



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO DE PÉPTIDOS DE HARINA  
EXTRUDIDA DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)**

---

Por:

**Alejandra Colón Sandoval**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para la revisión de tesis de Alejandra Colón Sandoval la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



---

M.C. Laura Aracely Contreras Angulo  
Director de tesis



---

Dr. José Basilio Heredia  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Leticia Xóchitl López Martínez  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. María Dolores Muy Rangel  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Potencial Antihipertensivo de Péptidos de Harina Extrudida de Garbanzo (*Cicer arietinum* L.)” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Alejandra Colón Sandoval, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico prestado durante el postgrado.

A CIAD por brindar todas las facilidades por medio de sus instalaciones y su personal.

Al grupo de Laboratorio de alimentos funcionales y nutracéuticos, por el apoyo y seguimiento del desarrollo del proyecto.

Al Dr. José Basilio Heredia por aceptarme en su grupo de trabajo, por estar siempre pendiente de mi desempeño y apoyarme de manera amable, respetuosa y profesional durante toda la estancia de la maestría.

A mi directora de tesis M.C. Laura A. Contreras Angulo por su valioso y gran apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Además, por darme la confianza para despejar cualquier duda y orientarme con su extensa experiencia en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. L. Xóchitl López Martínez por su enorme apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, por estar siempre pendiente y dar seguimiento al desarrollo del proyecto, por sus consejos como profesional y como amiga, porque en lo personal la considero un gran ser humano.

A la Dra. M. Dolores Muy Rangel por enseñarme tanto y porque desde el inicio de este viaje me dio una gran lección, lo cual agradezco mucho; por sus observaciones tan acertadas y profesionales.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación durante toda la maestría.

A todos los laboratorios, a los técnicos a cargo y a todo el personal de CIAD Culiacán ya que de una u otra manera contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por su disposición para despejar dudas, por sus observaciones etc, Agradezco especialmente a Sara Avilés por su valioso apoyo tanto en laboratorio como a resolver muchas dudas.

A mis compañeros de generación, pero sobre todo a aquellos que me brindaron su amistad: Alicia, Alsino, Dulce, Iliana y mi amiga desde el primer día de mi estancia en CIAD, Brisceida.

## **DEDICATORIA**

*A mi hermosa familia:  
mis pequeños y hermosos hijos:  
José Alejandro, Mario Alonso y Mateo Said, Y  
mi esposo Mario Alejandro Mejía  
por su amor incondicional y por ser mi fortaleza.*

*A mis padres: Artemia y Alejandrino, y  
a mis hermanos porque siempre me han apoyado y  
han creído en mí.*

*A mis amigos por estar siempre al pendiente y,  
por su apoyo aún en la distancia*

**LOS AMO!!!**

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1. Generalidades del Garbanzo.....	15
2.2. Importancia Mundial, Nacional y Regional .....	15
2.3. Clasificación Taxonómica y Descripción Botánica de la Planta.....	16
2.4. Usos del Garbanzo (semilla).....	17
2.5. Composición Nutricional de la Semilla de Garbanzo .....	18
2.5.1. Importancia de la Proteína del Garbanzo.....	19
2.5.2. Elementos Antinutricionales de la Semilla de Garbanzo.....	19
2.5.2.1. Extrusión .....	20
2.6. Péptidos Bioactivos .....	21
2.6.1. Péptidos Antioxidantes de Origen Vegetal .....	23
2.6.2. Péptidos Antioxidantes de Garbanzo.....	25
2.6.3. Péptidos Inhibidores de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	27
2.6.4. Seguridad de los Péptidos Bioactivos.....	31
2.6.4.1. Ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> L. ....	32
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Específicos .....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
5.1. Material Vegetal .....	36
5.2. Obtención de la Harina de Garbanzo.....	36
5.3. Extrusión de la Harina de Garbanzo.....	37
5.3.1. Acondicionamiento de la Harina .....	38
5.3.2. Extrusión.....	38
5.4. Desgrasado de la Harina Extrudida .....	39
5.5. Extracción Proteica.....	39
5.6. Determinación de Proteína por el Método de Micro-Kjeldahl .....	40
5.7. Hidrólisis Enzimática .....	40

5.8. Digestión Gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	41
5.9. Evaluación de los Péptidos (HA y HGI) .....	41
5.9.1. Grado de Hidrólisis .....	42
5.9.2. Perfil Electroforético.....	42
5.9.3. Capacidad Antioxidante.....	43
5.9.3.1. Inhibición del Radical 2,2'-azinobis (Ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS <sup>+</sup> ).....	43
5.9.3.2. Inhibición del Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	44
5.9.4. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) .....	44
5.9.5. Ensayo de Toxicidad.....	45
5.10. Diseño Experimental .....	46
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	47
6.1. Determinación de Proteína .....	47
6.2. Perfil Electroforético .....	48
6.3. Grado de Hidrólisis.....	51
6.4. Capacidad Antioxidante .....	53
6.4.1. Inhibición del Radical 2,2'-azinobis (Ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS <sup>+</sup> ).....	53
6.4.2. Inhibición del Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	57
6.5. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	60
6.6. Ensayo de Toxicidad con <i>Artemia salina</i> L.....	64
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	68
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Efectos fisiológicos de péptidos biológicamente activos derivados de proteínas de alimentos .....	23
2. Mecanismo de acción de actividad antihipertensiva de péptidos bioactivos .....	29
3. Proceso de obtención de la harina de garbanzo .....	37
4. Proceso de extrusión de harina de garbanzo.....	39
5. Porcentaje de proteína en las harinas y el concentrado proteico de garbanzo.....	48
6. Perfil electroforético del concentrado proteico de garbanzo. A) Sin extrudir. Carril 1: marcador molecular; carril 2, 3, y 4: volumen de 15, 10 y 5 $\mu$ L, respectivamente (dilución 1:15). B) Extrudido. Carril 1: marcador molecular; carril 2 y 3: 10 y 5 $\mu$ L (dilución 1:20) y carril 4: 10 $\mu$ L (dilución 1:10).....	50
7. Perfil electroforético del HA y HGI. Carril 1: marcador molecular; carril 2: 5 $\mu$ L de HA (Dilución 1:2); carril 3: 10 $\mu$ L de HA (Dilución 1:5); carril 4: 5 $\mu$ L de HGI (Dilución 1:2) y carril 5: 10 $\mu$ L de HGI (Dilución 1:1).....	51
8. Grado de hidrólisis (%) del hidrolizado con la enzima alcalasa (HA) .....	52
9. Inhibición de radicales ABTS <sup>+</sup> .....	54
10. Inhibición de radicales ABTS <sup>+</sup> del HA. Concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, y 2.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	55
11. Inhibición de radicales ABTS <sup>+</sup> del HGI. Concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, y 2.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	56
12. Inhibición de radicales DPPH del concentrado proteico. Se usaron concentraciones de 0.5, 1.0, 3, 5, 8 y 10 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	58
13. Inhibición de radicales DPPH del HA. Se usaron concentraciones de 0.5, 1.0, 3, 5, y 8 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	58
14. Inhibición de radicales DPPH del HGI. Se usaron concentraciones de 0.5, 3, 5, 8 y 10 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	59
15. Inhibición de ECA del concentrado proteico. Se usaron concentraciones de 0.02, 0.05, 0.5, 1.0 y 3.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	61

