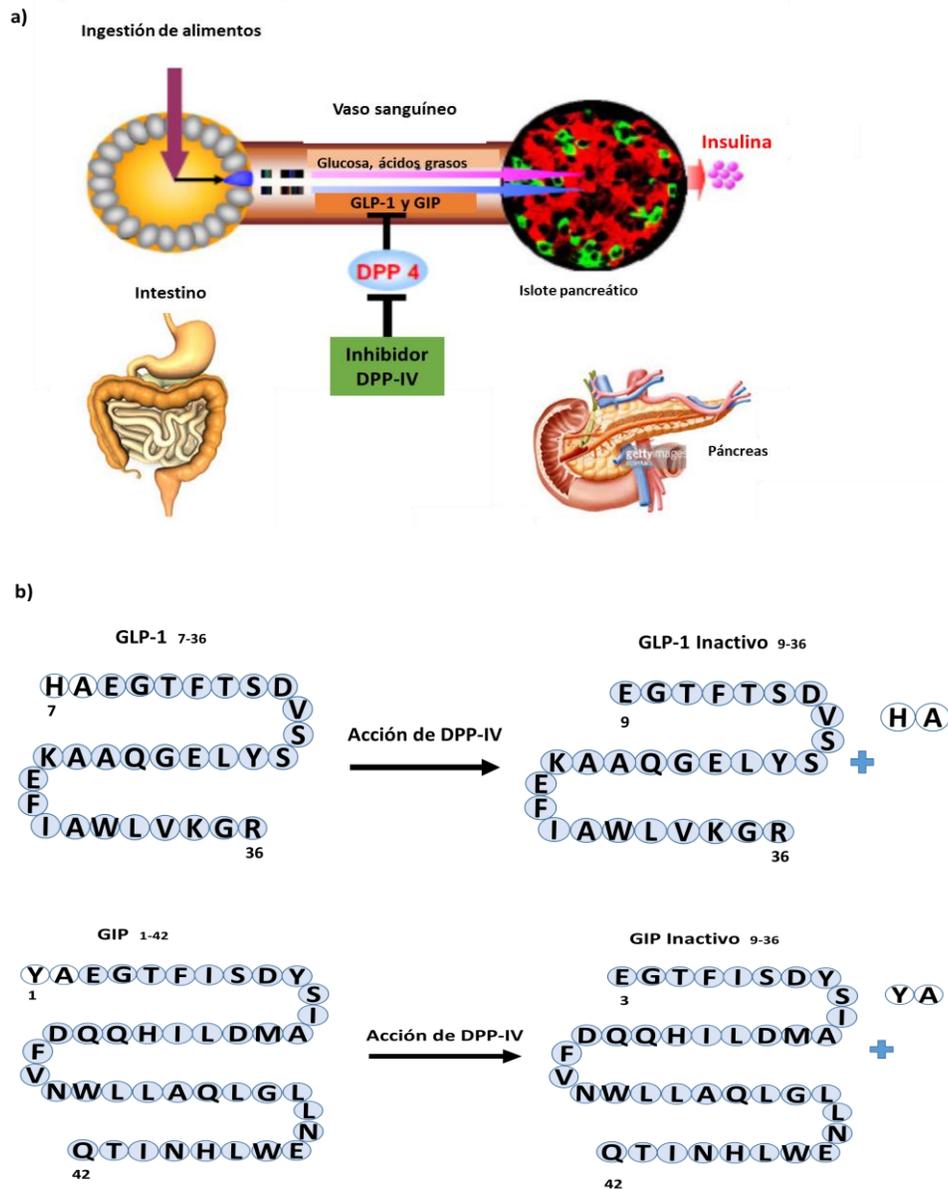


Figura 3. a) Secreción de las incretinas (GLP-1 y GIP) en el intestino, durante la ingesta de alimentos, y su acción de promoción de secreción de insulina en el páncreas (Células rojas β) para la regulación de glucosa en sangre (Kim y Egan, 2008). b) Inhibición de las incretinas por la enzima DPP-IV (Power et al., 2014).

Durante una comida las incretinas GLP-1 y GIP son liberadas dentro del intestino delgado y actúan como los reguladores primarios de la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, en un paciente con DMT2 la actividad de dichas hormonas se ve disminuida hasta en un 50% comparado con una persona saludable. El GLP-1 es un péptido pro-glucagon derivado presente en las células (L) enteroendocrinas, las cuales son predominantemente encontradas en la porción inferior del intestino delgado. Es liberado a la circulación en su forma activa, pero tiene una vida corta de 2-4 min y es rápidamente degradado por la enzima dipeptidil peptidasa (DPP-IV) la cual rompe el dipéptido N-terminal (His-Ala) produciendo un GLP-1 inactivo. El GIP es un péptido que es liberado de las células (K) duodenales en el intestino delgado proximal. Es secretado en respuesta a ingestión de nutrientes como grasa y carbohidratos y se eleva dentro de los 5-10 min del periodo postprandial con picos de 30 a 60 min después de la ingestión de nutrientes. Es inactivado por la DPP-IV por el rompimiento del dipéptido N-terminal (Try-Ala) (Power et al., 2014) (Figura 3 b).

Se ha demostrado que un número de péptidos actúan como inhibidores competitivos de la DPP-IV que compiten con el sustrato por el sitio catalítico. Los inhibidores no competitivos pueden interactuar con sitios de enlaces secundarios (por ejemplo, sitios receptores y sitios de reconocimiento de sustrato) y modifican la especificidad del sustrato y actividad catalítica de la DPP-IV (figura 4).

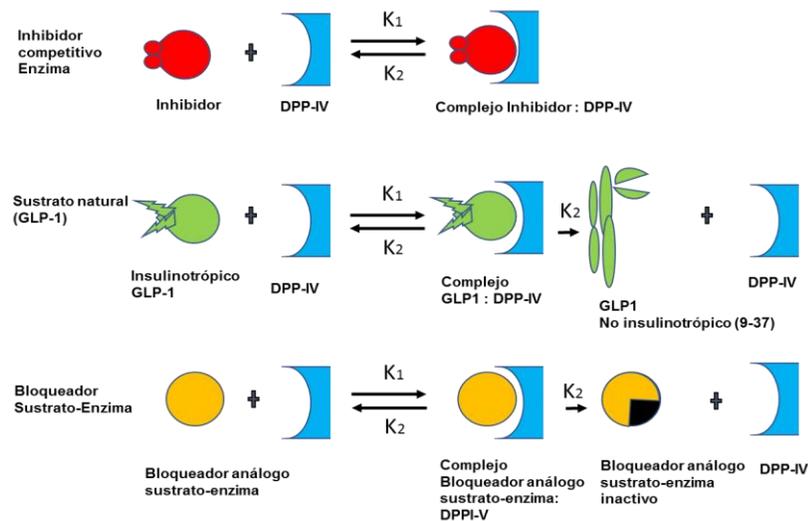


Figura 4. Modo de acción de los inhibidores de la DPP-IV (Ahrén et al., 2011).

Velarde-Salcedo et al. (2013) analizaron péptidos identificados, obtenidos de hidrolizados de proteína de amaranto y mediante una simulación de unión molecular, encontraron que estos (principalmente los péptidos pequeños menores a 13 residuos)

interactuaron dentro de la cavidad de la puerta de entrada preferida por los sustratos naturales de la DPP-IV, bloqueando su acceso y otros de mayor tamaño de hasta 50 residuos interactuaron en la interface de la DPP-IV bloqueando su forma activa.

Los inhibidores de DPP-IV conocidos como gliptinas son fármacos emergentes peptidomiméticos o no peptidomiméticos. Los primeros imitan el dipéptido N-terminal. Entre los fármacos comerciales inhibidores de DPP-IV se encuentran: Vildagliptina, (Galvus®), Saxagliptina (Onglyza™), Linagliptina (Tradjenta™), Sitagliptina (Januvia®), Alogliptina (SYR-322). La mayoría de los inhibidores de DPP-IV son bien tolerados, sin embargo, algunos efectos adversos de componentes de la gliptina han sido reportados como dolores de cabeza, infecciones urinarias y del tracto respiratorio (Power et al., 2014) así como reacciones gastrointestinales.

Citotoxicidad

Generalidades.

Autores como Hartmann, Wal, Bernard y Pentzien (2007) reportan que debe probarse mediante estudios en humanos, el efecto benéfico a la salud del consumo de hidrolizados o péptidos bioactivos. Al igual que debe tomarse en cuenta la valoración de los posibles efectos adversos que estos componentes podrían ejercer o bien los subproductos, que podrían estar contenidos inevitablemente en tales alimentos, antes de ser ampliamente consumidos, para asegurar que no representa un riesgo a la salud humana. Dentro de los requerimientos de valoración de efectos adversos se incluye la ausencia de toxicidad, citotoxicidad y alergenicidad.

Las reacciones adversas a los alimentos se dividen clásicamente en tóxicas y no tóxicas. Las reacciones tóxicas, en la cual se incluye la citotoxicidad, se producen en cualquier individuo de la población general a condición de una dosis de exposición que sea suficiente. Las reacciones adversas no tóxicas sólo se producen en determinados grupos de la población o incluso en individuos predispuestos que tienen una base genética particular y la susceptibilidad a ciertos alimentos. Esta categoría comprende las reacciones que están mediadas inmunológicamente (por ejemplo, alergia) y varias otras reacciones, dependiendo de los mecanismos biológicos implicados. Las reacciones adversas que no están mediadas inmunológicamente también implican (en alimentos) el llamado fenómeno de intolerancia. La causa puede ser enzimática (por ejemplo, intolerancia a la lactosa, la cual se debe a la deficiencia de lactasa), farmacológica (por ejemplo, la particular reactividad a sustancias bioactivas que pueden ser componentes naturales de los alimentos o de los aditivos alimentarios) y en su mayoría desconocida, o combinación de varios mecanismos (Hartmann et al., 2007). En el caso de la alergenicidad, la resistencia a la hidrólisis proteolítica con pepsina, se sigue proponiendo

como un criterio adicional a la evaluación de riesgos de proteínas alérgicas. Ya que en el caso de que una degradación rápida y extensa de una proteína en presencia de pepsina no se confirme en condiciones apropiadas, deben llevarse a cabo estudios adicionales para determinar la probabilidad de que la proteína pueda ser alérgica, en caso contrario no sería relevante realizar esta prueba (Hartmann et al., 2007).

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos de producir una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño; a través de estímulos las células pierden su equilibrio homeostático, que provoca que se adapten, se degeneren o mueran y estos daños pueden ser detectados. Entre los ensayos para su cuantificación, se encuentran por ejemplo los métodos que miden la actividad metabólica celular, los de proliferación celular o los de exclusión celular para medir la viabilidad de las células, mediante tinciones (Acevedo et al., 2013, Hartmann et al., 2007). Los métodos que estiman el número de células viables en cultivo se basan por lo general en la medición de un indicador de la actividad metabólica o medición de masa celular. Tales como los métodos de tinción desarrollados para medir células viables metabólicamente activas en base a su capacidad de convertir ciertas clases de productos químicos en formas que se pueden medir fácilmente o compuestos químicos que se unen a determinadas moléculas de las células. Los ensayos de citotoxicidad, técnicas de cultivo *in vitro* dan una idea del potencial citotóxico de tales compuestos en vivo (animales o humanos) (Stoddart, 2011) y pueden ayudar a comprender el mecanismo de acción, lo cual ayuda a minimizar los costos de estudios clínicos, así como el uso de animales de laboratorio (Hartmann et al., 2007).

Línea celular para ensayos de citotoxicidad.

Los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un importante papel para identificar y caracterizar los potenciales efectos biológicos de agentes químicos y físicos que rodean al hombre. Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentran, las células CHO (células de hámster de ovario chino), las células VERO (células de riñón de mono verde), células RK (de riñón de conejo), las células HeLa (células de cáncer cervical), las células MCDK (células de riñón de canino Madin Darby), las cuales pueden ser utilizadas para ensayos de citotoxicidad (Acevedo et al., 2013).

Para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas de *P. lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. en el presente trabajo, se seleccionó la línea celular Vero ATCC-CCL-81 (línea celular epitelial normal de riñón de mono verde africano) por su disponibilidad, velocidad de crecimiento, facilidad de cultivo y homología a las células humanas (Liao, Shi, Jia, Jia y Wang et al., 2010). Los sistemas de cultivo de células intestinales han recibido gran atención como modelos para estudios toxicológicos, ya que el intestino es uno de los sitios principales de la exposición a compuestos bioactivos y tóxicos (Hartmann et al., 2007).

Estudios han demostrado que los compuestos citotóxicos pueden perturbar la función normal del epitelio del intestino. Además, las monocapas de células epiteliales representan una barrera para toxinas y antinutrientes. Este hecho subraya la importancia particular de los modelos de cultivo de células epiteliales para una evaluación de la citotoxicidad integral de proteínas y péptidos (Hartman et al., 2007). La línea celular Vero a pesar de no representar un modelo del enterocito humano como las células epiteliales intestinales HT29 o la Caco-2, las cuales a pesar de tratarse de células malignas presentan mayores similitudes morfológicas y funcionales a los enterocitos humanos sanos (Hartman et al, 2007; Singh, Mitic, Wieckowski, Anderson y McClane, 2001), representa un modelo común para el estudio de nefrotoxicidad (Dias et al., 2009) y efectos citopáticos extensivos. En diversos estudios de citotoxicidad ha demostrado ser susceptible a diversos componentes tóxicos de diversas plantas y otros compuestos químicos como trazas contaminantes, así como ciertas toxinas, virus y microbios (Bézivin, Tomasi, Lohezic-Le Devehat y Boustie, 2003; Freire, Labrador, Martín y Hazen, 2005; Osada et al., 2014; Srivastava, Ahmad y Khan, 2015).

Lo anterior resulta relevante ya que el transporte de un compuesto ajeno al organismo (*xenobiótico*) implica su exposición a diferentes partes de éste, por ejemplo, hígado, riñón, glándulas sudoríparas, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, entre otros, pudiendo ser biotransformado, almacenado o llegar a un sitio específico de acción causando alteraciones biológicas. El riñón es el sistema de excreción por excelencia para desechar compuestos a través de la orina (Valle y Lucas, 2000). Por lo que el flujo alto de sangre al riñón combinado con su capacidad para concentrar solutos puede exponer a este órgano a altas concentraciones de xenobióticos. Dantas et al. (2015) mencionan que la nefrotoxicidad causada por la exposición a agentes *xenobióticos* es un problema, no obstante, los factores responsables de la susceptibilidad a las lesiones aún no se han comprendido plenamente. El túbulo epitelial es particularmente susceptible a lesión, atribuida en parte a la sensibilidad, velocidad metabólica y alta exposición a concentraciones intracelulares de compuestos que aquellos normalmente vistos con otros tipos de células en el cuerpo. Por lo que el daño celular en el epitelio tubular resultaría en la pérdida de función de transporte, reduciendo así el transporte de electrolitos, tales como sodio y cloruro, tal como lo observaron Dantas et al. (2015) en un estudio realizado con veneno de víbora *Bothrops marajoensis*.

Citotoxicidad de hidrolizados proteínicos o péptidos bioactivos

Existen investigaciones donde se ha reportado que algunas proteínas, hidrolizados proteínicos y péptidos de origen animal y vegetal que son ingeridos como alimentos normales o funcionales pueden exhibir un determinado potencial citotóxico en el sistema humano. Algunos autores como (Wang y de Mejía, 2005) reportaron que péptidos obtenidos por hidrólisis de proteína de soya desgrasada, como el nonapéptido (X-M-L-P-S-Y-S-P-Y) purificado, mostró cierta citotoxicidad *in vitro* en una línea celular

de macrófagos de monocitos de ratón. Otros estudios de péptidos de hidrolizados de proteínas de leche como α -S1-caseína (obtenidos mediante digestión con tripsina de bovino) con secuencias identificadas arginil-proli-lisina, leucil-lisil-lisina y tirosil-lisina, nombrados α -caseidicinas, mostraron citotoxicidad hacia las células sanas T y B de ratón (Otani y Susuki, 2003). Sin embargo, también se ha evaluado que péptidos inhibidores de ECA derivados de caseína bovina no presentaron citotoxicidad en ensayos realizados con líneas celulares ECV-304 (células venosas endoteliales umbilicales humanas) (Wu, Yu, Zhang, Che y Jiang, 2014). Resultados similares se encontraron cuando se evaluaron hidrolizados de proteína muscular de rana en líneas celulares de fibroblastos de pulmón embrionarios (MRC-5) (Qian, Jung, Lee, Byun y Kim, 2007). Así como con hidrolizados de miofibrillas de carne y extractos de proteína de tejido conectivo, que produjeron péptidos bioactivos no citotóxicos, con capacidad antioxidante y de inhibición de ECA, los cuales fueron probados en células Vero (Ryder, Bekhit, McConnell y Carne, 2016).

Cabe señalar que varios estudios informan también sobre un potencial citotóxico de péptidos y proteínas bioactivas, exclusivamente o al menos en un grado más alto en experimentos con células malignas (Hartmann et al., 2007). Por lo que estos componentes bioactivos podrían tener un efecto benéfico contra cáncer (Hartmann et al., 2007). Por ejemplo, se ha identificado citotoxicidad *in vitro* de proteínas de la leche como lactoferrina que ha mostrado efectos en la proliferación de linfocitos mediada por lectina, la α -lactoalbúmina inhibe la proliferación de la línea celular intestinal IEC-9, Caco-2 y HT29 e induce la apoptosis en células linfoides (Hartmann et al., 2007). Se ha reportado por ejemplo, que proteínas de frijol runner (o ayocote) (*Phaseolus coccineus* cv.) han presentado actividad antiproliferativa en líneas celulares de leucemia (Ngai y Ng, 2004); los frijoles Jack han presentado inhibición de líneas celulares de estudio (Fitzgerald et al., 2001); un péptido purificado obtenido a partir de frijol común también tuvo efecto citotóxico sobre líneas celulares con cáncer de mama y leucemia (Wong y Ng, 2005). En el caso de la proteína de trigo y otras gramíneas han presentado inhibición de la síntesis de ADN/ARN en células Caco-2 e inhibición de crecimiento de diferentes células de mamíferos (Giovannini, Mancini y De Vincenzi, 1996).

Compuestos tóxicos de P. lunatus L. y V. unguiculata L.

Durante el procesamiento y obtención de productos alimenticios proteínicos tales como los concentrados e hidrolizados, se pueden presentar cambios en la proteína debido a los métodos de procesamiento u obtención. Uno de los procesos ampliamente empleados para la obtención de concentrados de proteína, es el tratamiento de esta con álcalis (como hidróxido de sodio) para lograr su solubilización y también se puede emplear para mantener las condiciones alcalinas durante el proceso de hidrólisis de la proteína, lo cual puede dar lugar a la degradación de varios aminoácidos como cisteína, arginina, treonina y serina, que son los más sensibles. Por lo que, bajo condiciones alcalinas y temperaturas moderadas, se pueden formar productos que se han

encontrado son nefrotóxicos en ratas, por ejemplo, la lisinoalanina, la ornitinoalanina y la lantionina. La lisinoalanina se forma por desulfuración de la cisteína y el sulfuro es liberado como ácido sulfhídrico. El tratamiento de la serina y residuos de fosfoserina con álcali también pueden dar lugar a la dehidroalanina. El grado de formación de lisinoalanina depende de la naturaleza de la proteína, la duración y temperatura de reacción y la concentración del álcali utilizado. Para diferentes proteínas de leguminosas, por ejemplo, de frijol mungo, caupí (*Vigna unguiculata* L.) y cacahuate, se ha reportado que producen cantidades considerables de lisinoalanina cuando son tratadas con hidróxido de sodio 0.05 a 0.075 N a 20°C por 30 min y el contenido por gramo de proteína puede variar de 200 a 800 mg/100g, sin embargo, las proteínas de frijol como el “riñón” y lima (*Phaseolus lunatus* L.) se han reportado estables bajo estas condiciones (De Vries, 1996).

Los compuestos antinutrimientales presentes en ciertas leguminosas, también pueden inducir efectos tóxicos indirectamente. Los mayores efectos tóxicos de las leguminosas son producidos por los inhibidores de proteasas y lectinas, compuestos de estructura proteínica (Sotelo, Arteaga, Frías y González-Garza, 1980). Las lectinas, consideradas como auténticas enterotoxinas a diferencia de los inhibidores de proteasas, tienen una afinidad específica por ciertos receptores que se localizan en la membrana celular como es el caso de la membrana de los eritrocitos, y se ha visto que entre sus efectos tóxicos se encuentran el retraso en el crecimiento e incluso la muerte, causando una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con destrucción del epitelio y edema, al interactuar con los vellos intestinales o lesiones epiteliales del intestino (Valle y Lucas, 2000). Sotelo et al. (1980) encontraron que la viabilidad *in vitro* de células epiteliales de intestino de rata se vio disminuida al estar en contacto con extractos de proteína de frijol escumite (*Phaseolus acutifolios*), posiblemente relacionada con el contenido de lectinas en dicha especie.

Las lectinas se pueden inactivar por procesos de calentamiento o remojo (Adeparusi, 2001; Lajolo y Genovese, 2002) o mediante obtención de concentrados proteínicos (Olivera-Castillo et al., 2007). Se ha visto que aun cuando los concentrados proteínicos son sometidos a procesos de hidrólisis enzimática, algunos inhibidores de proteasas han sido capaces de resistir la proteólisis con pepsina-pancreatina *in vitro* (Lajolo y Genovese, 2002) y las lectinas pueden ser tóxicas si resisten la hidrólisis de enzimas digestivas (Valle y Lucas, 2000) pudiéndose observar cantidades residuales (Olivera-Castillo et al., 2007). Freitas et al. (2004) reportaron que en la fracción de proteína albúmina de *V. unguiculata*, las lectinas exhibieron actividad de aglutinación de eritrocitos hacia eritrocitos triptinizados de conejo, pero en la fracción de globulina purificada, principal proteína de almacenamiento de esta leguminosa no se observó actividad. Olivera-Castillo et al., 2007 reportaron que en la obtención de un concentrado de proteína de *V. unguiculata*, no se detectó actividad debida a lectinas. De La vega y

Sotelo (1986), reportaron que el contenido de lectinas en *P. lunatus*, fue bajo en especies domesticadas en comparación con especies silvestres.

Debido al procesamiento por el cual atraviesa la obtención de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas a partir de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, la presencia de componentes tóxicos se prevé baja o nula, sin embargo, tomando en cuenta la complejidad de los péptidos bioactivos péptidos y sus procedimientos de preparación, se hace necesario mantener la evaluación de sus posibles efectos adversos (Wang y de Mejía, 2005). Por lo que sólo evaluando la ausencia de éstos o demostrando que son despreciables, los productos proteínicos podrían postularse como benéficos a la salud sin restricciones (Hartmann et al., 2007).

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Evaluar el potencial antidiabético y el efecto citotóxico *in vitro* de hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas ultrafiltradas obtenidas a partir de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L.

3.2. Objetivos particulares.

Estimar el grado de hidrólisis de los hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, generados con los sistemas secuenciales de enzimas alcalasa-flavourzima y pepsina-pancreatina.

Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los hidrolizados proteínicos y sus correspondientes fracciones peptídicas de tamaño >10, 5-10, 3-5, 1-3 y <1 kDa, obtenidas por ultrafiltración, sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV,

Valorar el efecto citotóxico *in vitro*, de los hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas que hayan tenido la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV.

Establecer el perfil de aminoácidos de los hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas que hayan tenido la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

En la Figura 5, se presenta el esquema completo sobre la metodología seguida para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo.

Los granos de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, se limpiaron y molieron para obtener las harinas, las cuales se suspendieron en una solución alcalina para la obtención de los aislados de proteína por precipitación de ésta hasta su punto isoeléctrico. Los aislados proteínicos de cada frijol se sometieron a un proceso de hidrólisis enzimática con el sistema secuencial de enzimas alcalasa-flavourzima y con el sistema secuencial de enzimas pepsina-pancreatina, utilizando ambos sistemas en forma independiente. Posteriormente los cuatro hidrolizados proteínicos obtenidos se ultrafiltraron para obtener cinco fracciones peptídicas de tamaño >10, 5-10, 3-5, 1-3 y < 1 kDa a partir de cada hidrolizado.

