



S.E.P. TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

TESIS

OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS A
PARTIR DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL
Phaseolus dumosus CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

PRESENTA:

IBQ. MARIANA GUERRERO MARTÍNEZ

DIRECTOR:

DR. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO

CO-DIRECTORA INTERNA:

DRA. BETSABÉ HERNÁNDEZ SANTOS

CO-DIRECTORA EXTERNA:

DRA. MARÍA DE LA LUZ SÁNCHEZ MUNDO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.

Septiembre 2023.

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

Subdirección Académica
División de Estudios Profesionales

Autorización de Presentación Electrónica de Tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., 26/septiembre/2023

Oficio No. DEP/CT-3910

**C. MARIANA GUERRERO MARTINEZ
EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
CON NÚMERO DE CONTROL M15350590
P R E S E N T E**

POR MEDIO DE LA PRESENTE ME PERMITO CÓMUNICARLE QUE EL COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR LOS CC. JUAN GABRIEL TORRUCO UCO, BETSABÉ HÉRNANDEZ SANTOS, MARÍA DE LA LUZ SÁNCHEZ MUNDO, JESUS RODRÍGUEZ MIRANDA Y IVET GALLEGOS MARÍN, REVISÓ Y APROBÓ EN SU TOTALIDAD EL TRABAJO PROFESIONAL DENOMINADO "OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS A PARTIR DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL PHASEOLUS DUMOSUS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA" PRESENTADO POR USTED COMO PRODUCTO DE TESIS DE ACUERDO AL LINEAMIENTO DE TITULACIÓN CORRESPONDIENTE, PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS.

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

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®



JULIÁN KURI MAR
SUBDIRECTOR ACADÉMICO
ccp. Depto. Servicios Escolares
Archivo
MMHC/emh*



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC

**SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA**



Calzada Dr. Víctor Bravo Ahuja Num. 561, Col. Predio el Paraíso, C.P. 68350, San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. Tel. 2878751044 e-mail: difusion@tuxtepec.tecnm.mx | tecnm.mx | tuxtepec.tecnm.mx



2023
**Francisco
VILLA**

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

“Obtención de hidrolizados proteínicos a partir de las fracciones proteicas del *Phaseolus dumosus* con actividad antihipertensiva”

Por:

Mariana Guerrero Martínez

Tesis propuesta al

Instituto Tecnológico de Tuxtepec

Como requerimiento para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Alimentos

Septiembre 2023

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tuxtepec el día 30 de septiembre del 2023, el que escribe, C. Mariana Guerrero Martínez, estudiante del programa de posgrado Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control: M15350590, inscrito al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec, manifiesto que soy autor intelectual de la presente investigación de Tesis bajo la dirección del **Dr. Juan Gabriel Torruco Uco**, cedo los derechos del trabajo titulado: **“Obtención de hidrolizados proteínicos a partir de las fracciones proteicas del *Phaseolus dumosus* con actividad antihipertensiva”** al Tecnológico de Tuxtepec para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a los correos: marianaguerrer@outlook.com y jtorruco79@outlook.com, si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente al citar la fuente de este trabajo de investigación.

Tuxtepec, Oaxaca a 30 de septiembre del 2023.



IBQ. Mariana Guerrero Martínez

Nombre y firma

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

Yo, Mariana Guerrero Martínez con número de control: M15350590, alumna de la Maestría en Ciencias en Alimentos, del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec, autor (a) de la Tesis titulada “Obtención de hidrolizados proteínicos a partir de las fracciones proteicas del *Phaseolus dumosus* con actividad antihipertensiva”.

DECLARO QUÉ:

1. El presente trabajo de investigación y tema de la tesis presentada para la obtención del título de Maestra en Ciencias en Alimentos es original y asignado por mi director de tesis el Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, siendo resultado de mi trabajo experimental y escritura personal, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación, ni utilizado ideas, fórmulas, ni citas completas, así como ilustraciones diversas, sacadas de cualquier tesis artículo u otro tipo de trabajo de investigación. Caso contrario menciono de forma clara y exacta su origen y autor, tanto en el cuerpo del escrito, figuras, tablas u otros que tengan derecho de autor.
2. Declaro que el trabajo de investigación que pongo en consideración para ser evaluado fue presentado con anterioridad para la obtención de un grado académico o título, mucho menos ha sido publicado en alguna revista científica.
3. Mi persona es consciente de que el hecho de violar los derechos de autor y/o hacer plagio, es objeto de sanciones administrativas por parte del instituto, por lo que asumo la responsabilidad de lo que puede derivar de irregularidades en la tesis, así como los derechos sobre la obra presentada.

En base a lo anterior me hago responsable ante la institución o terceros, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado. De identificarse falsificación, fraude, plagio o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción deriven, sometiéndome a la normatividad vigente del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtepec.

Tuxtepec, Oaxaca a 30 de septiembre del 2023.

IBQ. Mariana Guerrero Martínez

Nombre y firma



NOMBRE DEL TRABAJO

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPE
C-MARIANA.docx**

AUTOR

Mariana

RECuento DE PALABRAS

24739 Words

RECuento DE CARACTERES

134248 Characters

RECuento DE PÁGINAS

94 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.7MB

FECHA DE ENTREGA

Sep 12, 2023 1:00 PM CST

FECHA DEL INFORME

Sep 12, 2023 1:01 PM CST

● **21% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 20% Base de datos de Internet
- 5% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, dador de vida, por darme la oportunidad de concluir este proyecto de investigación científica y sostenerme en los tiempos difíciles que se iban presentando.

A mi Papá por sus consejos y apoyo incondicional, que con su ejemplo de amor y esfuerzo siempre me ha enseñado que lo que se empieza se termina y se ama lo que se hace. A mi madre, que por las etapas de la vida ya no está para verme concluir este Proyecto, pero a ella mis infinitas gracias por dejar en mí el deseo de superarme.

A mis Hermanos Juan César y Gabriel por su apoyo, su amor y su compañía, a mi Abuela Consuelo por ese amor maternal y apoyo emocional, a mi tía Adelina por su amor y apoyo incondicional, a mi abuela Angelina y familia por creer en mí e impulsarme a seguir hacia adelante, a todos ustedes muchas gracias.

Quiero agradecer al Tecnológico Nacional de México/Campus Tuxtepec y la coordinación y consejo de posgrado por haberme aceptado a ser parte de ella para la realización de mi posgrado en la Maestría en Ciencias en Alimentos.

A mi Director de Tesis, Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, por orientarme, apoyarme, por sus oportunas palabras en los momentos de dificultad ya sea en lo profesional o en lo personal, mis más sinceras gracias por ser mi amigo, mi orientador y mi director. Gracias por su paciencia, su tiempo, sus enseñanzas, su cercanía, su cariño hacia mí. Gracias por haber depositado en mí su confianza para la realización de este Proyecto, por motivarme a seguir con mi preparación profesional.

A la Dra. María de la Luz Sánchez Mundo por aceptar ser mi Co-Directora externa y por recibirme durante mi estancia profesional en el Tecnológico superior de las Choapas, gracias por compartir sus conocimientos. A mi comité de revisión de tesis, Dra. Betsabé, Dr. Jesús, Dra. Ivet, gracias por sus oportunas observaciones y por su apoyo durante la realización de este proyecto.

A mi amiga Miriam, gracias por su cariño y apoyo incondicional, su cercanía y sus consejos que necesité durante esta etapa. A mi amiga Nancy por ese apoyo emocional y por creer en mí. A mis compañeros y amigos Mónica, Jocelyn, Jazmín y Luis Andrés por nuestra amistad y los buenos momentos que pasamos juntos durante la maestría. Mi agradecimiento también va dirigido al Lic. Adán Carrasco por su apoyo durante esta etapa de mi preparación profesional, sus consejos y por creer en mí. Al Lic. Pablo Sánchez por inspirarme a continuar preparándome. A mis amigos Gabriel y Viry por creer en mí. A mi amigo Bram por hacerme reír con sus ocurrencias en los momentos de estrés.

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

A todos mis profesores de mi formación de Maestría, por su aporte de conocimientos invaluable, sugerencias para el enriquecimiento de mi trabajo. A mi equipo de laboratorio, a mis chicas de servicio social, Iris Casandra y Caro, gracias por su apoyo.

Y para finalizar quiero agradecer al CONAHCYT por aceptarme como becaria y hacer posible la realización de mis estudios de la Maestría.

DEDICATORIA

A Dios

Por ser mi Todo, el que me sostiene y me guía. Me dio las fuerzas para terminar satisfactoriamente la Maestría en Ciencias en Alimentos, a pesar de las grandes dificultades que pasé durante la realización de mis estudios.

Por haberme permitido llegar hasta aquí, que en un principio no lo creí, pero ÉL puso en mi este sueño, fue un camino largo, donde me encontré con tristezas, tropiezos, estrés, noches sin dormir, sin embargo, lo hemos logrado.

A mi Papá

Por confiar en mí desde el primer día y apoyarme incondicionalmente hasta el término de este Proyecto.

Por ser un ejemplo para mí, que con esfuerzo y dedicación se puede hacer realidad tus sueños. Has sido mi roca, mi apoyo y mi mayor motivación, este logro es un reflejo de tu amor.

A mi Madre

Porque siempre confió en mí, me vio comenzar esta etapa de mi preparación profesional y siempre me dijo que, si lo creo, lo puedo lograr.

Ya no estás físicamente, pero te dedico esta Tesis como un homenaje a tu amor, tu sacrificio y tu legado, tu luz sigue iluminando mi camino.

A mis Hermanos

Por todos los momentos bonitos que pasamos durante esta etapa, por su constante apoyo durante mi formación académica.

A mi tía Adelina y abuela Consuelo

Por su amor y apoyo incondicional, por creer y depositar su confianza en mí.

RESUMEN

Guerrero Martínez, M., Tecnológico Nacional de México campus Tuxtepec. Septiembre, 2023. “Obtención de hidrolizados proteínicos a partir de las fracciones proteicas del *Phaseolus dumosus* con actividad antihipertensiva”. Director: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-directora: Dra. Betsabé Hernández Santos, Co-directora externa: Dra. María de la Luz Sánchez Mundo.

La hipertensión arterial es lo que principalmente ha causado las enfermedades cardiovasculares y la de mayor incidencia a nivel mundial, cada vez es más evidente las causas de esta patología que incluye los procesos fisiopatológicos, opciones de estilo de vida, factores ambientales, entre otros. Los fármacos que se emplean para su tratamiento producen reacciones adversas en el organismo, por ello la Ciencia en Alimentos se ha enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas de origen natural como las leguminosas, por su alto contenido de proteínas (20%) y a partir de ella se han obtenido péptidos con actividad biológica como coadyuvante del tratamiento y/o prevención de esta patología. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue extraer fracciones proteínicas a partir del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) para obtener péptidos bioactivos y evaluar su actividad antihipertensiva. Los granos de frijol gordo fueron adquiridos en el municipio de San José Tenango, Oaxaca; los cuales se seleccionaron 100 para su estudio morfológico y físico. Los granos fueron secados a 50 °C/24 h para la obtención de la harina. Posteriormente se obtuvo un concentrado proteico por precipitación isoeléctrica (pH 4.3). Se determinó la composición química proximal y parámetros de color de la harina y concentrado proteico. Las proteínas fueron extraídas de acuerdo con su solubilidad, albúminas (ALB) solubles en agua, globulinas (GLB) solubles en soluciones salinas, glutelinas (GLT) solubles en soluciones ácidas y básicas y prolaminas (PRL), en soluciones alcohólicas. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el software estadístico Minitab 17, se hizo una comparación de medias con la prueba de Fisher con un nivel de confianza de 95%. En la composición química proximal de la harina y del concentrado proteico, se obtuvieron contenidos de proteínas de 24.86% y 66.51%, respectivamente; los parámetros de color, mostraron un valor de L^* de 85.45 de la harina y 63.50 del concentrado proteico. Se encontraron los siguientes resultados de contenido proteico presente en las fracciones proteínicas: albúminas 29.88%; globulinas 52:68%; prolaminas 12.07% y glutelinas 9.71%. Se seleccionaron las albúminas y globulinas por su mayor contenido de proteínas y estas

fueron hidrolizadas con proteasas comerciales (Flavourzima[®] y Alcalasa[®]), las albúminas hidrolizadas con Flavourzima[®] presentaron un grado de hidrólisis (%GH) de 21.97% a los 60 min de reacción y la fracción de globulinas mostró un GH de 5.42% con la misma enzima a los 10 min de reacción, mientras que, los hidrolizados con la enzima Alcalasa[®] los valores más altos fueron a los 60 min de reacción en ambas fracciones, Albúminas: 12.90 y globulinas 22.47%, respectivamente. La distribución de los pesos moleculares obtenido por SDS-PAGE de la fracción globulinas fue entre 16.2 y 96.1 kDa; en las albúminas de 30.77 y 98 kDa, mientras que en los hidrolizados de globulinas se apreciaron bandas intensas superior a 75 kDa y otras más tenue de aproximadamente 25 kDa. La mayor inhibición de la ECA en la fracción globulinas con Flavourzima[®] fue a una concentración de 2500 ppm a los 50 min de reacción, mostrando un valor de 90.61%, mientras que, en la fracción albúminas con la enzima Alcalasa[®] la mayor inhibición fue con un valor de 85.74% a una concentración de 1000 ppm a los 50 min de reacción. Los valores de IC_{50} de la ECA fueron globulinas hidrolizadas con Flavourzima[®] a los 10 min de reacción con 0.154 mg/mL; albúminas con Flavourzima[®] a los 40 min de reacción con 0.19 mg/mL; globulinas con Alcalasa[®] a los 40 min de reacción con 1.51 mg/mL y albúminas con Alcalasa[®] a los 10 min de reacción con 11.77 mg/mL. Estos resultados nos podrían indicar el posible empleo de estos hidrolizados para el desarrollo de sistemas alimenticios que presenten actividad antihipertensiva.

ABSTRACT

Guerrero Martínez, M., Tecnológico Nacional de México campus Tuxtepec. Septiembre, 2023. "Obtaining protein hydrolysates from the protein fractions of *Phaseolus dumosus* with antihypertensive activity". Adviser: Dr. Juan Gabriel Torruco Uco, Co-adviser: Dra. Betsabé Hernández Santos, External Co-adviser: Dra. María de la Luz Sánchez Mundo.

Arterial hypertension is what has mainly caused cardiovascular diseases and the one with the highest incidence worldwide, the causes of this pathology that includes pathophysiological processes, lifestyle choices, environmental factors, among others, are becoming more evident. The drugs used for its treatment produce adverse reactions in the body, which is why Food Science has focused on the search for new alternatives of natural origin such as legumes, due to their high protein content (20%) and from Peptides with biological activity have been obtained as an adjunct to the treatment and/or prevention of this pathology. Therefore, the objective of this research is to extract protein fractions from kidney beans (*Phaseolus dumosus*) to obtain bioactive peptides and evaluate their antihypertensive activity. The fat bean grains were purchased in the municipality of San José Tenango, Oaxaca; which 100 were selected for their morphological and physical study. The grains were dried at 50 °C/24 to obtain flour. Subsequently, a protein concentrate was obtained by isoelectric precipitation (pH 4.3). The proximal chemical composition and color parameters of the flour and protein concentrate were determined. The proteins were extracted according to their solubility, albumins (ALB) soluble in water, globulins (GLB) soluble in saline solutions, glutelins (GLT) soluble in acid and basic solutions, and prolamins (PRL) in alcoholic solutions. The results obtained were evaluated using the Minitab 17 statistical software, a comparison of means was made using Fisher's test with a confidence level of 95%. In the proximal chemical composition of the flour and the protein concentrate, protein content of 24.86% and 66.51% were obtained, respectively; the color parameters showed an L^* value of 85.45 for the flour and 63.50 for the protein concentrate. The following results of protein content present in the protein fractions were found: albumins 29.88%; globulins 52.68%; prolamines 12.07% and glutelins 9.71%. Albumins and globulins were selected for their higher protein content and they were hydrolyzed with commercial proteases (Flavourzima® and Alcalasa®), albumins hydrolyzed with Flavourzima® presented a degree of hydrolysis (%GH) of 21.97% at 60 min of reaction

and the globulin fraction showed a GH of 5.42% with the same enzyme at 10 min of reaction, while those hydrolyzed with the enzyme Alcalase® the highest values were at 60 min of reaction in both fractions, Albumins: 12.90 and globulins 22.47%, respectively. The distribution of molecular weights obtained by SDS-PAGE of the globulin fraction was between 16.2 and 96.1 kDa; in the albumins of 30.77 and 98 kDa, while in the globulin hydrolysates, intense bands greater than 75 kDa and other fainter ones of approximately 25 kDa were observed. The greatest inhibition of ACE in the globulin fraction with Flavourzima® was at a concentration of 2500 ppm at 50 min of reaction, showing a value of 90.61%, while in the albumin fraction with the enzyme Alcalase® the greatest inhibition was with a value of 85.74% at a concentration of 1000 ppm after 50 min of reaction. The IC_{50} values of the ACE were globulins hydrolyzed with Flavourzima® at 10 min of reaction with 0.154 mg/mL; albumins with Flavourzima® at 40 min of reaction with 0.19 mg/mL; globulins with Alcalase® at 40 min of reaction with 1.51 mg/mL and albumins with Alcalase® at 10 min of reaction with 11.77 mg/mL. These results could indicate the possible use of these hydrolysates for the development of food systems that present antihypertensive activity.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.	MARCO TEÓRICO	5
2.1.	Enfermedades cardiovasculares.....	5
2.1.1.	Hipertensión arterial.....	5
2.1.2.	Prevalencia de la hipertensión arterial.....	6
2.2.	Mecanismo renina-angiotensina-aldosterona	7
2.2.1.	Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA-I).....	8
2.2.2.	Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial	9
2.2.3.	Prevención de la hipertensión arterial.....	10
2.3.	El papel de las proteínas en el organismo humano	11
2.4.	Clasificación de las proteínas por su solubilidad (Osborne).....	12
2.5.	Proteínas de origen vegetal.....	12
2.6.	Las leguminosas como fuentes de proteínas.....	13
2.7.	Frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	13
2.8.	Hidrolizados proteicos	15
2.8.1.	Características de los hidrolizados proteicos	16
2.9.	Péptidos bioactivos	16
2.10.	Obtención de los péptidos bioactivos.....	17
2.10.1.	Método químico	17
2.10.2.	Fermentación microbiana.....	18
2.10.3.	Método enzimático	18
2.11.	Enzimas empleados en la obtención de hidrolizados proteicos	19
2.11.1.	Alcalasa	20
2.11.2.	Flavourzima	21

2.12.	Actividad biológica de los péptidos bioactivos.....	21
2.13.	Péptidos antihipertensivos.....	22
III.	ANTECEDENTES.....	24
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	27
V.	OBJETIVOS.....	29
5.1.	Objetivo General.....	29
5.2.	Objetivos Específicos.....	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1.	Materia prima y reactivos.....	31
4.3.	Obtención de la harina de frijol gordo.....	32
4.4.	Obtención del concentrado proteico del frijol gordo.....	32
4.7.	Obtención de las fracciones proteicas del frijol gordo.....	35
4.8.	Determinación de color de la harina y concentrado proteico del frijol gordo.....	36
4.9.	Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones proteicas e hidrolizados proteicos del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	36
4.10.	Hidrólisis de las fracciones proteicos.....	40
4.10.1.	Determinación del grado de hidrolisis (%GH).....	40
4.10.2.	Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (actividad antihipertensiva).....	42
VI.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1.	Análisis morfológico del grano de frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	45
7.2.	Propiedades físicas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	46
7.3.	Composición química de la harina y concentrado proteico del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	47
7.4.	Color de la harina y concentrado proteico del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	50
7.5.	Solubilidad de las proteínas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	52
7.6.	Precipitación de las proteínas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	54

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

7.7.	Fracciones proteicas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>)	55
7.8.	Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>) 57	
7.8.1.	Hidrólisis enzimática con la enzima Alcalasa®	57
7.9.	Electroforesis de las fracciones e hidrolizados proteicos del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).....	62
7.9.1.	Distribución de pesos moleculares de la fracción globulina e hidrolizados del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>) con enzimas comerciales	62
7.9.2.	Distribución de pesos moleculares de la fracción albúmina e hidrolizados del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>) con enzimas comerciales	64
7.10.	Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i> (inhibición de la ECA)	67
VIII.	CONCLUSIONES	73
IX.	REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Descripción	Pág.
1	Clasificación en categorías basadas en oficina de presión arterial y definiciones de grados de hipertensión.	6
2	Trastornos susceptibles de ser producidos por fármacos.	10
3	Enzimas disponibles comercialmente de grado alimenticio.	20
4	Curva de calibración para la determinación de proteínas.	34
5	Cuantificación de proteína de la muestra.	35
6	Preparación de amortiguadores de las muestras.	38
7	Mezcla de reactivos para la actividad ECA.	42
8	Valores morfológicos de frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).	45
9	Parámetros físicos de frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).	47
10	Composición químico proximal de la harina y del concentrado proteico.	48
11	Análisis de color de la harina y del concentrado proteico del frijol gordo.	51
12	Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados de globulinas con Flavourzima® a diferentes tiempos de reacción.	67
13	Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados de albúminas con Flavourzima® a diferentes tiempos de reacción.	68
14	Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados de globulinas con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción.	69
15	Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados de albúminas con Alcalasa® a diferentes tiempos de reacción.	70
16	IC ₅₀ de la actividad antihipertensiva de hidrolizados de las fracciones albúminas y globulinas a diferentes tiempos de reacción las enzimas Flavourzima® y Alcalasa®.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1	Frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).	14
2	Curva de solubilidad de las proteínas a diferentes pHs.	53
3	Punto Isoeléctrico del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).	54
4	Fracciones proteicas extraídas del concentrado proteico del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>).	56
5	Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>) con la enzima Alcalasa®.	58
6	Hidrolisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (<i>Phaseolus dumosus</i>) con la enzima Flavourzima®.	60
7	SDS-PAGE de la fracción globulinas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción globulinas; carril 3-8: Hidrolizados de globulinas con Alcalasa®.	63
8	SDS-PAGE de la fracción globulinas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción globulinas; carril 3-8: Hidrolizados de globulinas con Flavourzima®.	64
9	SDS-PAGE de la fracción albúminas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción albúminas; carril 3-7: Hidrolizados de albúminas con Flavourzima®.	65
10	SDS-PAGE de la fracción albúminas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción albúminas; carril 3-8: Hidrolizados de albúminas con Alcalasa®.	66

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Los hábitos alimenticios que hemos estado llevando en la actualidad incrementa notablemente la probabilidad de desarrollar ciertas patologías en la vida adulta, como la diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, cáncer, estrés oxidativo, oxidación celular e incluso envejecimiento prematuro. Según los estudios de la Ciencia de la Nutrición han observado que una alimentación no saludable condiciona la aparición de la hipertensión arterial, aumento del colesterol y sobrepeso (Aquino-Llave, 2017). Por ello, en los últimos años la Ciencia de los Alimentos ha puesto mayor interés a las nuevas alternativas para la obtención de compuestos de origen natural para coadyuvar el tratamiento y prevenir estas enfermedades.