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
16. Inhibición de ECA del HA. Se usaron concentraciones de 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, y 0.3 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	62
17. Inhibición de ECA del HGI. Se usaron concentraciones de 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión. ....	63

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales usos del garbanzo para consumo humano .....	18
2. Composición química del garbanzo .....	19
3. Composición y posicionamiento de aminoácidos en relación con la actividad antioxidante peptídica.....	25
4. Procedimientos de ensayo de actividad inhibitoria de ECA. ....	45
5. Diseño de los experimentos para la evaluación de HA y HGI.....	46
6. Inhibición de radicales ABTS <sup>+</sup> por los hidrolizados y el concentrado proteico.....	56
7. Inhibición de radicales DPPH por los hidrolizados y el concentrado proteico.....	59
8. Inhibición de ECA por los hidrolizados y el concentrado proteico .....	63
9. Concentraciones de péptidos para ensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i> L. ....	64
10. Concentración letal media (LC <sub>50</sub> ) de péptidos sobre <i>Artemia salina</i> L. ....	65

## RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV), se estima que más del 50% de estas se pueden prevenir si se logran reducir factores como la HTA. Los fármacos comúnmente utilizados para el control de la HTA actúan sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sin embargo, estos suelen causar reacciones adversas como erupciones cutáneas, cefaleas, hipotensión y fetopatía entre otros, por lo que el uso de fuentes naturales como los péptidos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) representa una alternativa para coadyuvar en el tratamiento. No obstante, es necesario proporcionar evidencia sobre su bioactividad, así como ausencia de toxicidad. El objetivo de este estudio fue obtener péptidos inhibidores de ECA, a partir de harina extrudida de garbanzo. Para lograrlo se obtuvo concentrado proteico (CP) con 85.4% de proteína, el cual fue hidrolizado con la enzima alcalasa (HA) y los péptidos obtenidos fueron sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* (HGI). Mediante SDS-PAGE se obtuvo el perfil electroforético del CP, HA y HGI, el cual reveló un perfil típico de la proteína de garbanzo, para HA se obtuvieron pesos moleculares de 5 a 12 kDa, y de 10 kDa para HGI; esto en concordancia con el grado de hidrólisis de 10.6 y 13.5% para HA y HGI, respectivamente, obtenido por la cuantificación de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético. Lo anterior sugiere que HA presenta resistencia a la acción de las proteasas. Tanto HA como HGI mostraron, *in vitro*, actividad inhibitoria sobre la ECA con valores de IC<sub>50</sub> de 0.0675 y 0.173 mg/mL, respectivamente, entre las que no hubo diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a la capacidad antioxidante HGI mostró un IC<sub>50</sub> de 0.757 mg/mL, mejor que el mostrado por HA de 1.512 mg/mL en la inhibición de radicales ABTS<sup>+</sup>. En la inhibición de radicales DPPH, HA mostró una inhibición máxima de 33.13% con 5.56 mg/mL y de 26.21% con 7.9 mg/mL para HGI. De acuerdo al índice de toxicidad de Meyer, HA y HGI no mostraron toxicidad mediante el ensayo con *Artemia salina* L., ya que no se registró muerte de organismos a concentraciones >1000 mg/mL. En general los resultados, sobre todo la actividad inhibitoria sobre la ECA, indican que estos péptidos obtenidos con alcalasa mostraron potencial antihipertensivo y pueden ser candidatos para uso como ingrediente activo de alimentos funcionales o para el aislamiento de péptidos para estudios posteriores.

**Palabras clave:** harina extrudida, proteína de garbanzo hidrolizada, alcalasa, péptidos inhibidores de ECA, digestión gastrointestinal, toxicidad.

## ABSTRACT

Arterial Hypertension (AHT) is one of the main risk factors for cardiovascular diseases (CVD), it is estimated that more than 50% of these may be prevented if factors such as high blood pressure can be reduced. The drugs commonly used to control AHT work over the angiotensin converting enzyme (ACE) in the renin-angiotensin-aldosterone system. Although these may cause adverse reactions, such as: skin eruptions, headaches, hypotension and fetopathy among others. The use of natural sources such as chickpea (*Cicer arietinum* L.) peptides provides an alternative to assist with the treatment. However, it is necessary to provide evidence of its bioactivity as well as the lack of toxicity. The objective of this study was to obtain inhibitor peptides of ACE, from extruded chickpea flour. To accomplish it, we obtained protein concentrate (CP) with 85.4% of protein, which was hydrolyzed with alcalase enzyme (HA) and the obtained peptides were submitted to in vitro gastrointestinal digestion (HGI). Through SDS-PAGE we obtained an electrophoretic profile of PC, HA and HGI, which reveal a typical profile of the chickpea protein, for HA the molecular weight from 5 to 12 kDa and 10kDa for HGI; this is with concordance with the hydrolysis degree of 10.6 and 13.5% for HA and HGI respectively, obtained through the quantification of soluble in trichloroacetic acid. This suggests that HA has resistance to the proteases action. Both HA and HGI showed, in vitro, inhibit activity over the ACE with values of  $IC_{50}$  of 0.0675 and 0.173 mg/mL, respectively among which there was no statistical significant difference. In regards of antioxidant capacity HGI showed a un  $IC_{50}$  of 0.757 mg/mL, better than the one showed by HA of 1.512 mg/mL in the radical inhibition ABTS+. For the radical inhibition of DPPH, HA showed a maximum inhibition of 33.13% with 5.56 mg/mL and of 26.21% with 7.9 mg/mL for HGI. According to Meyers toxicity index, HA and HGI didn't show toxicity through the test with *Artemia salina* L., since it didn't register any organism death in concentrations >1000 mg/mL. In general, the results, especially the inhibit activity through ACE, show that these obtained peptides with alcalase have antihypertensive potential and can be candidates for usage as active ingredient for functional foods or for the peptide isolation for future studies.

**Key words:** extruded flour, hydrolyzed chickpea protein, alcalase, ACE inhibitor peptides, gastrointestinal digestion, toxicity.