Se evaluó el potencial antidiabético de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas ultrafiltradas, mediante la actividad inhibitoria *in vitro* de cada uno de éstos sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV. A los hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas, que presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre dichas enzimas se les determinó la IC₅₀, su perfil de aminoácidos y su citotoxicidad *in vitro*.

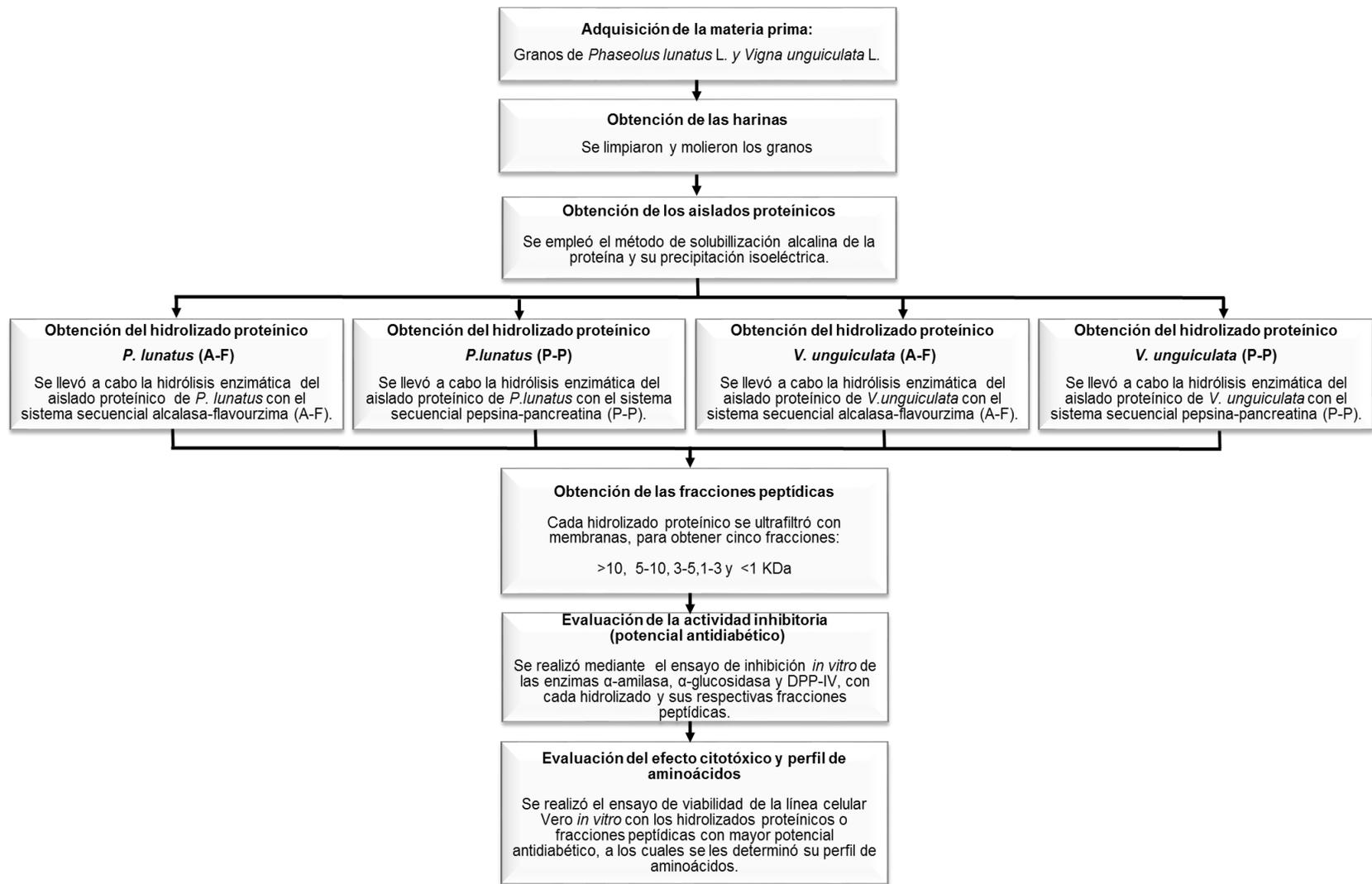


Figura 5. Desarrollo experimental del trabajo de investigación.

4.1. Obtención de materia prima.

Los granos de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) variedad plana y caupí variedad negra (*Vigna unguiculata* L.) fueron adquiridos de una cosecha de noviembre-diciembre del año 2015, en la unidad de agricultores del municipio de Muna y en la central de abastos del municipio de Mérida en el estado de Yucatán, respectivamente. Se trasladaron al laboratorio de Ciencias de los Alimentos en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán donde se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

4.2. Obtención de las harinas.

Los granos fueron limpiados manualmente para eliminar impurezas y granos dañados o quebrados. Posteriormente los granos de *Phaseolus lunatus* L. se molieron en un molino universal pulvex hasta obtener una harina capaz de atravesar la malla 20 (0.85mm), la cual se molió en un molino cycotec 1093 hasta obtener una harina capaz de pasar a través de una malla 60 (0.24 mm). Para la obtención de la harina de los granos de *Vigna unguiculata* L., se siguió el mismo procedimiento que *Phaseolus lunatus* L., pero utilizando un molino mykros.

4.3. Obtención de los aislados proteínicos.

Para obtener los aislados proteínicos de *P. lunatus* L. y *V. unguiculata* L., se procedió conforme al método indicado por Chel-Guerrero et al. (2002) con una ligera modificación. Se procesaron 10.4 kg y 9.3 kg de harina de *P. lunatus* y de *V. unguiculata*, respectivamente. Se suspendió la harina, en agua destilada en una proporción 1:6 p/v (harina/agua) y se ajustó el pH a 11 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M, dejando en agitación mecánica durante 1h a 400 rpm con un equipo caframo (Rz-1, *Heidolph Schwabach, Germany*). Posteriormente la suspensión se pasó de manera secuencial por mallas 80 y 150 para separar la parte de sólidos de fibra de la mezcla líquida que contenía proteína y almidón. El residuo sólido de fibra fue lavado cinco veces con 825 ml (agua destilada) por kilogramo de harina procesada. La suspensión de la mezcla de proteína y almidón se dejó reposar durante 1.5 h en un recipiente a temperatura ambiente para recuperar las fracciones respectivamente de proteína solubilizada y almidón. La fracción de proteína soluble fue separada del almidón mediante un sifón. Posteriormente se ajustó el pH a 4.5 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M, para precipitar la proteína. La suspensión fue centrifugada a 1317 x g durante 12 min, en una centrífuga (Mistral 3000i) para recuperar el precipitado de proteína, el cual fue liofilizado a -47 °C y 13×10^{-3} mbar (Figura 6).

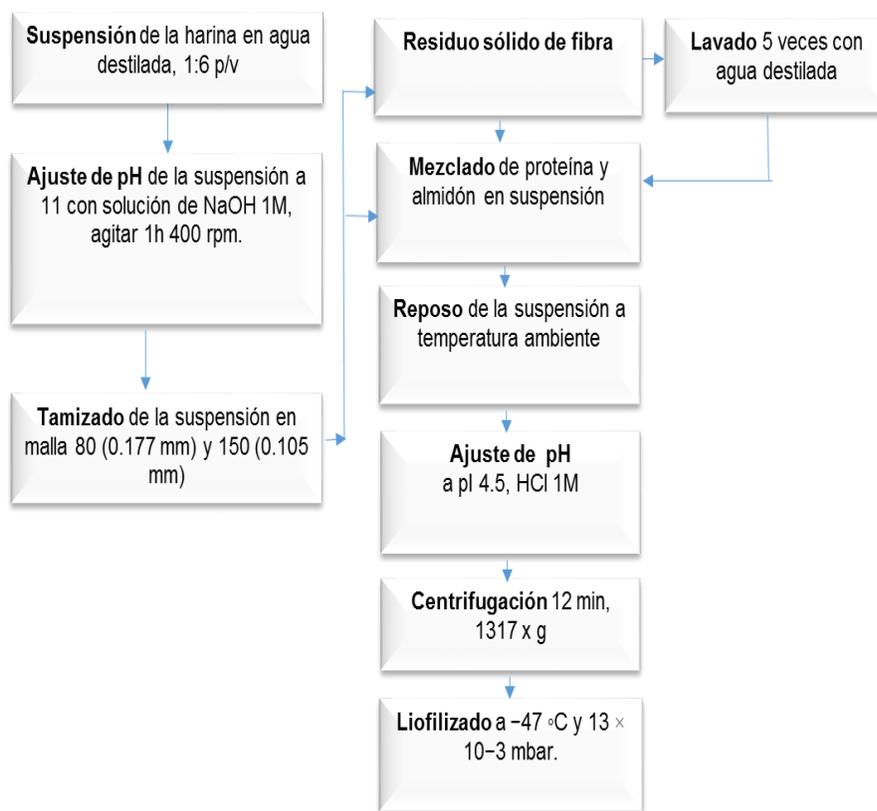


Figura 6. Diagrama de bloques para la obtención del aislado proteínico.

4.4. Análisis proximal de las harinas y aislados proteínicos.

La composición proximal de las harinas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* y de sus aislados proteínicos, se determinó conforme a los métodos oficiales de análisis (*Official Methods of Analysis of AOAC International, 2005*).

Se determinó la humedad, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, cenizas, conforme a los métodos AOAC: 925.09, 2001.11, 920.39, 962.09, 923.03 respectivamente. El extracto libre de nitrógeno (ELN) se determinó restando del 100%, la suma de los porcentajes de proteína, grasa, cenizas y fibra.

4.5. Hidrólisis enzimática secuencial con alcalasa-flavourzima (A-F) y pepsina-pancreatina (P-P).

La hidrólisis enzimática secuencial de los aislados proteínicos de *P. lunatus* y *V. unguiculata* fue realizada conforme lo reportado por Segura et al. (2010). La variable de respuesta fue el grado de hidrólisis (GH). La hidrólisis se realizó bajo condiciones controladas de temperatura, pH y agitación en un vaso de 1000 ml, equipado con un agitador, termómetro y potenciómetro. El aislado de proteína se suspendió en agua destilada para producir una solución de proteína al 4% (p/v).

Para la hidrólisis enzimática se utilizaron los tratamientos enzimáticos secuenciales Alcalasa® 2.4L (P-4860) (*Bacillus licheniformis*) y Flavourzima® (P-6110) (*Aspergillus oryzae*). Esta solución se acondicionó a temperatura y pH óptimos para cada proteasa antes de adicionarlas. Las proteasas fueron adicionadas a la solución de proteína en una proporción de 0.3 UAg⁻¹ para la Alcalasa® (UA, Unidades Anson, definidas como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto bajo condiciones especificadas) y 50 UAPL g⁻¹ para la Flavourzima® (1 UAPL se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de leucina-*p*-nitroanilida por minuto). Las condiciones de reacción fueron de 90 min para el complejo alcalasa-flavourzima (45 min por cada enzima) a 50°C, con pH 8.0 para Alcalasa® y pH 7.0 para Flavourzima®. El pH se mantuvo constante adicionando hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 M durante la hidrólisis (Figura 7).

La hidrólisis enzimática con el sistema secuencial pepsina-pancreatina, se realizó utilizando pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7000-100G) y pancreatina de páncreas de porcino (Sigma, 1750-25G), bajo condiciones controladas de temperatura, pH y agitación en un vaso de 1000 ml, equipado con un agitador, termómetro y potenciómetro. Se realizó hidrolizó con pepsina por 45 min seguida por incubación con pancreatina por 45 min. Los parámetros de la hidrólisis fueron una concentración de sustrato (solución de proteína) al 4%; una relación en enzima: sustrato 1:10; pH 2 y pH 7.5 para pepsina y para pancreatina respectivamente a 37°C. La hidrólisis para todos los casos se detuvo mediante calentamiento a 80°C por 20 min, seguida de centrifugación a 9880 x g por 20 min para remover la porción insoluble (Figura 7).

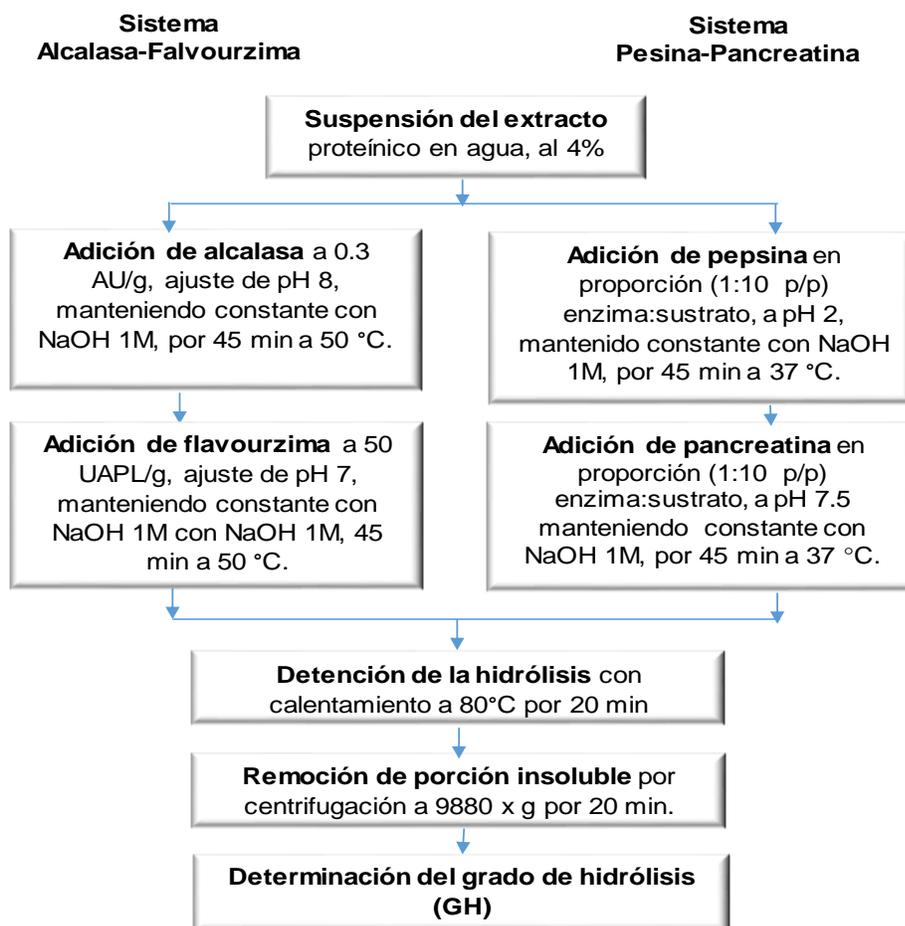


Figura 7. Diagrama de bloques para las hidrólisis enzimáticas secuenciales.

4.6. Determinación del grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis (GH) se calculó con la Ecuación 1, determinando los grupos libres amino con o-ftaldialdehído conforme la metodología reportada por Nielsen, Petersen y Dambrmann (2001).

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

h_{tot} : Es el número total de enlaces de peptídicos por equivalente de proteína

h : Es el número de enlaces hidrolizados

Para ello se procedió a la preparación de una solución madre de L-serina con una concentración de 1 mg/ml, para lo cual se pesó 5 mg de L-serina, que se disolvió en 50 ml de agua desionizada. Se preparó una curva patrón de la solución de L-serina, conforme a la Tabla 5, a cada tubo se le adicionó 1.5 ml del reactivo OPA (Orto-ftaldehído). El reactivo OPA se preparó disolviendo 3.81 g de tetraborato de sodio y 100 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS) en 75 ml de agua desionizada. Por otra parte, se disolvieron 80 mg de reactivo OPA en 2 ml de etanol y esta solución se adicionó a la solución anterior por enjuague con agua destilada, finalmente se adicionó a la solución formada, 88 mg de DTT, DL-Ditiotreitol (treo-2,3-dihidroxi-1,4-butanodiol) y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

Tabla 5. Curva patrón de L- Serina.

Tubo	H ₂ O desionizada (µl)	Testigo: L-serina (µl)
Blanco	200	-
Testigo 1	150	50
Testigo 2	100	100
Testigo 3	50	150
Testigo 4	-	200

Para obtener el valor de “h_{tot}” se realizó una hidrólisis total de los aislados proteínicos; se pesó por triplicado una cantidad de aislado proteínico equivalente a 4 mg de proteína, que se colocó en un tubo pyrex con tapón de rosca, se adicionó 6 ml de HCl 6N, se incorporó una cantidad del nitrógeno para desplazar en lo posible el oxígeno de los tubos, se taparon y se procedió a incubarlos en una estufa de convección a 110°C durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, el ácido se evaporó empleando una estufa de vacío a 90°C durante 48 h. El residuo obtenido se resuspendió en 2 ml de SDS al 1%, y de esta solución se realizó una dilución 1:10 con SDS 1%, de esta solución se hizo una dilución 1:2 con SDS 1%. A ésta última solución se procedió a añadir 1.5 ml de OPA, se agitó en un vórtex y se esperó un tiempo de 2 min para llevar a cabo la lectura en un espectrofotómetro UV *Thermo Scientific* a 340 nm.

Para obtener el valor de “h” de los hidrolizados de proteína de cada especie de frijol obtenidos con los diferentes sistemas secuencial de enzimas, se prepararon 10 ml de una solución al 0.25% (v/v) en agua destilada de cada hidrolizado, de esta solución se tomaron 200 µl y añadió 1.5 ml de OPA, se leyó en el espectrofotómetro a las mismas condiciones que como se mencionó en el hidrolizado total; las mediciones se realizaron por triplicado. Con las absorbancias obtenidas del hidrolizado total de los aislados proteínicos y los hidrolizados enzimáticos se obtuvieron las lecturas de los enlaces peptídicos hidrolizados por equivalente de proteína, en la curva patrón de L-serina y se determinó el grado de hidrólisis con la fórmula citada anteriormente.

4.7. Obtención de fracciones peptídicas ultrafiltradas

Una vez obtenidos los cuatro hidrolizados proteínicos, dos de *P. lunatus*. y dos de *V. unguiculata*, fueron fraccionados por ultrafiltración (UF) conforme al método reportado por Cho et al. (2004), utilizando una celda de ultrafiltración (Modelo 2000, Millipore Billerica, Ma, USA) y cuatro membranas de corte de peso molecular (MWCO) de 1, 3, 5 y 10 kDa. La fracción soluble de los hidrolizados obtenidos mediante la hidrólisis con los sistemas alcalasa-flavourzima y pepsina pancreatina, se hicieron pasar a través de celda de ultrafiltración, comenzando con la membrana más grande de 10 kDa. La parte retenida y la parte filtrada fueron recolectadas por separado hasta alcanzar el máximo rendimiento de filtrado, indicado por un descenso en la velocidad de flujo del filtrado. El filtrado de 10 kDa, se pasó a través de la membrana de 5 kDa hasta alcanzar el máximo rendimiento. El filtrado de 5 kDa se hizo pasar por la membrana de 3 kDa y el filtrado obtenido se hizo pasar a través de la membrana de 1 kDa; de esta manera se obtuvieron cinco fracciones peptídicas ultrafiltradas de cada hidrolizado nombradas como >10 kDa (fracción retenida), 5-10 kDa (fracción retenida 5 kDa, fracción filtrada 10 kDa), 3-5 kDa (fracción retenida 3 kDa, fracción filtrada 5 kDa), 1-3 kDa (fracción retenida 1kDa, fracción filtrada 3 kDa) y < 1 kDa (fracción filtrada 1 kDa), identificadas como *P. lunatus* P-P, *P. lunatus* A-F, *V. unguiculata* P-P y *V. unguiculata* A-F, siendo en total 20 fracciones peptídicas por los cuatro hidrolizados (Figura 8).

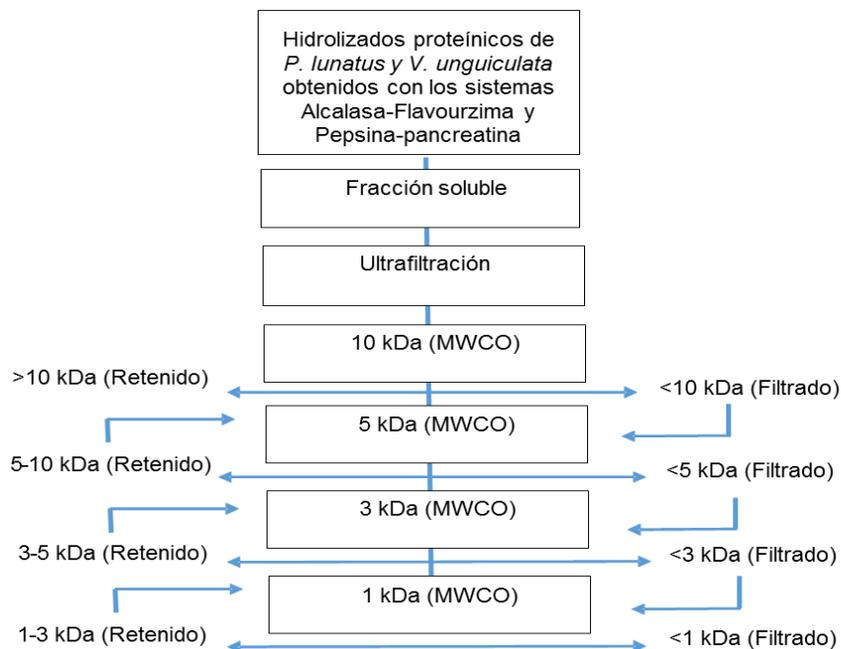


Figura 8. Diagrama de bloques del proceso de obtención de las fracciones peptídicas ultrafiltradas a partir de los hidrolizados proteínicos.

4.8. Determinación del contenido de proteína de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas ultrafiltradas.

A los hidrolizados y fracciones obtenidas por ultrafiltración se les determinó por triplicado el contenido de proteína soluble, mediante el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall et al. (1951).

En tubos de ensayo se colocaron 100 µl de muestra diluida (10 mg de muestra en 10 ml de agua destilada) y se añadieron 100 µl de hidróxido de sodio 2.0 N, se homogenizó el contenido mediante agitación en vórtex durante 30 s y se calentó en un baño a 100 °C durante 10 min. Los tubos se retiraron del baño y se dejaron enfriar durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml de reactivo complejo, preparado con carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2.0%, sulfato cúprico (CuSO₄•4H₂O) al 1% y tartrato de sodio y potasio (C₄H₄KNaO₆•4H₂O) al 2%, en relación 100:1:1 (v/v/v), se homogenizó el contenido mediante agitación en vórtex durante 30 s y los tubos se colocaron en la obscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 100 µl de reactivo Folin-Ciocalteu al 50.0%, se homogenizó el contenido mediante agitación en vórtex durante 30 s, se colocó en la obscuridad durante 45 min a temperatura ambiente y al término de este tiempo se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS *Jenway 7305, USA*. La cuantificación de proteína soluble se realizó mediante una curva de calibración preparada a partir de una solución de 2 mg/ml de seroalbúmina bovina.

4.9. Evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* sobre las enzimas α-amilasa, α-glucosidasa y DPP-IV.

La evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas obtenidas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* sobre las enzimas, α-amilasa y α-glucosidasa se realizó conforme a los métodos modificados de Mojica et al. (2015) y Dineshkumar, Mitra y Manjunatha (2010), respectivamente.

4.9.1. Inhibición de enzima α-Amilasa.

Para llevar a cabo el método se procedió conforme a las proporciones de reactivos indicados en la Tabla 6. En tubos de ensayo, se añadieron 200 µl de solución de α-amilasa 13 U/ml (Tipo VI-B de páncreas de porcino, Sigma Aldrich, lote 27H0463, previamente disuelta en regulador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.9), posteriormente se adicionaron 200 µl de muestra (hidrolizado proteínico o fracción peptídica ultrafiltrada, disueltos en agua a una concentración de 100 mg proteína/ml) y se procedió a incubar a 25 °C durante 10 min. Posteriormente para iniciar la reacción, se adicionó a cada tubo 200 µl de una solución de almidón (Maízena®) al 1% (previamente disuelto en regulador

de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.9 y hervido por 15 min) y se procedió a incubar a 25°C por otros 10 min. Al término de este tiempo para detener la reacción se adicionó a cada tubo 400 µl del reactivo de color DNS (preparado previamente con ácido 3,5-dinitrosalicílico 1%, tartrato de Na-K 30% en hidróxido de sodio 0.4 M) y se incubó en un baño de agua a 100°C durante 5 min. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 min y a cada tubo se le adicionó 6 ml de agua, se agitó por inversión del tubo y se procedió a leer la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS *Jenway* 7305, utilizando un blanco fotométrico de solución de regulador.