La hipertensión arterial es definida como la elevación de la presión arterial sistólica a 140 mm Hg o más, presión arterial diastólica a 90 mm Hg o más y está asociada directamente con daño en las arterias y los órganos especialmente expuestos son el corazón, riñón, cerebro y retina, cuyo daño es proporcional a la magnitud y a la duración de la hipertensión. Los niveles normales de presión arterial de una persona sana son de 120/80 mm Hg (presión sistólica/diastólica, respectivamente) (Pérez *et al.*, 2017). Es importante que la población general la conozca para lograr la detección oportuna y así tener mejor control. A pesar de que la ciencia ha encontrado tratamientos farmacológicos mediante el uso de medicamentos durante tiempos prolongados, se ha probado las reacciones adversas que produce, generando otros padecimientos como alteraciones del gusto, cáncer de labios, angioedema, entre otros (Armijos *et al.*, 2022).

Por todo lo anterior, la Ciencia en Alimentos ha estado promoviendo un nuevo concepto de nutrición donde incluye a aquellos alimentos que presentan un potencial en el mejoramiento de la salud y disminuye los riesgos de enfermedades, por eso muchas investigaciones se han enfocado en la extracción de péptidos bioactivos de fuentes vegetales, capaces de ofrecer beneficios a la salud de los consumidores. Entre los beneficios que ofrecen estos péptidos bioactivos es que tienen la capacidad de disminuir la presión arterial. Hoy en día los investigadores de Ciencias en Alimentos y la salud se han dado a la tarea de aislar y purificar péptidos con actividad antihipertensiva desde diferentes fuentes animales y

vegetales, siendo esta última la que está cobrando mayor importancia debido a que son materias primas que pueden obtenerse más fácilmente y su costo es accesible.

Por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar los hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con actividad antihipertensiva.

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) constituyen en la actualidad uno de los mayores retos que enfrentan los Sistemas de Salud a nivel mundial. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las primeras causas de muerte a nivel global. Según las estadísticas de la OMS, más de 40 millones de personas mueren anualmente por ECNT y son las principales causas de fallecimiento siendo las enfermedades cardiovasculares las que se encuentra en primera fila con la cifra de 17,7 millones cada año (Valdés, 2020).

Las ECV son tipos de enfermedades que afectan principalmente el corazón y los vasos sanguíneos, provocando un mal pronóstico de supervivencia y elevado coste económico. Entre las enfermedades de tipo cardiovascular encontramos la de las arterias coronarias, hipertensión, miocardiopatía, accidentes cerebrovasculares, entre otras. Su progresión se ha asociado con aumento de coágulos de sangre, depósitos de grasa dentro de las arterias (aterosclerosis), así como daño a las arterias en los órganos, muchas de estas enfermedades se acompañan de una serie de daños irreversibles que conducen a complicaciones orgánicas y vasculares. Estas enfermedades cardiovasculares generalmente afectan a los adultos mayores, presentando tasa de incidencia más alta (Gao & Hou, 2023).

Estas enfermedades pueden ser causadas por una variedad de factores de riesgo que provocan estrés oxidativo severo como fumar, beber en exceso, falta de ejercicio, dieta deficiente, obesidad y falta de sueño. Esta enfermedad puede prevenirse y tratarse a través de una dieta adecuada y de intervenciones en el estilo de vida (Lechner *et al.*, 2020)

2.1.1. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial es una elevación continua de la presión arterial por encima de los límites establecidos, desde el punto de vista epidemiológico se identifica como un importante factor de riesgo cardiovascular para la población (Ocharan-Corcuera y Espinosa-Furlong, 2016)

Esta patología se define como la elevación patológica de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos (Hong *et al.*, 2003) y está asociada con daño en las arterias y en diversos parénquimas (conglomerados de células de igual diámetro formando meatos entre sí y que pueden elaborar y almacenar sustancias). Los niveles normales de presión arterial de una persona sana deben de ser de 120/80 mm Hg (presión sistólica/diastólica) (Tabla 1). Sin embargo, una presión arterial alta se considera cuando los niveles sobrepasan de 130/85 mm Hg de presión y es cuando se le debe prestar atención a la misma para ser atendida y poder controlarla antes que incremente y pueda dañar órganos importantes. A niveles mayores de 180/110 mm Hg (denominada de grado 3 ó extremo) se pueden presentar en el individuo apoplejías (embolias) causando parálisis e inclusive la muerte (Rosas *et al.*, 2005), dicha clasificación se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación en categorías basadas en oficina de presión arterial y definiciones de grados de hipertensión.

Clasificación de la PA	Sistólica (mm/Hg)	Diastólica (mm/Hg)
Normal/Óptimo	<120	<80
Normal/Elevado	120-129	80-84
Alto Normal	130-139	85-89
Grado 1	140-159	90-99
Grado 2	160-179	100-109
Grado 3	≥180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥140	<90

Fuente: Barbos *et al.* (2017); Wyss *et al.* (2020).

2.1.2. Prevalencia de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial es una de las enfermedades con mayor prevalencia en la población mundial, que se presenta en el 30 - 45% en los adultos, afectando todos los sistemas del organismo humano, por lo que, el descuido puede provocar múltiples manifestaciones clínicas. Esta patología se origina por una combinación de factores genéticos y ambientales, de los cuales la herencia constituye del 30 al 50%. Por otro lado, recientemente se ha

demostrado que la obesidad es un factor estimulante simpática y que ciertas enfermedades como la artritis reumatoide, que aumentan el riesgo de padecerla, así también se debe tener en cuenta que la hipertensión arterial se puede asociar al consumo de ciertos medicamentos, como los inhibidores de calcineurina y anticuerpos monoclonales inhibidores de factor de crecimiento vascular endotelial (Gopar-Nieto *et al.*, 2021).

Esta patología no solo es muy prevalente, sino que va en aumento rápidamente, según estudios, se estima que para el año 2025 su prevalencia alcanzará >29%. Factores como el estrés, la actividad física, el tabaquismo, la paridad, la diabetes mellitus, los perfiles de lípidos y los patrones dietéticos, pueden influir en la aparición y en el desarrollo de la hipertensión arterial (Farahmand *et al.*, 2023).

La hipertensión arterial es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas como: la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular y enfermedades renales (Faradonbeh *et al.*, 2018). El responsable principal de regular la presión arterial es el sistema renina-angiotensina, la cual consiste en una secuencia de reacciones diseñadas para el control de la presión arterial, por lo que, resulta importante conocer su mecanismo.

2.2. Mecanismo renina-angiotensina-aldosterona

En las enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, vasculopatías, enfermedades coronarias, el sistema renina angiotensina (SRA) su participación es esencial de forma particular en la regulación de la presión arterial. Este sistema participa en la remodelación vascular que consiste en la capacidad de una arterial en adaptar su tamaño estructural ante estímulos crónicos por crecimiento o reducción del tamaño externo para mantener un lumen funcional (Ciau-Solís y Betancur-Ancona, 2021).

El SRA tiene un importante papel en la regulación de la presión arterial (PA) mediante la liberación de Ang II y el equilibrio hidro-salino, a través de la liberación de aldosterona. Generalmente, el SRA actuaría como un mecanismo de defensa que se activa en respuesta a una hipotensión hipovolémica. Cuando la PA disminuye como resultado de la restricción de sodio o hipovolemia, las células yuxtglomerulares del riñón sintetizan una enzima, la renina, que se libera a la sangre circulante (Nawaz *et al.*, 2017).

La renina rompe el enlace existente entre Leu-10 y Val-11 del angiotensinógeno (AGT), glucoproteína $\beta 2$ plasmática de 453 aminoácidos (55-61 kDa) sintetizada en el hígado, lo que produce un decapeptido inactivo, siendo la Ang I, dicho decapeptido recibe la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), secretada por las células endoteliales de los pulmones, fundamentalmente, y de los riñón, posteriormente esta enzima hidroliza el dipéptido terminal His-9-Leu-10 de la Ang I y la convierte en un octapéptido activo, la Ang II. Esta estimula los receptores AT1 y AT2, produciendo una respuesta vasoconstrictora que incrementa las resistencias vasculares periféricas y la PA, aumenta la actividad del sistema simpático, estimula la liberación de vasopresina, incrementa el cronotropismo cardíaco, y favorece la aparición de cambios en las funciones glomerular y tubular del riñón con un aumento en la liberación de aldosterona por la corteza suprarrenal que es la que produce retención renal de sodio y agua, con lo que aumenta aún más la PA (Ponce, 2012).

2.2.1. Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA-I)

La ECA es una ectoenzimametaloproteínasa de zinc dipeptidocarboxipeptidasa que escinde el péptido histidil-leucina de la terminación carboxilo del decapeptido DRVYIHPFHL de la Angiotensina-I, mediante el SRA generando el octapéptido vasoconstrictor angiotensina-II. En el ser humano, la ECA-I se presenta en dos isoformas; la primera se denomina ECA somática (sECA) y se localiza en la membrana de las células endoteliales parenquimatosas. La segunda isoforma, denominada ECA germinativa o testicular (tECA) es una enzima más pequeña, se localiza en las células germinativas en el testículo y su acción está relacionada con la maduración de espermatozoides en los varones. La ECA-I posee propiedades endo y exopeptidasa, la actividad inusual de exopeptidasa se ha observado mediante el anclaje e hidrólisis del segundo residuo de aminoácido en la región terminal del grupo carboxilo en una variedad de péptidos como sustrato, la bradikinina y angiotensina-I HHL (Hipuril-L-Histidil-L-Leucina). Se ha demostrado que un tripéptido con la región amino terminal acilado es el mejor sustrato para la ECA-I, así como la presencia de un residuo de aminoácido aromático como la Fen en la antepenúltima posición confiere al péptido sustrato una gran afinidad con la enzima. Actualmente se sabe que la actividad primaria de la ECA es anclarse en oligopéptidos que presenten un grupo carboxilo libre con amplia especificidad (Domínguez *et al.*, 2012).

La ECA desempeña un papel importante en el control de la hipertensión ya que es un componente clave dentro del sistema renina angiotensina aldosterona. La ECA convierte la angiotensina I inactiva en angiotensina II, un potente vasoconstrictor, dicho compuesto inactiva la bradicinina, un vasodilatador que ayuda en la disminución de la presión arterial. Los inhibidores de esta enzima bloquean la producción de angiotensina II y previene la constricción de los vasos sanguíneos, de esa manera reduciendo la presión arterial (Paiva *et al.*, 2023).

2.2.2. Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial

Esta enfermedad ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos que inhiben a la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), mecanismo responsable de la alteración de la presión normal de la sangre, cuando esta circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano. Entre los medicamentos más comunes en el mercado se encuentran los inhibidores de la ECA, los β -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión. La farmacoterapia se recomienda en persona con presiones arteriales $\geq 140/90$ mm Hg. Los fármacos empleados para la hipertensión son considerados como inhibidores competitivos, reversibles y de rápida acción para enlazarse con la ECA-I provocando la inhibición. El grado de beneficio de estos fármacos va a depender de la magnitud de la disminución de la presión arterial, por lo tanto, la disminución de 10 a 12 mm Hg de la PAS y de 5 a 6 mm Hg de la PAD confiere las disminuciones relativas de riesgo de 35 a 40% para el caso de apoplejía y 12 a 16% para cardiopatía congestiva en término de cinco años de haber comenzado el tratamiento (Kotchen, 2012).

Sin embargo, por su uso prolongado puede provocar reacciones adversas a la salud del consumidor, una reacción adversa fue definido por el Real Decreto 577/2013, como cualquier respuesta nociva y no intencionada a un medicamento. Los medicamentos comúnmente usados para el tratamiento de la hipertensión arterial, por mencionar algunos, son el captopril y enalapril, en la Tabla 2 se presentan los tipos de alteraciones que pueden ocasionar estos fármacos.

Tabla 2. Trastornos susceptibles de ser producidos por fármacos.

Tratamiento	Fármaco	Tipo de alteración	Reacción adversa
Hipertensión	Enalapril	Alérgica hipersensibilidad	o Angioedema
	Captopril	Hidroelectrolítica	Hiperpotasemia
		Vascular	Hipotensión arterial

Fuente: Pedrós *et al.* (2014); Montané y Santesmases (2020), con modificaciones.

Las reacciones adversas a medicamentos son una causa importante de morbimortalidad y de aumento de costes. Ocurren en el 10% de los pacientes ambulatorios, causan el 5-10% de los ingresos hospitalarios y las presentan el 10 - 20% de los pacientes hospitalizados, lo que hace que aumente su estancia media (Montané y Santesmases, 2020).

2.2.3. Prevención de la hipertensión arterial

Los estudios epidemiológicos demuestran que existe una fuerte asociación entre el estilo de vida sedentario (inactividad física) y los factores de riesgo cardiovascular, como la obesidad, la diabetes y la hipertensión. Estudios como el Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) evaluaron el efecto de la actividad física sobre la mortalidad y la enfermedad cardiovascular y obtuvieron resultados en personas sin enfermedad cardiovascular donde observaron que hay una reducción del riesgo relativo del 86% entre los grupos de actividad física moderada frente al grupo de actividad física baja para el desarrollo de la hipertensión arterial, así también el control de peso corporal es otra estrategia eficaz para mejorar el control de la hipertensión. Reportes evidencian sobre una fuerte asociación entre la ingesta de sodio y la presión arterial sistólica, en comunidades que consumen más de 5 g de sodio por día. Además, se recomienda dejar de fumar, limitar el consumo de bebidas alcohólicas y aumentar el consumo de potasio, verduras, frutas, pescado y ácidos grasos insaturados (Wyss *et al.*, 2020).

Actualmente se ha prestado especial atención a las nuevas alternativas para la prevención de las enfermedades crónicas como la hipertensión arterial, estas nuevas alternativas en las

Ciencias en Alimentos es en torno a las proteínas, como fuentes de producción de péptidos con actividades biológicas activas, incluido el efecto antihipertensivo.

2.3. El papel de las proteínas en el organismo humano

Las proteínas son las macromoléculas orgánicas más abundantes en las células vivas y en el ser humano. Desempeñan funciones importantes como componentes estructurales, enzimas, hormonas, transportadores, mensajeros, componentes del sistema inmune, entre otras funciones (Quesada & Gómez, 2019). A nivel elemental, las proteínas contienen 50-55% de carbono, 20-23% de oxígeno, 12-19% de nitrógeno, 6-7% de hidrógeno y por último 0.2-3.0% de azufre. La parte más pequeña que se pueden dividir son unidades estructurales llamadas aminoácidos, la diversidad funcional de las proteínas se debe especialmente a su composición química, constituidos por hasta 20 aminoácidos diferentes, estos aminoácidos se unen vía enlaces amida sustituidos teniendo parcialmente carácter de doble enlace, lo que aumenta la complejidad estructural de las proteínas (Fennema, 1996).

La proteína supone aproximadamente el 17% de la masa corporal, a pesar de su diversidad funcional el 25% es proteína estructural y hemoglobina. La importancia de la proteína presente en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para el mantenimiento de la proteína corporal y al incremento de esta durante el crecimiento. El aspecto más importante de una proteína, desde el punto de vista nutricional, es su composición de aminoácidos, aunque otras características estructurales como la solubilidad y la glicosilación, puede afectar su digestibilidad y por lo tanto, su valor nutricional (Augustin y De Victoria, 2006)

Diversas investigaciones compuestos y moléculas como las proteínas de cereales, leguminosas, granos andinos y otros alimentos naturales, con propiedades de retrasar la progresión de enfermedades inhibiendo los mecanismos fisiopatológicos o suprimiendo las actividades de patógenos, entre otros, por lo que el papel que desempeñan las proteínas en el organismo humano como componentes fisiológicamente activos se está reconociendo cada vez más, principalmente por ser fuentes de péptidos biológicamente activos (Moscoso-Mujica *et al.*, 2017).

2.4. Clasificación de las proteínas por su solubilidad (Osborne)

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula, para la extracción de las proteínas de una manera más eficiente, se pueden disolver más proteínas en una solución de forma que se enriquezca el medio y luego se pueda extraer, uno de los métodos más relevantes y que han dado buenos resultados es la solubilización basada en los criterios propuesto por Osborne (Hipolito & Caballero, 2022). La clasificación de proteínas que fue desarrollada por Osborne en 1924 consiste en una extracción secuencial con: agua, solución de sal diluida, solución de alcohol y solución de ácidos o álcalis diluidos, al usar esta serie de extracción se logra la separación de las proteínas que dónde se pueden clasificar en albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, respectivamente. Las fracciones de Osborne no proporcionan una clara separación entre las proteínas para poder diferenciarlas de manera bioquímica, genética o funcionalmente. La metodología propuesta por Osborne todavía se usa extensamente en estudios que relacionan la composición de proteínas de acuerdo con su funcionalidad, ya que, este método de separación es relativamente simple (Goesaert *et al.*, 2005)

Para un mejor conocimiento de las proteínas de reserva va a permitir su utilización para aplicaciones novedosas, como la producción de vacunas, usos especiales, dietas para prevenir o tratar enfermedades (Maruyama *et al.*, 2014)

2.5. Proteínas de origen vegetal

El consumo adecuado de proteínas resulta crucial para el óptimo funcionamiento del organismo, ya sea de fuente animal o vegetal. Las proteínas de origen animal son una excelente fuente de zinc, hierro, vitaminas del complejo B y aminoácidos esenciales, sin embargo, un alto consumo de estas proteínas se asocia a un mayor mortalidad y desarrollo de complicaciones para la salud cardiovascular. Al consumir las proteínas de origen vegetal es posible obtener proteínas de alta calidad mediante la combinación de fuentes vegetales. En ambas fuentes se pueden obtener péptidos bioactivos capaces de ejercer diferentes actividades biológicas como inmonomoduladores, hipocolesterolémicos, antihipertensivos, entre otros (Quesada & Gómez, 2019). Por lo que, una dieta basada de alimentos de origen vegetal conferiría mayores beneficios tanto para la salud como para el medio ambiente, ya

que las evidencias de los estudios en torno a los alimentos vegetales han mostrado que tiene un menor efecto ambiental por unidad de peso, tamaño de porción, gramos de proteína o energía aportada que los de origen animal (Maruyama *et al.*, 2014).

2.6. Las leguminosas como fuentes de proteínas

La proteína que mayormente consume la humanidad es de fuentes vegetales, siendo las leguminosas el grupo principal de estas, así como la soya que es el cultivo más importante, seguida del frijol. Los granos de las leguminosas son nutricionalmente importantes, como la principal fuente de proteínas (20 - 40%) y de bajo costo en la dieta de la población mexicana (Pérez *et al.*, 2002). Las leguminosas son una rica fuente de proteínas, son parte de las dietas tradicionales en la mayoría de las culturas. Además, tienen una huella hídrica y de gases de efecto invernadero bajas. Las leguminosas presentan ventajas ambientales adicionales, ya que mejoran la calidad del suelo a través de la fijación de nitrógeno, reducen la necesidad de fertilizantes nitrogenados, mejoran la producción de cultivos y las enfermedades mediante cultivos intercalados o rotación de cultivos, por lo que son relativamente económicas (Semba *et al.*, 2021).

Las proteínas de las semillas de leguminosas son sintetizadas en el cotiledón, proporcionando proteínas necesarias a la planta durante la germinación y el crecimiento como plántula. Las proteínas de almacenamiento de semillas contienen aminoácidos que dan valor nutricional a las leguminosas. La calidad de la proteína dietética se basa en la digestión de las proteínas y la absorción de sus aminoácidos constituyentes y la utilización de los aminoácidos absorbidos para apoyar la síntesis de proteínas en todo el cuerpo (WHO, 2007)

2.7. Frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

Los frijoles son un componente de importancia mundial en la dieta humana, la seguridad alimentaria y los medios de vida (Broughton *et al.*, 2003). El frijol común, *Phaseolus vulgaris*, es un cultivo básico en América del Sur, América Central y África, donde es una fuente importante de proteína dietética y un objetivo de los programas de mejoramiento y biofortificación en curso (Gepts & Debouck, 1991; Schmutz *et al.*, 2014).