## 1. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa de la familia Fabaceae, es una planta herbácea, anual, con flores blancas y violetas, las cuales desarrollan una vaina con 2 o 3 semillas. A nivel mundial se cultivan principalmente dos tipos de garbanzo, Kabuli y Desi, que se diferencian físicamente porque el primero es más grande, redondeado, de color crema y posee mejor valor nutricional (Milán-Noris *et al.*, 2018; Pino Pérez y Jorge Lazo, 2010); mientras que el segundo es más pequeño, con bordes más pronunciados y de color marrón. El garbanzo se cultiva en 80 países, México ocupa el décimo lugar y es el séptimo mayor exportador con 75% de su producción y un consumo aparente de 25% (FAOSTAT, 2017). Es la tercera leguminosa de importancia mundial (FAOSTAT, 2014), diversas investigaciones han demostrado que además de su alto valor nutricional proporciona beneficios a la salud. Algunos de estos efectos beneficiosos se le atribuyen a los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de esta semilla (El-Adawy, 2002).

Una de las bioactividades ampliamente estudiadas de los péptidos de garbanzo es la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), responsable de la vasoconstricción y como consecuencia de la hipertensión arterial (HTA) (Arnoldi *et al.*, 2015). En el 2010, el 40% de la población adulta a nivel mundial fue diagnosticada con HTA y en México fue la responsable del 18.1% del total de las muertes en el 2015 (Campos-Nonato *et al.*, 2018). Los fármacos para la HTA tienen efectos adversos como erupciones cutáneas, cefaleas, hipotensión y fetopatía entre otros, por lo que se han encaminado esfuerzos por buscar alternativas naturales para coadyuvar el tratamiento de esta enfermedad (Barbana y Boye, 2010). Tal es el caso de los péptidos de garbanzo, estos inhiben ECA y evitan la conversión de angiotensina I en angiotensina II, controlando de esta manera la HTA (Bhandari *et al.*, 2020). Estos péptidos se caracterizan por tener aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en el extremo c-terminal (Daskaya-Dikmen *et al.*, 2017) y se obtienen principalmente por hidrólisis enzimática; una enzima muy utilizada es alcalasa, una endopeptidasa que corta por delante de AA hidrofóbicos (López-Barrios *et al.*, 2014; Pedroche *et al.*, 2002).

En la obtención de péptidos bioactivos de vegetales se ha usado la extrusión como tratamiento térmico, previo a la hidrólisis, para la inactivación de compuestos antinutricionales, y se ha demostrado que tiene efectos positivos en la capacidad antioxidante en frijol y soya e inhibición de ECA en *Jatropha* (Khan *et al.*, 2018; Milán-Carrillo *et al.*, 2007; Valdez-Flores *et al.*, 2016).

Los péptidos de garbanzo, inhibidores de ECA representan una oportunidad como ingrediente funcional, para coadyuvar el tratamiento de la HTA. Sin embargo; es necesario proporcionar evidencia suficiente de la efectividad de estos, así como de la no toxicidad (Hartmann *et al.*, 2007). Para ello se tienen disponibles ensayos *in vitro* que pueden ayudar a estimar el potencial citotóxico de los compuestos; uno de ellos es el ensayo con *Artemia salina* L., crustáceo que tiene alta sensibilidad a diversas moléculas, es rápido y fácil de manejar, y se obtienen resultados con buena correlación con ensayos *in vivo*(Khan *et al.*, 2018) (Khan *et al.*, 2018). Por lo tanto, se tiene como objetivo obtener péptidos inhibidores de ECA, a partir de harina de garbanzo extrudida y evaluar el potencial antihipertensivo *in vitro*; así como, generar evidencia de no toxicidad utilizando *Artemia salina* L., como modelo de estudio.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades del Garbanzo

Las legumbres son muy antiguas, existen desde hace millones de años y su domesticación podría ser más antigua que la del maíz, están extendidas por todo el planeta. Representan la principal fuente de proteínas vegetales en muchos países (FAO, 2016 ). Su amplia distribución geográfica, sus completas cualidades nutricionales, unas necesidades hídricas que suelen estar localizadas al inicio de su crecimiento, la singular capacidad de aportar nitrógeno a su tierra de cultivo y la posibilidad de conservarse en seco similar a la de los cereales, convierten a las legumbres en un enemigo implacable contra el hambre y la desnutrición a nivel mundial, lo cual los hace un verdadero superalimento del futuro (FAO, 2016 ).

### 2.2. Importancia Mundial, Nacional y Regional

El garbanzo se cultiva en aproximadamente 80 países. La India produce dos tercios de la cosecha mundial, según datos de la FAO en 2017 se produjeron 9,073,000 t y México ocupó el décimo lugar con 188,939 t (FAOSTAT, 2019).

Por otra parte, en materia de comercio internacional, en 2016 los principales países exportadores del grano de garbanzo fueron Australia con 1,274,875 t, Rusia con 239,079 t y Canadá con 137,055 t, México fue el séptimo mayor exportador del mundo con 110,043 t; sin embargo, en dicho año ocupó el tercer lugar, sólo por debajo de Australia y Rusia, en cuanto al valor de las exportaciones de este grano con un total de 151,621,000 dólares. Por su parte, los principales países importadores de garbanzo fueron India con 873,542 t, Bangladesh con 171,297 t y Pakistán con 129,844 t (FAOSTAT, 2019). Cabe destacar que la India a pesar de ser el principal país productor de garbanzo, es también uno de los principales mercados importadores de este grano a nivel mundial. En el caso de México, aunque el volumen exportado no es muy alto, el precio que alcanza el

garbanzo mexicano en los mercados internacionales es alto, a tal nivel que lo lleva a ocupar uno de los primeros sitios en cuanto al valor de exportación (Rivera López y Gutiérrez Hernández, 2019). El cultivo de garbanzo en México es un producto básicamente de exportación, puesto que el consumo aparente es muy bajo, llegando incluso a ser negativo. El precio que se le paga al productor de este grano es de alrededor del 50% del precio de exportación, lo cual es bueno puesto que implica que es corta la cadena de comercialización nacional e internacional del grano en México. En 2017, los principales países importadores de garbanzo mexicano fueron: Argelia, Turquía, España, Emiratos Árabes Unidos y Estados Unidos de América; la diversificación exterior que presenta el mercado del garbanzo mexicano hace que no dependa de la demanda de un país en particular. Por tanto, se afirma que el garbanzo mexicano es competitivo en el mercado internacional (Rivera López y Gutiérrez Hernández, 2019).

En el mercado nacional, en 2017, los principales estados productores de garbanzo fueron: Sinaloa con 87,508.74 t, Sonora con 55,728.95 t y Michoacán con 25,200.69 t quienes cosecharon el 46.32, 29.49 y 13.34%, respectivamente, de la producción del país, es decir, el 89.15% en forma grupal. Para el 2018 y 2019 Sinaloa cosechó 185, 895 y 106,897 t, respectivamente. (SIACON, 2019).