Para cada corrida experimental se preparó un control negativo (ES) que contenía la enzima y el sustrato sin muestra, adicionando en su lugar regulador, se preparó su respectivo blanco (BES) que contenía los mismos componentes excepto la enzima. Para cada tubo conteniendo enzima-sustrato-muestra (ESM), se preparó también su respectivo blanco (BESM) que contenía los mismos componentes, excepto la enzima. Por otro lado, se preparó un control positivo con su respectivo blanco procediendo como en ESM y BESM, pero utilizando para ello en lugar de muestra, 200 µl de solución de acarbosa 1mM, que inhibió el 98.41% de la actividad enzimática de la α-amilasa, bajo estas condiciones de ensayo.

Tabla 6. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de α-amilasa.

Componente	Cantidad	ES	BES	ESM	BESM
α-amilasa	(200 µl)	Sí	No	Sí	No
Muestra	(200 µl)	No	No	Sí	Sí
Regulador	(200 µl)	Sí	Sí	No	No
Incubación	25°C 10 min	Sí	Sí	Sí	Sí
Almidón	(200 µl)	Sí	Sí	Sí	Sí
Incubación	25°C 10 min	Sí	Sí	Sí	Sí
DNS	(400 µl)	Sí	Sí	Sí	Sí
α-amilasa	(200 µl)	No	Sí	No	Sí
Incubación	100°C 5 min	Sí	Sí	Sí	Sí
Enfriar	T ambiente	Sí	Sí	Sí	Sí
Agua	6ml	Sí	Sí	Sí	Sí

ES (Tubo Enzima-Sustrato), BES (Tubo blanco Enzima-Sustrato), ESM (Tubo Enzima-Sustrato-muestra), BESM (Tubo blanco Enzima-Sustrato-Muestra).

Las pruebas de inhibición se realizaron por triplicado. La actividad inhibitoria se calculó como el porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima α-amilasa y se determinó conforme la Ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición de } \alpha - \text{amilasa} = \frac{(a_{ES} - a_{BES}) - (a_{ESM} - a_{BESM})}{(a_{ES} - a_{BES})} \times 100 \quad (2)$$

Donde: aES es la absorbancia de la mezcla de la enzima con el sustrato (ES); aBES es la absorbancia del blanco (BES); aESM es la absorbancia de la mezcla de la enzima-sustrato-muestra (ESM) y aBESM es la absorbancia del blanco (BESM).

Se determinó el valor de la IC₅₀ a los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas, de cada especie de frijol obtenidas con los sistemas de enzimas P-P o A-F, que tuvieron la mayor actividad inhibitoria. La IC₅₀ es la concentración de inhibidor de α-amilasa necesaria para inhibir el 50% de la actividad de esta enzima bajo las condiciones de ensayo. La IC₅₀ se calculó por medio de la Ecuación 3, generada a partir de la construcción de la gráfica de la actividad inhibitoria de α-amilasa (%) en función de la concentración de proteína del hidrolizado o fracción peptídica analizada, utilizando para ello siete concentraciones en un intervalo de 0 a 100 mg proteína/ml para *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema P-P, o cinco concentraciones en un intervalo de 40 a 75, 50 a 85 mg proteína/ml para *P. lunatus* y 10 a 50 mg proteína/ml para *V. unguiculata* con el sistema A-F:

$$x = IC_{50} = \frac{(50 - b)}{m} \quad (3)$$

Donde:

x: IC₅₀

y: 50, es el 50% de inhibición

b: es la ordenada al origen

m: es la pendiente de la recta.

4.9.2. Inhibición de la enzima α-Glucosidasa.

Para el ensayo de inhibición de la enzima α-glucosidasa, se procedió conforme a las proporciones indicadas en la Tabla 7. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 µl de una solución de α-glucosidasa 2U/ml (Typo I de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Aldrich, lote SLBP0778V, disuelta en solución regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.8) y se mezcló con 20 µl de solución muestra (hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas disueltas en agua a una concentración de 200 mg de proteína/ml) y se incubó a 37°C por 20 min. Posteriormente se adicionaron 20 µl de p-nitrofenil- α-D-glucopiranosido (PNPG, 1 mM) como sustrato para iniciar la reacción y se incubó a 37°C por 20 min, al término de este tiempo se adicionaron 50 µl de una solución de Na₂CO₃ (1 M) para terminar la reacción y cada pozo se completó a un volumen de 150 µl con solución de regulador. La cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a 405 nm utilizando un lector de placas *Stat Fax 4200 Awareness USA*, utilizando como blanco fotométrico solución de regulador. Para todas las pruebas, el ensayo de inhibición se realizó por cuadruplicado. Se utilizó como control positivo acarbose, medicamento aprobado como

inhibidor de α -glucosidasa que puede inhibir tanto α -amilasa como α -glucosidasa (Mojica, et al, 2015; Kalra, 2014).

Para cada ensayo se preparó un control negativo (ES) que contenía la enzima y el sustrato sin muestra, adicionando en su lugar regulador, se preparó su respectivo blanco (BES) que contenía los mismos componentes excepto la enzima. Para cada pozo conteniendo enzima-sustrato-muestra (ESM), se preparó también un blanco (BESM) que contenía los mismos componentes excepto la enzima. Por otro lado, se preparó un control positivo con su respectivo blanco procediendo como en ESM y BESM, pero utilizando para ello en lugar de muestra, 20 μ l de solución de acarbosa 50 mM, que inhibió el 90.18 % de la actividad enzimática de la α -amilasa bajo estas condiciones de ensayo.

Tabla 7. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de α -glucosidasa.

Componente	Cantidad	ES	BES	ESM	BESM
α -glucosidasa	(20 μ l)	Sí	No	Sí	No
Muestra	(20 μ l)	No	No	Sí	Sí
Regulador	(20 μ l)	Sí	Sí	No	No
Incubación	37°C 5 min	Sí	Sí	Sí	Sí
PNP-G	(20 μ l)	Sí	Sí	Sí	Sí
Incubación	37°C 20 min	Sí	Sí	Sí	Sí
Na ₂ CO ₃	(50 μ l)	Sí	Sí	Sí	Sí
α -glucosidasa	(20 μ l)	No	Sí	No	Sí
Regulador	(40 μ l)	Sí	Sí	Sí	Sí

ES (Tubo Enzima-Sustrato), BES (Tubo blanco Enzima-Sustrato), ESM (Tubo Enzima-Sustrato-muestra), BESM (Tubo blanco Enzima-Sustrato-Muestra).

La actividad inhibitoria se calculó como el porcentaje de inhibición de actividad la enzima α -glucosidasa y se determinó conforme la Ecuación 4:

$$\% \text{ Inhibición de } \alpha - \text{ glucosidasa} = \frac{(a_{ES} - a_{BES}) - (a_{ESM} - a_{BESM})}{(a_{ES} - a_{BES})} \times 100 \quad (4)$$

Donde: aES la absorbancia de la mezcla de la enzima con el sustrato (ES); aBES es la absorbancia del blanco (BES); aESM es la absorbancia de la mezcla de la enzima-sustrato-muestra (ESM) y aBESM es la absorbancia del blanco de (ESM).

Se determinó el valor de la IC₅₀ a los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas, de cada especie de frijol obtenidas con los sistemas de enzimas P-P o A-F, que tuvieron la mayor actividad inhibitoria. Esto conforme el mismo procedimiento

citado en el ensayo de α -amilasa, empleando para ello la Ecuación 3. Para lo cual se construyó una curva de actividad inhibitoria de α -glucosidasa, utilizando siete concentraciones de hidrolizado o fracción peptídica en un intervalo de 100 a 250 mg/ml proteína para *V. unguiculata* con el sistema P-P o cinco concentraciones en un intervalo de 0.4 a 1; 1 a 2 mg de proteína/ml para *V. unguiculata* y de 60 a 200 mg proteína/ml para *P. lunatus* con el sistema A-F.

4.9.3. Inhibición de enzima Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV).

Para el ensayo de inhibición de la enzima DPP-IV, se procedió conforme a las proporciones de la tabla 8, indicadas en el boletín técnico del kit de inhibición de DPP-IV Sigma Aldrich, catálogo MAK203. En una placa oscura de 96 pozos, se adicionaron: 25 μ l de solución de muestra (hidrolizados proteínicos o fracciones peptídicas ultrafiltradas disueltos en regulador a una concentración de 10 mg de proteína/ml), 25 μ l de regulador, seguido de 50 μ l de solución de enzima (preparada previamente disolviendo 1 μ l de enzima con 49 μ l de regulador), seguido de la adición de 50 μ l de regulador. Posteriormente se incubó a 37°C por 10 min y al término de dicho tiempo se adicionó 25 μ l de solución de sustrato (preparado previamente, disolviendo 2 μ l de sustrato con 23 μ l de regulador). Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 min y se leyó en un fluorómetro *Thermo Scientific Appliskan*, a una longitud de excitación (λ_{ex}) de 355 nm y longitud de emisión (λ_{em}) de 460 nm al tiempo 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para cada ensayo experimental se preparó un control negativo (ES) que contenía la enzima y el sustrato sin muestra, adicionando en lugar de ésta regulador, se preparó su respectivo blanco (BES) que contenía los mismos componentes, excepto la enzima. Para cada pozo conteniendo enzima-sustrato-muestra (ESM), se preparó también un blanco (BESM) que contenía los mismos componentes excepto la enzima. Por otro lado, se preparó un control positivo con su respectivo blanco procediendo como en ESM y BESM, pero utilizando para ello en lugar de muestra, 25 μ l de solución de sitagliptina (previamente preparada, disolviendo 2.5 μ l de sitagliptina con 22.5 μ l de regulador) la cual presentó un % de inhibición relativa de la DPP-IV de 99.77% bajo estas condiciones de ensayo.

Tabla 8. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de DPP-IV.

Componente	Cantidad	ES	BES	ESM	BESM
Muestra	(25 µl)	No	No	Sí	Sí
Regulador	(25 µl)	Sí	Sí	No	No
Enzima	(50 µl)	Sí	No	Sí	No
Regulador	(50 µl)	No	Sí	No	Sí
Incubación	37°C 10 min	Sí	Sí	Sí	Sí
Sustrato	(25 µl)	Sí	Sí	Sí	Sí
Incubación	37°C 30 min	Sí	Sí	Sí	Sí

ES (Tubo Enzima-Sustrato), BES (Tubo blanco Enzima-Sustrato), ESM (Tubo Enzima-Sustrato-muestra), BESM (Tubo blanco Enzima-Sustrato-Muestra).

El porcentaje de inhibición relativa de la DPPIV, se determinó a partir de la construcción de las gráficas de las lecturas de fluorescencia (FLU) contra el tiempo, para cada pozo. En el intervalo lineal de cada gráfica, se determinó la pendiente ($P = \Delta FLU / \text{min}$) de la recta correspondiente.

A las pendientes de cada muestra, se restó la pendiente correspondiente al blanco, para determinar el % inhibición relativa de DPP-IV conforme la Ecuación 5:

$$\% \text{ Inhibición relativa de DPP - IV} = \frac{[P_{ES} - P_{BES}] - [P_{ESM} - P_{BESM}]}{[P_{ES} - P_{BES}]} \times 100 \quad (5)$$

Donde: $P_{(ES)}$ es la pendiente de la curva de fluorescencia de la mezcla de la enzima con el sustrato (ES); $P_{(BES)}$ es la pendiente de la curva de fluorescencia del blanco (BES); $P_{(ESM)}$ es la pendiente de la curva de fluorescencia de la mezcla enzima-sustrato-muestra (ESM) y $P_{(BESM)}$ es pendiente de la curva de fluorescencia del blanco (ESM).

Se determinó el valor de la IC_{50} a los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas, de cada especie de frijol obtenidas con los sistemas de enzimas P-P o A-F, que tuvieron la mayor actividad inhibitoria, empleando la Ecuación 6. La IC_{50} se obtuvo graficando el % de inhibición relativa de DPP-IV como función de la concentración la muestra (hidrolizado proteínico o fracción peptídica a seis concentraciones en un intervalo de 0.5 a 10 mg proteína/ml) despejando de la ecuación obtenida $y = a \ln(x) + b$:

$$x = IC_{50} = e^{\left(\frac{y-b}{a}\right)} \quad (6)$$

Donde: x: es la IC_{50} ; y: 50 es el 50% de inhibición; a, b: son constantes de la ecuación.

4.10. Perfil aminoácido de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas que presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre la enzima α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.

La determinación del perfil de aminoácidos, se realizó conforme al procedimiento descrito por Alaiz, Navarro, Girón, y Vioque (1992) con ligeras modificaciones.

Se pesaron 10 mg de muestra (hidrolizado proteínico o fracción peptídica) en un vial, al cual se le adicionaron 2 ml ácido clorhídrico 6N. Se sometió a hidrólisis durante 24 h a 110°C en una estufa. Al término de la hidrólisis, los viales se colocaron bajo una atmósfera de nitrógeno para evaporar el ácido clorhídrico, hasta sequedad.

Posteriormente las muestras se derivatizaron conforme lo siguiente: Al vial conteniendo la muestra hidrolizada se le adicionó 1 ml de regulador de borato de sodio 1M, pH 9, conteniendo 0.02 % de azida de sodio (pH ajustado con hidróxido de sodio 40%) y se agitó en vórtex. De esta solución se tomó una alícuota de 30 μ l ó 40 μ l (dependiendo si se trataba de una muestra de hidrolizado proteínico o fracción peptídica) y se transfirió a otro vial, al cual se le añadieron 10 μ l de patrón interno (ácido D,L aminobutírico 3 mM), 0.8 μ l de derivatizante (EMMDE, etoximetilenmalonato de dietilo) y regulador de borato de sodio hasta completar un volumen de 1 ml; se agitó en vórtex e incubó a 50°C durante 50 min para la lograr la formación de N-[2,2-bis(etoxicarbonil)vinil], a partir de la reacción del dietil etoximetilenmalonato (EMMDE) con los aminoácidos, procedimiento útil para garantizar que la reacción entre el derivatizante y los aminoácidos sea cuantitativa y no se genere subproductos interferentes.

Al término de los 50 min, la muestra derivatizada se pasó por un filtro milipore 0.45 μ m, depositando el filtrado en un nuevo vial, del cual se inyectaron 15 ó 20 μ l de la muestra, en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Agilent, 1100 series) utilizando las siguientes condiciones: Columna de cromatografía C18 en fase reversa, tamaño de partícula 4 μ m, 300 x 3.9mm; detector de longitud de onda variable UV-VIS a una longitud de onda de 280 nm; fases móviles A: de acetato de sodio 25 mM pH 6 (preparada con 0.02% de azida de sodio y pH ajustado con hidróxido de sodio 40%), fase móvil B: acetonitrilo grado HPLC, previamente filtradas con membrana millipore 0.45 μ m, a un gradiente de elución como se muestra en la Tabla 9 a flujo de 0.9 ml/min.

Para la cuantificación de los aminoácidos, se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones, a partir de una solución de estándares de aminoácidos Sigma Aldrich (de 17 aminoácidos: A, F, K, Y, R, G, M, T, H, P, V, E, I, S, C, L, D) preparada conforme la Tabla 10.

Tabla 9. Gradiente de elución para determinación de aminoácidos por HPLC.

Tiempo	% Fase B	% Fase A
0	9	91
3	14	86
13	14	86
30	31	69
35	31	69
40	9	91

Tabla 10. Curva de calibración de los estándares de aminoácidos.

Concentración (pmol / 20 µl)	Estándar de aminoácidos (µl)	Patrón interno (µl)	EMMDE (µl)	Regulador borato de sodio pH 9 (µl)
50	1	10	0.8	988
250	5	10	0.8	984
500	10	10	0.8	979
1000	20	10	0.8	969
2000	40	10	0.8	949
4000	80	10	0.8	910

Los viales de estándares de aminoácidos preparados para las curvas de calibración, se sometieron a las mismas condiciones de derivatización e inyección mencionadas anteriormente. El volumen total de todas las soluciones correspondió a 1 ml y el cálculo se efectuó para 15 o 20 µl de volumen de inyección (según el cromatógrafo utilizado). Para determinar las áreas bajo la curva de cada aminoácido, se compararon los tiempos de retención bibliográficos para cada aminoácido (Alaiz et al., 1992).

Debido a que el triptófano es un aminoácido que se destruye durante hidrólisis ácida, su determinación se realizó por separado mediante una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio, conforme al procedimiento establecido por Yust et al. (2004). Se pesó una muestra de 20 mg (hidrolizado proteínico o fracción peptídica) en tubo falcón de 50ml, se adicionó 3 ml de hidróxido de sodio 4 N y se selló con atmósfera de nitrógeno. Se sometió a hidrólisis durante 4 h a 100°C en una estufa, y al término de dicho tiempo, los tubos se transfirieron a un baño de hielo, donde inmediatamente se neutralizaron con HCl 12 N hasta lograr el pH 7, inmediatamente se adicionó 25 ml de regulador de borato de sodio (pH 9) y se pasaron a un baño a 50°C para evitar cristalización del regulador de borato. Posteriormente cada tubo se agitó en un vórtex y se tomó una alícuota de 3 ml, la cual se filtró mediante un filtro millipore 0.45 µm, depositando el filtrado en un vial, del cual se tomaron 15 µl para inyectar al cromatógrafo. Las condiciones empleadas fueron las mencionadas anteriormente, pero con un gradiente de elución de A: 91, B:9 a un flujo de 0.9 ml/min durante 8 min. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Se realizó una curva de calibración de triptófano, para lo cual se preparó una solución estándar de triptófano a una concentración de 0.51 mg/ml con hidróxido de sodio 4 N, a partir de la cual se realizaron diluciones para tener ocho puntos, a las cuales

se les adicionó 3 ml de hidróxido de sodio y se procesaron conforme al procedimiento anterior (Yust et al.,2004).

4.11. Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad citotóxica de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L.

Las pruebas de citotoxicidad fueron realizadas por la Unidad Médica de Investigación Yucatán/Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital Regional 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se probó la citotoxicidad de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas que tuvieron la mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.

4.11.1. Cultivo celular.

La línea de células Vero (ATCC-CCL-81) (células de riñón de mono verde, Cercopithecus aethiops) se cultivó con medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) y se suplementó con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS, Gibco), 100 U / ml de penicilina (*In Vitro*), 100 μ g/ml de estreptomycin (*In Vitro*), 2.5 μ g/ml de anfotericina B (*In vitro*), en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C. La dilución de las soluciones madre se realizó en medio de cultivo, y las concentraciones de compuestos finales de 62.5, 125, 250, 500 y 1000 μ g /ml se realizaron con DMSO de 0.01% el cual no tienen un efecto sobre el crecimiento celular.

4.11.2. Ensayo de citotoxicidad.

Para el ensayo se siguió el método reportado por Camargo Filho, Cortez, Ueda-Nakamura, Nakamura y Dias Filho (2008). Las células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos; se añadieron 100 μ l de suspensión celular a una concentración aproximada de 5×10^4 células / ml a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. A las 24 h cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%, el medio se reemplazó y las células se trataron con diferentes concentraciones de los hidrolizados o fracciones peptídicas a concentraciones de 62.5-1000 μ g/ml en medio sin suero fetal bovino por 48 h. Al final del tiempo de exposición, se retiró el medio y se fijaron las células con solución de ácido tricloroacético (TCA) a cada pocillo y se incubaron a 4°C durante 30 min. Después de la incubación, se eliminó el TCA y se añadió sulforrodamina B a cada pocillo y se dejó en contacto con las células durante 30 min, después de lo cual se lavaron con ácido acético al 1% y se aclararon tres veces hasta que sólo quedó el colorante adherido

a las células. Las placas se secaron y se añadieron 100 µl de base Tris 10 mM a cada pocillo para solubilizar el colorante. Las placas se agitaron suavemente durante 10 min y se determinó la viabilidad celular midiendo la densidad óptica (DO) a 540 nm usando un lector de bioensayo (BioRad, USA). Se utilizó docetaxel (Taxotere®, Sigma-Aldrich Co.) como control positivo, mientras que se usaron células no tratadas como control negativo. Los experimentos se realizaron por triplicado y se determinó el % mortalidad = $[\text{DO del control negativo} - \text{DO de muestra o control positivo}] \times 100 / \text{DO del control negativo}$. La concentración de la muestra que provocó la muerte del 50% de las células (CC_{50}) se calculó mediante un intervalo de concentraciones de 62.5 a 1000 µg /ml de hidrolizado o fracción peptídica liofilizada utilizando el software GraphPad Prism 4. Figura 12.

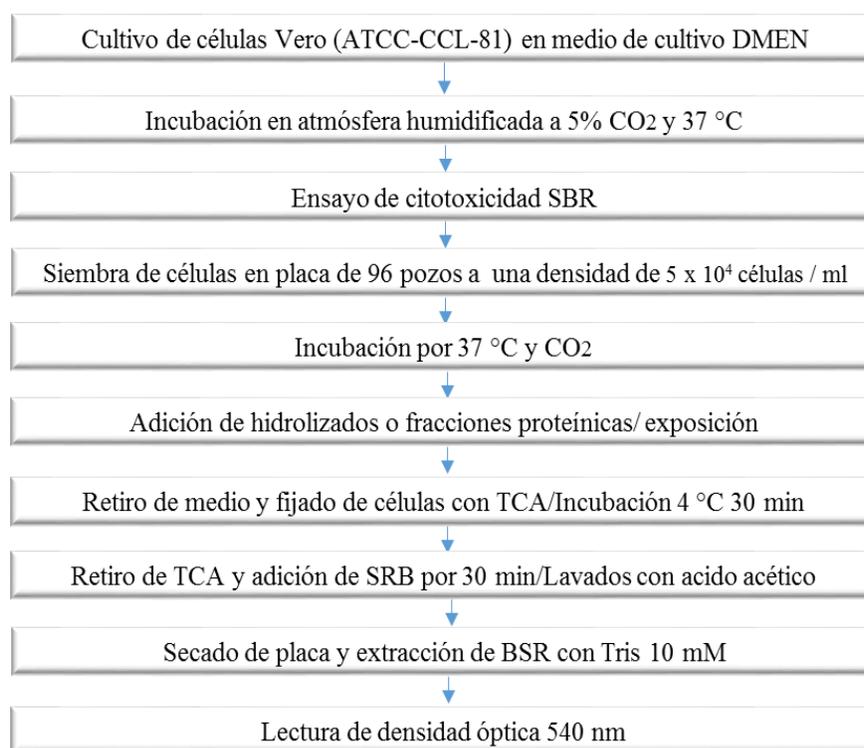


Figura 9. Diagrama de para el ensayo de citotoxicidad.

4.12. Análisis estadístico.

El grado de hidrólisis y la actividad inhibitoria (% de inhibición enzimática) fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía. Para establecer diferencia entre tratamientos, se aplicó el método de diferencia significativa mínima LSD (*least*

significant difference) para. Los resultados de citotoxicidad, en los que la variable de respuesta fue el porcentaje (%) de mortalidad celular, así como los resultados del perfil de aminoácidos se evaluaron con medidas de tendencia central, tales como determinación de medias y desviación estándar. Para todos los casos se utilizó el programa estadístico Minitab 17 y se procedió conforme a lo establecido por Montgomery (2004) y Gutiérrez y De La Vara (2008).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Composición proximal de las harinas de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L.

La composición proximal (%b.s. por ciento en base seca) de las harinas obtenidas de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición proximal de las harinas de los granos de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. (% b.s, excepto humedad).