Si bien *Phaseolus* es un género grande de aproximadamente 50 especies (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Otras especies de *Phaseolus*, como *P. acutifolius*, constituyen un acervo genético terciario porque están relacionadas más lejanamente, con barreras de hibridación sexual (Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Una mayor comprensión de la variación genética dentro del acervo genético secundario puede orientar la reproducción a través de cruces interespecíficos y puede identificar poblaciones de prioridad de conservación (Porch *et al.*, 2013). De las especies dentro del acervo genético secundario, *P. dumosus* (frijol de un año) (Figura 1) está estrechamente relacionado tanto con *P. vulgaris* como con *P. coccineus*, que también es un cultivo muy extendido. Sin embargo, se considera que *P. dumosus* es menos diverso genéticamente que cualquiera de estas otras dos especies, lo que sugiere una domesticación más reciente (Freytag & Debouck, 2002). Es importante destacar que *P. dumosus* muestra características de interés agronómico para la adaptación al cambio climático, incluida la tolerancia a condiciones húmedas y de gran altitud y resistencia en el campo al tizón de la hoja por ascochyta, antracnosis y moho blanco (Mahuku *et al.*, 2002).



Figura 1. Frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

A diferencia de *P. coccineus* y *P. vulgaris*, los tipos silvestres ancestrales de *P. dumosus* se conocen solo en las tierras altas de Guatemala, donde se cultiva comúnmente. *P. dumosus* silvestre muestra una morfología intermedia con características compartidas con *P. coccineus* (raíz semituberosa, semillas grandes) y *P. vulgaris* (cotiledones epigeales, anteras

intrusas). Estas características llevaron a la sugerencia de que *P. dumosus* podría derivar de la hibridación de *P. coccineus* y *P. vulgaris* (Hernández-Xolocotzi *et al.*, 1959). En los últimos años, la hipótesis de un origen híbrido ha recibido el apoyo de las discrepancias observadas entre el ADN plastídico (ADNc) y los marcadores de ADN nuclear (Spataro *et al.*, 2011). Típicamente, *P. dumosus* se resuelve para estar más estrechamente relacionado con *P. vulgaris* cuando se usa cpDNA, pero con *P. coccineus* con marcadores nucleares. También se ha propuesto que puede haber ocurrido un evento de reticulación durante la evolución de *P. dumosus*, posiblemente también involucrando *P. costaricensis* (Debouck, 1999). Sin embargo, los análisis más recientes en *Phaseolus* se han centrado en las relaciones de *P. vulgaris* o *P. coccineus*, y solo se ha investigado un pequeño número de individuos de *P. dumosus*.

Los granos de las leguminosas comestibles son nutricionalmente importantes, como la principal fuente de proteínas (20 - 40% o más de la ingesta diaria) de bajo costo en la dieta de la población mexicana (Pérez *et al.*, 2002). La familia de las leguminosas y en particular el caso de la soya, es un claro ejemplo de semillas ricas en proteína usada en la alimentación, y en el caso de la familia de las cucurbitáceas se puede tomar como ejemplo a la pepita o semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*), ya que la semilla contiene 31% de proteínas, 36% de lípidos y 15% de hidratos de carbono, muy consumida en la República Mexicana, aunque desperdiciada en otros países (Martínez *et al.*, 2011).

2.8. Hidrolizados proteicos

Generalmente las proteínas se han recuperado principalmente en forma de hidrolizados, que se originan de las proteínas nativas como péptidos de distintos tamaños después de una hidrólisis química o enzimática (Montero-Barrantes, 2021). Los hidrolizados proteicos son un conjunto de péptidos que tiene diferentes tamaños, los cuales son generados a partir de la hidrólisis de proteínas, por agentes químicos o por enzimas. Los métodos más comunes para la obtención de péptidos son mediante una hidrólisis química, microbiana o enzimática, siendo la última que ha sido utilizada mayormente por ser un tratamiento suave, presentando más ventajas (Estrada, 2022; Ulug *et al.*, 2021). En los hidrolizados proteicos se potencian diversas características funcionales como la viscosidad baja, alta solubilidad y

dispersión, lo que las hace interesante en el uso como ingredientes en productos alimenticios. Las aplicaciones más importantes han sido como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales para alimentación infantil y/o adultos enfermos. Dichas dietas se diseñan para una absorción en el intestino sin digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición (Benítez et al., 2008).

2.8.1. Características de los hidrolizados proteicos

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental del hidrolizado y va a influenciar de manera importante las demás características de este y por ende su posible uso. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación con la proteína original. Esta determinado por las condiciones utilizadas, como, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura, además la naturaleza de la enzima es otro factor muy importante que se caracteriza por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima empleada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.*, 2008).

2.9. Péptidos bioactivos

A partir de un hidrolizado proteico se producen los péptidos bioactivos, que son pequeñas cadenas peptídicas específicas, usualmente compuestos por 2 - 20 residuos de aminoácidos, con masas moleculares inferiores a los 6000 Da, inactivos en el interior de la proteína precursora y tras su liberación enzimática, ejerce su actividad biológica. Estos fragmentos o moléculas son capaces de atravesar la barrera epitelial pudiendo accionar en el nivel local, gastrointestinal o sistémico. Los péptidos bioactivos pueden generarse a partir de fuentes de proteínas de origen animal o vegetal, de tal forma que al obtenerse ejercen actividades opiáceas, inmunomoduladores, antiinflamatorios, antioxidantes, antihipertensivos, entre otros (Quesada *et al.*, 2019).

Muchos de los péptidos bioactivos son multifuncionales, es decir, tienen varios modos de acción, por lo que ejercen más de una actividad fisiológica. Los péptidos bioactivos derivados de alimentos poseen un gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales, nutracéuticos o ambas funciones, para la prevención de muchas enfermedades crónicas (Ulug *et al.*, 2021).

2.10. Obtención de los péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son los fragmentos resultantes de un tratamiento bioquímico en las proteínas intactas, estando inactivas dentro de la proteína precursora y que al liberarse se activan para actuar en beneficio de la salud del organismo y presentando propiedades relacionadas principalmente en el control de los sistemas nervioso y circulatorio del organismo humano (Segura-Campos *et al.*, 2013).

Anteriormente los hidrolizados proteicos se obtenían a partir de procesos químicos, sin embargo, se ha observado que presentan desventajas como la poca capacidad de controlar la calidad del producto, el enorme uso de agua por los pasos secuenciales de solubilización, el uso de elevadas temperaturas y altas concentraciones de ácidos y bases, lo que genera posible contaminación ambiental y baja funcionalidad de los hidrolizados producidos, por ello, en los últimos años se ha empleado la hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos bioactivos, por sus condiciones moderadas de reacción, homogeneidad, calidad superior del producto y funcionalidad (Montero, 2021). El uso de las enzimas proteolíticas para la hidrólisis ha ido incrementando y es considerado una de las técnicas más eficiente para la producción de péptidos bioactivos (Chalamaiah *et al.*, 2018).

2.10.1. Método químico

La hidrólisis de proteínas por el método químico ha sido utilizada por ser simple, se utilizan los ácidos o los alcalinos para escindir los enlaces peptídicos para la producción de péptidos y aminoácidos libres. Sin embargo, la hidrólisis por este método presenta muchas limitaciones, como las dificultades para controlar el proceso, lo que provoca generar resultados con composiciones químicas variables, además las condiciones de temperatura y pH que se emplean provocan malas cualidades y bajas funcionalidades. Los hidrolizados de

proteínas de la hidrólisis ácida poseen menos propiedades nutricionales en comparación con los producidos por enzimas, así la hidrólisis por método alcalino también suele dar como resultado una disminución del valor nutricional de los hidrolizados proteicos generados, por eso no se prefiere hidrólisis química para la producción de péptidos bioactivos (Ulug *et al.*, 2021)

2.10.2. Fermentación microbiana

La fermentación es un método que se ha empleado desde la antigüedad para la conservación de alimentos en donde se generan péptidos bioactivos, generalmente estos alimentos fermentados se producen por una fermentación natural y controlada de bacterias ácidos lácticas, este tipo de bacterias son importantes en la producción de productos fermentados impartiendo propiedades nutricionales y tecnológicas, incluido el desarrollo de textura y sabor en los alimentos. En los productos cárnicos fermentados, durante la fermentación conduce a una reducción del pH, lo que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, dicha disminución de pH afecta indirectamente la degradación de las proteínas al aumentar las actividades de las proteasas musculares, donde los polipéptidos generados por las proteasas cárnicas endógenas son degradados aún más por las enzimas bacterianas durante la fermentación, lo que hace que se liberen péptidos bioactivos potenciales en los productos cárnicos (Wu *et al.*, 2015; Ulug *et al.*, 2021). La producción de péptidos bioactivos por el método de fermentación microbiana es relativamente económica, sin embargo, la explotación industrial con el fin de producir péptidos bioactivos se ve obstaculizada debido al bajo rendimiento y la falta de especificidad de los péptidos bioactivos (Raveschot *et al.*, 2018)

2.10.3. Método enzimático

La hidrólisis enzimática se ha empleado como un método principal para la producción de péptidos con actividad biológica y generalmente se lleva a cabo bajo condiciones controladas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2013). La producción o “liberación” de los péptidos depende del sustrato con el que se esté trabajando, tipo de enzima, y condiciones del proceso de hidrólisis, tales como temperatura, pH, tiempo de reacción, entre otras. (Korhonen & Pihlanto, 2006). La especificidad de la enzima afecta el tamaño y cantidad de

los péptidos generados, así como la composición y secuencia de aminoácidos contenidos en estos y por ende en su funcionalidad y bioactividad (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). La alta especificidad y la falta de solventes orgánicos residuales y químicos tóxicos en las preparaciones peptídicas finales hace que la hidrólisis enzimática sea el proceso más preferido de las industrias alimentaria y farmacéutica para la producción de péptidos con actividades biológicas (Murciniak *et al.*, 2018).

Actualmente se han empleado la hidrólisis secuencial de proteínas haciendo el uso de una combinación de enzimas proteolíticas para la producción de fragmentos más pequeños, si las condiciones óptimas de hidrólisis son similares, se pueden añadir enzimas simultáneamente o de forma secuencial. Los péptidos bioactivos generados por hidrólisis enzimática, empleando enzimas de calidad alimentaria generalmente son reconocidos como seguros (Ulug *et al.*, 2021).

Los hidrolizados enzimáticos han sido utilizados para muchos propósitos, tales como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios, en la formulación de productos farmacéuticos y de aplicación clínica específica, así como para reducir la alergenicidad de la proteína y en la obtención de péptidos bioactivos (Tardioli *et al.*, 2003). Durante la hidrólisis de las proteínas, la elección de la enzima y las condiciones del proceso influyen en la composición de péptidos en el hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades funcionales (Van der Ven *et al.*, 2002). Atendiendo a su grado de hidrólisis (GH), los productos proteínicos pueden ser clasificados en hidrolizados parciales (GH 10%), cada uno de ellos presenta propiedades específicas que afectan a su utilización (Vioque *et al.*, 2006).

2.11. Enzimas empleados en la obtención de hidrolizados proteicos

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas de grado alimenticio, que pueden ser clasificadas por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo-exo-actividad) o por su sitio catalítico. Las endopeptidasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína, mientras que las exopeptidasas eliminan aminoácidos terminales. Las primeras enzimas proteolíticas

utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal (Benitez *et al.*, 2008). Las proteasas de origen vegetal como la papaína o las de origen animal, como la pepsina, tripsina y quimotripsina (enzimas gastrointestinales) son las enzimas comerciales más utilizadas para la hidrólisis de proteínas de productos y subproductos pesqueros (Gómez-Guillén *et al.*, 2010). Las enzimas de origen microbiano (provenientes de hongos y bacterias, grado alimentario) como Alcalasa[®], Flavourzima[®], Properase[®] y Termolisina también han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos. Estas enzimas, en comparación con las enzimas derivadas de plantas o animales, ofrecen muchas ventajas, incluyendo una amplia variedad de actividades catalíticas, actividad a un amplio intervalo de pH, estabilidad a diferentes temperaturas, son de bajo costo, seguras y generan altos rendimientos en poco tiempo (Hernández-Ledesma *et al.*, 2013). Algunas enzimas comerciales de grado alimenticio se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Enzimas disponibles comercialmente de grado alimenticio

Nombre	Origen	Fuente	Temperatura (°C)	pH
Tripsina	Animal	Porcino, bovino	30 - 60	7 - 9
Alcalasa	Bacteriana	<i>Bacillus licheniformis</i>	50 - 60	6 - 10
Flavourzima		<i>Aspergillus oryzae</i>		7
Papaína	Plantas	Papaya	40 - 75	5 - 8
Bromelina		Piña	20 - 65	
Fúngica	Newlasa	<i>Rhizopus sp</i>	40 - 50	3 - 6

Fuente: Benítez *et al.* (2008).

2.11.1. Alcalasa

La enzima alcalasa es de origen bacteriano con actividad endopeptidasa, la cual ha sido ampliamente utilizado para la producción de péptidos bioactivos. Se reporta que esta enzima, en el contexto de las proteasas, presenta una alta eficiencia en la hidrólisis de

diferentes proteínas para obtener péptidos bioactivos. Esta enzima es capaz de reconocer más sitios aminoacídicos, lo que lleva a un hidrolizado con muchos péptidos de menor tamaño (Zhu *et al.*, 2022).

La alcalasa es una enzima proteolítica que se produce por fermentación sumergida de *Bacillus licheniformis* seguida de purificación y formulación. Hidroliza eficazmente las proteínas dentro de un amplio rango de temperatura y pH de 45 - 65 °C y 7.5 - 9.5, respectivamente. Dependiendo del tipo de sustrato (Zapata *et al.*, 2019). Tiene amplias aplicaciones en el campo de la industria alimentaria, médico, de los detergentes, en la hidrólisis de proteínas de origen vegetal o animal, entre otros.

2.11.2. Flavourzima

La proteasa flavourzima es un preparado enzimático biológico refinado por la biotecnología moderna, que contiene dos tipos de enzimas activas: una endopeptidasa y otra exopeptidasa, y se ha utilizado para mejorar la calidad de los alimentos. La exopeptidasa realiza principalmente la actividad liberando un aminoácido desde el final de la cadena polipeptídica cada vez, lo que degrada por completo los péptidos amargos en aminoácidos y péptidos de menor peso molecular, reduce el amargor y realza o mejora el sabor de los hidrolizados (Qu *et al.*, 2023).

2.12. Actividad biológica de los péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos, siendo polímeros cortos que constan de 2 a 20 aminoácidos con bajo peso molecular y como se ha citado anteriormente, estos son obtenidos mediante procesos de hidrólisis enzimáticas, fermentación u otras tecnologías emergentes. Los péptidos que son liberados pueden exhibir actividad biológica que podrían ofrecer varios beneficios para la salud. Desde hace años se han realizado investigaciones sobre la producción y caracterización de péptidos bioactivos con diferentes propiedades como, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y antihipertensivas, entre otras (López-Pedrouso *et al.*, 2023).

2.13. Péptidos antihipertensivos

El efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas de leguminosas ha sido demostrado en distintos estudios *in vitro* e *in vivo*. Concretamente, se han identificado secuencias procedentes de globulinas capaces de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Aunque se desconoce el mecanismo exacto de inhibición, la mayoría de los estudios indican que los péptidos identificados hasta el momento son principalmente inhibidores competitivos del extremo o dominio C-terminal de la ECA. Por ejemplo, se ha identificado el péptido KEDDEEEEQGEEE, liberado durante la fermentación de guisante con *Lactobacillus plantarum* 299v el cuál poseía aminoácidos cargados capaces de quelar el átomo de zinc del centro activo de la ECA (Durak *et al.*, 2013) reduciendo su velocidad catalítica para hidrolizar la angiotensina I (Aluko, 2015).

La actividad inhibitoria de la ECA de hidrolizados de guisante obtenidos con termolisina se relacionó directamente con la represión de la expresión de la enzima renina y la disminución de los niveles plasmáticos de angiotensina II y la disminución de la PAS y PAD en ratas Han:SPRD-cy, modelo animal con enfermedad renal crónica (Li *et al.*, 2011). Estudios sobre modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR, por sus siglas en inglés) han establecido algunas características estructurales que poseen los péptidos inhibidores de la ECA. Así, por ejemplo, la presencia de aminoácidos con residuos hidrofóbicos en los últimos 3 aminoácidos del extremo C-terminal ha sido asociada a péptidos con alta actividad inhibidora de la ECA (Shahidi y Zhong, 2008). Estudios de cristalografía han demostrado que péptidos de gran tamaño no logran introducirse en el centro activo de la ECA (Natesh *et al.*, 2003) lo que significa que péptidos con secuencias cortas de entre 2 y 12 residuos de aminoácidos poseen una potente actividad inhibitoria de la ECA (Hernández-Ledezma *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

III. ANTECEDENTES

Desde años anteriores, diversas investigaciones se centran en la obtención de componentes bioactivos a partir de fuentes vegetales que poseen diferentes actividades biológicas, como las que se citan a continuación.

Moscoso *et al.* (2017), realizaron el fraccionamiento y caracterización electroforética de las proteínas de la semilla de cañihua de las variedades Ramis y Cupi-Sayhua, a través de la evaluación de cinco técnicas de fraccionamiento proteico, según la solubilidad de Osborne, considerando solventes, metodologías y tiempo de extracción, para obtener fracciones proteicas con mayores contenidos proteínicos y rendimientos porcentuales, que incentiven a investigaciones posteriores a desarrollar nutraceuticos ricos en péptidos bioactivos. Como resultados obtuvieron que el contenido proteínico de la harina integral de cañihua fue mayor en la variedad Cupi-Sayhua con un valor de 18.7% y en la variedad Ramis con 16.2%. El contenido proteico mayoritario de las fracciones proteicas extraídas a partir de las harinas fue encontrado en las albuminas + NNP (4.4%), seguida de las globulinas (2.8%), glutelinas (2.2%), y finalmente las prolaminas (1.0%). El perfil electroforético mostró patrones similares en número de bandas y diferentes en concentración en ambas variedades. En la fracción albúminas presentaron regiones de polipéptidos entre 5 y 95 kDa y en la globulina 7S presentó regiones entre 4 y 92 kDa, y en globulina 11S entre 4 y 37 kDa.

Hanafi *et al.* (2018), investigaron la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) de hidrolizados proteicos de soya verde (*Glycine max*). En la obtención de los hidrolizados proteicos se emplearon cuatro diferentes proteasas de grado alimenticio, siendo éstos alcalasa, papaína, flavourzima y bromelina. El hidrolizado proteico obtenido con alcalasa fue la que mostró mayor actividad inhibidora de la ECA con un valor de $IC_{50} = 0.13$ mg/mL con un tiempo de hidrólisis de 7 h, seguido de papaína con un IC_{50} de 0.20 mg/mL con un tiempo de 5 h, además la bromelina con un IC_{50} de 0.36 mg/mL con un tiempo 6 h y por último empleando la enzima Flavourzima mostró un IC_{50} de 1.14 mg/mL con un tiempo de hidrólisis de 6 h.

Yang *et al.* (2022), estudiaron tres fuentes vegetales: frijol mungo, maní bambara y guisante amarillo. Su objetivo fue comparar las propiedades de estabilización de espuma de globulinas y albúminas extraídas de tres fuentes de leguminosas y evaluar la efectividad de la purificación de proteínas caracterizando las fracciones proteicas de las leguminosas estudiadas empleando electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, dando lugar a la formación de subunidades proteicas y monómeros. Para la extracción de las fracciones proteicas, como proteínas de almacenamiento emplearon la clasificación de Osborne, las solubles en agua (albúminas), solubles en soluciones salinas (globulinas), solubles en alcohol (prolaminas) y solubles en solución ácida o alcalina diluida (glutelina). Como resultados obtuvieron que los extractos de globulinas tenían contenidos de proteínas que oscilaban entre el 78 y 86.3%, mientras que los extractos de albúminas tenían purezas proteicas más bajas que oscilaban entre el 47.6 y 57.7%. La fracción albúminas presentaron bandas oscuras de pesos moleculares entre 23 y 26 kDa. Algunas globulinas presentaron bandas de baja intensidad similares a las de las fracciones de albúmina, lo que indicó una baja presencia de albúminas, mientras que las bandas con más intensidad y con pesos moleculares más altos las presentaron la fracción globulinas con pesos que oscilaban entre 20-70 kDa.

JUSTIFICACIÓN

IV. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas y a nivel mundial las enfermedades cardiovasculares han ido en aumento y aunque actualmente se cuenta con tratamientos con productos farmacológicos, a la larga puede ocasionar problemas secundarios en la salud del consumidor, en los últimos años se han buscado nuevas alternativas que ayuden a disminuir el desarrollo de estas enfermedades desde los componentes de origen vegetal e incorporarlos en un producto alimenticio, para tener una mayor accesibilidad sobre ellos. Existen reportes donde se han empleado granos de leguminosas para obtener compuestos bioactivos con propiedades funcionales y nutraceuticas. Por otro lado, en nuestro país contamos con una gran variedad de vegetales comestibles que no han sido caracterizados química y funcionalmente, pero siempre han estado presente en la dieta del hombre, entre estas fuentes no estudiadas se encuentran las leguminosas como el frijol gordo (*Phaseolus dumosus*), que representa uno de los alimentos de mayor importancia en la zona baja de la región de la Cañada, del estado de Oaxaca, además se sabe que las leguminosas son fuente importante de nutrientes valiosos, principalmente de proteínas y sobre todo de bajo costo, por eso los investigadores le han puesto especial interés en su estudio para un mayor aprovechamiento. Es por ello, por lo que en esta investigación se propuso utilizar la variedad del frijol gordo (*P. dumosus*) como fuente de proteínas para identificar sus fracciones proteicas y realizar hidrolizados proteicos empleando enzimas comerciales para posteriormente evaluar su efecto antihipertensiva vía *in vitro*, con la finalidad de que estos hidrolizados puedan ser una alternativa para su incorporación en nuevos sistemas alimenticios.

OBJETIVOS

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Obtener los hidrolizados proteínicos a partir de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con actividad antihipertensiva.