### 2.3. Clasificación Taxonómica y Descripción Botánica de la Planta

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) pertenece a la familia *Fabaceae*, es un cultivo anual que puede alcanzar una altura de 60 cm. Los frutos son en vaina bivalva con una o dos semillas en su interior que suelen ser algo arrugadas. La planta tiene dos cotiledones grandes. Es una planta que resiste la sequía y sensible a la salinidad (Infoagro, 2019).

Esta leguminosa es herbácea anual, su semilla es muy variable en apariencia pero, invariablemente, posee el "pico" característico que sobresale sobre el embrión, parecen avellanas sin cáscara, tienen sabor casi a nuez y textura cremosa (Knights y Hobson, 2016) Es originario de la zona donde actualmente se extiende Turquía, los garbanzos parecen avellanas sin cáscara tienen sabor casi a nuez y textura cremosa (FAO, 2016 ).

De acuerdo a la forma de la semilla, el color y, en menor medida, el tamaño, el garbanzo se divide en tres grupos principales: "desi", "kabuli" y "pea". Las semillas del garbanzo Desi tienen forma

angular, son gruesas y de color marrón; por el contrario, las semillas de Kabuli tienen forma redondeada y son de color crema o beige, estos dos tipos se asemejan en tamaño, pero, en general, las semillas de Desi son más pequeñas que las de Kabuli. El tipo “Pea” tiene poca importancia comercial. Los tipos “Desi” aportan el 70% de la producción mundial (Knights y Hobson, 2016).

#### 2.4. Usos del Garbanzo (semilla)

El garbanzo es un componente dietético clave en muchos países donde la proteína animal es demasiado cara o en otros países donde el cultivo tiene una larga historia de cultivo y consumo. El garbanzo se combina con trigo, arroz o algún cereal, para proporcionar la mayor parte de las proteínas y calorías de la dieta. La semilla madura, ya sea entera o procesada, representa casi todo el consumo, estas se tuestan en la vaina, se consumen crudas como bocadillo o se hierven (FAO, 2016).

Las semillas maduras (Desi y Kabuli) se remojan y se hierven, con o sin la adición de verduras o carne, para producir una variedad de platos tradicionales. Las semillas de Kabuli también se conservan después de la cocción, pero un uso más importante es como puré y mezclado con aceite. En el cuadro 1 se resumen los principales usos del cultivo del garbanzo para consumo humano desde las hojas, la planta, la vaina completa hasta la semilla de la cual se produce “dhal” y harina. Para producir “dhal” las semillas se muelen, un proceso que implica la eliminación de la cubierta de la semilla y la separación de los cotiledones; y la harina se obtiene de la molienda de éstos últimos (Knights y Hobson, 2016).

La molienda de garbanzos es una industria importante en el subcontinente indio, dhal es la principal forma de consumo; el plato preparado, también llamado "dhal", es casi siempre parte de la comida principal. El tercer uso principal del garbanzo es la harina molida de dhal, este se utiliza para una variedad de propósitos, más comúnmente como una masa o para producir productos de extrusión fritos. El garbanzo también desempeña un papel importante, aunque secundario, en la nutrición animal (Knights y Hobson, 2016).

Cuadro 1. Principales usos del garbanzo para consumo humano

<b>Parte utilizada</b>	<b>Proceso /Producto</b>	<b>País/Región</b>
Hojas verdes	Hervida como vegetal	India subcontinental (ISC)
Planta inmadura	Vainas rostizadas	ISC, medio oriente, Etiopía
Vaina tierna	Vainas hervidas o semillas crudas	ISC, Etiopía, Turquía
Semilla completa-kabuli	Empapado: hervidas solas o con vegetales arroz, carne y especias.	Mayoría de los países
	Empapado, hervido, enlatado	Norte América, Europa, Australia y medio oriente
	Empapado (brevemente) rostizado	Medio Oriente, norte de África
	Empapado, hervido, puré (humus)	Medio Oriente, norte de África
Semilla completa-desi	Empapado, hervido con vegetales, arroz, especias	ISC
	Empapado (brevemente) rostizado	ISC
	Germinado	ISC
Dhal	Empapado, hervida con especias	ISC
Harina	Harina para freír vegetales	ISC
	Harina para arroz, fermentado	ISC
	Espesado para gravies	ISC
	Texturizar productos para freír	
	Mezclado con harina de trigo para pan	ISC y medio oriente

(Knights y Hobson, 2016)

En México, el tipo de garbanzo Desi se cultiva específicamente para incorporarse en las raciones de cerdo. En otros lugares, los residuos del procesamiento (la cobertura de semillas y las croquetas de molienda y las semillas dañadas o de tamaño insuficiente de la clasificación) se utilizan habitualmente en la producción ganadera intensiva. Los residuos de la cosecha (tallos, hojas, vainas y semillas) también son una fuente valiosa de alimento para los animales rumiantes (Knights y Hobson, 2016)

### 2.5. Composición Nutricional de la Semilla de Garbanzo

Las semillas de garbanzo son de gran tamaño, de color crema y de acuerdo con los datos del cuadro 2 contiene altos niveles de carbohidratos (66.3%) y proteínas (22.7%); y los componentes en menor proporción son lípidos (5%), fibra (3%) y minerales (3%) (Asif *et al.*, 2013). El almidón es la fracción principal de carbohidratos, que representa aproximadamente el 83.9% del total de carbohidratos (El-Adawy, 2002).

Cuadro 2. Composición química del garbanzo

Componente	%
Proteína	22.7
Lípidos	5.0
Carbohidratos	66.3
Fibra	3.0
Minerales	3.0

(El-Adawy, 2002)

### 2.5.1. Importancia de la Proteína del Garbanzo

El garbanzo es considerado como una fuente rica en proteínas, la cual tiene una alta biodisponibilidad; además de una composición balanceada de aminoácidos, y niveles relativamente bajos de factores antinutricionales (Ghribi, Gafsi, *et al.*, 2015). El total de aminoácidos esenciales (39.6 g/16 g de N) y aromáticos (9.6 g/16 g de N) del garbanzo superan al patrón de referencia de la FAO/WHO (36 y 6 g/16 g de N, respectivamente) (El-Adawy, 2002).

La mayoría de las proteínas que se encuentran en el garbanzo son principalmente de reserva y se clasifican con base en sus propiedades de solubilidad, tales como albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas; glutelinas, solubles en soluciones tanto ácidas como básicas y prolaminas, solubles en soluciones alcohólicas. Las globulinas, representan aproximadamente el 70% del total de proteína contenida en las leguminas (garbanzo, chícharo y lentejas). Las albúminas, corresponden al 10-20% de la proteína total. Por último, las glutelinas, se encuentran entre el 10 y el 20% (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013).