Componente	Harina <i>P. lunatus</i> L.	Harina <i>V. unguiculata</i> L.
Humedad	(14.86 ± 0.07 ^a)	(13.32 ± 0.13 ^b)
Proteína	23.35 ± 0.05 ^b	24.17 ± 0.17 ^a
Grasa	1.53 ± 0.0 ^b	2.15 ± 0.08 ^a
Fibra	4.17 ± 0.37 ^b	6.06 ± 0.57 ^a
Cenizas	4.68 ± 0.01 ^a	3.89 ± 0.11 ^b
ELN	66.27 ± 0.40 ^a	63.73 ± 0.37 ^b

^{a b} Letras distintas en la misma fila significa que existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El contenido de proteína en la harina de *V. unguiculata* fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el contenido de proteína en la harina de *P. lunatus* como se aprecia en la Tabla 11. Con excepción del contenido de cenizas y extracto libre de nitrógeno (ELN) que fue más alto en *P. lunatus*, el contenido de grasa cruda y fibra cruda fueron mayores en *V. unguiculata*. El contenido de proteína de la harina *P. lunatus* fue menor que el reportado por Betancur-Ancona et al. (2004) de 25.5%; similar al reportado por Betancur-Ancona et al. (2009) de 23.7% y mayor al reportado por Adeparusi (2001) de 22.5% y Oshodi y Adelanum (1993) de 22.7%. El contenido de proteína de la harina de *V. unguiculata* fue similar al reportado por Prinyawiwatkul et al. (1996) quienes analizaron un promedio de ocho variedades africanas y americanas de *V. unguiculata* con 24.1-25.5%, al reportado por Sreerama, Sashikala, Pratape y Singh (2012) de 24.1%, así como al valor reportado Olivera-Castillo et al. (2007) de 24.7%. Por lo anterior las harinas representan una buena fuente de proteína para la obtención de aislados proteínicos, cuya variabilidad en los contenidos se puede atribuir a las diferentes especies, sitios de cultivo y etapas de madurez.

5.2. Obtención del aislado proteínico de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L.

En la Tabla 12 se muestra la composición proximal de los aislados proteínicos de *P. lunatus* y *V. unguiculata*. Se observa que el contenido de proteína para *V. unguiculata* fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que para *P. lunatus* y menor que el reportado por Olivera-Castillo et al. (2007), Mwasaru, Muhammad, Bakar y Man (1999), Horax, Hettiarachchy, Chen y Jalaluddin (2004) y Peyrano, Seperoni y Avanza (2016) con 78.6, 85.4, 91.4, 92.39% respectivamente. En el caso de *P. lunatus*, el resultado fue aproximadamente 5% menor que el reportado por Betancur-Ancona et al. (2004), Betancur-Ancona et al. (2009), Torruco-Uco et al. (2009) y Polanco-Lugo et al. (2014) quienes obtuvieron 71.1, 69.9, 71.8 y 72% respectivamente. Lo cual puede deberse a variaciones en los métodos empleados para aislar la proteína, así como la cantidad y composición de la proteína las fracciones solubles. Sin embargo, los aislados proteínicos obtenidos de ambas especies de frijol representan una buena fuente para la obtención de hidrolizados.

Tabla 12. Composición proximal del aislado proteínico de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. (% b.s, excepto humedad).

Componente	Aislado <i>Phaseolus lunatus</i> L.	Aislado <i>Vigna unguiculata</i> L.
Humedad	(6.49 ± 0.09^b)	(7.33 ± 0.15^a)
Proteína	65.34 ± 0.03^b	69.69 ± 0.66^a
Grasa	4.16 ± 0.34^a	3.38 ± 0.31^b
Fibra	0.90 ± 0.03^b	1.10 ± 0.11^a
Cenizas	4.19 ± 0.01^a	3.37 ± 0.11^b
ELN ³	25.41 ± 0.43^a	22.46 ± 0.49^b

^{a, b} Letras distintas en la misma fila significa que existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

5.3. Grado de hidrólisis de los hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L.

El grado de hidrólisis (GH) obtenido en los concentrados de proteína de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, empleando los sistemas de enzimas pepsina-pancreatina (P-P) y alcalasa-flavourzima (A-F), se muestran en la Figura 10.

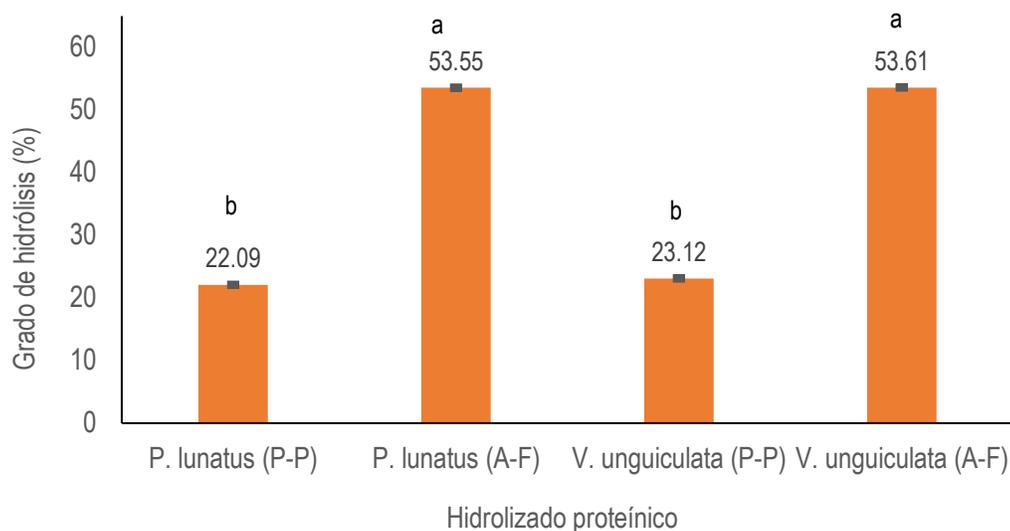


Figura 10. GH (%) de los hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con los sistemas P-P y A-F. ^{a, b} Letras diferentes significa que existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 10 se observa que el GH para *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema enzimático secuencial P-P, fue menor que con el sistema enzimático secuencial A-F. Las diferencias obtenidas, se debieron a las condiciones empleadas para la hidrólisis, principalmente en lo que concierne a la naturaleza y especificidad de las enzimas utilizadas ya que el resto de los factores que pueden influir, como el tiempo de hidrólisis, la concentración de sustrato, la relación enzima-sustrato fueron las mismas para ambos sistemas enzimáticos, y las condiciones de pH y temperatura utilizadas estuvieron dentro de los intervalos óptimos de acción de cada enzima (Tabla 3) y establecidos por la metodología seguida.

El %GH obtenido con el sistema P-P fue menor que con el de A-F posiblemente porque en el primer sistema se utiliza de inicio la pepsina, endoproteasa que puede romper enlaces peptídicos en cualquier lugar de la cadena de proteína, pero que debido a su alta especificidad entre residuos de fenilalanina, triptófano, tirosina o leucina y triptófano, fenilalanina o tirosina (Benítez et al., 2008), genera esencialmente péptidos largos en los primeros 45 min, aun cuando después de dicho tiempo es adicionada la pancreatina (que contiene endopeptidasas como la tripsina, elastasa y quimotripsina y la exoproteasa carboxipeptidasa) con la cual se incrementa el número de enlaces peptídicos hidrolizados generando una mezcla de oligopéptidos (Ramírez Ortiz, 2015) pero después de haber transcurrido la mitad del tiempo total de hidrólisis, reflejándose así en un menor GH. En el caso del sistema A-F, la alcalasa es una endoproteasa que a diferencia de la pepsina es inespecífica (Vioque et al., 1999) aunque tiene preferencia por enlaces peptídicos con aminoácidos hidrofóbicos o aminoácidos no cargados.

(Benítez, 2008; IntEnz, 2016; Rocha et., 2014) por cual puede romper en más enlaces peptídicos durante los primeros 45 min de hidrólisis, generando péptidos que posteriormente serían hidrolizados por la flavourzima, la cual es un complejo con mayor número de enzimas (ocho enzimas) que la pancreatina con variada especificidad para la hidrólisis de enlaces tanto internos como externos de los péptidos resultantes, reflejándose así en un mayor GH durante el tiempo total de la hidrólisis. Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por algunos autores respecto a que con las enzimas alcalasa, flavourzima en forma individual o en forma secuencial han mostrado en general exhibir mayor grado de hidrólisis que con las enzimas digestivas pepsina y pancreatina (Pedroche et al., 2002; Segura-Campos, Ruiz-Ruiz, Chel-Guerrero y Betancur-Ancona, 2013; Villanueva et al., 1999).

Los GH obtenidos con el sistema P-P fueron similares al reportado por Ruiz-Ruiz et al. (2013) de 26.15% quienes trabajaron condiciones similares, pero con *P. vulgaris*; y fueron un poco más altos que el reportado por Polanco-Lugo et al. (2014) con un GH de 15.97% con el sistema P-P por 60 min, empleando proteína de *P. lunatus*. Los GH con P-P estuvieron dentro del intervalo reportado por Mojica et al. (2015) de 25-35% para hidrolizados de proteína de *P. vulgaris* con P-P por 4 h, quienes confirmaron la formación de péptidos inhibidores de α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que emplear las enzimas en forma secuencial P-P a un tiempo de 90 min, comparado con 60 min o 4 h, contribuyó y fue suficiente para obtener un hidrolizado extensivo con un GH similar o mayor a los mencionados anteriormente.

Los GH obtenidos con el sistema A-F para *V. unguiculata* y *P. lunatus* (53.61 % y 53.55 % respectivamente) son mayores al dato reportado por Segura et al. (2013) de 23.61% empleando alcalasa por 60 min en un hidrolizado de *V. unguiculata*; también fueron mayores al dato reportado por Ruiz-Ruiz et. al. (2013) de 43.01 % con el mismo sistema enzimático en condiciones similares por 90 min y de 13.5% empleando sólo flavourzima por 90 min, sobre *P. vulgaris*. Asimismo, los GH fueron superiores a los reportados por Torruco (2009), al trabajar solo con alcalasa o flavourzima de forma independiente, de 37.94% y 22.03% durante un tiempo de hidrólisis de 45 min y 90 min respectivamente sobre *P. lunatus*. Dado lo anterior fue positivo emplear las enzimas alcalasa y flavourzima en forma secuencial a un tiempo de hidrólisis de 90 min, ya que hubo mayor hidrólisis de enlaces peptídicos, en lugar de haber empleado las enzimas en forma individual o durante un menor tiempo de hidrólisis. Los resultados fueron similares al GH obtenido por Osegura-Toledo et al. (2015) de 53%, quienes obtuvieron péptidos inhibidores de α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV a partir de un hidrolizado de proteína de *P. vulgaris*, empleando alcalasa por 120 min, así como a los GH obtenidos por Segura et al. (2010) y Segura et al. (2013) para *P. vulgaris* de 53% y 58.8% con alcalasa y con flavourzima de forma separada, por 90 min respectivamente. Para estos casos, los resultados sugieren que el empleo de las enzimas alcalasa y flavourzima en

forma secuencial fue conveniente para lograr en menor tiempo (90 min) un GH similar de igual forma extensivo que el obtenido con alcalasa en 120 min.

Con los dos sistemas enzimáticos en modo secuencial fue posible la obtención de hidrolizados con GH superiores a 10% (es decir extensivos), en un tiempo razonable, que potencian la posibilidad de generación de péptidos biológicamente activos (Pedroche et. al, 2003; Vioque et al., 2001).

5.4. Contenido de proteína de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas.

En la Tabla 13 se muestra el contenido de proteína de los cuatro hidrolizados obtenidos con los diferentes sistemas enzimáticos pepsina-pancreatina (P-P) y alcalasa-flavourzima (A-F), así como de sus correspondientes fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración.

Tabla 13. Contenido de proteína (mg proteína/ml) de hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* obtenidos con los sistemas enzimáticos secuenciales pepsina-pancreatina (P-P) y alcalasa-flavourzima (A-F).

Muestra	<i>V. unguiculata</i>		<i>P. lunatus</i>	
	P-P (mg/ml)	A-F (mg/ml)	P-P (mg/ml)	A-F(mg/ml)
Hidrolizado	0.64 ± 0.01 ^{b, C}	0.72 ± 0.01 ^{b, B}	0.82 ± 0.03 ^{b, A}	0.75 ± 0.03 ^{a, B}
F >10 kDa	0.75 ± 0.02 ^{a, D}	0.78 ± 0.00 ^{a, C}	0.90 ± 0.02 ^{a, A}	0.82 ± 0.00 ^{a, B}
F 5-10 kDa	0.67 ± 0.01 ^{b, B}	0.56 ± 0.03 ^{e, C}	0.84 ± 0.01 ^{b, A}	0.82 ± 0.00 ^{a, A}
F 3-5 kDa	0.68 ± 0.06 ^{b, AB}	0.65 ± 0.01 ^{c, B}	0.73 ± 0.03 ^{c, A}	0.62 ± 0.00 ^{b, B}
F 1-3 kDa	0.56 ± 0.03 ^{c, A}	0.60 ± 0.00 ^{d, A}	0.61 ± 0.02 ^{d, A}	0.61 ± 0.01 ^{b, A}
F <1 kDa	0.43 ± 0.03 ^{d, B}	0.60 ± 0.01 ^{d, A}	0.45 ± 0.01 ^{e, B}	0.60 ± 0.09 ^{b, A}

^{a, b} Letras minúsculas distintas en la misma columna y ^{A, B} letras mayúscula distintas en la misma fila significa que existe diferencia estadística significativa (p < 0.05).

Como se aprecia en la Tabla 13, el contenido de proteína para los hidrolizados y las fracciones peptídicas ultrafiltradas de *V. unguiculata*, obtenidos con el sistema enzimático P-P varió de 0.43-0.75 mg/ml y con A-F de 0.56-0.78 mg/ml y *P. lunatus* el contenido de proteína varió de 0.45-0.90 y de 0.60-0.82 mg/ml con los sistemas P-P y A-F respectivamente. Los resultados obtenidos fueron mayores a los reportados por Sandoval (2015) quien trabajó con *P. lunatus* variante elíptica. Se observa que el contenido de proteína, tiende a disminuir conforme menor es el tamaño de la fracción peptídica ultrafiltrada, similar a lo reportado por Ruiz-Ruiz et al. (2013) quienes trabajaron con fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. vulgaris* y a la reportado por Cho et al. (2004) para fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de hidrolizados de soya. Lo anterior puede deberse a que la proteína hidrolizada se enriquece más en las membranas de 10 y 5 kDa principalmente con un mayor rendimiento y en menor cantidad

en las membranas de 1 y 3 kDa donde atraviesan los péptidos de menor tamaño, así como por el volumen de cada fracción que es distinto. Por otro lado, en general el contenido de proteína donde se utilizó el tratamiento A-F fue ligeramente menor en algunos casos para *P. lunatus* y *V. unguiculata*, pero mayor en las fracciones peptídicas ultrafiltradas de menor tamaño, lo cual puede deberse a que hubo un mayor grado de hidrólisis con este sistema, además que la proteína soluble está en función de la exposición de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que se hayan expuesto durante la hidrólisis, posiblemente enriqueciéndose en este caso más en fracciones de menor tamaño. Variaciones en el contenido de proteína soluble reportaron Vernaza, Dia, de Mejia y Chang, 2012 para hidrolizados de proteína de soya obtenidos con alcalasa en donde el contenido de proteína incrementó o disminuyó durante la hidrólisis.

5.5. Inhibición enzimática de la enzima α -amilasa.

A continuación, en la Figura 11 se muestran los resultados para los ensayos de inhibición de la enzima α -amilasa con los hidrolizados proteínicos (H) y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas F>10, F 5-10, F 3-5, F 1-3, F<1 kDa de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, obtenidos con los sistemas enzimáticos P-P y A-F. Se muestra como referencia el control utilizado acarbosa, que presentó un 98.41% de inhibición.

En las Figuras 11 A y 11 C de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema P-P, se observa que tanto los hidrolizados (H), como las fracciones ultrafiltradas tuvieron actividad inhibitoria considerable sobre la α -amilasa, la cual se vio incrementada en fracciones de menor tamaño a partir de 3-5 kDa. La fracción F<1 para ambas especies fue la de mayor inhibición, aunque para *V. unguiculata*, las fracciones F1-3 y F<1 no presentaron diferencia estadística significativa ($P>0.05$). La alta inhibición de la α -amilasa con las fracciones peptídicas ultrafiltradas de menor tamaño molecular obtenidas a partir de *P. vulgaris* y *V. unguiculata* con P-P podría deberse a que los péptidos de menor tamaño son capaces de alcanzar más fácilmente el sitio catalítico de la enzima α -amilasa e inhibirla (Mojica et al., 2015).

Las actividades inhibitorias con *V. unguiculata* P-P fueron en su mayoría más altas respecto a *P. lunatus* P-P, excepto en las F>10 y F5-10. Esto indica que fue más factible obtener hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas biológicamente más activos a partir de *V. unguiculata* P-P. Lo cual podría atribuirse a la diferencia de la fuente de proteína, ya que posiblemente la proteína de *V. unguiculata* tiene una estructura primaria que al ser hidrolizada por las enzimas P-P dieron lugar a la liberaron péptidos con una composición y secuencia de aminoácidos más afines por la α -amilasa que provocaron su inhibición.

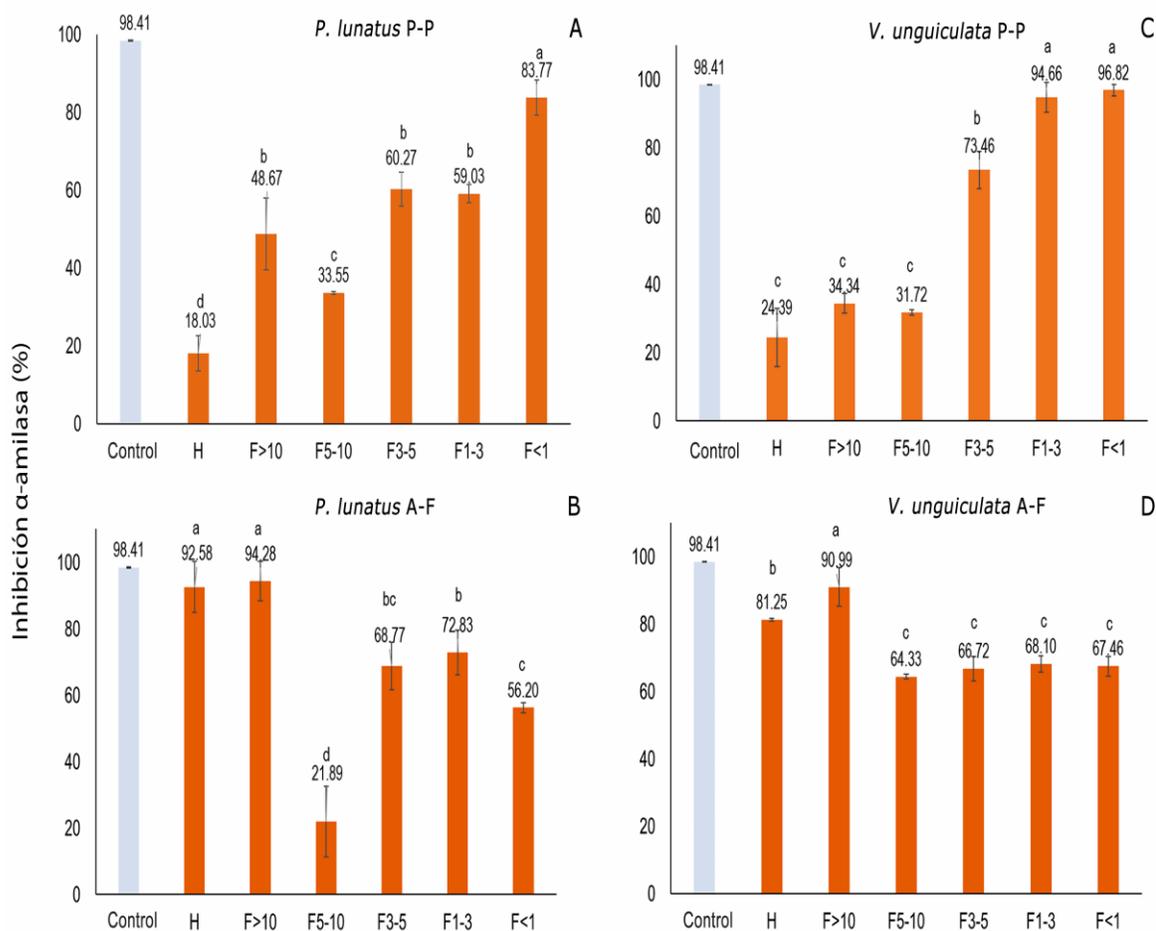


Figura 11. Actividad inhibitoria sobre la α -amilasa (Inhibición α -amilasa, %) del hidrolizado proteínico (H) y sus fracciones ultrafiltradas (F>10, F5-10, F3-5, F1-3, F<1 kDa) obtenidos con dos sistemas de enzimas secuenciales: **A)** *P. lunatus* P-P (100 mg /ml), **B)** *P. lunatus* A-F (75 mg /ml), **C)** *V. unguiculata* P-P (100 mg /ml), **D)** *V. unguiculata* A-F (50 mg /ml). Concentración de ensayo: mg de proteína/ml. Control: Acarbose (1 mM). Letras distintas en una misma gráfica significan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos con el sistema P-P (Figuras 11 A y 11 C) de 18 a 96% de inhibición (a una concentración de 100 mg proteína/ml, equivalente a 20 mg proteína presentes en el volumen de muestra utilizada en el ensayo) fueron menores que los reportados por Mojica et. al. (2015) quienes reportaron un 15-35% de inhibición/mg proteína, con hidrolizados proteínicos de cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* (precocido y sin precocer) obtenidos con P-P durante cuatro horas. La diferencia en los resultados posiblemente se debe a que *P. vulgaris* tiene inhibidores naturales de la α -

amilasa (Obiro, Zhang y Jiang, 2008) que contribuyen a una mayor inhibición, aunado al tiempo de hidrólisis de cuatro horas contra 90 min en el presente trabajo.

En los resultados obtenidos con el sistema A-F mostrados en las Figuras 11 B para *P. lunatus* y 11 D para *V. unguiculata*, empleando una concentración 100 mg proteína/ml, se obtuvo una inhibición de la α -amilasa superior al 100% para el hidrolizado y las fracciones peptídicas ultrafiltradas (excepto en las F>10 y F5-10) de *P. lunatus* y el hidrolizado y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *V. unguiculata*. Posiblemente debido a que dicha concentración fue lo suficientemente alta e inhibió totalmente a la α -amilasa. Por lo que se realizó una dilución a 50 mg proteína/ml para *V. unguiculata* y a 75 mg de proteína/ml para *P. lunatus*. Este comportamiento es característico de inhibidores competitivos o no competitivos donde la inhibición depende de la concentración del inhibidor y su afinidad por la enzima (Pacheco, 2015). Un caso similar reportó Oseguera-Toledo et al. (2015) con hidrolizados de proteína de *P. vulgaris* obtenidos con alcalasa o bromelaína, seguidos de pepsina-pancreatina, que presentaron más del 100% de inhibición.

En la Figura 11 B para *P. lunatus* A-F, se observa que el hidrolizado y todas las fracciones peptídicas ultrafiltradas presentaron actividad inhibitoria en su mayoría superior al 60%, excepto para la F5-10. Por lo que empleando menor concentración de proteína del hidrolizado o fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* A-F, se obtuvieron inhibiciones similares o incluso más altas que con P-P, especialmente para el hidrolizado y las fracciones F>10, F3-5, F1-3. El hidrolizado y la F>10 presentaron la mayor inhibición, caso opuesto a lo obtenido con el sistema P-P. Estos resultados concuerdan en parte con los resultados reportados por Oseguera-Toledo et al. (2015) quienes también reportaron que los hidrolizados de proteína *P. vulgaris* (Pinto Durango) obtenidos con alcalasa por dos horas, presentaron una actividad inhibitoria alta comparable a la F<1 kDa, en tanto que la F5-10 kDa tuvo la menor inhibición (< al 20%).

En la Figura 11 D para *V. unguiculata* A-F, se observa que con la mitad de la concentración de proteína empleada en *V. unguiculata* P-P, se tuvieron inhibiciones superiores al 60% y en general todas las fracciones peptídicas ultrafiltradas presentaron alta actividad inhibitoria, siendo mayor en el hidrolizado y la F>10. Por otro lado, la actividad inhibitoria de *V. unguiculata* A-F fue mayor que con *P. lunatus* A-F, lo cual podría atribuirse a la diferencia de la fuente de proteína, como se mencionó anteriormente.