5.2. Objetivos Específicos.

1. Caracterizar morfológica y físicamente los granos del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).
2. Caracterizar químicamente la harina y concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).
3. Obtener las fracciones proteicas (albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) del concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) de acuerdo con su solubilidad.
4. Determinar los parámetros de color de la harina y concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).
5. Realizar el perfil electroforético SDS-PAGE de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).
6. Evaluar las cinéticas de hidrólisis enzimática extensivas empleando enzimas comerciales (Alcalasa[®] y Flavourzima[®]) de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) a diferentes tiempos de reacción.
7. Evaluar la actividad antihipertensiva *in vitro* de los hidrolizados proteicos obtenidos de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima y reactivos

El frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) fue adquirido directamente con los pequeños productores de la comunidad de Cerro Ocote, Llano de Árnica, San José Tenango, Teotitlán, Oaxaca, México. Posteriormente fueron trasladados al Laboratorio de Ciencias de los Alimentos del Tecnológico Nacional de México campus Tuxtepec donde fueron procesados.

Todos los reactivos que se ocuparon en esta investigación son marcas reconocidas tales como Sigma Aldrich, J. T. Baker (Phillisburg, NJ, USA). Se emplearon las enzimas Flavourzima® y Alcalasa®, que fueron adquiridas de los laboratorios Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA).

4.2. Caracterización morfológica y física

Se utilizó el método descrito por Mpotokwane *et al.* (2008) para determinar las dimensiones lineales de los granos del frijol gordo. Se determinó la longitud (L), ancho (W), el espesor (T) y el peso a 100 granos seleccionados de forma aleatoria. A partir de dichas dimensiones se calculó el diámetro geométrico (Dg), diámetro aritmético (Da) por las ecuaciones propuestas por Bahnasawy (2007) y la esfericidad (ϕ), utilizando la ecuación propuesta por Mohsenin (1986).

$$D_g = (L W T)^{1/3} \quad \text{Ec. 1.}$$

$$D_a = \frac{(L+W+T)}{3} \quad \text{Ec. 2.}$$

$$\phi = \frac{(L W T)^{1/3}}{L} * 100 \quad \text{Ec. 3.}$$

El volumen (V) se calculó usando la ecuación dada por Mohsenin (1986).

Ecuación 4:

$$Vu (cm^2) = \frac{\frac{4}{3}\pi \cdot (l.b.t)}{1000}$$

La relación de aspecto (R) se determinó por la siguiente relación (Maduako y Faborode, 1990).

$$R = \frac{W}{L} \times 100 \quad \text{Ec. 5.}$$

4.3. Obtención de la harina de frijol gordo.

Para obtener la harina del frijol gordo se utilizó el método de Cruz-Cervera *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Los granos de frijol gordo se secaron en una estufa Binder mod. ED 115, Germany a una temperatura de 50 °C durante 24 h. Posteriormente estos fueron sometidos a un quebrado en un molino Grinding modelo 4-E (Quaker City, USA), una vez que los granos estaban quebrados fue necesario someterlos otras 12 h de secado con la finalidad de alcanzar una humedad menor al 11% y así garantizar la calidad de la harina. Estos granos quebrados se pasaron a un molino de café marca KRUPS® acero inoxidable modelo GX410011V. La harina obtenida se pasó en un tamiz con una apertura de malla de No. 80 (0.177 mm) y se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente cerrado de plástico hasta el momento de su utilización.

4.4. Obtención del concentrado proteico del frijol gordo.

Para obtener el extracto proteico, primero se determinó el punto isoeléctrico de las proteínas del frijol gordo con el método de precipitación isoeléctrica reportado por Bernardino-Nicanor *et al.* (2014) con algunas modificaciones, el cual consistió en dos pasos: en el primero se determinó el pH de máxima solubilidad de las proteínas y en el segundo se determinó el pH de máxima precipitación.

Se preparó una disolución con harina de frijol gordo y agua destilada en una relación 1:14 (p/v), se ajustó el pH con NaOH (1 N) en el intervalo de 9 a 12, se centrifugó a 10 °C durante 30 min a 3500 rpm para encontrar el pH de máxima solubilidad mediante la determinación de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry, encontrando el sobrenadante adecuado se ajustó el pH en un intervalo de 3 a 5 con HCl (1 N), el punto isoeléctrico de las proteínas fue aquel pH donde se obtuvo la menor concentración de

proteínas en el sobrenadante. Una vez ajustado el pH se dejó precipitar la proteína, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 30 min a 10 °C. Se recuperó el precipitado y se realizaron 5 lavados con agua desionizada. El precipitado fue secado en una estufa a 45 °C durante 12 h. Una vez seco el extracto se pasó por una molienda para obtener un polvo fino y fue almacenado hasta su utilización.

4.5. Determinación de proteínas por el método Lowry

La cuantificación de proteínas presente en los sobrenadantes fue determinada por el método de Folin-Lowry, así también para las fracciones proteicas, siguiendo la técnica reportada por García & Rojas, (1985).

Este método consta de dos etapas

- 1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de N de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Se procedió a preparar los reactivos:

1. Solución Standard de seroalbúmina bovina (1 mg/mL)
2. Muestra problema de concentración desconocida
3. Reactivo de Lowry, compuesto de tres soluciones que se mezclaron en el momento de su utilización:
 - A: carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M (0.4 g de NaOH / 100 mL)

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

- B: sulfato cúprico al 1%
- C: tartrato sódico-potásico al 2%
- En el momento de su uso se mezclan 50 mL de A con 0.5 mL de B y 0.5 mL de C y se forma el reactivo de Lowry.
- Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteau se preparó a una relación de 1:4

Se realizó la curva de calibración como se indica en la Tabla 4 según las cantidades correspondientes de cada reactivo.

Tabla 4. Curva de calibración para la determinación de proteínas.

Componentes	Tubos					
	0	1	2	3	4	5
Albúmina (mL)	0.0	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
Agua (mL)	1	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
Reactivo de Lowry (mL)	5	5	5	5	5	5
Se agitó enérgicamente en un vórtex y se dejó reposando durante 15 min.						
Folin-Ciocalteau (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Se agitó enérgicamente en un vórtex y se dejó reposando por 30 min. Se procedió a leer a una absorbancia de 660 nm.

a) Cuantificación de proteína de la muestra

Para la determinación de proteínas de la muestra problema se realizó de acuerdo a lo descrito en la Tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación de proteína de la muestra.

Tubo	Cantidades
Muestra problema (mL)	0.3
Agua destilada (mL)	0.7
React. De Lowry (mL)	5

Se agitó vigorosamente y se dejó reposando por 15 min, una vez transcurrido ese tiempo se procedió a agregar 0.5 mL de la solución Folin-Ciocalteu, se agitó y se esperó otros 30 min de reposo, finalmente se leyó a una absorbancia de 660 nm.

4.6. Análisis químico proximal de la harina desgrasada y concentrado proteico.

Se realizó el análisis químico proximal a las harinas y concentrados proteicos de semillas de frijol gordo, por triplicado de acuerdo con los métodos de la AOAC (2012); humedad (925.10), cenizas (923.03), proteínas (960.59), grasas (920.39), fibra cruda (962.09) y el extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia. La descripción de la metodología del AQP no es necesaria en una tesis de Maestría.

4.7. Obtención de las fracciones proteicas del frijol gordo.

Se utilizó el concentrado proteico para la extracción de las fracciones proteicas con base al criterio de solubilidad de acuerdo al método propuesto por Osborne 1924, adaptado por Teniente *et al.* (2014). La extracción se realizó de manera secuencial partiendo de las albúminas. La fracción de albuminas fue extraída con agua en una proporción de 1:10 (p/v) con agitación constante por 2 h a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min y el sobrenadante conteniendo la fracción de albúminas fue almacenado a 4 °C hasta su utilización. Para la extracción de globulinas el precipitado fue resuspendido en una solución

de NaCl al 10% pH 7.0 y se mantuvo en agitación continua durante 2 h a 4 °C. La suspensión fue centrifugada y las globulinas presentes en el sobrenadante fueron almacenadas. Se resuspendió el precipitado en isopropanol al 70% y la suspensión se agitó durante 2 h a 4 °C, se centrifugó y el sobrenadante correspondió a la fracción de prolaminas. Finalmente, la fracción de glutelinas fue extraída resuspendiendo el precipitado de la fracción anterior en NaOH al 0.1 M. Las fracciones fueron guardadas a 4 °C hasta su utilización. El contenido proteico presente en cada fracción fue cuantificado por el método de Lowry.

4.8. Determinación de color de la harina y concentrado proteico del frijol gordo

El color se determinó usando un colorímetro UltraScan® Vis (HunterLab, Hunter Associates Laboratory Inc., 11491 Sunset Hills Road, Reston, Virginia U.S.A). El equipo instrumental fue calibrado con un estándar blanco. Se obtuvieron los valores L^* (Luminosidad), a^* (+rojo, -verde) y b^* (+amarillo, -azul). La diferencia de color total ΔE fue calculada como: $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$, donde ΔL , Δa y Δb representan la diferencia entre el valor L^* , a^* y b^* respectivamente, entre el estándar y la muestra (Wani *et al.*, 2013). Para la obtención de la paleta y el código de color se empleó el motor de búsqueda EasyRGB (2020).

4.9. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones proteicas e hidrolizados proteicos del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

Las muestras de proteínas solubles totales de la harina y de hidrolizados proteico del frijol gordo fueron analizados utilizando un sistema discontinuo SDS-PAGE, siguiendo la metodología de Laemmli (1970). Las muestras fueron aplicadas en un gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en una cámara electroforética de tipo vertical Mighty Hoefer (Mini-PROTEAN® Tetra (BIO-RAD), Singapore), durante 1 h y 30 min para lo cual se usó una corriente constante de 20 miliamperios. Se procedió a preparar los siguientes reactivos:

a) Regulador Tris 3 M pH 8.8

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

Se pesó 36.3 g de Tris y se midió 0.46 mL de TEMED, los cuales se disolvieron con agua desionizada (60 mL aproximadamente). Se ajustó el pH a 8.8 con HCl diluido y se aforó a un volumen final de 100 mL. Se guardó en refrigeración.

b) Regulador Tris 1 M pH 6.8

Se pesó 5.98 g de Tris y 0.46 mL de TEMED. Se diluyeron con agua desionizada (70 mL aproximadamente). Se ajustó el pH a 6.8 con HCl diluido y se aforó a un volumen final de 100 mL. Se guardó en refrigeración.

c) Solución de SDS al 0.21%

Se procedió a pesar 0.21 g de SDS para disolver en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL. Se puede almacenar en refrigeración.

Solución Stock de Acrilamida-Bis al 30% (Solución para el gel separador y el gel concentrador)

Se pesó 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de Bis-acrilamida. Se disolvió la acrilamida en aproximadamente 70 mL de agua desionizada con agitación. Se agregaron los 0.8 g de bis-acrilamida y se disolvió con agitación constante, finalmente se aforó a 100 mL. Si se observan sólidos es necesario pasarlo a través de un filtro Millipore HA-0.45 μ y se conservó en frasco ámbar.

d) Regulador de electrodos

Se pesaron 6.05 g de Tris, 28.8 g de glicina, 2 g de SDS, se disolvieron a un volumen final de 2 L a un pH de 8.3. Se almacenó en refrigeración.

Posteriormente se prepararon los amortiguadores de las muestras de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de amortiguadores para las muestras

Componentes	Amortiguador Laemmli 2x (con SDS + 2-Me)	Amortiguador con SDS, sin 2-Me	Amortiguador con 2-Me, sin SDS
-------------	--	--------------------------------	--------------------------------

Amortiguador 11 (4x)	5 mL	5 mL	5 mL
SDS al 20%	2 mL	2 mL	-
Glicerol	2 mL	2 mL	2 mL
2-Mercapto	1 mL	-	1 mL
Azul de bromofenol	1 mL	1 mL	1 mL
H₂O desionizada	-	1 mL	2 mL

Nota: las rayitas marcadas dentro del cuadro se sustituyen por agua desionizada

e) Azul de Comassie R-250

Se procedió a pesar 1.25 g de azul de Comassie R-250 en 500 mL de SlnG. Donde SlnG = 400 mL de metanol, 70 mL de ácido acético y 530 mL de H₂O.

f) SDS al 20%

Se pesó 20 g de SDS y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

g) Azul de Bromofenol al 0.02%

Se pesó 0.02 g de azul de bromofenol y se diluyó en 100 mL de agua destilada.

h) Preparación de los geles:

Gel separador al 11% de acrilamida:

- 1.6 mL de SDS al 0.21%
- 1.2 mL de Tris 3 M ph 8.8
- 3.6 mL de acrilamida:Bis
- 54.4 µL de persulfato de amonio al 12.5%

Nota: si se prefiere hacer más concentrado el gel, sólo se cambia la cantidad de acrilamida mediante una regla de tres, lo demás queda igual.

Gel concentrador al 6% de acrilamida

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

- 2.4 mL de SDS al 0.21%
- 0.75 mL de TRIS 1 M pH 6.8
- 1.5 mL de Acrilamida-Bis
- 81.6 μ L de persulfato de amonio al 12.5%

Procedimiento para teñir y desteñir los geles de electroforesis

- Se adicionó aproximadamente 100 mL de solución de ácido tricloroacético al 12.5%.
- Se agitó a 30 rpm durante 30 min.
- Se hicieron lavados con agua destilada (puedes usar agua de la llave) cada 15 min durante 1 h, hasta igualar el pH del agua.
- Se hizo la tinción con azul de Comassie por 3 ó 4 h en el mismo día (o puedes dejarlo toda la noche).
- Al término de la tinción se devolvió la solución teñidora a su botella. Posteriormente se lavó el gel con agua destilada (o agua de la llave).
- Se adicionó la solución de etanol al 50% (Solución I) y se agitó por 15 min, al término de lavar con agua se repitió dos veces más. En la última adición de etanol al 50% ya no se lavó con agua.
- Si planeas dejar el gel toda la noche, poner la solución II (etanol al 5% y ácido acético al 7 y 88% de agua destilada) dejar en agitación y al día siguiente hacer un último lavado con la solución IV (metanol al 25% y ácido acético al 10 y 65% de agua destilada) durante 30 min.
- Si no planeas dejarlo toda la noche poner la solución III (etanol al 30%, ácido acético al 7 y 63% de agua destilada) durante 30 min de agitación. Si el gel se ve todavía azul, tirar la solución y poner más solución III por otros 30 min en agitación.
- Por último, se puso la solución IV durante 30 min con agitación. Si todavía se veía azul se colocó nuevamente la solución IV (esta parte es opcional ya que por lo general los geles quedan bien desteñidos en la solución III).

4.10. Hidrólisis de las fracciones proteicas

Para la hidrólisis del concentrado proteico se utilizó el método empleado por Vercruyssen *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Para el cual se empleó un diseño de bloques aleatorios, donde los bloques fueron las enzimas comerciales Flavourzima[®] y Alcalasa[®], con el tiempo de reacción como factor a evaluar y como variable de respuesta el grado de hidrólisis. Cada enzima se evaluó de manera individual. Por lo que el proceso de digestión se realizó bajo las siguientes condiciones: para la Flavourzima[®] el pH se ajustó a 7 con NaOH (1 M) y se incubó por 90 min a una temperatura de 55 °C con una relación 1/1 (enzima/sustrato). Por otra parte, el pH de la Alcalasa[®] se ajustó a 8 con NaOH (4 M) y se incubó durante 90 min a una temperatura de 55 °C. La hidrólisis se realizó en un vaso de precipitado de 1000 mL, el cual fue equipado con un agitador magnético, termómetro y un electrodo para mantener un control sobre la temperatura y pH de la reacción. En ambos casos se tomaron muestras a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min de reacción. La hidrólisis se detuvo por calentamiento a 85 °C por 15 min a baño maría. Todas las muestras se centrifugaron en una centrifuga (Hettich zentrifugen, Rotina 380 R, Alemania) a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se filtró y se almacenó a una temperatura de 10 °C hasta su utilización.

4.10.1. Determinación del grado de hidrolisis (%GH)

El porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) se determinó por el método de orto-ftalaldehído (OPA, por sus siglas en inglés) siguiendo la metodología de Nielsen (2001). Este método se basa en la reacción entre los grupos amino y el OPA en presencia de un grupo tiol, formando un compuesto colorido detectable a 340 nm. Se preparó 200 mL de reactivo OPA, para ello se pesaron 7.620 g de Sodio tetraborato decahidratado (Borax) y 200 mg de sodio dodecilsulfato (SDS) y se diluyeron en aproximadamente 150 mL de agua destilada en un vaso precipitado de 500 mL, con un agitador magnético y a temperatura aproximadamente de 50 °C para facilitar la disolución. Paralelamente se pesó 160 mg de O-ftaldialdehído (OPA) y se disolvió en 4 mL de etanol al 99% en un vaso de 10 mL con una barra de agitación. Se requiere que ambas mezclas estén completamente disueltas antes de continuar. La solución de OPA fue transferida cuantitativamente a la mezcla de Borax con SDS. Finalmente, se agregaron 176 mg de ditiotreitól (DTT) a la mezcla. Se esperó que se

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

disolviera todo y que no quedaran rastros de los reactivos iniciales y se procedió a aforar a 200 mL con agua destilada. Posteriormente se envasó en una botella ámbar.

Para el estándar de serina se preparó pesando 10 mg de serina en 100 mL de agua desionizada. Para calibrar la solución de OPA previamente preparada se realizó una curva de calibración con el estándar de serina. El estándar de serina se preparó en diluciones entre 0 y 100 mg/L y se obtienen absorbancias aproximadas entre 0 y 0.7000 nm respectivamente. Para obtener la absorbancia se procedió a tomar 200 μ L de uno de los estándares de serina y se le agregó 1.5 mL de reactivo OPA se esperó 2 min para leer a 340 nm en el espectrofotómetro.

Una vez construida la curva de calibración con serina, se procedió a medir la cantidad de grupos aminos libres mediante el reactivo OPA. Los tubos de ensaye para el análisis consistieron en triplicados de estándar (serina), blanco (agua) y muestra (hidrolizado). A cada tubo se agregaron 3 mL del reactivo OPA y 400 μ L de la muestra, del blanco o del estándar, se mezcló por 5 s en un vórtex y después de 2 min de reacción se realizó la medición de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UV-Visible.

Se calculó con las siguientes fórmulas:

Determinación de h ,

$$\text{Serina NH}_2 = \frac{OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{blanco}}}{OD_{\text{standar}} - OD_{\text{blanco}}} + 0.9516 \frac{\text{meqv}}{L} + \frac{0.1-100 L}{X+P} \frac{L}{g} \text{proteína} \quad \text{Ec. 6.}$$

Serina NH₂ = meqv de serina NH₂/g proteína

X = μ L de muestra

P = porcentaje de proteína de la muestra g

0.1 es el volumen de la muestra de un litro.

Por lo tanto, h es,

$$h = \frac{\text{Serina NH}_2 - \beta \text{ meqv}}{a} \text{ g proteína} \quad \text{Ec. 7.}$$

Para la obtención del grado de hidrólisis se aplicó la ecuación 13:

$$\% \text{ GH} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad \text{Ec. 8.}$$

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

4.10.2. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (actividad antihipertensiva).

Para evaluar la actividad de la enzima inhibitorio-convertidora de angiotensina se utilizó el método espectrofotométrico propuesto por Cushman & Cheung (1971), con algunas modificaciones. Para 200 mL (pesar 1.1082 g de H_3BO_3 + 0.7920 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ + 3.5 g NaCl), se disolvió en agua desionizada y se ajustó a pH 8.3 y se aforó a 200 mL. A 100 mL del sustrato (HHL) se le añadieron 40 mL de cada una de las muestras cuya actividad inhibitoria de la ECA se quiere determinar. Se añadió 2 mU de la enzima ECA (EC 3.4.15.1, 5.1 U/mg) (Sigma), disuelta en glicerol al 50%. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 min. La enzima se inactivó por descenso del pH, adicionando 150 mL de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado se extrajo con 1000 mL de acetato de etilo. Tras agitación y posterior centrifugación a 4000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, se tomaron 750 mL de la fase orgánica. Este volumen se evaporó por calentamiento a 95 °C durante 15 min. Las muestras se prepararon como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reactivos para la actividad ECA

	CONTROL		BLANCO		TRATAMIENTO
HHL	100 μL	HHL	100 μL	HHL	100 μL
H₂O	40 μL	MUESTRA	40 μL	MUESTRA	40 μL
ECA	2 mU (10 μL)	H₂O	2 mU (10 μL)	ECA	2 mU (10 μL)

Maestría en Ciencias en Alimentos TecNM Instituto Tecnológico de Tuxtepec

El residuo de ácido hipúrico se disolvió en 800 mL de agua destilada y tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c Thermo Scientific, Bancroft Building Wilmington, EE.UU.), y se obtuvo el promedio de absorbancia de cada tipo de mezcla de reacción. Para cada muestra evaluada se calculó el % de actividad IECA con la ecuación 14:

$$\text{Actividad inhibitoria ECA (\%)} = \frac{(\text{Abscontrol} - \text{Absmuestra})}{(\text{Abscontrol} - \text{Absblanco})} \times 100 \quad \text{Ec. 9.}$$

9.