### 2.5.2. Elementos Antinutricionales de la Semilla de Garbanzo

El garbanzo al igual que la mayoría de las leguminosas contiene sustancias que interfieren en el metabolismo de los nutrientes y pueden llegar a causar ciertos desordenes. Los principales

antinutrientes en las leguminosas son taninos, ácido fítico, saponinas, flavonoides, alcaloides, oxalatos, lectinas e inhibidores de tripsina (ITs) (Soetan y Oyewole, 2009). El caso particular de los ITs se ha descrito que estas moléculas reducen la absorción y digestión de las proteínas ingeridas; al inhibir fuertemente a la tripsina y quimiotripsina en el intestino. Esta inhibición promueve un incremento en la producción enzimática y como resultado se tienen efectos adversos como daños al riñón y páncreas, retención de nitrógeno y retraso en el crecimiento entre otros (Mondor *et al.*, 2009).

Estos elementos antinutricionales pueden ser eliminados mediante procesos que incluyen: remojo, descascarillado y tratamientos térmicos o la combinación de éstos. Un ejemplo de estos métodos es la extrusión que ha sido ampliamente utilizada para la eliminación de estas sustancias.

2.5.2.1. Extrusión. Es un proceso térmico que es clasificado como HTST (high temperature short time). Este proceso es muy utilizado para mejorar la digestibilidad de la proteína, así como la eliminación de antinutrientes como taninos, lectinas e inhibidores de tripsina. Durante este proceso se da una desnaturalización parcial de las proteínas, las cuales adquieren mayor susceptibilidad a la acción enzimática (Valls, 1993). También, se ha descrito que durante el proceso de extrusión al desnaturalizarse el almidón de las harinas se liberan las proteínas que se encuentran atrapadas en estos y por consiguiente una mejora de la biodisponibilidad; lo que se traduce en un incremento del porcentaje de proteína (Milán-Carrillo *et al.*, 2002).

La extrusión de harina de garbanzo ya ha sido ampliamente estudiada y existen condiciones optimizadas de proceso a fin de obtener harina como ingrediente para elaborar alimentos funcionales; como lo descrito por Milán-Carrillo *et al.* (2002), en donde se usaron los siguientes parámetros de proceso: temperatura de 151°C, velocidad del tornillo de 191 rpm y la humedad de la harina a procesar de 26.5%; obteniendo un incremento de 21.7% en la digestibilidad de la proteína así como un 36.9% en el índice de eficiencia proteica, debida presumiblemente a la eliminación de factores indeseables como taninos durante el descascarado, así como lectinas e inhibidores de tripsina durante la extrusión; en donde también se da una desnaturalización de las proteínas, haciéndolas más susceptibles a la acción enzimática.

## 2.6. Péptidos Bioactivos

Las proteínas alimentarias se investigan no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos (Mulero Cánovas *et al.*, 2011). Se han explorado diversas proteínas de origen vegetal o animal, como la leche, el huevo, el trigo, entre otros, para producir hidrolizados bioactivos de proteínas (Nasri, 2017).

Los péptidos bioactivos no son más que una pequeña secuencia de aminoácidos encriptados en las proteínas; cabe por tanto esperar, debido a la amplia gama de alimentos proteicos existentes en la naturaleza y sobre todo en el mercado, que su ingesta esté asegurada con una alimentación equilibrada. Sin embargo, su biodisponibilidad no está tan clara, ya que han de ser liberados de las proteínas en las que se encuentran tras sufrir la acción de las proteasas gástricas e intestinales y han de poder atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea para poder ejercer su acción (Mulero Cánovas *et al.*, 2011).

Los péptidos están presentes en forma inactiva y pueden producirse a partir de proteínas precursoras a través de dos métodos biológicos diferentes: hidrólisis enzimática y fermentación. La bioactividad de los péptidos depende principalmente de las enzimas utilizadas para la hidrólisis, condiciones de procesamiento (Bhandari *et al.*, 2020).

Con respecto al proceso enzimático, la naturaleza de los sustratos de proteínas de los alimentos, la especificidad de las enzimas proteolíticas utilizadas para la hidrólisis, las condiciones de procesamiento (tiempo y temperatura), así como la relación enzima/sustrato influyeron en gran medida en el peso molecular, la composición de aminoácidos, y secuencias de biopéptidos y por tanto sus actividades biológicas (Nasri, 2017).

Para la producción de péptidos por hidrólisis enzimática se usan diferentes enzimas proteolíticas tales como papaína, pepsina, pancreatina, tripsina, quimotripsina, termolisina, alcalasa y muchas otras de fuentes bacterianas y fúngicas, dependiendo de la proteína original para producir hidrolizados proteicos. Las condiciones de procesamiento que influyen en el grado de hidrólisis y son: pH, relación enzima sustrato, tiempo y temperatura. Este método es más fácil de adaptar, los tiempos de reacción son cortos y es predecible comparado con la fermentación, en la cual el grado de hidrólisis depende del tipo de cultivo iniciador, fuente de proteína y tiempo de fermentación. Además, la funcionalidad de los péptidos en este caso depende de la cepa utilizada para la

hidrólisis, ya que cada microorganismo tiene un sistema proteolítico único y se hace complicado el aislamiento y separación de los péptidos; finalmente para verificar bioactividad, se sintetiza la versión del péptido y se repite el ensayo (Bhandari *et al.*, 2020).

El grado de hidrólisis (GH) de proteínas es el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos por la acción de las enzimas. Es importante medir este parámetro para monitorear la reacción y obtener los péptidos con la actividad buscada. Existen diversos métodos para evaluar el grado de hidrólisis los cuales se basan en tres principios esenciales: la determinación de la cantidad de nitrógeno liberado por la hidrólisis de proteínas que se vuelve soluble en presencia de un agente de precipitación (por ejemplo, ácido tricloroacético), la determinación de grupos  $\alpha$ -amino libres y la titulación de los liberados protones (Silvestre, 1997).

Diversos estudios en las últimas décadas han reportado que los hidrolizados de proteínas de diversas fuentes alimenticias, además de sus propiedades nutricionales, exhibieron varias funciones biológicas que incluyen antioxidantes, propiedades antimicrobianas, actividad hipotensora, anticoagulante, capacidad para reducir el colesterol, efecto hipoglucémico, actividad antitumoral; estas funciones están asociadas con biopéptidos de longitud de 3 a 50 residuos de aminoácidos, presentes en los hidrolizados de proteínas (Nasri, 2017).

La bioactividad de los péptidos se basa principalmente en su composición y secuencia de aminoácidos. Además, se ha reportado que varios péptidos exhiben actividades multifuncionales basadas en su estructura, así como en su hidrofobicidad y carga (Nasri, 2017).