La actividad inhibitoria sobre la α -amilasa que en general con el sistema A-F, fue mayor que con el sistema P-P, podría deberse a que el sistema A-F tuvo una mayor eficiencia catalítica reflejándose en un mayor grado de hidrólisis, así como a la amplia especificidad de sustrato, resultado de las diversas enzimas que conforman dicho sistema enzimático (Merz, 2015). Lo cual pudo dar lugar al rompimiento en diversos

enlaces peptídicos que originaron la formación de péptidos bioactivos afines a la α -amilasa, con capacidad para inhibirla.

Es posible que dichos péptidos hayan quedado distribuidos y retenidos a través de las diferentes fracciones peptídicas ultrafiltradas (ya sea como oligopéptidos, polipéptidos o proteínas dependiendo de corte de peso molecular de la membrana utilizada durante la ultrafiltración). Esto en una forma semejante a la investigación reportada por Cho et al. (2004) en donde un hidrolizado de proteína de soya con mayor grado de hidrólisis, tuvo una distribución más amplia de su rendimiento a través de las diferentes fracciones peptídicas (>10, 5-10, 3-5, 1-3 y <1 kDa) que un hidrolizado con menor grado de hidrólisis, en donde la mayor distribución del rendimiento se tuvo en la fracción de mayor tamaño molecular. Reflejándose por lo tanto una actividad inhibitoria superior al 60% en la mayoría de dichas fracciones peptídicas ultrafiltradas con A-F (Figuras 11 B y 11 D). A diferencia con el sistema P-P, posiblemente hubo porciones de proteína que no fueron totalmente hidrolizadas quedando retenidas en la membrana >10 kDa, concentrándose así solo los péptidos biológicamente más activos en las fracciones peptídicas ultrafiltradas de menor tamaño molecular.

La alta actividad inhibitoria de los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* A-F, probablemente se debe a que están conformados por la mezcla de todos los péptidos bioactivos distribuidos en todas las fracciones ultrafiltradas, los cuales a su vez presentaron altos porcentajes de inhibición de la actividad de la α -amilasa. Por otra lado, es posible que la alta actividad inhibitoria de la F>10 de *P. lunatus* y *V. unguiculata* A-F se haya debido a un comportamiento similar al reportado por Machius et al. (1996) en donde en una de sus investigaciones encontraron que un polipéptido inhibidor de la α -amilasa, de masa molecular aproximada de 9000 Da, obtenido de la bacteria *Streptomyces tendae*, interactuó no solo con el sitio activo la enzima α -amilasa, sino también con regiones de enlazamiento adicionales más allá del sitio activo, siendo posible que la enzima α -amilasa modificara su conformación para acomodar al inhibidor dando lugar así a la inhibición. Los resultados obtenidos para la F>10, también concuerdan con lo reportado por Feng et al. (1996), quienes encontraron que un inhibidor de α -amilasa purificado del trigo (miembro de una familia de inhibidores de amilasa de los cereales), un polipéptido de masa molecular alrededor de 14 kDa fue capaz de inhibir no sólo la amilasa de insectos, sino también la amilasa pancreática humana.

Los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas que tuvieron la mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa, es posible que contengan péptidos con secuencias aminoácidas más afines para unirse a la enzima α -amilasa, siendo capaces de inhibir a la enzima en un modo competitivo o no competitivo. Ya que como menciona Ngho y Gan (2016), la composición de los péptidos, así como sus secuencias juegan un rol importante en el mecanismo de inhibición, siendo claves para el potencial de interacción entre los grupos funcionales de los péptidos con los aminoácidos en el sitio

catalítico de las enzimas (Mojica et al. (2015). Incluso los péptidos pueden también enlazarse a la enzima, produciendo una forma alterada de ésta que deshabilita el enlazamiento entre la enzima y el sustrato natural dándose así la inhibición (Ngoh et al., 2016; Ngoh y Gan, 2017). Aunado a esto el complejo comportamiento de enlazamiento de inhibidores de origen proteínico con la α -amilasa explica su pronunciada especificidad, y el por qué péptidos grandes y pequeños pueden inhibirla (Machius et al., 1996).

A continuación, en la Tabla 14 se muestran las IC_{50} de las fracciones peptídicas ultrafiltradas que presentaron mayor inhibición de la α -amilasa detectadas en la Figura 11.

Tabla 14. IC_{50} de hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa.

Especie/sistema enzimático	Hidrolizado o fracción peptídica	IC_{50} (mg proteína/ml)
<i>P. lunatus</i> (P-P)	F<1	55.79
<i>P. lunatus</i> (A-F)	H	64.67
	F>10	54.61
<i>V. unguiculata</i> (P-P)	F1-3	65.79
	F<1	40.17
<i>V. unguiculata</i> (A-F)	F>10	31.58

(H) H hidrolizado, (F) Fracción peptídica (kDa)

Para *P. lunatus* A-F se muestran los resultados del hidrolizado (H) y F>10 que no presentaron diferencia estadística significativa en la actividad inhibitoria (porcentaje de inhibición) de igual forma la F1-3 y F<1 para *V. unguiculata* P-P.

Se observó que para *P. lunatus*, la IC_{50} de la F>10 (con el sistema A-F) presentó la menor IC_{50} , aunque solo fue ligeramente menor que el de la F>1 de *P. lunatus* P-P, por lo cual se puede deducir que ambas fracciones tiene un potencial similar para inhibir la α -amilasa.

Cuando se empleó como fuente de proteína *V. unguiculata*, se observa que con el sistema P-P, la F<1 tuvo una IC_{50} menor que la F1-3, lo cual se puede explicar porque durante la determinación de IC_{50} , se requirió menor concentración de proteína de la F<1 para arrojar un mismo porcentaje de inhibición que la F 1-3 kDa. Sin embargo, la IC_{50} de la F>10 obtenida con el sistema A-F fue la menor, con IC_{50} de 31.58 mg/ml representado así a la fracción con mayor potencial antidiabético.

La IC₅₀ de la F>10 kDa de *V. unguiculata* A-F fue mayor que los valores reportados por Ngho y Gan (2016) de 1.97 a 20 mg/ml para diferentes péptidos identificados, obtenidos a partir del hidrolizado de proteína *P. vulgaris* (frijol pinto). La diferencia en los resultados puede atribuirse, como se mencionó en apartados anteriores, a que *P. vulgaris* tiene inhibidores naturales de la α -amilasa que podrían estar contribuyendo en obtener una menor IC₅₀. También fue más alta que el valor reportado por Yu et al. (2012) de 0.075 mg proteína/ml para el péptido purificado KLPGF de albúmina de huevo y los valores reportados por Chiang, Chen, Jeng y Sung (2014) de 0.017-0.080 mg extracto/ml para extractos metanólicos de inhibidores naturales del frijol *P. vulgaris*. Los resultados de la IC₅₀ obtenidos en el presente trabajo fueron menores que la IC₅₀ de la acarbosa, cuyo valor oscila entre 0.00131-0.0037 mg/ml (Buchholz y Melzing, 2016; Chiang et al., 2014). Sin embargo, es probable que con procedimientos de purificación de las fracciones peptídicas ultrafiltradas de la tabla 14, se podrían conseguir IC₅₀ menores. Por lo anterior las fracciones peptídicas de *V. unguiculata* y *P. lunatus*, representan ingredientes potenciales para la elaboración de alimentos funcionales destinados a pacientes con DMT2, especialmente la F>10 *V. unguiculata* A-F.

Son pocos los autores que han reportado estudios de inhibición de la α -amilasa a partir de hidrolizados de fuentes de proteína similares al presente trabajo y de fracciones ultrafiltradas, y no se tienen reportes de trabajos previos con *V. unguiculata* y *P. lunatus*, generalmente reportan trabajos con inhibidores naturales de frijol de *P. vulgaris*, extractos de hojas, de cortezas y de plantas medicinales, entre otros (Buchholz y Melzing, 2016; Chiang et al., 2014; Rodríguez, 2012; Kim, Wang y Rhee, 2004).

5.6. Inhibición enzimática de la enzima α -glucosidasa.

A continuación, en la Figura 12 se muestran los resultados de inhibición de la enzima α -glucosidasa, con los hidrolizados (H) y fracciones peptídicas F>10, F 5-10, F 3-5, F 1-3, F<1 kDa de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, obtenidos con los sistemas de enzimáticos P-P y A-F. Se muestra como referencia el control utilizado acarbosa que presentó un 90.18% de inhibición.

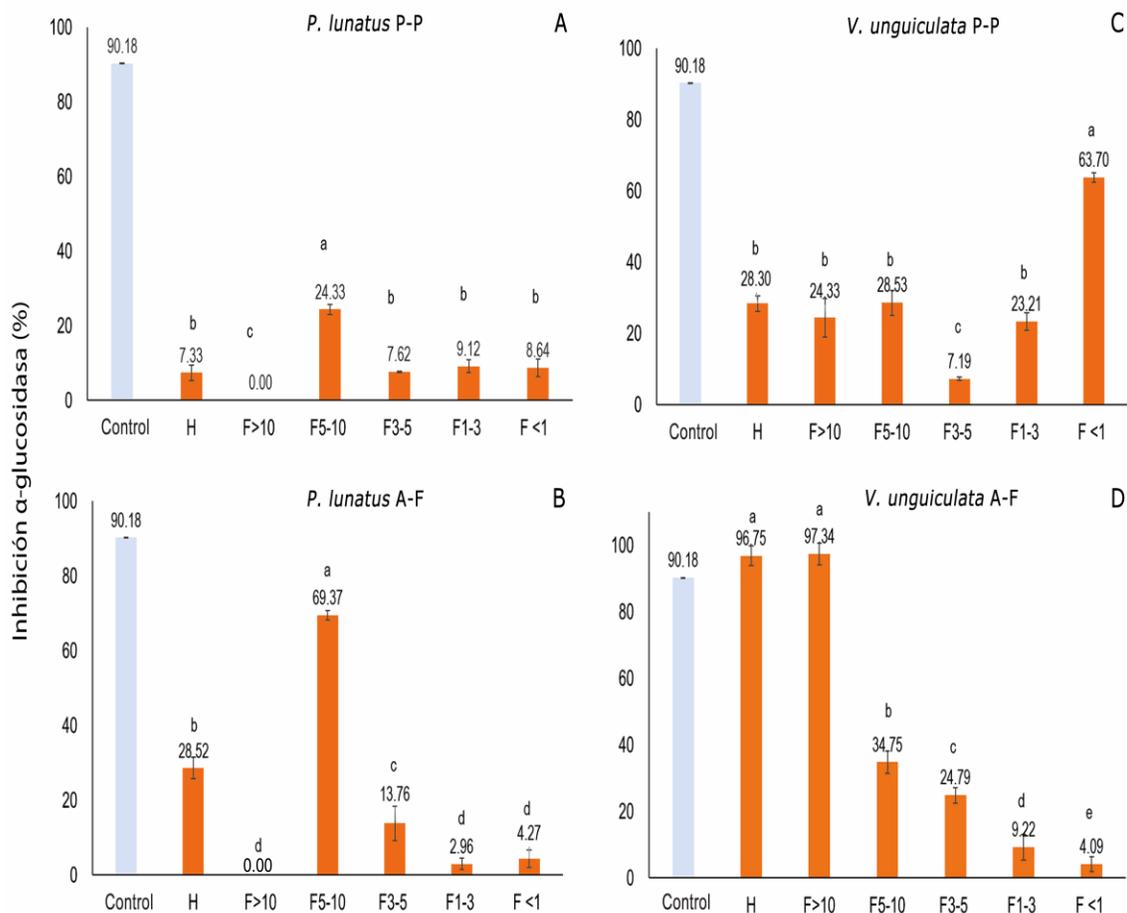


Figura 12. Actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa (inhibición α -glucosidasa %) del hidrolizado (H) proteínico y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas (F>10, F5-10, F3-5, F1-3 y F<1 kDa), obtenidos con diferentes sistemas de enzimas secuenciales: **A)** *P. lunatus* P-P (200 mg/ml), **B)** *P. lunatus* A-F (200 mg/ml), **C)** *V. unguiculata* P-P (200 mg/ml), **D)** *V. unguiculata* A-F (10 mg /ml). Concentración de ensayo: mg proteína/ml. Control es acarbosa (50 mM). Letras distintas en una misma gráfica significan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En Figura 12 A de *P. lunatus* P-P se observa que el hidrolizado y las fracciones peptídicas ultrafiltradas mostraron en general una baja actividad inhibitoria sin ser estadísticamente diferentes ($p > 0.05$). Excepto la F5-10 que tuvo la actividad inhibitoria más alta y la F >10 que no mostró inhibición sobre la α -glucosidasa, posiblemente porque en esta fracción no están presentes en una concentración suficiente péptidos bioactivos con afinidad por la α -glucosidasa que hayan interactuado con la misma para provocar su

inhibición, debido a que no están presentes las secuencias aminoácidas bioactivas determinantes para la inhibición (Ren et al.,2016) pero sí se encuentran en la F5-10.

En la Figura 12 C de *V. unguiculata* P-P, se observa que el hidrolizado sin fraccionar, así como en general todas las fracciones peptídicas ultrafiltradas tuvieron actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa sin diferencia estadística significativa ($p>0.05$), excepto la F3-5 que fue la más baja, y la F<1 que tuvo el mayor porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por autores como Lee et al. (2011) quienes encontraron que la F<1 kDa obtenida de un hidrolizado de proteína de capullos de seda (*Bombyx mori*), obtenido con proteasa-N por tres horas, presentó la mayor actividad inhibitoria de la α -glucosidasa. Así como con Oseguera-Toledo et al. (2015) quienes encontraron que las fracciones ultrafiltradas F<1 kDa, obtenidas a partir de hidrolizados de proteína de *P. vulgaris* (Pinto Durango y Negro), obtenidas con bromelaína o alcalasa durante dos horas, tuvieron la mayor inhibición de la enzima.

La alta inhibición de la F<1 *V. unguiculata* P-P puede atribuirse a la presencia de péptidos de tamaños moleculares pequeños presentes en dicha fracción ya que, como reportan Lee et al. (2011), Ren et al. (2016), Oseguera-Toledo et al. (2015), Kang, Yi y Lee (2013) se han encontrado que péptidos con tamaños moleculares <1 kDa, en promedio de 300-700 Da pueden ser potenciales inhibidores de la α -glucosidasa, debido a que por su tamaño pueden tener un acceso más fácil a la hendidura del sitio catalítico de la enzima y bloquearlo, tal como sugiere Mojica et al. (2015).

La actividad inhibitoria de la F<1 de *V. unguiculata* P-P de 63.7% (a una concentración de 200 mg proteína/ml, equivalente a 4 mg de proteína presentes en el volumen de muestra utilizada en el ensayo) fue menor que los valores reportados por Mojica et al. (2015), quienes obtuvieron inhibiciones de α -glucosidasa entre 40-60% y 60-70% / mg proteína con hidrolizados de proteína de cinco variedades *P. vulgaris* precocido y sin cocer respectivamente, obtenidos con pepsina-pancreatina por cuatro horas. La diferencia en los resultados posiblemente se debió al tiempo de hidrólisis que utilizaron de cuatro horas contra 90 min en el presente trabajo, y que obtuvieron grados de hidrólisis un poco mayor que los aquí reportados, lo cual pudo dar lugar a la formación de más péptidos bioactivos. Pues como señala dicho autor, es posible que una mayor hidrólisis represente una alta producción de péptidos de menor masa molecular que posiblemente pueden alcanzar el sitio catalítico de la α -glucosidasa incrementado así su potencial de inhibición. Aunque se ha visto que no necesariamente el grado de hidrólisis está relacionado con una mayor actividad inhibitoria (Lacroix y Li-Chan 2013). Aunado a lo mencionado anteriormente, la diferencia de la fuente de proteína empleada, es otro factor que pudo contribuir a los resultados obtenidos, ya que se trata de estudios con diferentes especies de frijol.

Respecto al hidrolizado y las fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* P-P que mostraron entre un 7 a 28% de inhibición, estos datos fueron en términos de porcentaje de inhibición del orden de los resultados reportados por Lacroix y Li-Chan (2013) quienes obtuvieron entre 5-20% de inhibición con hidrolizados de proteínas α -lactoalbúmina, lactoferrina y seroalbúmina de bovino (obtenidos con pepsina por una hora) y 32-36% de inhibición con un hidrolizado de proteína de suero de leche y β -lactoglobulina. Sin embargo, en el presente trabajo se requirió mayor concentración de proteína para alcanzar actividades inhibitorias similares, ya que dichos autores trabajaron a 2.5 mg proteína/ml. La diferencia en los resultados pudo deberse al tipo de proteína empleada que en su caso fue de origen animal, obteniendo en general inhibiciones más altas que para *V. unguiculata* y *P. lunatus* P-P, así como a las condiciones de ensayo.

Por otro lado, en general la actividad inhibitoria del hidrolizado y las fracciones peptídicas ultrafiltradas de *V. unguiculata* fue mayor que *P. lunatus*, con el sistema enzimático (P-P). Lo cual puede atribuirse a las características de la proteína de cada especie de frijol, tal como su estructura primaria y conformación tridimensional. Se ha reportado que la proteína de almacenamiento de *P. lunatus* son principalmente globulinas 11S con una masa molecular más grande que las de *V. unguiculata* que son globulinas 7S de menor masa molecular (Chel Guerrero et al., 2007; Rocha et al., 2014) por lo que es posible que la enzimas pepsina-pancreatina hayan tenido un mejor acceso sobre la proteína de *V. unguiculata* por ser más pequeñas y catalizaron la hidrólisis de enlaces peptídicos más eficientemente, generando probablemente más péptidos inhibidores de la α -glucosidasa a partir de esta especie.

En la Figura 12 B de *P. lunatus* A-F, los resultados muestran un comportamiento similar a los de *P. lunatus* P-P de baja inhibición, incluso la F>10 no inhibió en ambos casos, quizá porque a dicho tamaño de corte molecular de la membrana utilizada durante la ultrafiltración, no quedaron retenidos péptidos bioactivos, como se mencionó anteriormente. No obstante, el hidrolizado y la F5-10 mostraron un poco más de actividad inhibitoria que con el sistema P-P. El sistema A-F resultó más conveniente para la obtención de péptidos biológicamente más activos a partir de esta especie que con el sistema P-P, posiblemente debido a su mayor eficiencia catalítica, que se reflejó en un mayor grado de hidrólisis, así como la especificidad de las enzimas que conforman este sistema enzimático, tal como fue discutido en la sección de α -amilasa.

En la Figura 12 D para *V. unguiculata* A-F se realizó una dilución para trabajar a 10 mg de proteína, ya que cuando se realizó el ensayo a la concentración de 200 mg/ml, el hidrolizado y la F>10 tuvieron una actividad inhibitoria superior al 100%, lo cual sugirió que la enzima fue totalmente inhibida. Se observa que tanto el hidrolizado como la F>10 tuvieron la mayor actividad de inhibición de la α -glucosidasa, caso opuesto a lo obtenido con *V. unguiculata* P-P. Para el hidrolizado y las fracciones F>10, 5-10, 3-5 con

una concentración de proteína 20 veces menor que la utilizada con el sistema P-P, se alcanzó una mayor inhibición de la α -glucosidasa. Respecto a las F1-3 y F<1 *V. unguiculata* A-F, es posible que con este sistema incluso se hayan formado péptidos muy pequeños menores a 300-700 Da como los que mencionan algunos autores, que tal vez quedaron retenidos en dichas fracciones ultrafiltradas, que no son capaces de bloquear el sitio catalítico de la α -glucosidasa, y por lo tanto muestran la menor actividad inhibitoria en la Figura 12 D. Por otro lado, la inhibición de la α -glucosidasa con el hidrolizado y fracciones ultrafiltradas de *V. unguiculata* A-F fueron mayores que con *P. lunatus* A-F, lo cual puede deberse a la diferencia en la fuente de proteína.

Los resultados de la F5-10 de *P. lunatus* A-F, hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F que tuvieron la mayor actividad inhibitoria respecto a las fracciones peptídicas ultrafiltradas de cada uno de esos hidrolizados, concuerdan en parte con lo reportado por Oseguera-Toledo et al. (2015) quienes encontraron que no sólo las fracciones más pequeñas (F3-5, F1-3, F<1 kDa) sino también los hidrolizados y todas las fracciones peptídicas incluyendo las de mayor tamaño como F>10, F5-10 kDa, obtenidas a partir de hidrolizados de proteína *P. vulgaris* (frijol pinto Durango y negro) obtenidos con alcalasa por dos horas, mostraron alta actividad inhibitoria. Resultados semejantes reportaron Lacroix y Li-Chan (2013), quienes observaron que hidrolizados de proteína de suero de leche y β -lactoglobulina, que presentaron la mayor actividad inhibitoria respecto de otros hidrolizados, contenían principalmente fracciones peptídicas de entre 14-17 kDa aproximadamente.

La alta actividad inhibitoria de la F>10 de *V. unguiculata* A-F y F5-10 de *P. lunatus* A-F podría atribuirse a la presencia de péptidos (proteínas) presentes en dichas fracciones, que contienen aminoácidos en secuencias que son determinantes para la inhibición (Ren et al., 2016), que podrían haber interactuado directamente con el sitio catalítico de la enzima como lo hacen los péptidos de menor masa molecular o con otras regiones de la α -glucosidasa. Ya que, como menciona Zhang et al. (2016), en estudios con compuestos de naturaleza no glucosídica inhibidores de dicha enzima, la inhibición puede resultar por múltiples interacciones de estos con la enzima.

Las actividades inhibitorias del hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F, fueron aparentemente mayores que la reportada por Ren et al. (2016) quienes obtuvieron 58.26% de inhibición con un hidrolizado de proteína de semilla de *Cannabis sativa* L. obtenido con alcalasa (empleando 5 mg hidrolizado/ml). También fue aparentemente mayor que la actividad inhibitoria del hidrolizado y fracciones peptídicas, obtenidos a partir de proteína *P. vulgaris* (frijol pinto Durango y negro) con alcalasa por dos horas, de 50-76% (empleando 100 μ g de muestra /ml) (Oseguera-Toledo et al., 2015). Sin embargo, es de señalar que en los estudios mencionados con *P. vulgaris*, se empleó menor cantidad de muestra, por lo que la actividad inhibitoria a partir de *V. unguiculata* podría ser menor respecto a esa especie, y dado que el grado de hidrólisis de dicho

estudio fue similar al aquí obtenido, la variación en el resultado pudo deberse a la diferencia de la proteína empleada, y condiciones de ensayo. Actualmente no hay reportes de estudios de inhibición de α -glucosidasa de péptidos obtenidos a partir de *V. unguiculata* o *P. lunatus*.

Es posible que en los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, estén presentes péptidos con secuencias aminoácidas bioactivas responsables de la inhibición de la α -glucosidasa. Tal como lo reportado por Oseguera-Toledo et al. (2015) quienes en un estudio con hidrolizados y fracciones peptídicas de proteína de *P. vulgaris*, identificaron péptidos con la misma secuencia aminoácida bioactiva tanto en los hidrolizados como en las fracciones <1 kDa, tanto de la misma variedad como diferentes variedades de *P. vulgaris*, que presentaron alta actividad inhibitoria.

A continuación, se presenta la Tabla 15, que contienen los resultados de la IC₅₀ de los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas, que tuvieron la mayor actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa.

Tabla 15. IC₅₀ de hidrolizados o fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa.

Especie/sistema enzimático	Hidrolizado o fracción peptídica	IC ₅₀ (mg proteína/ml)
<i>P. lunatus</i> (P-P)	F5-10	N. D.
<i>P. lunatus</i> (A-F)	F5-10	124.14
<i>V. unguiculata</i> (P-P)	F<1	189.04
<i>V. unguiculata</i> (A-F)	H	1.81
	F>10	0.633

N. D. No detectada; H (hidrolizado), (F) Fracción peptídica (kDa)

En la Tabla 15 se muestra para *P. lunatus* que, con el sistema P-P no hubo suficiente inhibición para alcanzar el 50%. Se realizaron ensayos adicionales, incrementando la concentración de proteína de hidrolizado y todas las fracciones peptídicas, no obstante, la inhibición no se vio afectada. Con el sistema A-F sí fue posible determinar la IC₅₀.

Se observa para *V. unguiculata*, que el H y la F>10 con el sistema A-F fueron las muestras que tuvieron la menor IC₅₀, pero la que representa mayor potencial antidiabético es la F>10, ya que con menor cantidad de esa fracción se puede inhibir el 50% de la actividad enzimática de la α -glucosidasa.