Los valores de IC_{50} (concentración media inhibitoria necesaria para inhibir el 50% la actividad de la ECA) se determinaron graficando los porcentajes de inhibición de la ECA frente a los valores semilogarítmicos de las concentraciones de muestra siguientes.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron evaluados mediante un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% y en todos los casos se realizó una comparación de medias por el método de mínima diferencia significativa (LSD, por sus siglas en inglés) para establecer las diferencias entre los tratamientos empleando una prueba de Fisher. Todos estos análisis se efectuaron utilizando el software Statgraphics Centurion 16.103 (Montgomery, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis morfológico del grano de frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

En la Tabla 8 se presenta el estudio morfológico de los granos de frijol gordo (*Phaseolus dumosus*). El frijol gordo mostró un valor promedio de 13.94 mm de largo, superior a lo reportado por Gómez-Aldapa (2010) para las variedades Pinto Saltillo y Negro San Luis, donde obtuvieron valores de 12.90 y 11.83 mm, respectivamente e inferior en comparación con la variedad Bayo Victoria que también caracterizó este autor obteniéndose un valor de 14.84 mm de largo. En cuanto al ancho se obtuvo un valor de 9.51 mm el cual fue similar a lo reportado en el frijol variedad Bayo Victoria, Pinto Saltillo y Negro San Luis, con valores de 9.52, 7.12 y 8.23 mm, respectivamente, reportado por el mismo autor. Por otro lado, Mex-Álvarez *et al.* (2021) en la variedad *Phaseolus vulgaris*, frijol de Holpechén, Campeche, reporta el ancho de esta variedad un valor de 6.6 mm, inferior a lo reportado en este estudio. En lo que respecta al parámetro del espesor el frijol gordo presentó un valor de 7.23 mm. Morales-Santos (2017), reportó valores de espesor en variedades de frijol que denominaron semillas silvestres y domesticadas, donde obtuvieron 2.6 mm y 4.9 mm, respectivamente, valores inferiores a lo reportado en esta investigación y Mex-Álvarez *et al.* (2021), reportaron un valor de 4.4 mm de espesor en *Phaseolus vulgaris*.

Tabla 8. Valores morfológicos de frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

Parámetros	Valores obtenidos
Longitud (mm)	13.94 ± 1.10
Ancho (mm)	9.51 ± 0.68
Espesor (mm)	7.23 ± 0.46
Peso (g)	0.62± 0.08

Los resultados son el promedio de 100 repeticiones ± desviación estándar.

El grano de frijol gordo en estudio es de tamaño grande, ya que sobresale en longitud y ancho. En este sentido, Gontia y Awasthi (1999) señalaron que la emergencia y desarrollo de las plántulas de granos grandes es mayor, y que éstas luego tienen mejor desarrollo

vegetativo y reproductivo por las mayores reservas de nutrientes en su interior. Las diferencias entre la variedad estudiada y las referenciadas, se le puede atribuir a que son variedades diferentes y a las condiciones climatológicas del lugar donde fueron cultivados los frijoles, así como los cuidados que se consideraron para la planta, además juega un papel importante las características de los suelos, así como la concentración de nutrientes presentes, por lo que pudieran interferir en los resultados en cada muestra. El tamaño del grano y el desarrollo de estas, están relacionados con la eficiencia en la asignación de biomasa al grano en el ambiente de crecimiento, además depende de características de la semilla, como el vigor (Morales-Santos, 2017).

7.2. Propiedades físicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

A partir de los parámetros morfológicos que se obtuvieron de los granos del frijol gordo (*P. dumosus*) se calcularon los parámetros físicos, como se presenta en la Tabla 9. El frijol gordo mostró un diámetro geométrico y aritmético de 9.85 y 10.23%, valores menores a lo reportado por Niveditha *et al.* (2013) en frijol *Canavalia ensiformis*, un grano que tiene un aspecto similar al de un frijol. De acuerdo con el internacional Board For Plant Genetic Resources (1982) se pueden encontrar las siguientes formas de grano de frijol: redonda, ovalada, cuboide, forma de riñón, truncada fastigiada; de acuerdo con la esfericidad reportada en esta investigación el frijol gordo tiene una representación ovalada, mostrando una esfericidad de 70.83%, un valor cercano a 100 resulta en una mayor tendencia a rodar. El volumen de este grano fue de 4.05 cm³. La relación de aspecto fue de 68 lo que nos podría indicar un mayor deslizamiento.

Tabla 9. Parámetros físicos de frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

Parámetros	
Diámetro geométrico (mm)	9.85 ± 0.57
Diámetro aritmético (mm)	10.23 ± 0.62
Esfericidad (%)	70.83 ± 3.34
Volumen (cm ³)	4.05 ± 0.72
Relación de aspecto	68.40 ± 5.17

Los resultados son el promedio de 100 repeticiones ± desviación estándar.

Las propiedades geométricas y físicas de productos agrícolas son investigados con la finalidad de entender su comportamiento mecánico. La importancia que tiene conocer estas propiedades, son útiles si se quisiera diseñar equipo u operaciones de transformación del producto para conseguir un periodo más largo de almacenamiento (Guerrero-Martínez *et al.*, 2023).

7.3. Composición química de la harina y concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

La caracterización químico proximal de la harina y concentrado proteico se presenta en la Tabla 10. Se puede observar que el contenido de humedad de ambas materias primas es inferior al 10%, lo que podría garantizar una vida de anaquel del “grano o semillas” por más tiempo, siempre y cuando se consideren las condiciones adecuadas de almacenamiento. Los resultados son comparados con lo reportado por Tovar *et al.* (2016) en harina y concentrado proteico de frijol bayo (*Phaseolus vulgaris* L.), obteniendo contenidos de humedad de 7.12 y 5.58%, respectivamente, estos valores son similares a lo obtenido en esta investigación, ya que en harina se obtuvo un valor de 7.21% y en el concentrado proteico fue de 6.05% de humedad. La disminución del porcentaje de humedad que se aprecia en el concentrado proteico en comparación con la harina, se le puede atribuir a las condiciones que se emplearon para su obtención, así como el proceso de secado que fue necesario someterlo, eliminándose así la mayor cantidad de humedad posible.

En lo que respecta al contenido de proteína, en la harina del frijol gordo se encontró un contenido proteico de 24.86%, este valor lo convierte en una materia prima con potencial para la obtención de un concentrado proteico a partir de esta leguminosa; este contenido fue mayor a lo obtenido por Tovar *et al.* (2016) en la variedad bayo reportaron un valor de 23.05%, por otro lado, estos autores informaron un contenido proteína en el concentrado proteico de 63.13%, el cual fue menor a lo reportado en esta investigación (66.51%). Marrugo-Ligardo *et al.* (2016) obtuvieron un contenido proteico similar a lo obtenido en este estudio para el concentrado de proteínas de *Phaseolus lunatus*, con un valor de 66.8%. Estas diferencias podrían ser debidas a que son variedades diferentes, fueron cultivadas en distintos lugares y por ende las propiedades de cultivo y de suelo son distintas, por lo que la composición química de estas difiere en su contenido de nutrientes.

Tabla 10. Composición químico proximal de la harina y del concentrado proteico

Parámetros (%)	Harina	Concentrado Proteico
Humedad*	7.21 ± 0.02 ^a	6.05 ± 0.10 ^b
Cenizas	5.27 ± 0.07 ^b	6.22 ± 0.62 ^a
Grasas	2.59 ± 0.27 ^a	2.17 ± 0.33 ^a
Proteínas	24.86 ± 0.38 ^b	66.51 ± 0.44 ^a
Fibra	2.49 ± 0.59 ^b	3.02 ± 0.02 ^a
ELN	57.58 ± 0.26 ^a	16.03 ± 0.30 ^b

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. ^{a-b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística ($p < 0.05$). *Todos los resultados están expresados en base seca, excepto la humedad. ELN = Extracto libre de nitrógeno.

En cuanto al contenido de grasas, la harina evaluada presentó un contenido de 2.59%, este valor disminuyó en el concentrado proteico, mostrando un contenido de 2.17%, En algunos casos, los concentrados proteicos de las leguminosas muestran un contenido de grasas mayor al de sus respectivas harinas, este comportamiento puede deberse a que, durante la saponificación de los lípidos, algunos se solubilizan durante la fase acuosa y estas son transportada al precipitado proteico (Chel-Guerrero *et al.*, 2002).

El contenido de fibra (Tabla 10) en la harina fue de 2.49%, este contenido aumentó a 3.02 en el concentrado proteico, esto podría deberse a la complejidad en cuanto a la composición de las leguminosas, como las considerables cantidades de constituyentes no proteicos, lo que sugiere que durante la obtención del concentrado, precipitan junto con las proteínas en forma de fosfolípidos, pectinas y otros polisacáridos estructurales (González-Quijada, 1999).

La compleja composición de las legumbres, donde la proteína está asociada a los carbohidratos, forma estructuras cristalinas por la baja cantidad de agua, y la interacción carbohidrato-proteína es de vital importancia en las plantas como en procesos biológicos (Hernández-Cruz *et al.*, 2005).

El contenido de extractos libres de nitrógeno (ELN) presente en la harina fue de 57.58% y en el concentrado proteico fue de 16.03%, esta disminución puede deberse que, para la obtención del concentrado se hacen varios lavados y se tamiza una vez solubilizada las proteínas con la finalidad de eliminar el mayor contenido posible de residuos de carbohidratos, generalmente almidones, que quedan atrapados en el tamiz durante la fase acuosa.

La importancia que tiene el estudio de la composición química de los alimentos nos permite no sólo conocer la proporción de las macromoléculas que las integran, sino que con base en ello se infiere su calidad nutritiva y además se establecen las bases para un mayor conocimiento y valoración de estos (Ramos *et al.*, 2012).

7.4. Color de la harina y concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

En la Tabla 11, se puede observar que la harina del frijol gordo presenta una mayor luminosidad que el concentrado proteico, ya que la harina tuvo un valor de L^* de 85.45, este valor es similar a lo reportado por Dussan-Sarria *et al.* (2019), para la harina de quinoa (84.87), por otro lado, el concentrado proteico, tuvo un valor de L^* de 63.50, con una tendencia oscura, esto se le atribuye por el medio alcalino que fue sometido para su obtención, por lo que, se vio afectado la luminosidad, además durante la obtención del concentrado proteico fue necesario eliminar “impurezas” como los carbohidratos, por ejemplo, los almidones mediante un tamizado durante la fase acuosa, reteniéndose el bagazo en el tamiz.

El parámetro a^* en la harina se observó un valor de 1.69, mientras que en el concentrado proteico presentó un valor de 7.46. Mientras que, el parámetro b^* , la harina del frijol gordo presentó un valor de 7.54 en comparación el concentrado proteico que presentó un valor superior de 14.25, con mayor tendencia a la coloración amarilla.

Por otro lado, el valor de C^* está asociada a que tan vivido es un color, según Dussán-Sarria *et al.* (2019), a mayores valores de los parámetros a^* y b^* corresponden mayores valores de cromaticidad, esto se cumple en este estudio donde se observa que en la harina presenta valores inferiores de a^* y b^* correspondiendo un valor de cromaticidad de 7.73, mientras que en el concentrado proteico presentó valores superiores de a^* y b^* correspondiendo a un valor de cromaticidad de 16.08, lo que significa que presenta una mayor saturación de color.

Tabla 11. Análisis de color de la harina y del concentrado proteico de frijol gordo.

Parámetros	Harina	Concentrado proteico
Luminosidad (L^*)	85.45 ± 0.21 ^a	63.50 ± 0.02 ^b
Enrojecimiento (a^*)	1.69 ± 0.15 ^b	7.46 ± 0.27 ^a
Amarillamiento (b^*)	7.54 ± 0.06 ^b	14.25 ± 0.02 ^a
Saturación (C^*)	7.73 ± 0.09 ^b	16.08 ± 0.13 ^a
Matiz o tono (h°)	77.43 ± 0.98 ^a	62.37 ± 0.81 ^a
Rojo (%R)	35 ± 0.01 ^b	39 ± 0.58 ^a
Verde (%G)	33 ± 1.15 ^a	33 ± 0.01 ^a
Azul (%B)	31 ± 0.58 ^a	28 ± 0.01 ^b
Paletas de color		
Código de color	#ded3c7	#b09480

^{a-b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

El ángulo Hue (h°) que es el parámetro que nos da el tono o matiz de una muestra, en la harina presentó un valor superior (77.43), mientras que el concentrado presentó un valor de 62.37, mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con diferentes tonalidades o matiz. El parámetro del h° representa el color real de la muestra, el cual es necesario para la visualización de la apariencia del color de los productos alimenticios (Dussán-Sarria *et al.*, 2019). Cabe hacer mención que en la Tabla 11, también se presentan los porcentajes de color rojo, verde y azul, donde el color rojo es el que está en mayor concentración (35 y 39%) en harina y concentrado proteico, respectivamente, lo que da como resultado en la paleta y código de color de cada muestra.

Es importante caracterizar el color de las harinas como una propiedad física, sobre todo si ésta tendrá una aplicación en la industria alimentaria, de esta manera definir las concentraciones requeridas necesarias en el diseño o mejora de productos alimenticios.

7.5. Solubilidad de las proteínas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

El concentrado proteico se obtuvo mediante precipitación isoeléctrica, para ello fue importante encontrar la solubilidad de las proteínas. En la Figura 2 podemos apreciar la mayor solubilidad de las proteínas del frijol gordo, a un intervalo de pH básico de 10 a 11, siendo a un pH 11 donde se observó la máxima solubilidad de las proteínas presentes en este frijol con un contenido proteico de 54.66% en el sobrenadante, esto se debe a que en un medio alcalino son más accesibles las proteínas de esta variedad de frijol debido a que son parcialmente desnaturalizadas. Estos valores pueden ser comparadas con lo obtenido por Teniente (2014) en la variedad de frijol morado y negro, obteniendo una máxima solubilidad a un pH cercano a 12. La extracción de proteínas a menudo se realiza mediante extracción alcalina, como lo utilizado en este estudio, solubilizando las proteínas a un pH alcalino, para posteriormente concentrar la proteína mediante precipitación. El aumento de la solubilidad de las proteínas se debe a un despliegue parcial de la estructura de la proteína terciaria conocida como estructura de “glóbulo fundido”, esto es causado por una mayor repulsión en las cadenas laterales de la proteína al experimentar condiciones extremas de pH tal como lo menciona Juul *et al.* (2023).

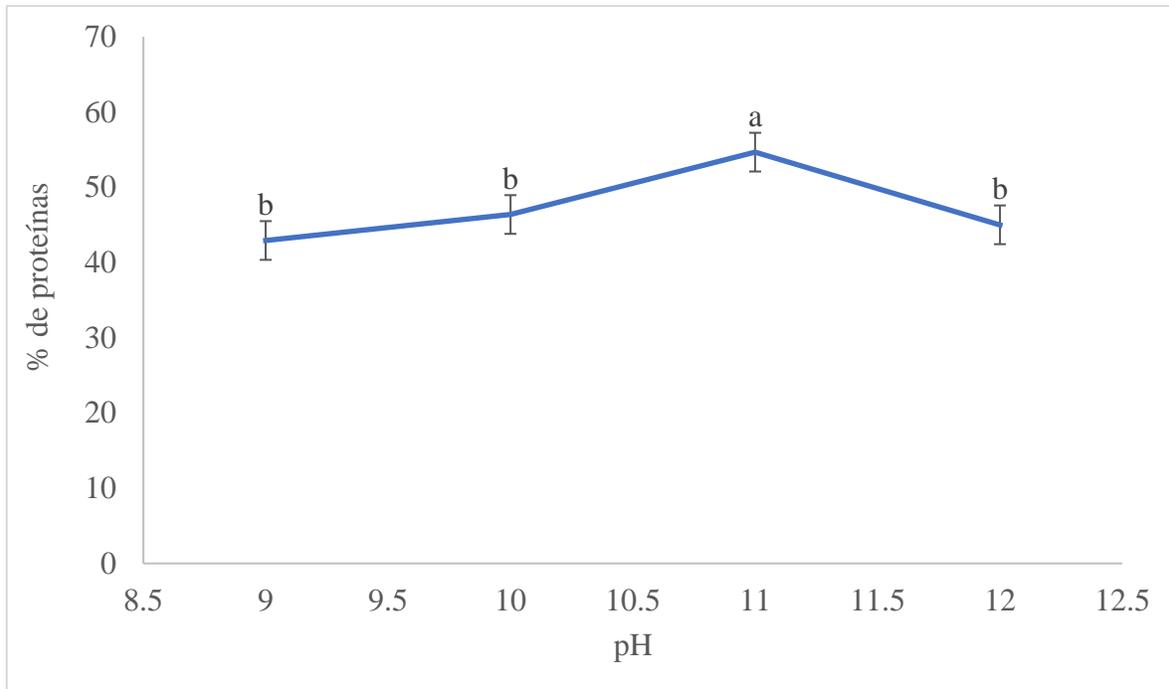


Figura 2. Curva de solubilidad de las proteínas a diferentes pH's.

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones. ^{a-b}Letras diferentes en la curva indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

La solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga y en consecuencia, de la cantidad de residuos de aminoácidos hidrofílicos presentes. La solubilidad se debe a los radicales libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos (Silva, 2006). Cabe hacer mención, que el perfil de solubilidad se ha empleado como una guía para la determinación de la funcionalidad de proteínas de diversas fuentes, ya que, se relaciona directamente con propiedades como la capacidad para la formación de emulsiones, espumas y geles (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017).

7.6. Precipitación de las proteínas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

Después de determinar la solubilidad de las proteínas presentes en la harina del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*), se procedió a determinar el punto isoelectrico de estas, es decir, una precipitación en la región ácida, considerando un intervalo de pH ácido entre 4.0 a 4.7, como se muestra en la Figura 3. Se encontró un punto isoelectrico de 4.3 en las proteínas solubilizadas a pH básico de 11. Esta determinación fue de acuerdo con el contenido de proteínas presente en el concentrado ya que este mostró un contenido de proteínas de 66.51%. Por lo que, el punto isoelectrico es clave importante para lograr que precipiten las proteínas. Estos resultados fueron comparados con lo obtenido por Teniente (2014), en dos variedades de frijol (morado y negro) donde obtuvieron el mismo punto isoelectrico de 4.0 en ambas variedades.

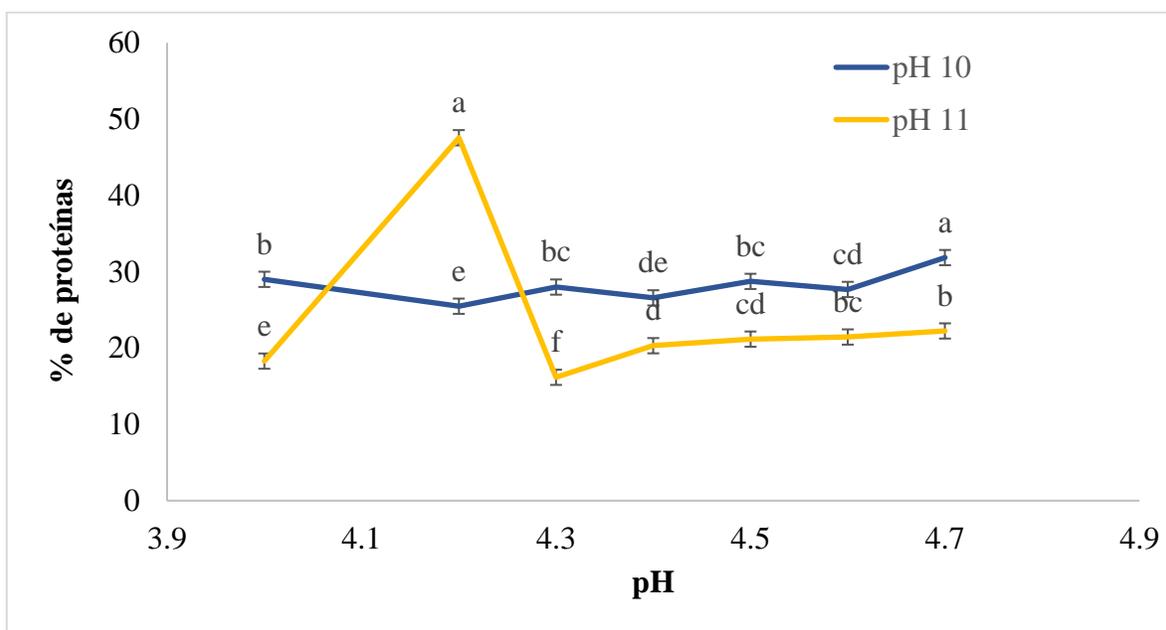


Figura 3. Punto Isoeléctrico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones. ^{a-f}Letras diferentes en cada cinética de hidrólisis indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los diferentes pH de punto isoelectrico para cada materia prima (analizada y referenciada) se pudiera atribuir por la naturaleza de cada muestra, a las variedades de los frijoles, otro

factor importante sería la metodología empleada para cada estudio. Por lo que, se muestra que el efecto del pH en la solubilidad de las proteínas es útil para conocer el punto isoeléctrico. Partiendo desde valores de pH ácidos, hasta que alcanza el punto isoeléctrico, debido a la pérdida de fuerzas de repulsión electrostáticas, lo que proporciona condiciones favorables para la formación de agregados proteicos, la alta densidad aparente y el gran diámetro de los agregados resultan en la precipitación de la proteína, mientras que, las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las proteínas con carga positiva ayudan a mantenerlas separadas y aumentar las interacciones de proteínas y solvente y por tanto la solubilidad a valores de pH básicos (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2017).

7.7. Fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

El fraccionamiento de las proteínas de la semilla de frijol resulta ser muy conveniente, ya que, se inicia la caracterización de las proteínas de reserva de una variedad de frijol que aún no ha sido estudiada del todo, como es el caso del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*). Se obtuvieron las fracciones proteicas del frijol gordo siguiendo la metodología de Osborne (Figura 4). Las fracciones proteicas mayoritarias fueron las globulinas y las albúminas con un contenido de proteínas de 56 y 29% respectivamente. Y en menor proporción fueron las fracciones proteicas prolaminas y glutelinas, con un contenido de proteínas de 12.07 y 9.71%, respectivamente. Lo cual, cumple con lo que se fundamenta en la literatura, dónde indica que las fracciones proteicas más abundantes y analizadas en las leguminosas son albúminas y globulinas (Aguilar-Raymundo & Vélez-Ruiz, 2013).