En los últimos años se han destinado muchos esfuerzos al estudio de las diferentes actividades beneficiosas que estos péptidos bioactivos pueden tener sobre el organismo humano. En la figura 1 se describen los efectos fisiológicos que ejercen los péptidos en cada uno de los diferentes sistemas del organismo, entre las bioactividades que podemos destacar son: hipotensora, hipocolesterolemia, antioxidante, antimicrobiana e inmunomoduladora y opioide (Nasri, 2017). Así mismo se están destinando esfuerzos en investigación para la detección de fuentes alimentarias de péptidos bioactivos así como al estudio de su biodisponibilidad, de sus propiedades funcionales y de sus mecanismos de acción (Mulero Cánovas *et al.*, 2011).

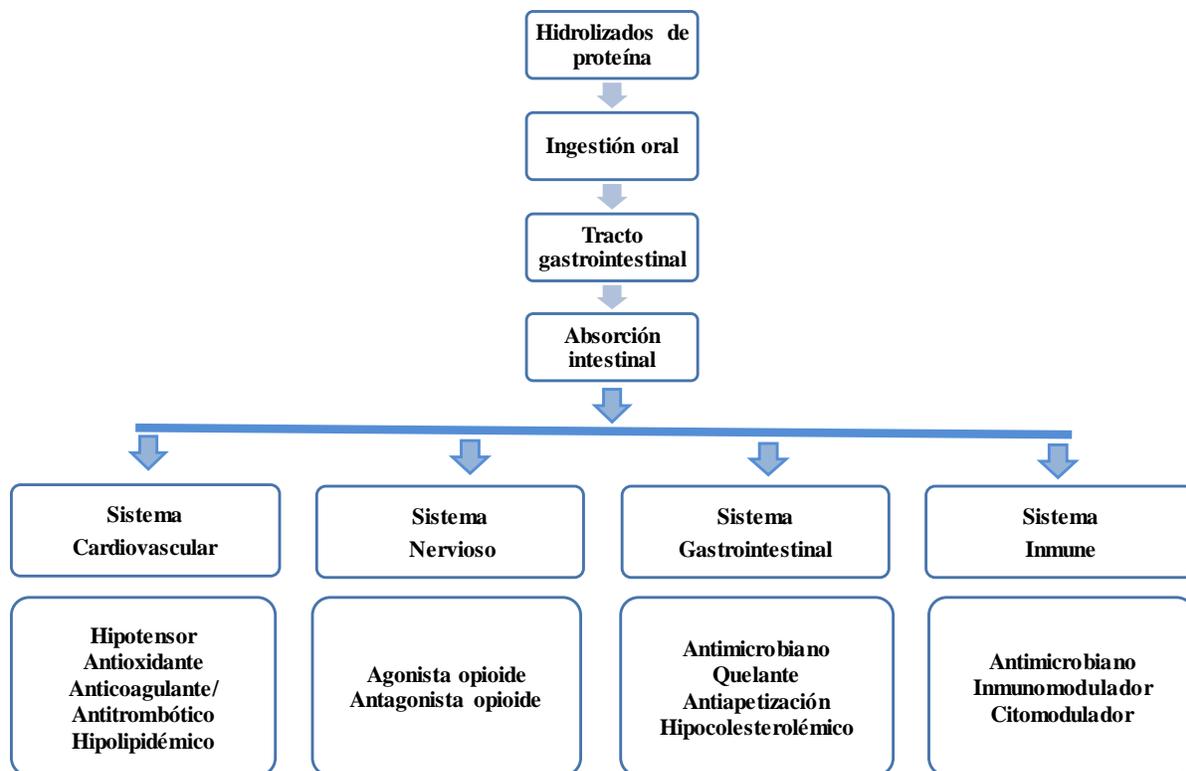


Figura 1. Efectos fisiológicos de péptidos biológicamente activos derivados de proteínas de alimentos. (Nasri, 2017).

Debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, de esta manera, proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos siendo interesante destacar que, dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usada y de las condiciones de procesado, los péptidos obtenidos y la actividad biológica es distinta (Mulero Cánovas *et al.*, 2011).

### 2.6.1. Péptidos Antioxidantes de Origen Vegetal

La presencia de péptidos bioactivos en los cereales y las legumbres puede contribuir a aumentar el valor de la calidad de las proteínas de los alimentos y agregar "funcionalidad" a los alimentos que

se consumen a diario. Las legumbres más estudiadas son: soya, frijol, chícharo y garbanzo (Malaguti *et al.*, 2014).

Se han reportado diversas actividades biológicas hidrolizados de proteína de garbanzo, incluyendo la actividad antioxidante, anti-fúngica, antigénica, capacidad de quelación de metales y la inhibición de ECA. Se ha informado también que la hidrólisis parcial del concentrado proteico de garbanzo (CPG) con alcalasa es útil para mejorar algunas propiedades funcionales; Ghribi, Gafsi, *et al.* (2015) realizaron hidrólisis enzimática de la proteína de garbanzo y evaluaron propiedades funcionales; encontraron que un tratamiento enzimático limitado con alcalasa podría mejorar las propiedades emulsionantes de la proteína del garbanzo. Un bajo grado de hidrólisis CP (GH = 4%) mejora tanto la capacidad de emulsión como la estabilidad de la emulsión. Elegir el grado correcto de hidrólisis es crucial para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas. El hidrolizado del concentrado proteico (CPH) con su alta solubilidad en un amplio intervalo de pH, puede ser más adecuado para muchas formulaciones de alimentos, especialmente en alimentos ácidos. En general, los resultados indicaron que el CPH podría crear nuevas oportunidades para el desarrollo de aditivos tecno funcionales eficaces para uso en una amplia gama de formulaciones alimenticias, cosméticas y farmacéuticas.

Torres-Fuentes *et al.* (2015) identificaron secuencias peptídicas, de hidrolizado de proteína de garbanzo, con actividad antioxidante. Las secuencias principales, ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH, correspondieron a la legumina, la principal proteína de la semilla. La mayoría de los péptidos que contenían histidina, han mostrado actividad antioxidante. Dos péptidos incluían triptófano y fenilalanina, en los que el grupo fenólico también podría servir como donante de hidrógeno. Estos resultados muestran que la legumina es una fuente de péptidos antioxidantes de gran interés para las industrias farmacéuticas y de alimentos para desarrollar nuevos nutraceuticos y alimentos funcionales.

En relación a la actividad antioxidante, en el cuadro 3 se describe el papel de los diferentes tipos de aminoácidos (AAs) y su posicionamiento en los péptidos en relación a la actividad antioxidante peptídica. Por ejemplo, los aminoácidos aromáticos ubicados en el extremo C-terminal de la cadena peptídica son eficaces eliminadores de diversos radicales; para el caso de los péptidos con aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal y las secuencias mejoran la solubilidad de éste en lípidos, lo que facilita el acceso a las especies de radicales hidrófobas; aminoácidos ácidos y básicos se caracterizan por ser quelantes de iones metálicos y donadores de hidrógeno; y en el caso

particular de la cisteína el grupo sulfidrilo actúa como eliminador de radicales, que protege el tejido del estrés oxidativo, mejorando la actividad del glutatión (Sarmadi y Ismail, 2010).