La IC₅₀ de las fracciones F5-10 de *P. lunatus* A-F y F<1 de *V. unguiculata* P-P fueron menores que la reportada por Lee et al. (2011) de 213.6 mg proteína/ml para la F<1 kDa de un hidrolizado de proteína de capullo de seda. La IC₅₀ del hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F fueron menores que las reportadas por Lacroix y Li-Chan (2013) de 4.5 y 3.5 mg proteína/ml para un hidrolizado de proteína de suero y otro de β-lactoglobulina respectivamente, así como la de un péptido obtenido a partir de un hidrolizado del oligopéptido N159-I de *Aspergillus Oryzae* cuya IC₅₀ fue de 3.1 mg /ml (Kang et al., 2013). También fue menor que la de un hidrolizado de músculo de sardina de 48.7 mg/ml y una fracción cromatográfica de este de 15 mg/ml (Matsui et al., 1996). Incluso la IC₅₀ de la F >10 de *V. unguiculata* A-F fue menor que la de los péptidos (SP1F41 y SP1F42) purificados de la fracción F<1 kDa de un hidrolizado de proteína de capullo de seda de 2.7 y 1.5 mg proteína/ml, respectivamente (Lee et al., 2011). Por lo anterior el hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F tienen mayor potencial antidiabético que los hidrolizados, fracciones o péptidos mencionados por dichos investigadores. Son pocas los estudios con inhibidores de fuentes de proteína de frijol u otras leguminosas en los que se reporta la IC₅₀.

La IC₅₀ de la F >10 de *V. unguiculata* A-F obtenida en el presente trabajo, fue mayor que la reportada para el péptido KLPGF purificado de un hidrolizado de albúmina de huevo (obtenido con alcalasa por tres horas) con IC₅₀ de 0.0376 mg proteína/ml (Yu et al., 2012), así como de la IC₅₀ reportada para la acarbosa que oscila entre 0.039-0.079 mg/ml (estimada por Yu et al., 2012 y Lee et al., 2011 en ensayos con glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*). Sin embargo, con estudios posteriores de purificación principalmente de hidrolizado y la F>10 *V. unguiculata* A-F se podrían obtener IC₅₀ menores, tal como lo reportó Lee et al. (2011) quienes obtuvieron después de purificar la F<1 kDa de su estudio (mediante una columna de biogel y posteriormente por HPLC), una fracción con una IC₅₀ de 1.5 mg/ml, menor que la inicial de 213 mg proteína/ml. Por lo anterior, principalmente el hidrolizado y la F>10 tienen potencial para la elaboración de alimentos funcionales destinados a pacientes con DMT2.

5.7. Inhibición enzimática de la enzima DPP-IV.

A continuación, en la Figura 13, se muestran los resultados de la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), con los hidrolizados (H) y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con los sistemas de enzimas P-P y A-F. Se presentan los resultados de los hidrolizados y fracciones peptídicas que tuvieron la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa. En todas las gráficas se muestra como el control utilizado sitagliptina que tuvo una inhibición relativa de 97.77%.

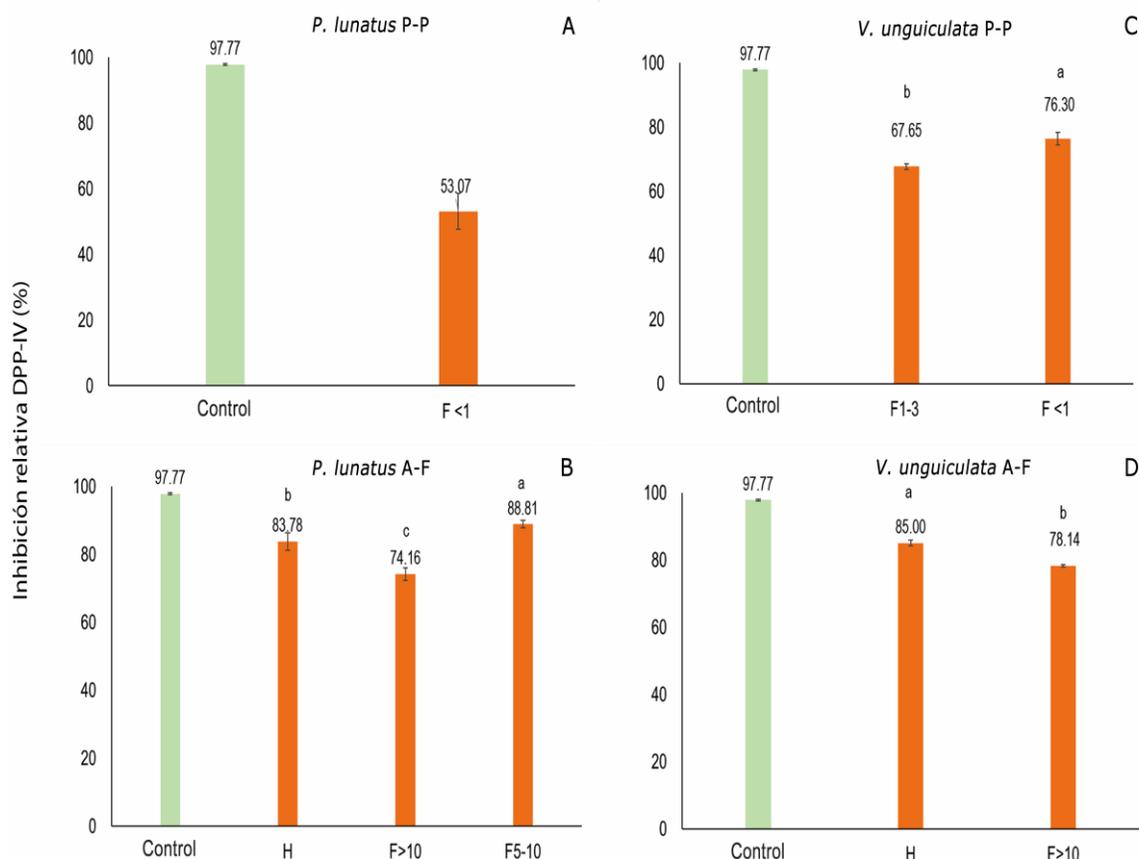


Figura 13. Actividad inhibitoria sobre la DPP-IV (Inhibición relativa DPP-IV %) del hidrolizado (H) proteínico y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas (F>10, F5-10, F3-5, F1-3 y F<1 kDa) obtenidos con diferentes sistemas de enzimas secuenciales **A)** *P. lunatus* P-P, **B)** *P. lunatus* A-F, **C)** *V. unguiculata* P-P, **D)** *V. unguiculata* A-F. Concentración de ensayo: 10 mg proteína/ml. Control: Sitagliptina. Letras distintas en una misma gráfica, significa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 13 A de *P. lunatus* P-P se observa la actividad inhibitoria de la F<1 sobre la enzima DPP-IV y en la Figura 13 C de *V. unguiculata* P-P, la F<1 tuvo el mayor porcentaje de inhibición de la DPP-IV, el cual fue a su vez mayor que el de la F<1 de *P. lunatus* P-P.

La actividad inhibitoria de las tres fracciones peptídicas ultrafiltradas mencionadas fue superior al 50%, lo cual puede deberse a que contienen péptidos que se formaron durante la hidrólisis de la proteína, probablemente con estructuras parecidas a los sustratos naturales de la DPP-IV (es decir con presencia de prolina o alanina en el dipéptido N-terminal) capaces de competir con el sustrato por el sitio catalítico de la DPP-

IV (Ahrén et al., 2011) ocasionando su inhibición. Lo anterior debido a que la DPP-IV es una aminopeptidasa con especificidad de sustrato relativamente estricta por dipéptidos que preferentemente contienen prolina o alanina en la P1 del N-terminal del sustrato (y a muy bajas velocidades escinde en Gly, Val, Ser y Leu en dicha posición) (Power et al., 2014) sin embargo, no escinde dipéptidos de sustratos con presencia de prolina en la tercera posición (P1'), los cuales pueden actuar como inhibidores (Lorey et al., 2003).

Los resultados anteriores (Figura 13 A y 13 C) concuerdan con lo mencionado por diversos autores (Nongonierma y Fitzgerald, 2013; Li-Chan et al., 2012; Rocha et al., 2014) quienes han reportado que los péptidos de masas moleculares pequeñas, generalmente <1 kDa o ligeramente superiores, con frecuencia dipéptidos o tripéptidos, conteniendo prolina o alanina en la P1, han mostrado una inhibición potente de la DPP-IV generalmente en un modo competitivo por el sitio activo (Power et al., 2014). Por esto es probable que los péptidos, principalmente los presentes en la F<1 kDa de *V. unguiculata* P-P, hayan interactuado con el sitio catalítico de la DPP-IV. En una forma similar a los péptidos identificados por Velarde-Salcedo et al. (2013), obtenidos de hidrolizados de proteína de amaranto, en donde encontraron que estos bloqueaban el acceso al sitio catalítico.

Los resultados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema P-P concuerdan con los resultados publicados por Oseguera-Toledo et al. (2015), en donde la fracción <1 kDa, obtenida a partir de hidrolizados de proteína de *P. vulgaris* (pinto Durango y negro) con alcalasa o bromelaína por dos horas, presentó el mayor porcentaje de inhibición de la DPP-IV (55%, empleando 100 µg hidrolizado/ml). Sin embargo, la actividad inhibitoria de la F<1 de *P. lunatus* y *V. unguiculata* (53.07 y 76.30 % respectivamente) es menor que *P. vulgaris*, debido a que para esta especie los autores emplearon una concentración de muestra menor al presente trabajo.

En la Figura 13 B de *P. lunatus* A-F se observa que tanto el hidrolizado como las fracciones peptídicas ultrafiltradas tuvieron una inhibición superior al 70% pero la F 5-10 fue la más alta. En la Figura 13 D de *V. unguiculata* A-F el hidrolizado tuvo la mayor inhibición sobre la DPP-IV. Se analizó que la actividad inhibitoria de los hidrolizados y F>10 de *P. lunatus* A-F y de *V. unguiculata* A-F no presentaron diferencia estadística significativa ($p>0.05$).

A diferencia de los resultados con el sistema P-P donde las fracciones peptídicas ultrafiltradas de menor tamaño mostraron alta inhibición de la DPP-IV, se confirma en los resultados con el sistema A-F que, también las fracciones más grandes como la F>10 y F5-10 de *P. lunatus* A-F y F>10 *V. unguiculata* A-F tuvieron actividad inhibitoria sobre la DPP-IV.

Lo anterior puede atribuirse a que péptidos largos de hasta aproximadamente 5 kDa o mayores pueden haberse retenido en dichas fracciones, en concentraciones altas

y actuaron como inhibidores no competitivos formando interacciones en la interface de dimerización de la enzima DPP-IV, bloqueando por lo tanto la forma activa de ésta. Esto tal como lo reportó Velarde-Salcedo et al. (2013) quienes hallaron que péptidos identificados de hidrolizados de glutelinas de amaranto, de más de 13 y hasta 50 residuos se enlazaban con la DPP-IV en dicha zona, a lo cual se podía atribuir la inhibición. Incluso los péptidos (que pueden ser polipéptidos o proteínas) contenidos en dichas fracciones podrían haber interactuado con sitios de enlazamiento secundarios, como receptores y de reconocimiento de sustrato en la estructura de la DPP-IV, modificando la especificidad del sustrato y la actividad catalítica de la DPP-IV, como lo reporta Power et al. (2014).

Para el caso de los hidrolizados, los cuales contienen el total de la mezcla de péptidos de distintos tamaños y composiciones, es posible que estos hayan ejercido un efecto inhibitorio mixto como lo ha reportado Lorey et al. (2003), en un estudio con oligopéptidos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) en el que los péptidos se pueden unir a la vez a diferentes sitios de la enzima, como el sitio catalítico y otra región, y por esto los hidrolizados exhibieron alta actividad inhibitoria sobre la DPP-IV.

Los resultados obtenidos para *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema A-F fueron en porcentaje, superiores a los reportados por Li-Chan et al. (2012), quienes obtuvieron para un hidrolizado de proteína de gelatina de piel de salmón (procesado con alcalasa por cuatro horas) 30, 40 y 60% de inhibición para sus fracciones F>2.5, F2-1 y F<1 kDa sin embargo, cabe señalar que dichos autores emplearon un concentración de ensayo menor (2 mg sólido/ml) y en el presente trabajo fue mayor (10 mg proteína/ml que equivalen a más de 10 mg de sólido liofilizado de hidrolizado o fracción peptídica ultrafiltrada según se trate).

Los resultados de los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con A-F (83 y 85 % de inhibición) y F5-10 (88%) son del orden de los resultados reportados por Velarde-Salcedo et al. (2013). Quienes probaron hidrolizados de proteína de amaranto, obtenidos con tripsina por 14 h con diferentes proporciones de enzima-sustrato, obteniendo inhibiciones desde un 20% hasta un 80% de inhibición (empleando una concentración de ensayo de 2 mg péptidos/ml). Sin embargo, la actividad inhibitoria de *P. lunatus* y *V. unguiculata* podría aparentemente ser menor que la del amaranto debido a que en el presente trabajó se emplearon 10 mg de proteína/ml como concentración de ensayo. Dicho autor también analizó hidrolizados de proteína frijol negro, soya, amaranto y trigo obteniendo inhibiciones aproximadamente de 20, 38, 60, 60 % respectivamente (a una concentración de ensayo de 1.4 mg péptidos/ml), por lo que se puede observar que la fuente de proteína influye en la obtención de péptidos bioactivos, ya que la especie de frijol fue la de menor potencial de inhibición.

Aun cuando el mecanismo inducido de inhibición de la DPP-IV no ha sido del todo elucidado, Power et al., (2014) mencionan que, las investigaciones que han analizado conducen en forma general a que los péptidos entre 2 a 7 aminoácidos con presencia de prolina o alanina en la penúltima posición del N-terminal actúan inhibiendo el sitio catalítico de la enzima. Y péptidos más grandes generalmente se unen a sitios secundarios de enlazamiento fuera del sitio catalítico. Motivo por el cual se pudo observar un potencial inhibitorio considerable sobre la DPP-IV con las fracciones de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con el sistema P-P y A-F. Adicionalmente la secuencia aminoácida puede alterar el modo de inhibición y la potencia de la inhibición, ya que las interacciones DPP-IV-inhibidor dependen de estos factores y de la conformación de la cadena peptídica, tal como reporta como menciona Lorey et al. (2003). Quienes encontraron en algunos péptidos inhibidores de la DPP-IV, que la sustitución en ubicaciones específicas como el tercer aminoácido de N-terminal alteró la potencia de inhibición.

Se realizó el análisis estadístico de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de la figura 17 (A, B, C y D) y se determinó que las fracciones con mayor actividad inhibitoria sobre la DPP-IV fueron la F5-10 de *P. lunatus* A-F y el hidrolizado de *V. unguiculata* A-F, al no ser estadísticamente diferentes ($p > 0.05$). Por ello se determinó su IC_{50} , la cual fue de 1.93 y 2.06 mg proteína/ml respectivamente.

La IC_{50} del hidrolizado de *V. unguiculata* A-F, fue mayor a la reportada por Rocha et al. (2014) para un hidrolizado de proteína de *V. unguiculata*, de 0.8 mg proteína/ml (obtenido con alcalasa por 2 h). Las IC_{50} obtenidas en el presente trabajo (hidrolizado y F5-10) fueron un poco más altas que las reportadas por Velarde-Salcedo et al. (2013) de 1.2-2 mg/ml y 1.0-1.6 mg/ml para unos hidrolizados de proteína de amaranto y sus fracciones $F < 10$ kDa respectivamente, así como la de 0.8 mg/ml para un hidrolizado de proteína de trigo. También fueron más altas que las reportadas por Mojica et al. (2015) para hidrolizados de cinco variedades de frijol *P. vulgaris* de 0.093 - 0.9 mg proteína/ml (obtenidos con pepsina-pancreatina por cuatro horas). La diferencia en los resultados se debe a las condiciones trabajo que fueron distintas, como el complejo enzimático, proporción de enzima:sustrato, tiempo de hidrólisis o la fuente de proteína. Incluso como menciona Rocha et al. (2014) una hidrólisis más intensa podría provocar un efecto adverso a la inhibición enzimática, como fue su caso que, después de hidrolizar por arriba de dos horas, su IC_{50} para *V. unguiculata* se vio incrementada aproximadamente de 0.8 a 1.5 mg proteína/ml.

Las IC_{50} de la F5-10 *P. lunatus* A-F e hidrolizado de *V. unguiculata* A-F, fueron más altas que la del tripéptido diprotina A, inhibidor patentado de la DPP-IV (Ile-Pro-Ile) con $IC_{50} = 0.0016$ mg/ml (Lacroix y Li-Chan, 2013). No obstante tienen potencial para inhibir la DPP-IV, por lo que con estudios adicionales de purificación se podrían reducir

la IC₅₀ y con estudios *in vivo* podrían ser empleadas para la elaboración de alimentos funcionales para contribuir al tratamiento de DMT2.

Por otro lado, en las figuras 11, 12 y 13 se observa que el hidrolizado y las fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* P-P tuvieron actividad inhibitoria considerable sobre la enzima α -amilasa y DPP-IV (sobre esta las fracciones de menor tamaño) pero muy baja o nula actividad en algunos casos sobre la α -glucosidasa. Una tendencia similar se presentó para *V. unguiculata* P-P. Se observa en las mismas figuras que los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* A-F tuvieron alta actividad inhibitoria sobre la α -amilasa y DPP-IV (para esta los hidrolizados, F>10 y F5-10). Y se detectó un poco más de inhibición sobre la enzima α -glucosidasa que con el sistema P-P para algunos casos y otros siguieron presentando baja o nula actividad. Para *V. unguiculata* A-F se encontró alta inhibición sobre la actividad de las tres enzimas.

El comportamiento anterior puede explicarse porque la especificidad por el sustrato es distinta para la α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV, la cual está en función de su sitio activo (Yamamoto, Miyake, Kusunoki y Osaki, 2010). En el caso de la α -amilasa y α -glucosidasa, a pesar de pertenecer a la misma familia de las glucohidrolasas, se ha identificado en sus estructuras que la organización a nivel de dominios juega un papel importante en la especificidad de las enzimas, e incluso en algunas glucohidrolasas, se han identificado diferencias a nivel del dominio C (Jespersen, MacGregor, Sierks y Svensson, 1991). Por esto los péptidos (proteínas, polipéptidos u oligopéptidos, según la membrana utilizada durante la ultrafiltración) contenidos en algunos hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* P-P o *P. lunatus* A-F que sí inhibieron la α -amilasa o DPP-IV no tuvieron la afinidad para interactuar con la misma potencia con la α -glucosidasa para provocar su inhibición.

A pesar de tratarse de los mismos hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas probados con las diferentes enzimas, cada uno contiene más de un péptido a la vez, y sólo algunos de ellos podrían tener la capacidad de inhibir a la vez a las tres enzimas o a dos o solo a una. Esto debido a que la composición y secuencia de sus aminoácidos es importante para ejercer su efecto inhibitorio. Por lo que seguramente los péptidos bioactivos contenidos en algunos hidrolizados o fracciones peptídicas (*P. lunatus* y *V. unguiculata* P-P o *P. lunatus* A-F) no se encontraron en una concentración suficiente para inhibir a la actividad de α -glucosidasa, pero sí para inhibir la α -amilasa y la DPP-IV, por ello la actividad inhibitoria puede ser más alta o baja en los diferentes casos.

5.8. Perfil de aminoácidos de los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria de las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, DPP-IV.

En la Tabla 16 y 17 se presenta respectivamente el perfil de aminoácidos y su distribución, de los hidrolizados o fracciones peptídicas de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, que presentaron las más altas actividades inhibitorias sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV.

Los aminoácidos limitantes en *P. lunatus* son cisteína y metionina, mientras que la especie *V. unguiculata* es rica en ácido glutámico, aspártico, leucina y lisina pero tiene un bajo contenido de cisteína y es limitante en metionina, lo que concuerda con lo reportado por Evans y Boulter (1974); Horax et al. (2004); Sandoval (2015) y Freitas et al. (2004).

Tabla 16. Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, α -amilasa y DPP-IV.

Aminoácido	F1-3 VU PP	F<1 VU PP	F<1 PL PP	H VU AF	F>10 VU AF	H PL AF	F>10 PL AF	F5-10 PL AF	Harina *	Harina **
									<i>V. unguiculata</i>	<i>P. lunatus</i>
Asp + Glu	24.83	18.13	19.13	40.25	37.11	21.25	21.69	22.77	29.7	24.83
Ser	3.01 ± 0.04 ^{c d}	1.93 ± 0.04 ^d	2.89 ± 0.19 ^{c d}	4.15 ± 0.24 ^{b c}	4.04 ± 0.71 ^{b c}	6.92 ± 0.25 ^a	5.55 ± 1.17 ^{a b}	3.95 ± 0.83 ^{b c}	5.90	5.44
His	0.73 ± 0.01 ^c	0.79 ± 0.19 ^c	0.66 ± 0.02 ^c	2.80 ± 0.01 ^{a b}	2.90 ± 0.59 ^{a b}	3.87 ± 0.22 ^a	3.91 ± 1.21 ^{a b}	2.72 ± 0.45 ^b	3.03	3.00
Gli	5.10 ± 0.05 ^a	4.97 ± 0.11 ^a	4.19 ± 0.02 ^{a b}	2.84 ± 0.16 ^b	3.51 ± 0.61 ^{a b}	4.75 ± 0.13 ^{a b}	4.58 ± 0.94 ^a	3.84 ± 0.15 ^{a b}	3.88	2.48
Tre	3.84 ± 0.07 ^a	3.37 ± 0.08 ^{a b}	4.07 ± 0.04 ^a	1.66 ± 0.09 ^c	1.56 ± 0.28 ^c	2.59 ± 0.19 ^{b c}	2.39 ± 0.80 ^{b c}	1.69 ± 0.25 ^c	3.09	4.10
Arg	3.19 ± 0.05 ^{c d}	1.63 ± 0.06 ^d	1.75 ± 0.02 ^d	6.26 ± 0.50 ^{a b}	5.11 ± 0.44 ^{b c}	6.32 ± 1.84 ^{a b}	6.31 ± 1.30 ^{a b}	7.69 ± 1.13 ^a	5.97	10.13
Ala	6.84 ± 0.22 ^b	7.87 ± 0.20 ^a	7.75 ± 0.26 ^a	2.63 ± 0.032 ^c	1.82 ± 0.14 ^d	2.90 ± 0.13 ^c	1.55 ± 0.22 ^{d e}	1.09 ± 0.20 ^e	4.44	3.30
Pro	3.86 ± 0.64 ^{b c}	4.17 ± 0.24 ^{b c}	4.07 ± 0.08 ^{b c}	3.34 ± 1.22 ^c	4.63 ± 2.83 ^{b c}	5.90 ± 0.43 ^{a b c}	6.77 ± 0.19 ^{a b}	8.11 ± 0.16 ^a	3.75	5.43
Tir	1.79 ± 0.01 ^{c d}	0.80 ± 0.07 ^f	1.20 ± 0.03 ^{e f}	2.32 ± 0.31 ^{b c}	1.45 ± 0.16 ^{d e}	4.52 ± 0.28 ^a	2.40 ± 0.29 ^b	2.49 ± 0.05 ^b	2.86	3.45
Val	7.47 ± 0.18 ^d	8.29 ± 0.14 ^{c d}	7.56 ± 0.18 ^d	8.50 ± 0.80 ^{c d}	13.14 ± 0.86 ^a	10.29 ± 0.04 ^{b c}	12.99 ± 1.53 ^a	12.31 ± 0.82 ^{a b}	4.71	5.90
Met	0.29 ± 0.09 ^b	0.001 ± 0.00 ^b	0.68 ± 0.03 ^{a b}	0.38 ± 0.14 ^b	0.23 ± 0.06 ^b	0.37 ± 0.13 ^b	0.84 ± 0.24 ^{a b}	1.27 ± 0.70 ^a	1.52	0.81
Cis	ND	ND	ND	1.68 ± 0.01 ^a	1.16 ± 0.16 ^{a b}	0.42 ± 0.11 ^{a b}	0.10 ± 0.02 ^a	1.32 ± 0.93 ^{a b}	1.00	0.29
Ile	6.46 ± 0.16 ^{a b c}	6.85 ± 0.04 ^a	6.68 ± 0.13 ^{a b}	3.42 ± 0.44 ^e	4.01 ± 0.32 ^e	5.12 ± 0.17 ^d	5.87 ± 0.43 ^{b c d}	5.74 ± 0.36 ^{c d}	4.18	5.71
Leu	11.93 ± 0.21 ^b	15.51 ± 0.31 ^a	16.15 ± 0.25 ^a	6.34 ± 0.67 ^c	6.70 ± 0.85 ^c	9.61 ± 0.22 ^b	9.73 ± 0.98 ^b	10.15 ± 1.68 ^b	8.73	9.35
Fen	9.91 ± 0.26 ^b	14.15 ± 0.15 ^a	13.64 ± 0.32 ^a	6.64 ± 3.46 ^c	4.46 ± 0.65 ^c	6.00 ± 0.26 ^c	6.08 ± 0.92 ^c	5.59 ± 0.58 ^c	5.60	6.18
Lis	7.97 ± 0.16 ^a	7.37 ± 0.24 ^{a b}	6.78 ± 0.44 ^{a b}	4.81 ± 0.66 ^c	5.98 ± 0.73 ^{b c}	7.06 ± 0.19 ^{a b}	7.35 ± 1.02 ^{a b}	6.83 ± 0.13 ^{a b}	7.30	5.69
Trp	2.76 ± 0.78 ^{a b}	4.17 ± 1.13 ^a	2.78 ± 0.74 ^{a b}	1.98 ± 0.05 ^b	2.16 ± 0.67 ^b	1.82 ± 0.41 ^b	1.84 ± 0.24 ^b	2.40 ± 0.29 ^b	-	1.66

Letras distintas en la misma fila presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). N.D No detectado. VU= *V. unguiculata*; PL= *P. lunatus*; H= Hidrolizado; P-P= Pepsina-Pancreatina; A-F= Alcalasa-Flavourzima. * Evans y Boulter (1974). ** Sandoval (2015)

Tabla 17. Distribución de perfil de aminoácidos (%) de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, α -amilasa y DPP-IV.