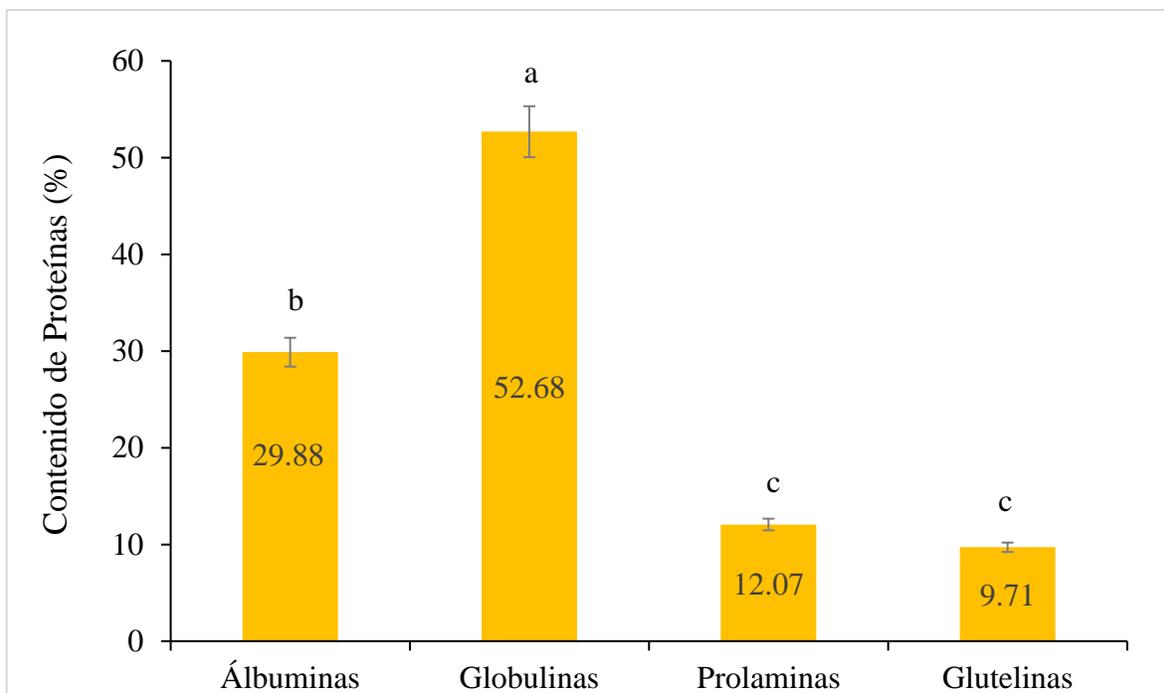


Figura 4. Fracciones proteicas extraídas del concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*).

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones. ^{a-c}Letras diferentes en la curva indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Estos resultados son comparados con lo reportado por Reyes-Bautista (2017) en amaranto, donde la mayor fracción fueron las albúminas con un 46.41% de proteína, seguida de la fracción glutelina y globulina con un 22.4 y 12.08% respectivamente y en menor proporción las prolaminas, esto por tratarse de un pseudocereal, por otro lado, Gallegos-Tintoré *et al.* (2004) obtuvieron como fracción mayoritaria las albúminas (26.4%) seguidas de globulinas (14.8%) a partir de la harina de *P. lunatus*.

Las variaciones observadas podrían ser atribuidas a diferentes factores, entre los cuales se encuentran, distinta variedad, proceso de extracción diferente y características de la harina usada en la extracción; ya que se ha demostrado que existen variaciones en los resultados cuando se maneja harina desengrasada o sin desengrasar (Nikokyris y Kandylis, 1997). También se sabe que factores como el tamaño de partícula de la harina, la fuerza de agitación, la relación entre la harina y disolvente, el número de extracciones por etapa, así

como el estado fisiológico de la semilla, influyen en la proporción de las fracciones proteicas presentes en la harina analizada (Gallegos-Tintoré *et al.*, 2004).

Durante la preparación convencional de leguminosas, que incluye remojo y cocción, proteínas abundantes y solubles como la albumina, y otras como las vicilinas, convicilinas y leguminas, consideradas globulinas, son liberadas en su matriz. A estas proteínas se les han adjudicado algunos efectos fisiológicos que incluyen la disminución de la colesterolemia, reducción de la glicemia postprandial, y efectos antihipertensivos y anticancerígenos (Hidalgo *et al.*, 2018).

7.8. Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*)

A partir de las fracciones proteicas extraídas del concentrado proteico del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*), de acuerdo con su solubilidad, se formaron los hidrolizados proteicos mediante hidrólisis enzimática, empleando las enzimas comerciales, Alcalasa[®] y Flavourzima[®]. La hidrólisis enzimática consistió en la ruptura de moléculas de las proteínas en péptidos de diferentes tamaños.

7.8.1. Hidrólisis enzimática con la enzima Alcalasa[®]

Se seleccionaron las fracciones mayoritarias encontradas en el concentrado proteico del frijol gordo, siendo las globulinas, seguidas de las albúminas. En la Figura 5 observamos el grado de hidrólisis empleado la enzima Alcalasa[®] con un tiempo de reacción de 60 min para ambas fracciones.

La hidrólisis con Alcalasa[®] de la fracción globulinas tuvo un incremento rápido de %GH en los primeros 20 min, y esta fue incrementando conforme el tiempo fue avanzando hasta alcanzar un GH de 22.47% a los 60 min de reacción. Mientras que, la hidrólisis de la fracción albúminas alcanzó a los 60 min de reacción un GH de 12.89%. En ambas fracciones se lograron obtener hidrolizados proteicos con GH >10%, indicando que se alcanzó una hidrólisis extensiva, lo que pudiera estarse generando péptidos bioactivos con

diferentes actividades biológicas. Además, estos resultados nos podrían estar indicando la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en las fracciones, encontrándose más en las globulinas ya que la enzima Alcalasa[®] actúa como endo-peptidasa, que escinde enlaces peptídicos del interior de la cadena polipeptídica. Esta enzima comercial es específica a enlaces peptídicos de aminoácidos hidrofóbicos y produce principalmente oligopéptidos/polipéptidos pequeños y medianos (López-García *et al.*, 2019).

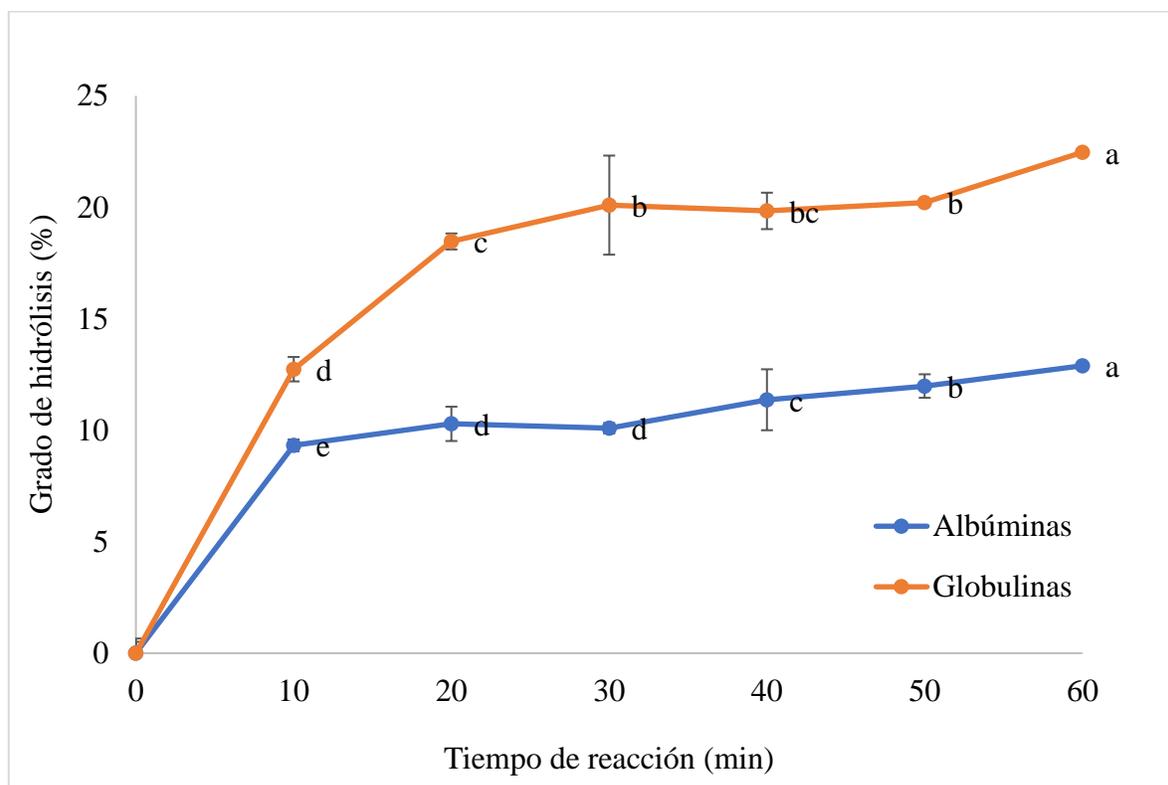


Figura 5. Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con la enzima Alcalasa[®].

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones. ^{a-d}Letras diferentes en la misma curva indican diferencia estadística ($p < 0.05$)

Estos resultados son comparados con lo obtenido por Reyes-Bautista (2017), donde alcanzaron grado de hidrólisis menores al 10% en ambas fracciones proteicas obtenidas a partir del amaranto, durante los primeros 60 minutos, estas diferencias se pueden deber por la naturaleza de cada materia prima o la concentración de enzima/sustrato, además de las condiciones que fueron realizadas. Por otro lado, se ha demostrado que la enzima Alcalasa[®] se encuentra entre las proteasas más eficientes, mostrando en la mejora de propiedades

nutracéuticas y funcionales de los hidrolizados que se obtienen durante su actividad, y estos hidrolizados muestran actividades antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, entre otras (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020).

7.8.2. Hidrólisis enzimática con la enzima Flavourzima®

La cinética de hidrólisis enzimática con Flavourzima®, se muestra en la Figura 5, donde se puede ver que la fracción albúminas alcanzó mayor GH a los 60 min con un 21.97%, mientras que, el GH de la fracción globulinas fue menor (GH = 5.16% a los 60 min de reacción). En la fracción albuminas hubo una ligera disminución del GH a los 40 min de reacción (19.66%), dicha disminución pudo deberse a una inhibición enzimática por productos generados de la reacción, desnaturalización parcial de la enzima, competencia entre proteína no hidrolizada y péptidos que empiezan a formarse constantemente durante el proceso de hidrólisis (López-García *et al.*, 2019). En general estos resultados nos podrían estar indicando la presencia de aminoácidos aromáticos en la fracción albúminas y en menos proporción en globulinas, ya que la enzima Flavourzima® tiene especificidad tanto endo como exo peptidasa y es específica a enlaces peptídicos de aminoácidos aromáticos. Además, la enzima Flavourzima® puede producir componentes de bajo peso molecular e incluso aminoácidos libres (López-García *et al.*, 2019).

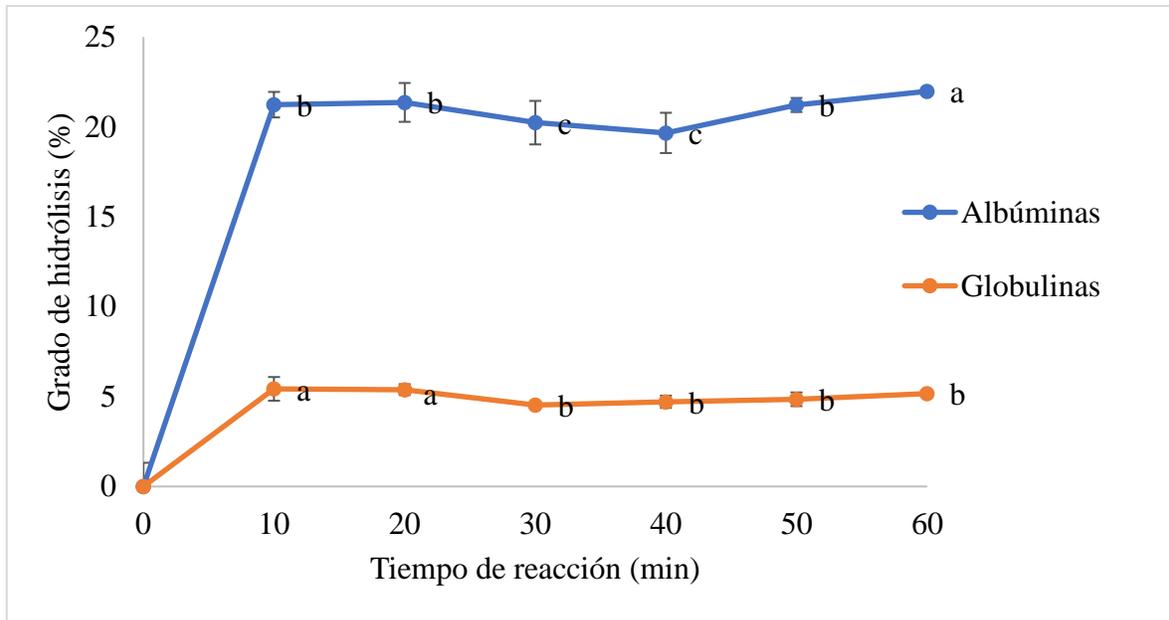


Figura 6. Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con la enzima Flavourzima®.

Los resultados son el promedio de 3 repeticiones. ^{a-c}Letras diferentes en la misma curva indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en esta investigación en la fracción globulinas son menores a lo reportado por García *et al.* (2017), empleando Flavourzima® y como sustrato el concentrado proteico de *Vigna unguiculata*, donde a los 60 min de reacción los autores reportaron un GH de 7.27%, mayor que lo reportado en esta investigación. Estas diferencias pueden deberse a las distintas estructuras primarias de las proteínas utilizadas como sustrato, ya que la muestra referenciada fue a partir de un concentrado proteico y en esta investigación fue de la fracción globulinas. Por otro lado, López-García *et al.* (2019) determinaron el grado de hidrólisis del concentrado de proteína de la chíá (*Salvia hispanica* L.) empleando la enzima Flavourzima®, donde obtuvieron que a los primeros 30 min de reacción el GH fue superior al 25% y a partir de ese tiempo hasta los 60 min de reacción hubo una disminución. En este estudio la enzima Flavourzima®, en la fracción albúminas, mostró amplia especificidad produciendo hidrolizados superior al 20%, durante los seis tiempos de reacción.

La importancia de los hidrolizados proteicos por acción enzimática se encuentra en su utilización para la modificación de la funcionalidad de la proteína de las leguminosas mediante la formación de los péptidos que muestran diversas actividades. La composición de aminoácidos de estos péptidos va a depender de factores, como la especificidad de la proteasa, el sustrato proteico, el grado de hidrólisis, tiempo de reacción, entre otros, donde el GH es un parámetro importante que refleja la eficiencia de la hidrólisis y va a estar estrechamente relacionado con la distribución del peso molecular de los péptidos (Xu *et al.*, 2021).

7.9. Electroforesis de las fracciones e hidrolizados proteicos del frijol gordo
(Phaseolus dumosus)

La distribución de los pesos moleculares de las fracciones proteicas (albúminas y globulinas) y de los hidrolizados a diferentes tiempos de reacción se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). La electroforesis SDS-PAGE es una técnica ampliamente usada para el análisis y caracterización de proteínas bajo condiciones reductoras y como indica la literatura que las leguminosas poseen grandes cantidades de proteínas de almacenamiento que pueden ser clasificadas de acuerdo a su solubilidad (Quinga-Paucar, 2017).

7.9.1. Distribución de pesos moleculares de la fracción globulina e hidrolizados del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con enzimas comerciales.

En la Figura 7 se muestra la distribución de pesos moleculares de la fracción e hidrolizados de globulinas con la enzima Alcalasa[®]. En el carril 1 se inyectó el marcador estándar de proteínas de amplio rango de peso molecular. En el carril 2 se inyectó la muestra globulina, previamente preparada, de la misma forma los hidrolizados proteicos en los carriles restantes. En la fracción globulinas se mostraron 4 bandas de diferentes pesos moleculares con pesos moleculares entre 16 a 96 kDa. Hubo una banda tenue de 16.2 kDa, mientras que las demás bandas fueron más intensas siendo la banda de 96.1 kDa la de mayor peso molecular.

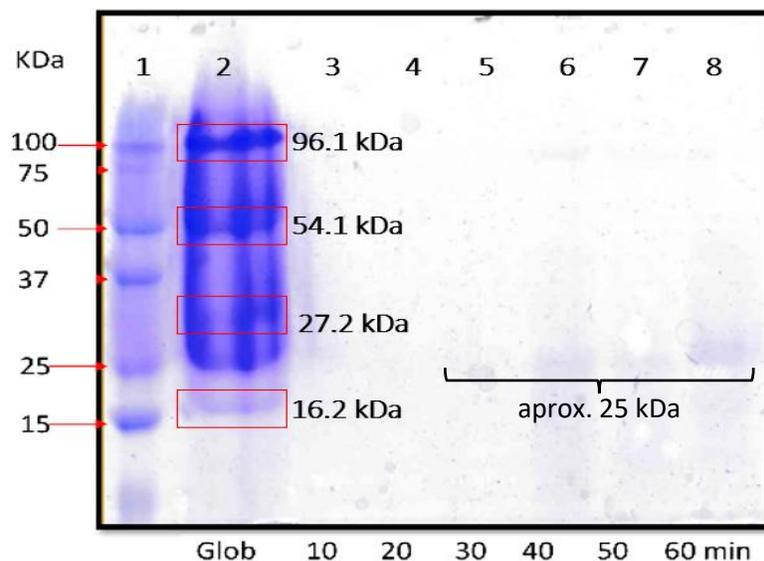


Figura 7. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción globulinas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción globulinas; carril 3-8: Hidrolizados de globulinas con Alcalasa[®].

En cuanto a los hidrolizados que fueron inyectados al gel, no fue posible la resolución de las bandas proteicas en ellas, en la Figura 7, apenas se observan bandas de aproximadamente de 25 kDa en los diferentes tiempos de reacción, estos resultados puede deberse a que los hidrolizados obtenidos fueron menor tamaño por lo que, no fue retenido por el gel separador o en su caso la tinción utilizada en este proyecto (azul de Coomasie) no fue la adecuada, por lo que valdría la pena ocupar otro tipo de tinción que pueda revelar péptidos de muy bajo pesos molecular.

Por otro lado, en la Figura 8 se presenta el patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción globulinas sin hidrolizar e hidrolizados de la fracción con la enzima Flavourzima[®]. El perfil proteico que presenta la fracción globulinas sin hidrolizar es similar al perfil que se muestra en la Figura 7, ya que se trata de la misma muestra, aunque varía ligeramente en los pesos moleculares que van de 17.8 a 89.4 kDa. Según los pesos moleculares que se reporta en la literatura, algunas bandas se pueden clasificar como proteínas de

almacenamiento principales como la banda de 74 kDa que corresponde a convicilina, la banda de 50 kDa a la vicilina, la banda de 36 kDa a α -legumina y la de 24 kDa a β -legumina, ya que se ha reportado del gran polimorfismo molecular que se encuentra en las proteínas de legumina y vicilina del frijol (Nikolic *et al.*, 2012).

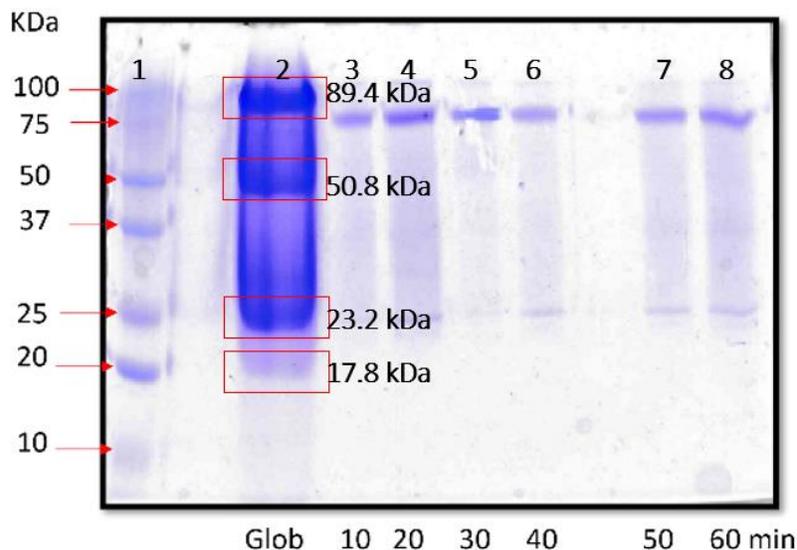


Figura 8. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción globulinas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción globulinas; carril 3-8: Hidrolizados de globulinas con Flavourzima®.

En cuanto a los hidrolizados de esta fracción con la enzima Flavourzima® se observan polipéptidos bandas intensas superior a 75 kDa de peso molecular en todos los hidrolizados a diferentes tiempos de reacción, así también se observan bandas ligeras de péptidos con peso molecular menor de 25 kDa.

7.9.2. Distribución de pesos moleculares de la fracción albúmina e hidrolizados del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) con enzimas comerciales.

En la Figura 9 y 10 se presentan el patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción albúminas sin hidrolizar e hidrolizados de la fracción con las proteasas comerciales

(Flavourzima[®] y Alcalasa[®]). En la figura 9 se observan dos bandas de menor intensidad de 30.77 y 98.34 kDa y en cuanto a los hidrolizados no se lograron observar ninguna banda.