Cuadro 3. Composición y posicionamiento de aminoácidos en relación con la actividad antioxidante peptídica.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Mecanismos de acción</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Aromáticos (Tyr, His, Trp, Phe)</b>	Convierten radicales en moléculas estables mediante la donación de electrones, manteniendo su propia estabilidad a través de la estructura de resonancia. Mejora las propiedades de eliminación de radicales de los residuos de aminoácidos.	His en N-terminal como un eficaz quelante de iones metálicos. His en C-terminal como un eficaz eliminador contra varios radicales. Tripéptidos con Trp o Tyr en el extremo C-terminal como fuertes eliminadores de radicales pero débiles eliminadores de peroxinitrilo
<b>Hidrofóbicos</b>	Mejora la solubilidad del péptido en lípidos, lo que facilita el acceso a las especies de radicales hidrófobas y a los AGPI hidrófobos. Gly como donante de hidrógeno	Val o Leu, en el extremo N y Pro, His o Tyr en las secuencias. Alta reactividad de grupos alifáticos en Ala, Val, Leu a AGPI hidrófobos. Ala o Leu en las terminaciones, Gln y un residuo Pro en las secuencias del péptido del gluten.
<b>Ácidos y básicos</b>	Grupos carboxilo y amino en las cadenas laterales como quelantes de iones metálicos, como donadores de hidrógeno.	Residuos de Asp (aminoácido ácido) e His (aminoácido básico) en péptido purificado a partir de salsa de mejillón fermentada.
<b>Cisteína</b>	Grupo SH (sulfidrilo) como eliminador de radicales, que protege el tejido del estrés oxidativo, mejorando la actividad del glutatión	Los tripéptidos con Cys son fuertes eliminadores de radicales de peroxinitrito. En proteínas de hoja de curry, el grupo SH junto con otros grupos funcionales están implicados en actividad antioxidante.

(Sarmadi y Ismail, 2010)

### 2.6.2. Péptidos Antioxidantes de Garbanzo

Los péptidos antioxidantes obtenidos a partir de proteínas de origen vegetal, convencionales o alternas, mediante enzimas de origen vegetal, animal o microbiana, tienen gran potencial de empleo en el desarrollo de antioxidantes seguros para la industria de alimentos y farmacéutica. Sin embargo, es necesario estudios a otro nivel para conocer su actividad antioxidante in vivo así como

posible toxicidad para el ser humano, lo que se ha vuelto un tema de relevancia en los trabajos de investigación recientes (Gallegos Tintoré *et al.*, 2013).

Sobre la base de las reacciones químicas, los ensayos para medir la capacidad antioxidante se clasifican en dos grupos: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y métodos basados en la transferencia de electrones (ET). La mayoría de los ensayos basados en HAT aplican una reacción competitiva, en la que el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales de peróxido generados térmicamente. La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), el parámetro antioxidante de atrapar radicales totales (TRAP) y el ensayo de decoloración del  $\beta$ -caroteno son ejemplos de ensayos basados en HAT. Los ensayos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que también actúa como la sonda para controlar la reacción y el indicador del punto final de la reacción. La capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC), el poder antioxidante reductor de ión férrico (FRAP) y la capacidad de captación de radicales picrylhydrazyl 2,2-diphenyl-1 (DPPH) son ejemplos de ensayos basados en ET, utilizados con frecuencia para medir la actividad antioxidante de los péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010).

Diversos estudios han demostrado que los péptidos de garbanzo son excelentes antioxidantes, su capacidad depende del peso molecular de éstos, así como el tipo y secuencia de aminoácidos. Tal como lo reportado por Li *et al.* (2008) quienes fraccionaron el hidrolizado de garbanzo con alcalasa y obtuvieron que las fracciones en la que los péptidos eran de menor tamaño (220-2622 Da) mostraron una alta capacidad antioxidante y de eliminación de radicales libres. Por ejemplo, esta fracción mostró una excelente eliminación del radical DPPH de hasta 85.82% con una concentración de 1.0 mg/ml. Ellos señalaron que además de los pesos moleculares, otros factores como la composición de los aminoácidos y la hidrofobicidad tuvieron una fuerte correlación con la capacidad antioxidante; esta fracción era rica en Arg, Phe, Lys, Leu, Ala y Asp y en cuanto a la hidrofobicidad, a medida que esta incrementa también se incrementa la solubilidad en lípidos y por lo tanto potencia su capacidad antioxidante. Por su parte Arcan y Yemenicioğlu (2010) hidrolizaron proteína de garbanzo con pepsina y obtuvo una capacidad de eliminación del radical ABTS de 277  $\mu\text{molTrolox/g}$  péptidos.

Yust *et al.* (2012) realizaron hidrólisis secuencial, proteína de garbanzo, con alcalasa y flavourzima para la obtención de péptidos antioxidantes y obtuvieron que tan solo con alcalasa a los 30 min de hidrólisis el hidrolizado mostró una reducción del 55% en la eliminación del radical DPPH. Pero

los mejores resultados se obtuvieron con la hidrólisis secuencial con las dos enzimas (alcalasa y flavourzima) eliminando el hasta un 77% el radical DPPH. Por su parte Kou *et al.* (2013) realizaron hidrólisis secuencial de proteína de garbanzo y obtuvieron tres fracciones del hidrolizado, de las cuales la fracción con los péptidos de menor peso molecular (1155 Da) fue la que presentó una mayor capacidad antioxidante tanto del radical ABTS como de DPPH; para el primero obtuvieron 0.967 mmol/L (TEAC) al usar una concentración de 0.5 mg/mL de los péptidos; además el IC<sub>50</sub> de esta fracción fue de 0.97 mmol/L. Para DPPH con una concentración de 0.5 mg/mL de péptidos obtuvieron una inhibición de 41.3%, para esta fracción se probaron diferentes concentraciones desde 0.1 a 5 mg/mL obteniendo una inhibición dependiente de la dosis.

Ghribi, Sila, *et al.* (2015) realizaron hidrólisis enzimática de concentrado proteico de garbanzo con alcalasa y los resultados mostraron que el hidrolizado mostró una mayor capacidad antioxidante que el concentrado proteico; ellos mencionaron que, aunque las proteínas actúan como compuestos antioxidantes, debido a su gran tamaño, no pueden atravesar las membranas celulares, por lo que se requiere generar péptidos más pequeños que posean la actividad biológica.

### **2.6.3. Péptidos Inhibidores de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)**

La enzima convertidora de angiotensina (ECA (EC 3.4.15.1)) es una metalopeptidasa de zinc, debido a su estructura tridimensional, que se encuentra tanto en fluidos biológicos como en muchos tejidos, esta enzima es la responsable de la vasoconstricción y como consecuencia hipertensión arterial (HTA) (Iwaniak *et al.*, 2014). La hipertensión arterial (HTA) es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como superior a 90 mm Hg para la presión arterial diastólica y 140 mm Hg para presión sistólica (Arnoldi *et al.*, 2015). Es uno de los factores de riesgo más importantes para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal que son otras importantes causas de mortalidad (Campos-Nonato *et al.*, 2013).