	Distribución de aminoácidos (%)							
	F1-3 VU PP	F<1 VU PP	F<1 PL PP	H VU AF	F>10 VU AF	H PL AF	F>10 PL AF	F5-10 PL AF
Hidrofóbicos (Ala, Val, Met, Fen, Leu, Ile, Pro, Trp)	49.52	61.01	59.31	33.23	37.16	42.01	45.67	46.66
Hidrofilicos (Arg, Asp+Asn, His, Lis, Glu+Gln)	36.72	27.92	28.32	54.12	51.10	38.76	39.26	40.01
Neutros (Ser, Tre, Gli, Tir, Cis, Gli)	13.74	11.07	12.35	12.65	11.72	19.20	15.02	13.29

VU= *V. unguiculata*; PL= *P. lunatus*; H= Hidrolizado; P-P= Pepsina-Pancreatina; A-F= Alcalasa-Flavourzima

Se aprecia en la Tabla 16 que en las fracciones peptídicas ultrafiltradas que tuvieron mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa, F<1 de *P. lunatus* P-P tiene un mayor contenido de leucina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina respecto a los demás aminoácidos de dicha fracción. En la F1-3 de *V. unguiculata* P-P predomina respecto al contenido del total de aminoácidos, la presencia de ácido glutámico y aspártico, leucina, fenilalanina y lisina. En la F<1 de *V. unguiculata* P-P hay mayor contenido de leucina, fenilalanina, glutámico, aspártico, valina y alanina. En el hidrolizado de *P. lunatus* A-F se encontró un mayor contenido de aminoácidos como valina, ácido aspártico y glutámico, leucina, lisina y serina. En la F>10 de *P. lunatus* A-F hay mayor contenido de valina, ácido aspártico y glutámico, leucina, lisina y arginina. En el hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F predomina el contenido de ácido glutámico, aspártico, valina, leucina, fenilalanina, arginina y lisina. En la Tabla 17, se observa que en las fracciones F<1 *P. lunatus* P-P, F1-3 y F<1 *V. unguiculata* P-P y F>10 *P. lunatus* A-F fue mayor el contenido de aminoácidos hidrofóbicos y en hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F el de aminoácidos hidrofílicos.

Por lo anterior es posible que la presencia de los aminoácidos mencionados, detectados en mayor concentración en los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas citadas, tengan participación en la inhibición de la α -amilasa. Principalmente aminoácidos hidrofóbicos como Leu, Val y Fen e hidrofílicos como Asp, Glu, Arg y Lis. Esto de acuerdo a lo reportado por autores como Ngoh y Gan (2016) y Ngoh et al. (2017) quienes han identificado algunos péptidos inhibidores de la α -amilasa, obtenidos de hidrolizados de proteína de frijol negro, tales como PPHMLP, PLPWGAGF, PPHMGGP, PLPLHMLP, LSSLEMGSLGALFVCM. Los cuales tienen presencia predominante de leucina y se enlazan a la α -amilasa, principalmente mediante aminoácidos como Pro, Met e His en regiones de unión de sustrato y sitio catalítico. Dichos autores observaron que con frecuencia la prolina aparece en el N-terminal de los péptidos identificados, lo cual resulta de interés para la inhibición. También reportaron que aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Leu, Fen, Val, Pro, Gli e hidrofílicos como Cis, Met, His y Ser juegan un papel importante en la inhibición de la α -amilasa, ya que se ha sugerido que estos residuos son los responsables de interactuar en los sitios activos de la enzima vía enlaces hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno.

La presencia frecuente de leucina también fue observada por Oseguera-Toledo et al. (2015) en péptidos inhibidores de la α -amilasa, como LLSL y FFL encontrados en hidrolizados de proteína de frijol negro, los cuales interactuaron en el sitio catalítico de la α -amilasa con al menos uno de los aminoácidos responsables de la hidrólisis de carbohidratos. Por otro lado, Yu et al. (2012) mencionan que la presencia de leucina y prolina se considera relevante para la inhibición, ya que encontraron que el péptido KLPGF, derivado de un hidrolizado de albúmina de huevo, fue capaz de inhibir la α -amilasa. Por otro lado, se ha visto que una secuencia de aminoácidos como Trp-Arg-Tir, y aminoácidos como Gli, Tre, Ala, Val, Asp y Glu como los encontrados en los

polipéptidos inhibidores de la α -amilasa del género *Streptomyces* son importantes en la inhibición (Machius et al., 1996).

Se observa en la Tabla 16 y 17, que los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas con más alta actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa: F<1 de *V. unguiculata* P-P tiene mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos como ácido glutámico y aspártico, leucina y fenilalanina respecto al resto de los aminoácidos, en la F5-10 de *P. lunatus* A-F, predominan aminoácidos hidrofóbicos como leucina, prolina e hidrofílicos como arginina y lisina, por otro lado, en el hidrolizado y F>10 de *V. unguiculata* A-F predomina la presencia de aminoácidos hidrofílicos sobre los hidrofílicos encontrándose en mayor cantidad ácido glutámico, aspártico valina, leucina, fenilalanina, arginina y lisina respecto al contenido de los demás aminoácidos. Por lo que es probable que dichos aminoácidos estén presentes en determinadas secuencias en los péptidos contenidos en los hidrolizados o fracciones peptídicas mencionados, pudiendo tener una participación importante en la inhibición de α -glucosidasa, principalmente aminoácidos como Leu, Pro, Glu, Fen y Lis. Esto debido a que autores como Yu et al. (2012); Lee et al. (2011); Kang et al. (2013) y Ren et al. (2016) han reportado la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como leucina, prolina, metionina, fenilalanina y glicina, así como la presencia de algunos hidrofílicos como arginina, ácido glutámico y tirosina, en péptidos inhibidores de α -glucosidasa, obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas de diferentes fuentes de proteína como albúmina de huevo, capullo de seda, *Aspergillus Oryza* N159-1, *Canabis sativa* L., tales como los péptidos KLPGF; GEY y GYG; PFP; LR y PLMLP, los cuales podrían formar parte de los péptidos contenidos en las fracciones obtenidas en el presente trabajo.

En la Tabla 16 se muestra que los péptidos presentes en las fracciones F5-10 de *P. lunatus* A-F que tuvieron la mayor inhibición sobre la DPP-IV y el hidrolizado de *V. unguiculata* A-F, contienen cantidades importantes de leucina, prolina, arginina, lisina y ácidos glutámico y aspártico, valina, leucina y lisina, respectivamente, por lo que principalmente la presencia de Pro, Val, Leu, Lis que se encontraron en mayor concentración en las fracciones mencionadas, e incluso Gli y Ser, que no precisamente están en mayor concentración, podrían formar parte de los péptidos de dichas fracciones, ya que la DPP-IV tienen preferencia por sustratos con dipéptidos N-terminales con presencia de prolina, alanina o incluso valina, glicina, serina y leucina en P1, y podrían haber actuado como inhibidores. Aunado a esto Mojica et al. (2015) reportaron que el péptido con mayor potencial inhibitorio de la DPP-IV encontrado en el hidrolizado de proteína de *P. vulgaris*, fue el LRENNKLMLELK, en el que las secuencias bioactivas LL, EL, LK, NKL, KL, se caracterizan por la presencia de leucina. Autores como Rocha et al. (2014) encontraron que los péptidos TTAGLLE y KVSVAL, obtenidos de hidrolizados de proteína de *V. unguiculata*, tuvieron el mayor número de interacciones con la enzima DPP-IV, en el sitio catalítico y sitios de reconocimiento. Oseguera-Toledo et al. (2015) reportaron que los péptidos LLSL, QQEG inhibidores de la α -amilasa, también inhibieron la DPP-IV, ya que el primero interaccionó con un aminoácido del sitio

catalítico y el segundo interaccionó con el sitio catalítico y otras regiones de la DPP-IV, péptidos en los que nuevamente se destaca la presencia de leucina y valina.

5.9. Citotoxicidad de hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, DPP-IV.

Los resultados de la actividad citotóxica evaluada para los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas con más alta actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV, se observan en la Figura 14.

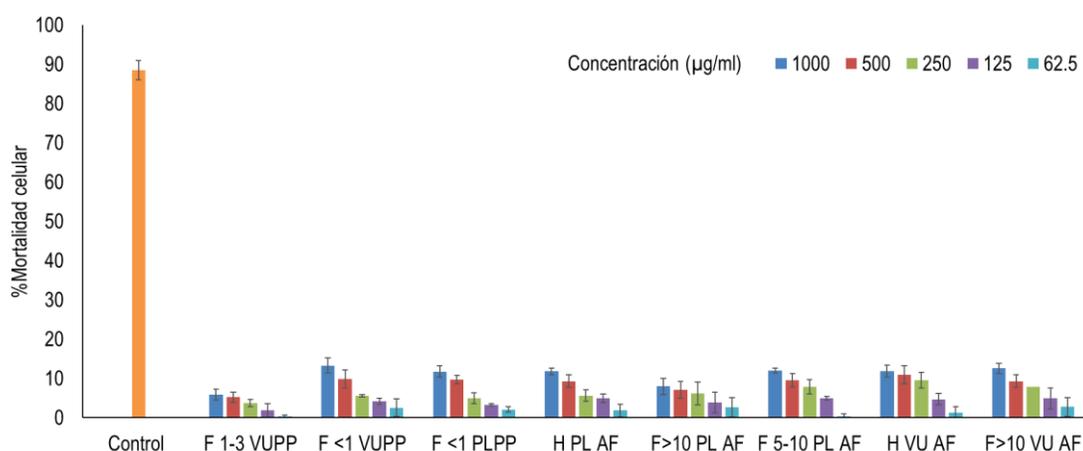


Figura 14. Actividad citotóxica (% mortalidad celular) sobre células vero de los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con más alta actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV. Control: Docetaxel (Taxotere®) (0.78 μ g/ml). VU: *V. unguiculata*, PL: *P. lunatus*, H: Hidrolizado, F: Fracción peptídica (kDa), PP: Pepsina-Pancreatina, A-F: Alcalasa-Flavourzima.

En la Figura 14, se observa que ningunas de estas muestras, tuvieron efecto citotóxico (expresada en % de mortalidad celular) suficiente para ocasionar la muerte del 50% de las células de prueba, a una concentración máxima 1000 μ g sólido /ml (equivalente a un contenido de proteína de 0.45 a 0.9 mg proteína/ml, según el hidrolizado o la fracción ultrafiltrada, de acuerdo a la Tabla 13). Por ello no se estableció una CC_{50} .

Estos resultados concuerdan con Cu-Cañetas (2017) quien reportó ausencia de citotoxicidad en fracciones peptídicas obtenidas a partir de *V. unguiculata* probadas en células Vero. Así como con lo publicado por Mora-Escobedo, Robles-Ramírez, Ramón-Gallegos y Reza-Alemán (2009) sobre hidrolizados de proteína de soya

geminada, los cuales mostraron citotoxicidad mínima en células normales humanas (keratinocitos) en comparación con la citotoxicidad exhibida en células cancerosas HeLa y C-33 (de carcinoma cervical). También concuerdan con lo publicado por Girón-Calle, Alaiz y Vioque (2010) para hidrolizados de proteína de garbanzo, en donde se observó que estos componentes redujeron la proliferación celular sólo de células cancerosas Caco-2.

Autores que han trabajado con péptidos bioactivos obtenidos de diferentes fuentes de proteína como frijol común, trigo y otras gramíneas han observado citotoxicidad de estos compuestos sólo hacia células tumorales (Giovannini et al., 1996; Fitzgerald et al., 2001; Ngai y Ng, 2004; Wong y Ng, 2005). Al respecto Ali et al. (2015) evaluaron la citotoxicidad de algunos fermentados de soya y frijol mungo, con formación de componentes bioactivos con capacidad antioxidante e inmunomoduladora, en los que se observó que sólo presentaron actividad citotóxica sobre células cancerosas, pero no en células normales. Wu et al. (2014), Qian et al. (2007) y Ryder et al. (2016) reportaron que péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y capacidad antioxidante provenientes de proteína caseína bovina y de algunos hidrolizados de proteína de carne, que al ser probados en células Vero o células endoteliales umbilicales humanas no produjeron efecto citotóxico.

6. CONCLUSIONES.

Se obtuvieron grados de hidrólisis extensivos en todos los hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. y se obtuvo un grado de hidrólisis más alto empleando el sistema enzimático secuencial alcalasa-flavourzima para ambas leguminosas.

La mayor actividad inhibitoria sobre la enzima α -amilasa, la presentó la F>10 kDa de *V. unguiculata* A-F, en comparación con el total de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* obtenidos con P-P y A-F, presentando una IC₅₀ de 31.58 mg proteína/ml.

La mayor actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa, la tuvo la F>10 kDa de *V. unguiculata* A-F, en comparación con el total de los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* obtenidos con P-P y A-F, presentando una IC₅₀ de 0.633 mg proteína/ml.

La mayor actividad inhibitoria sobre la enzima DPP-IV, la tuvo la F5-10 kDa de *P. lunatus* A-F, en comparación con los hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas probados con dicha enzima, teniendo una IC₅₀ de 1.93 mg proteína/ml.

Los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV no presentaron citotoxicidad *in vitro* en células vero.

En fracción peptídica ultrafiltrada con mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa y α -glucosidasa (F>10 kDa *V. unguiculata* A-F) predominó el contenido de ácido aspártico, glutámico, leucina y valina. Así como de prolina, leucina, valina y lisina en la fracción peptídica con mayor actividad inhibitoria sobre la DPP-IV (F5-10 kDa *P. lunatus* A-F).

De todos los hidrolizados proteínicos y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas, obtenidas a partir de *Phaseolus lunatus* L. y *Vigna unguiculata* L. con P-P y A-F, la F>10 kDa de *V. unguiculata* A-F y la F 5-10 kDa de *P. lunatus* A-F mostraron el más alto potencial antidiabético *in vitro* y no mostraron citotoxicidad *in vitro*.

7. REFERENCIAS.

- Acevedo, J. J., Chimal, J. S., Rivera, H. M., López, V. I., Quintana, N.Y, Magaña, D. Y., & Santana-Olalla, J. (2013). *Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos*. En Segura, M., Chel, L. & Betancur D. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 29-82). Barcelona: OnmniaSciencie
- Adams, J. B., & Langley, F. M. (1998). Nitrophenyl glucoside hydrolysis as a potential time-temperature integrator reaction. *Food chemistry*, 62(1), 65-68.
- Adeparusi, E. O. (2001). Effect of processing on the nutrients and anti-nutrients of lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) flour. *Food/Nahrung*, 45(2), 94-96.
- Adhikari, S., Manthena, P. V., Sajwan, K., Kota, K. K., & Roy, R. (2010). A unified method for purification of basic proteins. *Analytical Biochemistry*, 400(2), 203-206.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., ... & Prasad, G. S. (2004). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Science*, 13(2), 412-421.
- Ahrén, B., Schweizer, A., Dejager, S., Villhauer, E. B., Dunning, B. E., & Foley, J. E. (2011). Mechanisms of action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in humans. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(9), 775-783.
- Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by highperformance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1), 181-186.
- Ali, N. M., Yeap, S. K., Yusof, H. M., Beh, B. K., Ho, W. Y., Koh, S. P., ... & Long, K. (2016). Comparison of free amino acids, antioxidants, soluble phenolic acids, cytotoxicity and immunomodulation of fermented mung bean and soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1648-1658.
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33 (1), S62-S69.
- Badui, D. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson educación.
- Barragán, P. L. A. (1999). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. México: Universidad Autónoma de México.

- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: Processes and applications. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* L. seeds: Partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201.
- Betancur-Ancona, D., López-Luna, J., & Chel-Guerrero, L. (2003). Comparison of the chemical composition and functional properties of *Phaseolus lunatus* prime and tailing starches. *Food Chemistry*, 82(2), 217-225.
- Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* L. seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 128–137.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499-503.
- Bolaños, N., Lutz, G., & Herrera, C. H. (2003). *Química de Alimentos: Manual de laboratorio*. Universidad de Costa Rica.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118(3), 559-565.
- Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2016). Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus—Screening for Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibition. *Phytotherapy Research*, 30(2), 260-266.
- Cu-Cañetas (2017). Actividad antihipertensiva de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática proteínica de *Vigna unguiculata*. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.
- Camargo Filho, I., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2008). Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. *Phytomedicine*, 15(3), 202-208.

- Chan, C., & Phillips, R. D. (1994). Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1857-1860.
- Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Dávila-Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from phaseolus lunatus and canavalia ensiformis seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.
- Chel-Guerrero, L., Scilingo, A. A., Gallegos Tintoré, S., Dávila, G., & Añón, M. C. (2007). Physicochemical and structural characterization of lima bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1537-1544.
- Chiang, Y. C., Chen, C. L., Jeng, T. L., & Sung, J. M. (2014). *In vitro* inhibitory effects of cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts on aldose reductase, α -glucosidase and α -amylase. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(6), 1470-1479.
- 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.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 1-12.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2010). Malezas de México. Obtenido Agosto 17, 2015, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-lunatus/fichas/ficha.htm>
- Dantas, R. T., Jorge, A. R. C., Jorge, R. J. B., Lima, D. B., Torres, A. F. C., Toyama, M. H., ... & Martins, A. M. C. (2015). L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. *Toxicol*, 104, 52-56.
- De La Vega, A., & Sotelo, A. (1986). The nutritional quality and toxin content of wild and cultivated lima beans (*Phaseolus lunatus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 36(1), 75-83.
- De Vries, J. (1996). *Food safety and toxicity*. Holanda: CRC press.

- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M. C. C., Jordan, P., & Silva, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*, 53(5), 487-495.
- Dineshkumar, B., Mitra, A., & Manjunatha, M. (2010). Studies on the anti-diabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (Xanthone Glucoside) in streptozotocin-induced Type 1 and Type 2 diabetic model rats. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(1),75-85.
- Duranti, M., & Gius, C. (1997). Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53(1-3), 31-45.
- Dzul-Tejero, F., Coello-Coello, J., & Martínez-Castillo, J. (2014). Wild to crop introgression and genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in traditional Mayan milpas from Mexico. *Conservation Genetics*, 15, 1315–1328.
- Ehlers, J.D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53, 187-204.
- Escudero, E., Aristoya, M.C., Nishimurab, H., Ariharab, K., & Toldrá, F. (2012). Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cure ham. *Meat Science*, 91 (3), 306-311.
- Evans, I. M., & Boulter, D. (1974). Chemical methods suitable for screening for protein content and quality in cowpea (*Vigna unguiculata*) meals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(3), 311-322.
- Feduchi, E., Romero C., Yáñez, E., Blasco, I., & García-Hoz, C., (2011). *Bioquímica conceptos esenciales*. España: Panamericana
- Feinman, R., Pogozelski, W., Astrup, A., Bernstein, R., Fine, E., Westman, E., ... & Worm, N. (2015). Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: Critical review and evidence base. *Nutrition*, 31(1), 1-13.
- Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D., & Reeck, G. R. (1996). α -Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect biochemistry and molecular Biology*, 26(5), 419-426.

- Ferreira S. B., Sodero, A. C. R., Cardoso, M. F. C., Lima, E. S., Kaiser, C. R., Silva, F. P. & Ferreira, V. F. (2010). Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-Triazole derivatives of carbohydrates as α -Glucosidases inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53: 2364-2375.
- Fitzgerald, A. J., Jordinson, M., Rhodes, J. M., Singh, R., Calam, J., & Goodlad, R. A. (2001). Comparison of the effects of concanavalin-A and epidermal growth factor on epithelial cell proliferation in the rat intestine. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 15(7), 1077-1084.
- Freire, P. F., Labrador, V., Martín, J. P., & Hazen, M. J. (2005). Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*, 210(1), 37-44.
- Freitas, R. L., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* L. seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1682-1687.
- Gallego, M., Aristoy, M., & Toldra, F. (2014). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 96(2), 757-761.
- Giovannini, C., Mancini, E., & De Vincenzi, M. (1996). Inhibition of the cellular metabolism of caco-2 cells by prolamin peptides from cereals toxic for coeliacs. *Toxicology in Vitro*, 10(5), 533-538.
- Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Vioque, J. (2010). Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food research international*, 43(5), 1365-1370.
- González-Aguilar, G. A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B., Álvarez-Parilla, E. A. & García, H. S. (2014). *Los alimentos funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos*. México: AGT Editores, S.A. de C.V.
- Guo, L., Jiang, T., Lv, Z., & Wang, Y. (2010). Screening α -glucosidase inhibitors from traditional chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1250-1253.
- Gutiérrez, P. H & de la Vara, S. R. (2003). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw Hill

- Hartmann, R., Wal, J.M., Bernard, H., & Pentzien, A.K. (2007). Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 897-920.
- Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., ... & Mukaihara, T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 134(2), 797-802.
- Horax, R., Hettiarachchy, N. S., Chen, P., & Jalaluddin, M. (2004). Preparation and characterization of protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.). *Journal of Food Science*, 69(2), FCT114-FCT118.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M.D., & Rawn, J.D. (2008). *Principios de Bioquímica*. México: Pearson
- Huang, S., Jao, C., Ho, K., & Hsu, K. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, 35(1), 114-121.
- Integrated Relational Enzyme database (IntEnz)*. (2016). Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). <http://www.ebi.ac.uk/intenz/index.jsp>
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., & Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331-335.
- Issaq, H. J., Conrads, T. P., Janini, G. M., & Veenstra, T. D. (2002). Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis*, 23(17), 30483061.
- Iwaniak, A., & Minikiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptide. *Acta Scientiarum. Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 5-15.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R., & Svensson, B. (1991). Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochemical Journal*, 280(1), 51-55.
- Kakavanos, R., Hopwood, J. J., Lang, D., Meikle, P. J., & Brooks, D. A. (2006). Stabilising normal and mis-sense variant α -glucosidase. *FEBS Letters*, 580(18), 4365-4370.
- Kalra, S. (2014). Alpha glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 64(4), 474-476.