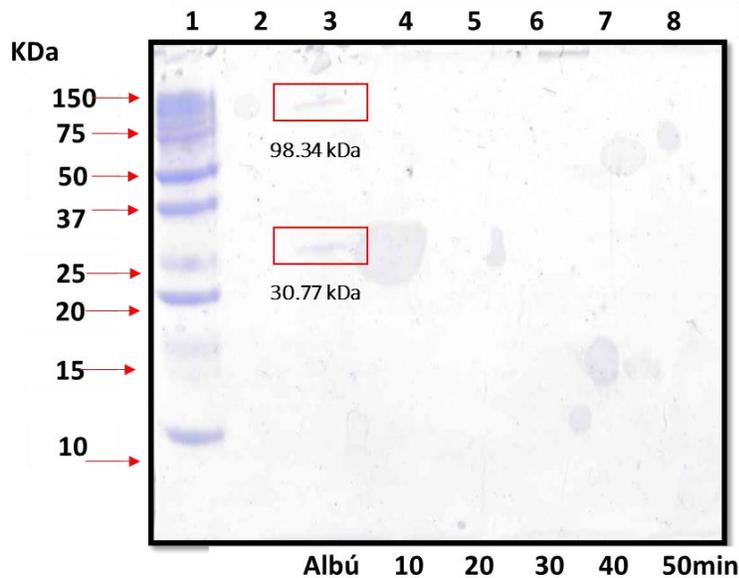


Figura 9. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción albúminas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción albúminas; carril 3-7: Hidrolizados de albúminas con Flavourzima[®].

Por otro lado, en la Figura 10, también se aprecia dos bandas dentro de la fracción albúminas con pesos moleculares similares a los anteriores (31.95 y 94.83 kDa), lo cual indica una separación deficiente de las proteínas. Estos resultados podrían deberse al bajo contenido de proteínas presentes en la fracción albúminas de esta variedad de frijol, por otra parte, sería recomendable concentrar más las proteínas de esta fracción mediante un previo tratamiento, mediante el empleo de una celda de ultrafiltración.

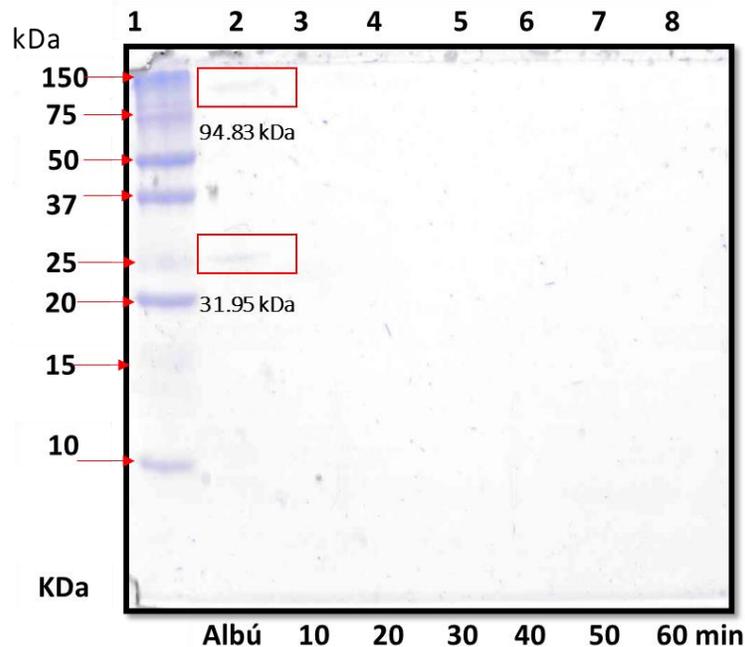


Figura 10. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la fracción albúminas. Carril 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa); carril 2: Fracción albúminas; carril 3-8: Hidrolizados de albúminas con Alcalasa[®].

Gallegos-Tintoré *et al.* (2004), encontraron un número de bandas en albúminas similares a las de globulinas en *Phaseolus lunatus* L. que van de 14 a 50 kDa y Moscoso-Mujica *et al.* (2017), reporta el perfil electroforético de las fracciones de cañihua Cupi-Sayhua, donde en la fracción albúminas observaron bandas intensas entre 5 a 95 kDa. Estas diferencias podrían deberse a la naturaleza de cada materia prima y/o al procedimiento que se siguió para obtener los perfiles electroforéticos de las muestras.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido utilizada ampliamente para la separación de proteínas y en la determinación de pesos moleculares como una herramienta cualitativa para analizar las proteínas de semillas. En donde las moléculas se redistribuyen de acuerdo con su forma y tamaño, generando bandas características, donde dichas bandas son resaltadas mediante tinciones y finalmente capturadas en forma de imagen para su posterior análisis. El mecanismo que sigue esta técnica es mediante la separación de las macromoléculas utilizando una diferencia de potencial eléctrico, lo cual provoca que se

desplacen de acuerdo con su masa y carga eléctrica. Los problemas más frecuentes que se encuentran a la hora de interpretar los resultados de electroforesis en gel es por el bajo contraste de la imagen, los altos niveles de ruido, como en el caso de la fracción globulinas, donde en el carril se observa como distorsionó el resultado final la solución salina con la cual fue extraída esta fracción, así también se encuentran variaciones de intensidad en los niveles de grises contenidas en ellas (Salazar-Centeno *et al.*, 2017).

7.10. Actividad antihipertensiva *in vitro* (inhibición de la ECA).

Los hidrolizados proteicos formados a partir de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) se muestran en la Tabla 12. Los hidrolizados proteicos de globulinas con la enzima Flavourzima® se tuvo la mayor actividad inhibitoria a los 50 min de reacción a una concentración de 2500 ppm del hidrolizado con una inhibición del 90.61%, seguida por el hidrolizado a los 10 min a una concentración de 10000 ppm con valor de inhibición de 89.84%, mientras que, los demás hidrolizados a diferentes concentraciones se encontraron valores entre 82.23 y 89.71% de inhibición de la ECA. Fajardo-Espinoza *et al.*, 2020, reportan que existe una correlación positiva entre la capacidad inhibitoria de la ECA y el grado de hidrólisis, esta correlación se vio en los primeros 40 min de reacción del frijol evaluado, ya que después de ese tiempo el porcentaje de inhibición disminuyó.

Tabla 12. Actividad inhibitoria de la ECA (%) de los hidrolizados proteicos de globulinas con Flavourzima® a diferentes tiempos de reacción.

Concentración (ppm)	Hidrolizados a diferentes tiempos de reacción (min)					
	10	20	30	40	50	60
250	82.23 ± 0.57 ^{bd}	87.86 ± 0.30 ^{ab}	88.86 ± 0.60 ^{ab}	89.71 ± 1.35 ^{aA}	88.76 ± 0.73 ^{baB}	85.43 ± 0.21 ^{bc}
500	83.06 ± 0.78 ^{bc}	89.06 ± 0.33 ^{aA}	89.61 ± 0.81 ^{aA}	89.47 ± 0.96 ^{aA}	88.58 ± 0.36 ^{ba}	86.25 ± 0.35 ^{abB}
1000	89.50 ± 1.71 ^{aA}	87.86 ± 1.36 ^{aAB}	89.08 ± 0.53 ^{aA}	89.04 ± 1.67 ^{aA}	89.43 ± 0.14 ^{abA}	86.47 ± 1.01 ^{abB}
2500	88.97 ± 1.61 ^{aA}	88.84 ± 0.62 ^{aA}	88.34 ± 1.96 ^{aA}	89.71 ± 1.17 ^{aA}	90.61 ± 1.47 ^{aA}	87.90 ± 2.94 ^A
5000	88.67 ± 0.81 ^{aA}	89.06 ± 1.08 ^{aA}	89.03 ± 0.92 ^{aA}	88.85 ± 1.86 ^{aA}	89.15 ± 0.83 ^{ba}	86.26 ± 0.72 ^{abB}
10000	89.84 ± 0.51 ^{aA}	88.54 ± 0.61 ^{ab}	89.76 ± 0.19 ^{aA}	89.32 ± 0.12 ^{aAB}	88.47 ± 0.57 ^{baBC}	87.65 ± 0.64 ^{abC}

^{a-b} Letras minúsculas diferentes en la misma columna y ^{A-D} Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En la Tabla 13, se presentan los hidrolizados de la fracción albúminas con la misma enzima (Flavourzima®), a diferentes tiempos de reacción y concentraciones. Los hidrolizados presentaron porcentaje de inhibición de la ECA superior al 80%, siendo los hidrolizados de 50 min los que presentaron el mayor porcentaje de inhibición en todas las concentraciones con valores entre 86.33 a 87.66%.

Tabla 13. Actividad inhibitoria de la ECA (%) de los hidrolizados proteicos de albúminas con Flavourzima a diferentes tiempos de reacción.

Concentración (ppm)	Hidrolizados a diferentes tiempos de reacción (min)					
	10	20	30	40	50	60
250	84.51 ± 1.24 ^{bB}	84.74 ± 1.19 ^{aB}	85.24 ± 0.65 ^{aAB}	84.42 ± 0.65 ^{aB}	86.64 ± 0.43 ^{aA}	85.58 ± 0.59 ^{bAB}
500	85.10 ± 1.18 ^{abBC}	85.47 ± 0.55 ^{aABC}	84.21 ± 1.01 ^{aC}	84.75 ± 1.55 ^{aBC}	86.94 ± 0.33 ^{aA}	86.02 ± 0.83 ^{bAB}
1000	84.75 ± 0.70 ^{bBC}	85.56 ± 0.87 ^{aB}	84.57 ± 0.19 ^{aBC}	84.39 ± 0.30 ^{aC}	86.98 ± 1.18 ^{aA}	84.77 ± 0.18 ^{cBC}
2500	84.44 ± 0.27 ^{bBC}	84.65 ± 1.30 ^{aBC}	84.09 ± 0.11 ^{aC}	84.27 ± 0.15 ^{aC}	87.07 ± 1.24 ^{aA}	85.71 ± 0.24 ^{bB}
5000	85.09 ± 0.56 ^{abBC}	84.73 ± 0.53 ^{aBC}	85.32 ± 1.48 ^{aAB}	83.91 ± 0.48 ^{aC}	86.33 ± 0.89 ^{aA}	85.63 ± 0.52 ^{bAB}
10000	86.21 ± 0.22 ^{aBC}	84.69 ± 1.38 ^{aD}	85.18 ± 0.49 ^{aCD}	85.07 ± 0.81 ^{aCD}	87.66 ± 1.11 ^{aA}	87.22 ± 0.60 ^{aAB}

^{a-b}Letras minúsculas diferentes en la misma columna y ^{A-D}Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En la Tabla 14, se presentan los datos de hidrolizados de globulinas con la enzima Alcalasa®, se puede observar que a los distintos tiempos de hidrólisis 10, 20 y 30 min de reacción a las diferentes concentraciones evaluadas presentaron un porcentaje de inhibición superior al 82%, así también los hidrolizados de 40 min a partir de una concentración de 500 a 10000 ppm.

Los hidrolizados obtenidos a partir de las fracciones mayoritarias del frijol gordo mostraron un porcentaje de inhibición de la ECA en promedio del 85%, tal sucedió también con la fracción albúminas con la enzima Alcalasa®, como se presenta en la Tabla 15, esto nos podría indicar que en los hidrolizados obtenidos podrían contener residuos aminoacídicos hidrofóbicos, ya que como se cita en la literatura, es una característica importante en los hidrolizados que dictan dicha actividad (Shahidi & Zhong, 2008).

Tabla 14. Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados proteicos de las globulinas con Alcalasa[®] a diferentes tiempos de reacción.

Concentración (ppm)	Hidrolizados a diferentes tiempos de reacción (min)					
	10	20	30	40	50	60
250	82.36 ± 0.66 ^{aA}	82.38 ± 0.77 ^{aA}	82.25 ± 1.11 ^{aA}	80.46 ± 1.64 ^{bB}	81.78 ± 0.48 ^{aAB}	81.32 ± 0.57 ^{abAB}
500	82.14 ± 1.45 ^{aAB}	82.74 ± 0.58 ^{aA}	82.11 ± 0.90 ^{aAB}	82.75 ± 1.22 ^{aA}	80.14 ± 0.98 ^{bC}	80.69 ± 0.54 ^{bBC}
1000	82.04 ± 0.85 ^{aAB}	82.18 ± 0.83 ^{aAB}	82.81 ± 0.66 ^{aA}	82.37 ± 0.33 ^{abA}	81.51 ± 0.18 ^{aAB}	81.06 ± 1.11 ^{bB}
2500	82.14 ± 0.67 ^{aAB}	82.22 ± 0.94 ^{aAB}	82.46 ± 0.62 ^{aAB}	82.76 ± 1.25 ^{aA}	80.95 ± 0.73 ^{abB}	82.45 ± 1.02 ^{aAB}
5000	82.45 ± 0.17 ^{aA}	82.84 ± 1.29 ^{aA}	82.90 ± 1.54 ^{aA}	82.36 ± 0.91 ^{abA}	81.50 ± 0.42 ^{aA}	81.90 ± 0.61 ^{abA}
10000	81.05 ± 1.64 ^{aAB}	82.38 ± 0.44 ^{aAB}	82.03 ± 0.58 ^{aAB}	82.48 ± 0.89 ^{aA}	80.89 ± 0.68 ^{abB}	81.89 ± 0.51 ^{abAB}

^{a-b} Letras minúsculas diferentes en la misma columna y ^{A-D} Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

García Mora *et al.* (2015) en hidrolizados de frijol pinto con la enzima Alcalasa[®], obtuvieron porcentaje de inhibición de la ECA >60% a partir de 90 min de reacción, estos péptidos fueron obtenidos por filtración de membrana. Las diferencias observadas en la actividad inhibitoria de ECA pueden estar relacionadas con diversos factores, como el método de extracción de la proteína, composición de la mezcla de péptidos, parámetros de la hidrólisis, método analítico para determinar la actividad inhibitoria de ECA, entre otros (Chin *et al.*, 2019).

Tabla 15. Actividad inhibitoria de la ECA (%) de hidrolizados proteicos de las albúminas con Alcalasa[®] a diferentes tiempos de reacción.

Concentración (ppm)	Hidrolizados a diferentes tiempos de reacción (min)					
	10	20	30	40	50	60
250	84.72 ± 0.47 ^{abAB}	85.25 ± 0.77 ^{aA}	84.37 ± 0.16 ^{cAB}	85.04 ± 0.83 ^{aA}	83.89 ± 1.27 ^{abB}	85.45 ± 1.24 ^{aA}
500	83.44 ± 1.33 ^{abB}	85.64 ± 2.04 ^{aA}	84.11 ± 0.37 ^{cAB}	83.49 ± 0.98 ^{bB}	84.40 ± 0.37 ^{bAB}	80.36 ± 3.26 ^{bC}
1000	82.92 ± 0.94 ^{bB}	84.62 ± 0.64 ^{aAB}	84.62 ± 0.28 ^{bcAB}	84.07 ± 0.63 ^{abAB}	85.74 ± 0.72 ^{aA}	84.01 ± 0.29 ^{aB}
2500	83.40 ± 2.08 ^{abB}	84.92 ± 0.38 ^{aAB}	85.06 ± 0.58 ^{abAB}	84.39 ± 0.35 ^{abAB}	85.16 ± 0.72 ^{abA}	85.45 ± 0.61 ^{aA}
5000	85.37 ± 1.02 ^{aA}	84.43 ± 1.01 ^{aA}	85.34 ± 0.04 ^{aA}	84.98 ± 0.26 ^{aA}	84.40 ± 0.50 ^{aA}	85.82 ± 0.47 ^{aA}
10000	84.53 ± 1.23 ^{abAB}	85.31 ± 0.73 ^{aAB}	84.16 ± 0.53 ^{cB}	84.66 ± 0.51 ^{aAB}	85.62 ± 0.32 ^{abA}	85.15 ± 0.50 ^{aAB}

^{a-b} Letras minúsculas diferentes en la misma columna y ^{A-B} Letras mayúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En la Tabla 16 se presenta la concentración media inhibitoria o IC_{50} de actividad antihipertensiva de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de las fracciones proteicas del frijol gordo. Los mejores resultados para los hidrolizados de globulinas con la enzima Flavourzima[®] fueron a los 10 min de reacción con un valor de 0.154 mg/mL teniendo en cuenta que bajos valores reflejan una alta actividad y a partir de los 20 min dicho valor incrementa. En el caso de la fracción albúminas con la misma enzima, el mejor valor de IC_{50} fue a los 40 min de reacción con un valor de 0.19 mg/mL de concentración media inhibitoria, mientras que los hidrolizados con la enzima Alcalasa[®] los mejores valores en la fracción globulinas a los 40 min de reacción y albúminas a los 10 min de reacción, presentaron valores de IC_{50} de 1.51 y 11.77 mg/mL, respectivamente.

Resulta un tanto difícil realizar comparaciones con nuestros resultados ya que no existe mucha información de obtención de hidrolizados a partir de fracciones proteicas de leguminosas, otros autores han empleado diferentes materias primas de partida, otras enzimas comerciales, largos tiempos de hidrólisis y montan otras técnicas para el ensayo de inhibición de la ECA, por lo que resulta una tarea muy compleja.

Tabla 16. IC_{50} de la actividad antihipertensiva de hidrolizados de las fracciones albúminas y globulinas a diferentes tiempos de reacción las enzimas Flavourzima® y Alcalasa®.

Hidrolizados (min)	IC_{50} (mg/mL)			
	Flavourzima®		Alcalasa®	
	Globulinas	Albúminas	Globulinas	Albúminas
10	0.15 ± 0.03^f	12.80 ± 0.04 ^c	10.05 ± 1.00 ^d	11.77 ± 1.07^e
20	17.09 ± 0.09 ^d	12.33 ± 0.03 ^d	10.47 ± 1.02 ^b	12.31 ± 1.09 ^c
30	17.81 ± 0.09 ^c	12.30 ± 0.03 ^d	10.52 ± 1.02 ^a	12.31 ± 1.09 ^c
40	17.86 ± 0.09 ^b	0.19 ± 0.02^e	1.51 ± 0.03^f	12.06 ± 1.08 ^d
50	18.15 ± 0.10 ^a	14.86 ± 0.05 ^a	9.637 ± 0.05 ^e	12.72 ± 1.10 ^a
60	14.36 ± 0.06 ^e	13.58 ± 0.07 ^b	10.15 ± 1.00 ^c	12.58 ± 1.10 ^b

^{a-f} Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

En la literatura se sustenta que existe una clara relación entre la estructura del péptido y la potencia inhibidora de la ECA, donde involucra el tipo de aminoácidos como las secuencias de éstas, que al final determina la actividad. La mayoría de los péptidos que se han estudiado y que presentan actividad inhibitoria de la ECA son secuencias cortas que van de 2 a 12 aminoácidos y los mejores péptidos antihipertensivos son los que contienen aminoácidos hidrofóbicos (García *et al.*, 2013).

Es importante obtener hidrolizados proteicos a partir de proteínas vegetales, como en las leguminosas, teniendo en cuenta que en el mercado no hay una gran diversidad de alimentos antihipertensivos, por otro lado, los consumidores se han mostrado más preocupados por adquirir alimentos con propiedades nutraceuticas, por lo que, los hidrolizados obtenidos a partir del frijol gordo, en un futuro podrían considerarse para su empleo en la elaboración o reformulación de alimentos.

CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. La caracterización de la morfología y parámetros físicos del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*), fue de suma importancia ya que no se ha estudiado y no existen reportes en la literatura sobre la caracterización de esta leguminosa que se cultiva en la zona alta de la Sierra Mazateca.
2. La composición químico proximal de la harina de frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) mostró un contenido de proteínas de 24.86%, dicho contenido lo convierte en una materia prima con potencial para la obtención de concentrado y/o aislado proteico.
3. El contenido de proteínas en el concentrado proteico del frijol gordo fue de 66.51%, el cual, lo hace una buena fuente para la obtención de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática.
4. En cuanto a la caracterización de color se obtuvo como resultado que la harina presentó mayor luminosidad, mientras que el concentrado proteico mostró una tendencia al oscurecimiento, por lo que se debe considerar su concentración si se requiere darle aplicación en la formulación o diseño de un alimento.
5. La composición proteínica de las fracciones proteicas extraídas fue: Albúminas 29.88%; globulinas 52.68%, cumpliéndose de esa manera lo que se sustenta en la literatura, que en las leguminosas las fracciones mayoritarias como proteínas de reserva son las globulinas y albúminas.
6. El grado de hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) fue más eficiente con Alcalasa[®] en globulinas dando un valor de 22.47% a los 60 min y para la fracción albúminas con la enzima Flavourzima[®] con un valor de 21.98% a los 60 min.
7. La electroforesis SDS-PAGE fue importante para observar las fracciones proteicas de globulinas y albúminas, mostrándose bandas que se lograron distinguir sus pesos moleculares, mientras que para los hidrolizados sería importante considerar concentrarlos más o en su caso cambiar la tinción al momento del revelado de las bandas e incluso cambiar las concentraciones de los geles para lograr una mejor separación.

8. Las enzimas comerciales empleadas (Alcalasa[®] y Flavourzima[®]) fueron proteasas eficientes para producir hidrolizados de fracciones proteicas del concentrado del frijol gordo con potentes actividades de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).
9. El porcentaje de inhibición de la ECA se pudo observar que a los 20, 30, 40 y 50 min de reacción a diferentes concentraciones la fracción globulinas hidrolizados con Flavourzima[®] presentaron porcentajes de inhibición mayor del 85%.
10. Los hidrolizados de las fracciones proteicas mayoritarias del frijol gordo, con la enzima Alcalasa[®], mostraron porcentajes de inhibición superior al 80% a los diferentes tiempos de reacción evaluados.
11. Los mejores valores de IC_{50} fueron los hidrolizados con la enzima Flavourzima[®] en las fracciones de globulinas y albúminas con IC_{50} de 0.154 y 0.19 mg/mL, respectivamente.

Como conclusión general podemos decir que las fracciones proteicas (albúminas y globulinas) del frijol gordo (*Phaseolus dumosus*) lograron generar hidrolizados proteicos con actividad antihipertensiva debido a la presencia de péptidos bioactivos que fueron generados por la hidrólisis enzimática empleada. Por lo que, estos podrían ser utilizados en el diseño y desarrollo de nuevos productos funcionales, que coadyuven en el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovascular como la hipertensión arterial.