- Kang, M. G., Yi, S. H., & Lee, J. S. (2013). Production and characterization of a new α -glucosidase inhibitory peptide from *Aspergillus oryzae* N159-1. *Mycobiology*, 41(3), 149-154.
- Kigel, J. (1995). *Seed development and germination*. Israel: CRC press.
- Kim, K. Y., Kim, S. M., Nam, K. A., & Kurihara, H. (2008). Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69(16), 2820-2825.
- Kim, W., & Egan, J. M. (2008). The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacological Reviews*, 60(4), 470-512.
- Kim, Y. B., Kopcho, L. M., Kirby, M. S., Hamann, L. G., Weigelt, C. A., Metzler, W. J., ... & Marcinkeviciene, J. (2006). Mechanism of glyproprNA cleavage catalyzed by dipeptidyl peptidase IV and its inhibition by saxagliptin (BMS 477118). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(1), 918.
- Kim, Y., Wang, M., & Rhee, H. (2004). A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research*, 339(3), 715-717.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1297-1308.
- Krasikov, V. V., Karellov, D. V., & Firsov, L. M. (2001). α -Glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*, 66(3), 267-281.
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C.Y. (2013). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and α -Glucosidase Activities by Pepsin-Treated Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7500–7506.
- Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2002). Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6592-6598.
- Lan, V. T. T., Ito, K., Ohno, M., Motoyama, T., Ito, S., & Kawarasaki, Y. (2015). Analyzing a dipeptide library to identify human dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Food Chemistry*, 175, 6673.
- Lee, H. J., Lee, H., Choi, J. W., Ra, K. S., Kim, J., & Suh, H. J. (2011). Novel tripeptides with α -glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon

- hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11522-11525.
- LeRoith, D. (2012). *Prevention of type 2 diabetes*. USA: Springer
- Liao, T. T., Shi, Y. L., Jia, J. W., Jia, R. W., & Wang, L. (2010). Sensitivity of morphological change of Vero cells exposed to lipophilic compounds and its mechanism. *Journal of hazardous materials*, 179(1), 1055-1064.
- Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S., Jao, C., Ho, K., & Hsu, K. (2012). Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.
- LinAmy, A. H., Nichols, B. L., Quezada-Calvillo, R., Avery, S. E., Sim, L., Rose, D. R., ... & Hamaker, B. R. (2012). Unexpected high digestion rate of cooked starch by the ct-maltase-glucoamylase small intestine mucosal α -glucosidase subunit. *Plos One*, 7(5), e35473.
- Lorey, S., StöckelMaschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M. D., ... & Neubert, K. (2003). Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the Nterminus of HIV1 tat indicate at least two inhibitor binding sites. *European Journal of Biochemistry*. 270(10), 2147-2156.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Machius, M., Vértesy, L., Huber, R., & Wiegand, G. (1996). Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic α -amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *Journal of molecular biology*, 260(3), 409-421.
- Mahmood, N. (2014). A review of α amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comparative Clinical Pathology*, 25(6), 12531264.
- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., & Osajima, Y. (1996). In vitro survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(12), 2019-2022.
- Mazur, A. K., & Nakatani, H. (1993). Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic α amylase hydrolysis of amylose and amylopectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306(1), 2938.

- McCarter, J. D., & Withers, S. G. (1996). Unequivocal identification of asp214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6889-6894.
- Megías, C., Del Mar Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., ... & Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1928-1932.
- Meisel, H. (2001). Bioactive peptides derived from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(2), 83-91.
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: Automated ninestep purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mojica, L., Chen, K., & Mejía, E. G. (2015). Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after Pepsin–Pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl Peptidase-IV. *Journal of Food Science*, 80(1), H188-H198.
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. México: Limusa Wiley.
- Mora-Escobedo, R., Robles-Ramírez, M. D. C., Ramón-Gallegos, E., & Reza-Alemán, R. (2009). Effect of protein hydrolysates from germinated soybean on cancerous cells of the human cervix: an in vitro study. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 64(4), 271-278.
- Morel, G. (2000). *Hibridación in situ en microscopía óptica*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Müller-Esterl, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. España: Reverté.
- Mustafa, M. S., El-Abadelah, M. M., Mubarak, M. S., Chibueze, I., Shao, D., & Agu, R. U. (2011). Synthesis and Fluorogenic Properties of Some 1-

(Coumarin-7-yl)-4, 5-dihydro-1, 2, 4-triazin-6 (1H)-ones. *International Journal of Chemistry*, 3(4), 89.

- Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (1999). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food chemistry*, 67(4), 435-443.
- Ngai, P. H. K., & Ng, T. B. (2004). Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides*, 25(12), 2063-2068.
- Ngoh, Y. Y., & Gan, C. Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food chemistry*, 190, 331-337.
- Ngoh, Y. Y., Lim, T. S., & Gan, C. Y. (2017). Screening and identification of five peptides from pinto bean with inhibitory activities against α -amylase using phage display technique. *Enzyme and microbial technology*, 89, 76-84.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646.
- Nongonierma, A. B., & Fitzgerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, 39(1), 157-163.
- Obiro, W. C., Zhang, T., & Jiang, B. (2008). The nutraceutical role of the phaseolus vulgaris [alpha]-amylase inhibitor. *The British Journal of Nutrition*, 100(1), 1-12.
- Official Methods of Analysis of AOAC International* (2005). USA: AOAC International
- Olivera-Castillo, L., Pereira-Pacheco, F., Polanco-Lugo, E., Olvera-Novoa, M., Rivas-Burgos, J., & Grant, G. (2007). Composition and bioactive factor content of cowpea (*vigna unguiculata* L. walp) raw meal and protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(1), 112-119.
- Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., ... & Hanada, K. (2014). The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA research*, 21(6), 673-683.

- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejía, E., & Amaya-Llano, S. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, 76, 839-851.
- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejía, E. G., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., & Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides. Mechanisms of action on diabetes management. *Nutrafoods*, 13(4), 147-157.
- Oshodi, A. A., & Adeladun, M. O. A. (1993). Proximate composition, some nutritionally valuable minerals and functional properties of three varieties of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43 (2), 181-186.
- Otani, H., & Suzuki, H. (2003). Isolation and characterization of cytotoxic small peptides, α -caseidins, from bovine α s1-casein digested with bovine trypsin. *Animal Science Journal*, 74(5), 427-435.
- Pacheco, L. D. (2015). *Bioquímica médica*. México: Limusa.
- Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2003). Plant protein hydrolysates and tailor-made foods. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(1), 233-235.
- Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 960-965.
- Peyrano, F., Speroni, F., & Avanza, M. V. (2016). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 38-46.
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of *Phaseolus lunatus* L. protein isolate. *Food Science and Technology*, 34(3), 441-448.
- Potier, M., & Tomé, D. (2008). Comparison of digestibility and quality of intact proteins with their respective hydrolysates. *Journal of AOAC International*, 91(4), 1002-1005.

- Power, O., Nongonierma, A., Jakeman, P., & FitzGerald, R. (2014). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(1), 34-46.
- Prinyawiwatkul, W., McWatters, K. H., Beuchat, L. R., & Phillips, R. D. (1996). Cowpea flour: A potential ingredient in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(5), 413-436.
- Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., & Payan, F. (1994). The Active Center of a Mammalian. alpha-Amylase. Structure of the Complex of a Pancreatic. alpha-Amylase with a Carbohydrate Inhibitor Refined to 2.2 Å Resolution. *Biochemistry*, 33 (20), 6284-6294.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., Lee, S. H., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2007). Antihypertensive effect of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) muscle protein in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochemistry*, 42(10), 1443-1448.
- Ramírez Ortíz, M. E. (2015). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. OmniaScience.
- Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Y., Wu, H., & Lai, F. (2016). Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26, 439-450.
- Rocha, T., Hernandez, L., Chang, Y., & de Mejía, E. (2014). Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata* L.) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. *Food Research International*, 64, 799-809.
- Rodríguez, G. M. (2012). *Extracción y purificación del inhibidor de α -amilasa de diferentes variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto in vivo*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. Querétaro.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2010). Wet fractionation of hard to cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1531-1540.

- Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013). Angiotensin I- converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37(1), 2635.
- Ryder, K., Bekhit, A. E. D., McConnell, M., & Carne, A. (2016). Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food chemistry*, 208, 42-50.
- Sandoval, P. V. (2015). *Microencapsulación de hidrolizados proteicos de Phaseolus lunatus l. con gomas de flamboyán (Delonix regia bojer raf.) y chía (Salvia hispanica L.)*. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membranebased techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1), 122.
- Schutyser, M. A. I., Pelgrom, P. J. M., Goot, v. d., A.J., & Boom, R. M. (2015). Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 327335.
- Segura, M. R., Chel, L. A., & Betancur, D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata L.* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2512.
- Segura-Campos, M., Ruiz-Ruiz, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013). Antioxidant activity of vigna unguiculata L. walp and hardtocook *Phaseolus vulgaris L.* protein hydrolysates. *Journal of Food*, 11(3), 208.
- Sheard, N. F., Clark, N. G., Brand-Miller, J. C., Franz, M. J., Pi-Sunyer, F. X., Mayer-Davis, E., ... & Geil, P. (2004). Dietary carbohydrate (amount and type) in the prevention and management of diabetes: A statement by the american diabetes association. *Diabetes Care*, 27(9), 2266-2271.
- Singh, U., Mitic, L. L., Wieckowski, E. U., Anderson, J. M., & McClane, B. A. (2001). Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of clostridium perfringens enterotoxin on polarized

- CaCo2 cells versus vero cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33402-33412.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Sotelo, A., Arteaga, M. E., Frías, M. I., & González-Garza, M. T. (1980). Cytotoxic effect of two legumes in epithelial cells of the small intestine. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 30(2), 79-85.
- Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratape, V. M., & Singh, V. (2012). Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, 131(2), 462-468.
- Srivastava, A. N., Ahmad, R., & Khan, M. A. (2015). Evaluation and comparison of the in vitro cytotoxic activity of *Withania somnifera* methanolic and ethanolic extracts against MDA-MB-231 and vero cell lines. *Scientia pharmaceutica*, 84(1), 41-60.
- Sttoddar, M. (2011). *Mammalian cell viability, methods and protocols*. USA: Humana Press.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 186-195.
- Torruco, J.G. (2009). *Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (Phaseolus lunatus L.) y frijol Jamapa (Phaseolus vulgaris L.)*. (Tesis de Doctorado). Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from phaseolus lunatus and phaseolus vulgaris seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1597-1604.
- Valle, V. P. & Lucas, F. B. (2000). *Toxicología de alimentos*. México: Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental.
- Van de Laar, F.A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6) 1189–1195.

- Vasudevan, D. M., & Sreekumari, S. (2012). *Texto de Bioquímica para Estudiantes de Medicina*. México: Cuéllar Ayala.
- Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G. M., Díaz-Gois, A., González De Mejia, E., & Barba De La Rosa, Ana P. (2013). *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, 136(2), 758-764.
- Vernaza, M. G., Dia, V. P., de Mejia, E. G., & Chang, Y. K. (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food chemistry*, 134(4), 2217-2225
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3), 1112-1116.
- Villalpando, S., de la Cruz, V., Rojas, R., Shamah-Levy, T., Avila, M., Gaona, B., ... & Hernandez, L. (2010). Prevalence and distribution of type 2 Diabetes Mellitus in mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud Pública De Mexico*, 52(1), S19-S26.
- Villanueva, A., Clemente, A., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas y aceites*, 50(6), 472-476.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Del Mar Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 132-136.
- Vioque, J., Sánchez Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. D. M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51(5), 361-365.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millan, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 819-823.
- Wang, W. & de Mejia, G. E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4(4), 63-78.

- Wong, J. H., & Ng, T. B. (2005). Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(8), 1626-1632.
- Wu, W., Yu, P. P., Zhang, F. Y., Che, H. X., & Jiang, Z. M. (2014). Stability and cytotoxicity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein. *Journal of Zhejiang University Science B*, 15(2), 143-152.
- Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., & Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS journal*, 277(20), 4205-4214.
- Yao, X., Mauldin, R., & Byers, L. (2003). Multiple sugar binding sites in α -glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1645(1), 22-29.
- Yoon, S. H., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2003). Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydrate research*, 338(10), 1127-1132.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., & Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against [alpha]-glucosidase and [alpha]-amylase. *Food Chemistry*, 135(3), 2078-2085.
- Yust, M. M., Pedroche, J., GirónCalle, J., Vioque, J., Millán, F., & Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by highperformance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 85(2), 317-320.
- Zhang, Y., Wang, N., Wang, W., Wang, J., Zhu, Z., & Li, X. (2016). Molecular mechanisms of novel peptides from silkworm pupae that inhibit α -glucosidase. *Peptides*, 76, 45-50.

8. ANEXO.

Abreviaturas		Descripción
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
S	Ser	Serina
H	His	Histidina
G	Gli	Glicina
T	Tre	Treonina
R	Arg	Arginina
A	Ala	Alanina
P	Pro	Prolina
Y	Tir	Tirosina
V	Val	Valina
M	Met	Metionina
C	Cis	Cisteína
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
F	Fen	Fenilalanina
K	Lis	Lisina
W	Trp	Triptófano
Q	Gln	Glutamina
N	Asn	Asparagina
B	Asx (Asp+Asn)	Ácido aspártico + asparagina
Z	Glx (Glu+Gln)	Ácido glutámico + glutamina
DPP-IV		Dipeptidil petidasa IV
A-F		Alcalasa-Flavourzima
P-P		Pesina-Pancreatina
GH		Grado de hidrólisis
IC ₅₀		Concentración que inhibe el 50% de actividad enzimática
CC ₅₀		Concentración de citotoxicidad que mata el 50% de células

Fundamentos de las técnicas de inhibición enzimática

Inhibición de la enzima α -amilasa

El fundamento de la metodología para el ensayo de inhibición de la enzima α -amilasa, está basado en la reacción de reducción del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al ácido 3-amino-5-nitro-salicílico, por los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis del almidón por la enzima α -amilasa en presencia o ausencia de inhibidor, en dicho proceso el grupo aldehído de azúcares reductores son oxidados al ácido carboxílico respectivo (Figura 14). La reducción del reactivo DNS se lleva a cabo en condiciones alcalinas, de calentamiento y presencia de tartrato de sodio-potasio que estabiliza la coloración resultante roja parda (Miller, 1959), la cual está en función de la cantidad de azúcares reductores presentes y que se puede leer por espectrofotometría de luz visible a una longitud de onda con absorbancia máxima a 540 nm.

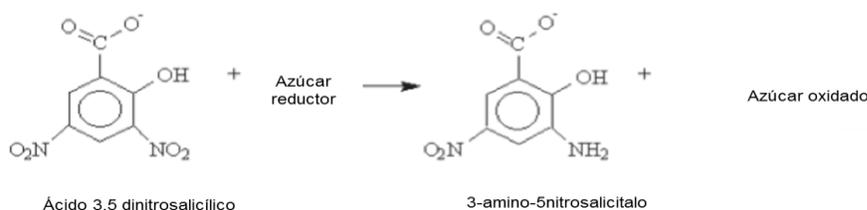


Figura 15. Reacción del ácido dinitrosalisílico con azúcares reductores.

Inhibición de la enzima α -glucosidasa

La metodología para el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa, está basado en la hidrólisis del sustrato sintético p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG) en el enlace α -1,6-glicosídico por acción de la α -glucosidasa en presencia o ausencia de inhibidor, que libera residuos de p-nitrofenol (como ion p-nitrofenolato) y α -D-glucosa, Figura 15 (Guo, Jiang, Lv y Wang, 2010). La resonancia del ion p-nitrofenolato se estabiliza en condiciones alcalinas (Adams y Langley, 1998) por lo que la coloración amarilla clara que se genera puede determinarse por espectrofotometría de luz visible a una longitud de onda de máxima absorbancia de 405 nm.

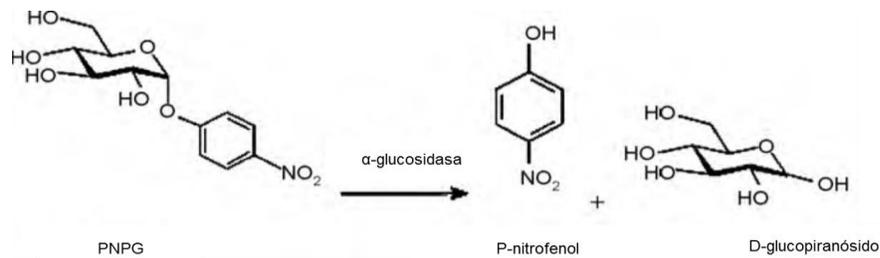


Figura 16. Reacción catalizada por la α -glucosidasa (Guo et al., 2010).

Inhibición de la enzima DPP-IV

La metodología para el ensayo de inhibición de la enzima DPP-IV, está basada en la escisión del sustrato fluoróforo sintético Gly-Pro-MCA (Glicil-prolina-4-metil-coumaril-7-amida) catalizada por la enzima DPP-IV, que libera el residuo MCA el cual tiene fluorescencia que puede monitorearse a longitudes de emisión y excitación $\lambda_{ex} = 360/\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ (Lan et al., 2015; Mustafa et al., 2011). La catálisis llevada a cabo por la DPP-IV involucra la formación del complejo enzima-sustrato, la formación de un intermediario covalente enzima-acil y la subsecuente hidrólisis del complejo, generalmente involucra dos fases (Kim et al., 2006) donde se libera el residuo MCA (Figura 16).



Figura 17. Reacción catalizada por la DPP-IV sobre el sustrato Gly-Pro-MCA.

Ensayo de citotoxicidad

El efecto citotóxico en la línea celular elegida fue evaluado de acuerdo al método descrito por Skehan et al. (1990). El fundamento de esta técnica se basa en el empleo de sulforrodamina (SRB) que es un colorante aminoxantano rosa brillante con dos grupos sulfónicos, que tiene una histoquímica similar a la de los colorantes relacionados, como el azul brillante de Coomassie, el azul de bromofenol y el amarillo de naftol S, que bajo condiciones ligeramente ácidas, el SRB se une a residuos de aminoácidos básicos de proteínas en células fijadas con ácido tricloroacético TCA para proporcionar un índice sensible del contenido de proteína celular. Debido a que el enlazamiento del SRB es estequiométrico a la cantidad de colorante extraído de las células teñidas, es directamente proporcional a la masa celular. Este método ha sido empleado para probar la toxicidad en líneas celulares cancerosas y no cancerosas (Vichai y Kirtikara, 2006).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de clases de medicamentos para DMT2.....	17
Tabla 2. Composición proximal de <i>Phaseolus lunatus</i> L. (Chel et. al., 2007) y <i>Vigna unguiculata</i> L. (Prinyawiwatkul et al., 1996).	21
Tabla 3. Ejemplos de proteasas comercialmente disponibles (Benítez et al., 2008; Bolaños, Lutz y Herrera, 2003; Merz, 2015; Morel, 2000; Ramírez Ortiz, 2015; Vasudevan y Sreekumari, 2012).	25
Tabla 4. Ejemplos de hidrolizados, fracciones peptídicas y péptidos bioactivos con potencial antidiabético (Mojica et al. 2015; Oseguera-Toledo et al., 2014; Oseguera-Toledo et al., 2015; Velarde-Salcedo et al., 2013).....	32
Tabla 5. Curva patrón de L- Serina.	59
Tabla 6. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de α -amilasa.62	62
Tabla 7. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de α -glucosidasa.....	64
Tabla 8. Proporción de reactivos utilizados para el ensayo de inhibición de DPP-IV.....	66
Tabla 9. Gradiente de elución para determinación de aminoácidos por HPLC.....	68
Tabla 10. Curva de calibración de los estándares de aminoácidos.	68
Tabla 11. Composición proximal de las harinas de los granos de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L. (% b.s, excepto humedad).....	73
Tabla 12. Composición proximal del aislado proteínico de <i>Phaseolus lunatus</i> L. y <i>Vigna unguiculata</i> L. (% b.s, excepto humedad).....	74
Tabla 13. Contenido de proteína (mg proteína/ml) de hidrolizados y fracciones peptídicas ultrafiltradas de <i>P. lunatus</i> y <i>V. unguiculata</i> obtenidos con los sistemas enzimáticos secuenciales pepsina-pancreatina (P-P) y alcalasa-flavourzima (A-F).	77
Tabla 14. IC ₅₀ de hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -amilasa.	82
Tabla 15. IC ₅₀ de hidrolizados o fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa.....	88
Tabla 16. Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, α -amilasa y DPP-IV.	96
Tabla 17. Distribución de perfil de aminoácidos (%) de los hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa, α -amilasa y DPP-IV.	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acción de la α -amilasa sobre la digestión del almidón (Feduchi et al., 2011).37	37
Figura 2. Enzimas y productos implicados en la digestión de carbohidratos (Feduchi et al., 2011).....	40

Figura 3. a) Secreción de las incretinas (GLP-1 y GIP) en el intestino, durante la ingesta de alimentos, y su acción de promoción de secreción de insulina en el páncreas (Células rojas β) para la regulación de glucosa en sangre (Kim y Egan, 2008). b) Inhibición de las incretinas por la enzima DPP-IV (Power et al., 2014).....	43
Figura 4. Modo de acción de los inhibidores de la DPP-IV (Ahrén et al., 2011).	44
Figura 5. Desarrollo experimental del trabajo de investigación.	54
Figura 6. Diagrama de bloques para la obtención del aislado proteínico.	56
Figura 7. Diagrama de bloques para las hidrólisis enzimáticas secuenciales.....	58
Figura 8. Diagrama de bloques del proceso de obtención de las fracciones peptídicas ultrafiltradas a partir de los hidrolizados proteínicos.	60
Figura 9. Diagrama de para el ensayo de citotoxicidad.....	70
Figura 10. GH (%) de los hidrolizados proteínicos de <i>P. lunatus</i> y <i>V. unguiculata</i> con los sistemas P-P y A-F. ^{a, b} Letras diferentes significa que existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	75
Figura 11. Actividad inhibitoria sobre la α -amilasa (Inhibición α -amilasa, %) del hidrolizado proteínico (H) y sus fracciones ultrafiltradas ($F > 10$, $F5-10$, $F3-5$, $F1-3$, $F < 1$ kDa) obtenidos con dos sistemas de enzimas secuenciales: A) <i>P. lunatus</i> P-P (100 mg /ml), B) <i>P. lunatus</i> A-F (75 mg /ml), C) <i>V. unguiculata</i> P-P (100 mg /ml), D) <i>V. unguiculata</i> A-F (50 mg /ml). Concentración de ensayo: mg de proteína/ml. Control: Acarbosa (1 mM). Letras distintas en una misma gráfica significan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	79
Figura 12. Actividad inhibitoria sobre la α -glucosidasa (inhibición α -glucosidasa %) del hidrolizado (H) proteínico y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas ($F > 10$, $F5-10$, $F3-5$, $F1-3$ y $F < 1$ kDa), obtenidos con diferentes sistemas de enzimas secuenciales: A) <i>P. lunatus</i> P-P (200 mg/ml), B) <i>P. lunatus</i> A-F (200 mg/ml), C) <i>V. unguiculata</i> P-P (200 mg/ml), D) <i>V. unguiculata</i> A-F (10 mg /ml). Concentración de ensayo: mg proteína/ml. Control es acarbosa (50 mM). Letras distintas en una misma gráfica significan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	84
Figura 13. Actividad inhibitoria sobre la DPP-IV (Inhibición relativa DPP-IV %) del hidrolizado (H) proteínico y sus fracciones peptídicas ultrafiltradas ($F > 10$, $F5-10$, $F3-5$, $F1-3$ y $F < 1$ kDa) obtenidos con diferentes sistemas de enzimas secuenciales A) <i>P. lunatus</i> P-P, B) <i>P. lunatus</i> A-F, C) <i>V. unguiculata</i> P-P, D) <i>V. unguiculata</i> A-F. Concentración de ensayo: 10 mg proteína/ml. Control: Sitagliptina. Letras distintas en una misma gráfica, significa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	90
Figura 14. Actividad citotóxica (% mortalidad celular) sobre células vero de los hidrolizados o fracciones peptídicas ultrafiltradas con más alta actividad inhibitoria sobre las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y DPP-IV. Control: Docetaxel (Taxotere®) (0.78 μ g/ml). VU: <i>V. unguiculata</i> , PL: <i>P. lunatus</i> , H: Hidrolizado, F: Fracción peptídica (kDa), PP: Pepsina-Pancreatina, A-F: Alcalasa-Flavourzima.	100
Figura 15. Reacción del ácido dinitrosalisílico con azúcares reductores.....	122
Figura 16. Reacción catalizada por la α -glucosidasa (Guo et al., 2010).	123
Figura 17. Reacción catalizada por la DPP-IV sobre el sustrato Gly-Pro-MCA.	123