REFERENCIAS

IX. REFERENCIAS

1. Aguilar-Raymundo V.G. & Vélez-Ruiz J.F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo. (*Cicer arietinum* L.). Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos. 7(2): 25–34
2. Aluko R. E. (2015). Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. Current Opinion in Food Science. 4: 44-50.
3. AOAC International. (2012). Official methods of analysis (19 ed.). Gaithersburg, MD: The Association.
4. Aquino-Llave A. B. (2017). Riesgo cardiometabólico, hábito alimentario y estado nutricional en los estudiantes de la Universidad Mayor de San Simón, del Departamento de Cochabamba en la Gestión. Tesis de Grado presentada para optar al Título de Especialista en alimentación y Nutrición Clínica. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Medicina. La Paz, Bolivia. Pág. 7-10, 36-37.
5. Augustin M. O. & De Victoria M. E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Nutrición hospitalaria. 21: 01-14.
6. Bahnasawy A.H. (2007). Some physical and mechanical properties of garlic. International Journal of Food Engineering. 3: 1–18.
7. Barbos E., Coca A., López-Jaramillo P., Ramirez A. J., Sanchez R. A., Zanchetti A. & Ponte-Negretti C. (2017). Guidelines on the management of arterial hypertension and related comorbidities in Latin America. Journal of Hypertension. 35(8): 1529-1545.
8. Benítez R., Ibarz A. & Pagan J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta bioquímica clínica latinoamericana. 42(2): 227-236.
9. Bernardino-Nicanor A., Bravo-Delgado C.H., Vivar-Vera G., Martínez-Sánchez G.E., Pérez Silva A., Rodríguez-Miranda J. & Vivar-Vera M.A. (2014). Preparation, composition, and functional properties of a protein isolate from a defatted mamey sapote (*Pouteria sapota*) seed meal. CyTA-Journal of Food. 12: 176-182.
10. Broughton W. J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P. & Vanderleyden J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. Plant and Soil. 252: 55–128.

11. Chalamaiah M., Yu W. & Wu J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*. 245: 205-222.
12. Chel-Guerrero L., Pérez-Flores V., Betancur-Ancona D. & Davila-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.
13. Chin Y. Y., Chew L. Y., Toh G. T., Salampessy J., Azlan A. & Ismail A. (2019). Nutritional composition and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of blue lupin (*Lupinus angustifolius*). *Food Bioscience*. 31:1-10.
14. Ciau-Solís N. & Betancur-Ancona D. (2021). Sistema renina-angiotensina (SRA) en las patologías cardiovasculares: papel sobre la hipertensión arterial. *Journal of Negative & No Positive Results*. 6(1):163-176.
15. Cruz-Cervera G., Castellanos-Ruelas A., Rosado-Rubio G. & Chel-Guerrero L. (2010). *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*. 50: 17-25
16. Cushman D. W. & Cheung H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry and Pharmacology*, 20: 1637–1648.
17. Debouck D. G. (1999). Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: Singh SP, ed. *Common bean improvement in the twenty-first century*. Dordrecht: Kluwer. 25–52.
18. Delgado-Salinas A., Bibler R. & Lavin M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31: 779-791.
19. Domínguez M., Betancur D. & Chel L. (2012). *Caracterización de la ECA-I e inhibición con péptidos alimentarios*. Alemania: Editorial Académica Española.
20. Durak A., Baraniak B., Jakubczyk A. & Świeca M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*. 141(3): 2177-2183.

21. Dussán-Sarria S., Hurtado-Hurtado D. L. & Camacho-Tamayo J. H. (2019). Granulometría, propiedades funcionales y propiedades de color de las harinas de quinua y chontaduro. *Información Tecnológica*. 30(5): 3-10.
22. Estrada F. L. L. (2022). Obtención de hidrolizados proteicos de frijol ayocote y su caracterización. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 15-19.
23. Fajardo-Espinoza F. S., Romero-Rojas A. & Hernández-Sánchez H. (2020). Production of bioactive peptides from bovine colostrum whey using enzymatic hydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 19(1): 1-9.
24. Faradonbeh N. A., Nikaeen F., Akbari M., Almasi N. & Vakhshoori M. (2018). Cardiovascular disease risk prediction among Iranian patients with diabetes mellitus in Isfahan Province, Iran, in 2014, by using Framingham risk score, atherosclerotic cardiovascular disease risk score, and high-sensitive C-reactive protein. *ARYA atherosclerosis*. 14(4): 163.
25. Farahmand M., Mousavi M., Momenanc A., Azizi F., Ramezani T. F. (2023). The association between arterial hypertension and menarcheal age. *Maturitas*. 174: 14-22.
26. Fennema O. R. (1996). *Food chemistry*. CRC Press. 76. 384.
27. Freytag G. F. & Debouck D. G. (2002). Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. *SIDA, Botanical Miscellany*. 23.
28. Gallego M., Mora L. & Toldrá F. (2018). Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*. 19: 8-14.
29. Gallegos Tintoré S., Pacheco Aguirre, J., Betancur Ancona, D. & Chel Guerrero, L. (2004). Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus L.* *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54(1): 81-88.
30. Gao J. & Hou T. (2023). Cardiovascular disease treatment using traditional Chinese medicine: Mitochondria as the Achilles' heel. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 164.

31. García A. L. & Rojas J. S. (1985). Determinación de proteínas en hojas de *Citrus. I.* Métodos e interferencias. Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias). 219-232.
32. García L. E., Guerrero L. C., Tintoré S. G., Ruelas A. F. C. & Ancona D. B. (2017). Modificación enzimática del concentrado proteínico de *vigna unguiculata* y su incorporación a un alimento para régimen especial. In Propiedades funcionales de hoy OmniaScience. 219.
33. García M. C., Puchalska P., Esteve C. & Marina M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. Talanta.106: 328-349.
34. Gepts P.& Debouck D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In: Voysest O, Van Schoonhoven A, eds. Common beans: research for crop improvement. Wallingford, UK: CABI. 7-53.
35. Goesaert H., Bris K., Veraberbeke W. S., Courtin C. M., Gebruers K. & Delcour J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends in Food Science & Technology.16: 12-30
36. Gómez Aldapa C. A. (2010). Evaluación de las características fisicoquímicas en la especie de frijol *phaseolus vulgaris* de las variedades; Pinto Saltillo, Bayo Victoria y Negro San Luis.
37. GómezGuillén M. C., Giménez B., López C. M. E. & Montero M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids. 25.faltan las paguinass
38. Gontia S. A., Awasthi M. K. (1999). Effect of seed grading by size on various seed vigour attributes, morpho-physiological characters and seed yield in soybean (*Glycine max (L.) merrill*) genotypes. Seed Research. 27(1): 25-30.
39. González-Quijada M. R. (1999). Caracterización Fisicoquímica y Valoración Nutricional y Funcional de un Aislado Proteico Obtenido de la Semilla de Ébano *Pithecellobium flexicaule (Benth)*. Tesis doctoral. Monterrey, Nuevo León, México.
40. Gopar-Nieto R., Ezquerro-Osori, A., Chávez-Góme, N. L., Manzur-Sandoval D. & Raymundo-Martínez G. I. (2021). ¿Cómo tratar la hipertensión arterial sistémica? Estrategias de tratamiento actuales. Archivos de Cardiología de México. 91(4): 493-499.

41. Guerrero-Martínez M., Ramírez-Figueroa E., Rodríguez-Miranda J., Hernández-Santos B., Carrera-Gómez A. M., Quiñones-Muñoz T. A. & Torruco-Uco J. G. (2023). Morphological and physical characterization of the fruit: chemical, antioxidant and functional evaluation of guasmole (*Renealmia alpinia*) flours. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-9.
42. Gyeong-Won K., Gab-Soo D., Yeonghwan B. & Yasuyuki S. (2008). Analysis of Mechanical Properties of Whole Apple Using Finite Element Method Based on Three-Dimensional Real Geometry. *Food Science Technology Res.* 14(4): 329–336.
43. Hanafi M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K. & Saari, N. (2018). High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International.* 106, 589-597.
44. Hernández-Cruz P., Pérez-Campos E., Martínez-Martínez L., Ortiz, B. & Martínez G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. 24(1): 21-27.
45. Hernández-Ledesma B., Lumen B. & Hsieh C. (2013). 1997-2012: Fifteen Years of Research on Peptide Lunasin. Hsieh, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. Croatia: Publishing Process Manager. 3-22.
46. Hernandez-Xolocotzi E., Miranda-Colin S. & Prywer C. (1959). El origen de *Phaseolus coccineus* L. darwinianus Hdz.-X. & Miranda-C subespecies nova. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* 20: 99–121.
47. Hidalgo M., Rodríguez, V. & Porras O. (2018). Una mirada actualizada de los beneficios fisiológicos derivados del consumo de legumbres. *Revista chilena de nutrición.* 45: 32-44.
48. Hipolito C. A. G. & Caballero B. L. (2022). Métodos de extracción de proteína y sus aplicaciones en el mejoramiento nutricional de productos Agroindustriales. *Journal of Agro-industry Sciences.* 4(3):133-140.
49. Hong E., Bravo G., Villalobos-Molina R. (2003). Hipertensión Arterial. *Avance y Perspectiva.* 22: 243-249.
50. International Board for Plant Genetic Resources. (1982). *Barley Descriptors*. IBPGR Secretariat.

51. Jannatizadeh A., Naderi B. M., Fatahi R., Ghasemi V. M. & Tabatabaeefar A. (2008). Some postharvest physical properties of Iranian apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit. *International Agrophysics*. 22(1): 125-131.
52. Juul L., Koch Haue S., Bruhn A., Boderskov T. & Kastrup Dalsgaard T. (2023). Alkaline pH increases protein extraction yield and solubility of the extracted protein from sugar kelp (*Saccharina latissima*). *Food and Bioproducts Processing*. 140: 144-150.
53. Korhonen H. & Pihlanto A. (2006). Review: bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16: 945–60.
54. Kotchen T., Longo D., Fauci A., Kasper D., Hauser S., Jameson J. & Loscalzo J. (2012). *Vasculopatía hipertensiva*. Eds. HARRISON. *Principios de medicina interna*. New York, N.Y. USA: McGraw-Hill.
55. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 257:680-5.
56. Lechener K, Schacky V. C., McKenzie L. A., Worm N., Nixdorff U., Lechener B., Kränkel N., Halle M., Krauss M. & Scherr R. J. (2020). Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *European Journal of Preventive Cardiology*. 27(4):394-406,
57. Li H., Zhu K., Zhou H. & Peng W. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on some functional and nutritional properties of soy protein isolate for infant formula. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 59: 12028-12036.
58. López-García S. C., Arámbula-Villa G., Torruco-Uco J. G., Contreras-Oliva A., Hernández-Rosas F., López-Espíndola M. & Herrera-Corredor J. A. (2019). Actividad antioxidante de la fracción proteica de chíá (*Salvia hispanica* L.) hidrolizada con alcalasa y flavourzima. *Agrociencia*. 53(4): 505-520.
59. López-Ibarra C. (2018). Evaluación de las características nutricionales y funcionales del concentrado proteico de *Phaseolus acutifolius* gray. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
60. López-Pedrouso M., Zaky A. A., Lorenzo M. J., Camiña M. & Franco D. A. (2023). Review on bioactive peptides derived from meat and byproducts: Extraction methods, biological activities, applications and limitations. 204.

61. Maduako J. N. & Faborode M. O. (1990). Some physical properties of cocoa pods in relation to primary processing. *Ife Journal of Technology*. 2(1): 1-7.
62. Mahuku G. S., Jara C. E., Cajiao C. & Beebe S. (2002). Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. *Plant Disease*. 86: 1383–1387.
63. Marciniak A., Suwal S., Naderi N., Pouliot Y. & Doyen A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology*. 80: 187-198.
64. Marrugo-Ligardo Y. A., Montero-Castillo P. M. & Duran-Lengua M. (2016). Evaluación nutricional de concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*. *Información Tecnológica*. 27(6): 107-114.
65. Martínez A. Y. O., Martínez Y. J., Córdova L. M., Valdivié N. & Estarrón E. M. (2011). Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolémicos en cinco variedades de semillas de *Cucurbita máxima* y *Cucurbita moschata* (calabaza). *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 16: 72-81.
66. Maruyama N., Fujiwara K. K., Yokoyama C. C., Hasegawa K. H., Takagi K., Nishizawa Y., Uki T., Kawarabayashi M., Shouji M., Ishimoto, P. & Terakawa T. (2014). Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 118(4): 441-447
67. Mex-Álvarez R. M. D. J., Garma-Quen P. M., Yanez-Nava D., Guillen-Morales M. M. & Novelo-Pérez M. I. (2021). Caracterización morfométrica de *Phaseolus vulgaris* en Campeche, México. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 52(1): 32-38.
68. Mohsenin N.N. (1986). *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
69. Montané E., & Santesmases J. (2020). Reacciones adversas a medicamentos. *Medicina Clínica*. 154(5): 178-184.
70. Montero-Barrantes M. (2021). Hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera: obtención y funcionalidad. *Agronomía Mesoamericana*. 32(2): 681-699.

71. Montgomery D. C. (2007). Diseño y Análisis de Experimentos, 2^a ed. (Limusa, Grupo Noriega Editores, 2007). 1-700.
72. Morales-Santos M. E., Peña-Valdivia C. B., García-Esteva A., Aguilar-Benítez G. & Kohashi-Shibata J. (2017). Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*. 51(1): 43-62.
73. Moscoso-Mujica G., Zavaleta A., Mujica Á., Santos M. & Calixto R. (2017). Fraccionamiento y caracterización electroforética de las proteínas de la semilla de kañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Revista Chilena de Nutrición*. 44(2): 144-152.
74. Mpotokwane S. M., Gaditlhatlhelwe E., Sebaka A. & Jideani V.A. (2008). Falta el nombre del artículo **89**(1): 93-98.
75. Nawaz K. A. A., David S. M., Muruges E., Thandeeswaran M., GopikrishnanKiran K. & Mahendran R. (2017) Identification and in silico characterization of a novel peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Phytomedicine*. 9: 13.
76. Nielsen P., Petersen, D. & Dammann C. (2001). Improved method for determine food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5): 642-648.
77. Nikolić Z., Đorđević V., Torbica A. & Mikić A. (2012). Legumes seed storage proteins characterization by SDS-PAGE and Lab-on-a-Chip electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 28(2): 75-80.
78. Niveditha V. R., Sridhar K. R. & Balasubramanian D. (2013). Physical and mechanical properties of seeds and kernels of Canavalia of coastal sand dunes. *International Food Research Journal*. 20(4): 1547.
79. Ocharan-Corcuera J., & Espinosa-Furlong M. D. C. N. (2016). Hipertensión arterial. Definición, clínica y seguimiento. *Gaceta Médica de Bilbao*. 113(4).
80. Osborne TB. (1924). The vegetable proteins. *Monographs on Biochemistry*. 2a edn. Longmans, Green and Co, London. 154.
81. Pedrós C., Quintana B., Rebolledo M., Porta N., Vallano A. & Arnau J.M. (2014). Prevalence, risk factors and main features of adverse drug reactions leading to hospital admission. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 70:361.

82. Pérez C. M. D., León Á. J. L., Dueñas H. A., Alfonzo G. J. P., Navarro D. D. A., Noval G. R. & Morales S. A. (2017). Guía cubana de diagnóstico, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Cubana de Medicina*. 56(4): 242-321.
83. Pérez H. P., Esquivel E. G., Rosales S. R. & Acosta G. J. A. (2002). Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52: 172-180.
84. Ponce Y. & Ponce A. (2012). El sistema Renina Angiotensina desde la circulación hasta la célula: implicaciones más allá de la hipertensión. *CorSalud*. 4(4): 287-293.
85. Porch T., Beaver J., Debouck D., Jackson S., Kelly J. & Dempewolf H. (2013). Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change. *Agronomy*. 3: 433-461.
86. Qu J., Zhang M., Hong T., Xu X. & Xu D. (2023). Improvement of adzuki vean paste quality by Flavourzyme-mediated enzymatic hydrolysis. *Food Bioscience*. 51.
87. Quesada D. & Gómez G. (2019). ¿Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo*. 2(1): 79-86.
88. Quinga P. M. A. (2017). Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-UHPLC. Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, Ecuador. 24.
89. Ramos R. B., Quintero S. B., Ramos-Elorduy J., Pino M. J. M., C.Ángeles C. S., García P. Á. & Barrera G. V. D. (2012). Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el estado de México. *Interciencia*. 37(12): 918.
90. Raveschot C., Cudennec B., Coutte F., Flahaut C., Fremont M. & Drider D. (2018). Production of bioactive peptides by lactobacillus species: From gene to application. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1-14.
91. Reyes-Bautista M. en B. R. (2017). Obtención de inhibidores de la dipeptidil peptidasa-iv del grano de amaranto (*amaranthus hypochondriacus l.*) y su efecto en

- la glucemia de ratones diabéticos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Cd. de México. 64-66.
92. Rosas P. M., Lara E. A., Pastelín H. G., Velázquez M. O., Martínez R. J., Méndez O. A., Lorenzo N. J. A., Lomelí E. C., González H. A., Herrera A. J. Tapia C. R., Attie F. (2005). Re-Encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. *Archivos de Cardiología de México*. 75(1): 96-111
93. Salazar-Centeno C. A., Niño-Niño C. A. & Díaz-Suárez R. A. (2017). Detección de bandas en color en una imagen de electroforesis en gel de una dimensión usando un algoritmo de localización basado en máximos y mínimos. *Iteckne*, 14(2): 122-130.
94. Sánchez-Mendoza N. A., Ruiz-Ruiz J. C., Dávila-Ortiz G. & Jiménez-Martínez C. (2017). Propiedades tecnofuncionales y biológicas de harina, aislado y fracciones proteicas mayoritarias de semillas de *Inga paterno*. *CYTA-Journal of Food*. 15(3): 400-408.
95. Schmutz J., McClean P. E. & Mamidi S. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*. 46: 707–713.
96. Segura-Campos M., Chel L. & Betancur D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Mexico. Editorial OmniaScience.
97. Semba R. D., Ramsing R., Rahman N., Kraemer K. & Bloem M. W. (2021). Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security*, 28, 100520.
98. Shahidi A. & Zhong B. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*. 91: 914-931.
99. Silva M. J. A. (2006). Obtención, caracterización y relación estructura funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*chenopodium quinoa*) orgánica proveniente de la VI región de Chile. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química-Universidad de Chile. Universidad de Chile. Chile.
100. Tacias-Pascacio V. G., Morellon-Sterling R., Siar E. H., Tavano O., Berenguer-Murcia Á. & Fernandez-Lafuente R. (2020a). Use of Alcalase in the

- production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 165: 2143–2196.
101. Tardioli W. P., Fernández-Lafuente R., Guisán M. J. & Giordano C. R. L. (2003). Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnology Progress*. 19(2): 565-574.
 102. Teniente Martínez G. (2014). Aislamiento, caracterización y estudio genotóxico de extractos proteínicos de frijol ayocote negro y morado (*Phaseolus coccineus L.*) en ratón CD1+. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Celaya. Guanajuato, México. 48-50.
 103. Tovar B. T., Jiménez M. C. & Dávila O. G. (2016). Actividad antihipertensiva de hidrolizados proteínicos obtenidos de frijol bayo (*Phaseolus vulgaris L.*). *Investigación y desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (1): 122-126.
 104. Ulug S. K., Jahandideh F. & Wu J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*. 108: 2739.
 105. Valdés M. Á. S. (2020). Las enfermedades crónicas no transmisibles y la pandemia por COVID-19. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*. 10(2): 78-8.
 106. Van der Ven C., Gruppen H., De Bont A. B. D. & Voragen J. G. A. (2002). Correlations between Biochemical Characteristics and Foam-Forming and -Stabilizing Ability of Whey and Casein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2938-2946.
 107. Vercruyse L., Van C. J. & Smagghe G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(21): 8106-8115.
 108. Vioque J., Pedroche J., Yust M. M., Lqari H., Megías C., Girón-Calle J., Alaiz M. & Millán F. (2006). Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. *Brazilian Journal of Food Technology*. 99-102.

109. Wani I. A., Sogi, D. S., Wani, A. A. & Gill, B. S. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1): 278-284.
110. World Health Organization/Food and Agricultural Organization/United Nations University, 2007. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. World Health Organization, Geneva.
111. Wu J., Jahandideh F., Yu W. & Majumder K. (2015). Bioactive peptides from meat proteins as functional food components. In G. Cirillo, U. G. Spizzirri & F. Lemma (Eds.). *Functional polymers in food science: From technology to biology*. Beverly, MA: Scrivener Publishing. 181–197.
112. Wyss F., Coca A., López-Jaramillo P., Ponte-Negretti C. (2020). Position statement of the Interamerican Society of Cardiology (IASC) on the current guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of arterial hypertension 2017-2020. *International Journal of Cardiology Hypertension*. 6.
113. Xu X., Qiao Y., Shi B. & Dia V. P. (2021). Alcalase and bromelain hydrolysis affected physicochemical and functional properties and biological activities of legume proteins. *Food Structure*. 27: 17.19
114. Yang J., Kornet R., Diedericks C. F., Yang Q., Berton-Carabin C. C., Nikiforidis C. V. & Sagis L. M. (2022). Rethinking plant protein extraction: Albumin—From side stream to an excellent foaming ingredient. *Food Structure*. 31. 100254.
115. Zapata J. E., Moya M. & Figueroa O. A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. *Información Tecnológica*. 30(6): 63-72.
116. Zhu H., Zhang Y., Yang T., Zhengb D., Liu X., Zhang J. & Zheng M. (2022). Preparation of immobilized Alcalase base don metal affinity for efficient production of bioactive peptides. *LWT*. 162.