Para el año 2010, el 40% de los adultos a nivel mundial fueron diagnosticados con HTA y se estima que para el 2025, 1.56 millones de personas padezcan esta enfermedad (Hanafi *et al.*, 2018). En el caso de México en el año 2012, el 31.5 % de adultos mayores de 20 años fueron diagnosticadas con HTA y cada año se diagnostican aproximadamente 450 mil casos nuevos; esta cifra podría

aumentar considerablemente ya que el 47.3% de la población desconoce que padece HTA. En el año 2015, la HTA fue la responsable del 18.1% de las muertes en México y se ha considerado a esta enfermedad, por más de dos décadas, como una de las nueve principales causas de muerte y el principal factor de riesgo de muertes prevenibles (Campos-Nonato *et al.*, 2013).

La presión arterial alta generalmente se trata con medicamentos, como bloqueadores de los receptores de angiotensina, bloqueadores beta, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos e inhibidores de enzima convertidora de angiotensina I. Algunas investigaciones experimentales y clínicas han demostrado que algunas proteínas de plantas, como las leguminosas, pueden ser útiles para mantener una presión arterial correcta (Arnoldi *et al.*, 2015).

Debido a los posibles efectos secundarios de los fármacos para el tratamiento de la HTA, como tos, erupciones cutáneas y angioedema, diarrea, mareos, fatiga y en caso más severos cefaleas, hipotensión y fetopatía (Aluko, 2015; Barbana y Boye, 2010; Guang y Phillips, 2009); se han encaminado esfuerzos por buscar alternativas naturales para coadyuvar el tratamiento de esta enfermedad (Barbana y Boye, 2010); tal es el caso de los péptidos inhibidores de ECA, como se muestra en la figura 2, los cuales evitan la conversión de angiotensina I en angiotensina II así como la degradación de bradiquinina un péptidos vasodilatador; resultando entonces en la dilatación de los vasos sanguíneos, controlando de esta manera la HTA (Bhandari *et al.*, 2020).

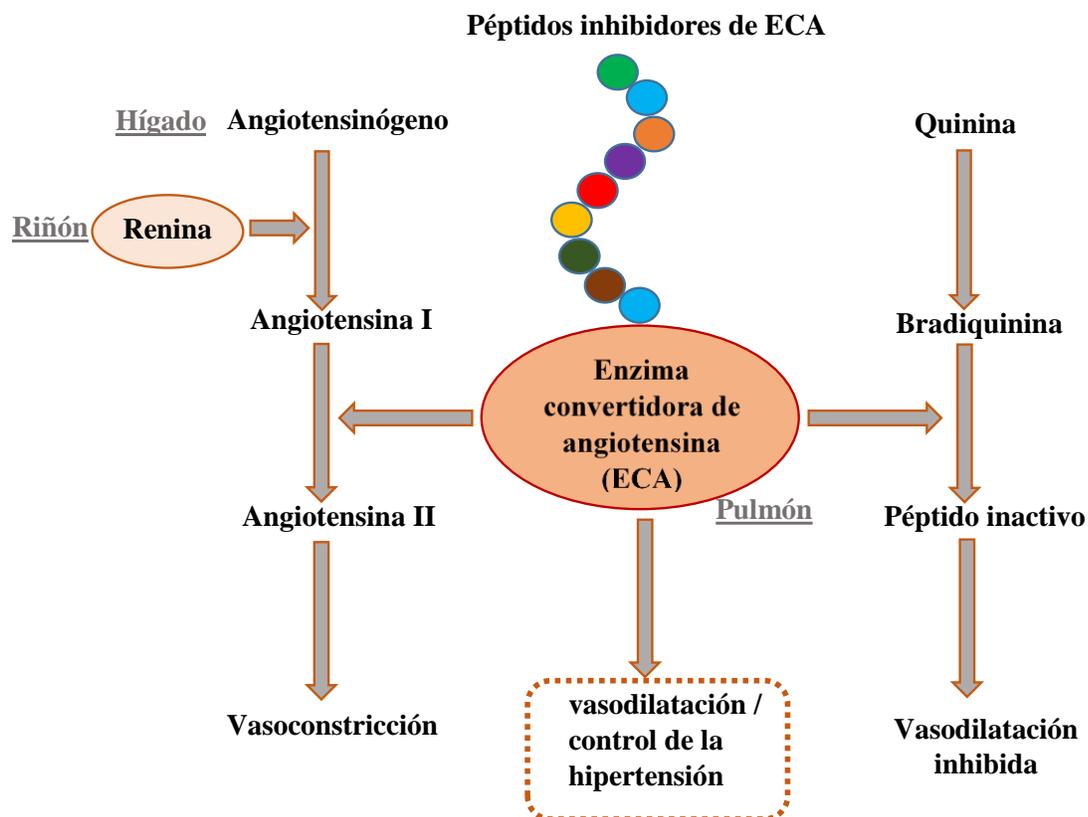


Figura 2. Mecanismo de acción de actividad antihipertensiva de péptidos bioactivos (Bhandari *et al.*, 2020).

Los péptidos inhibidores de la ECA pueden producirse por extracción con solventes, hidrólisis enzimática y fermentación microbiana de proteínas de alimentos. La forma más común de producirlos es a través de hidrólisis enzimática de las proteínas de los alimentos. La especificidad de la enzima proteolítica y las condiciones del proceso influyen en la composición peptídica de los hidrolizados y, por lo tanto, en su actividad inhibitoria. La combinación de pepsina-pancreatina o pepsina-quimotripsina-tripsina se usa generalmente para simular la degradación gastrointestinal de proteínas de alimentos en humano (Guang y Phillips, 2009).

Los péptidos inhibidores de ECA se caracterizan por tener aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en el extremo c-terminal (Daskaya-Dikmen *et al.*, 2017). Aquellos péptidos inhibidores de ECA con cadenas peptídicas cortas, generalmente de 2 a 5 aminoácidos, con residuos de prolina o hidroxiprolina en c-terminal tienen efectos inhibitorios más fuertes, ya que se ha demostrado que se unen más fuertemente a la ECA. Prolina, lisina y arginina son el sustrato c-terminal preferido para la ECA, lo que contribuye a una inhibición de la ECA más potente. Además, los péptidos

cortos son más fácilmente absorbidos por el sistema cardiovascular que los aminoácidos libres. Los péptidos más grandes (10-51 aminoácidos) se absorben fácilmente, sin embargo, su potencia inhibidora de la ECA se reduce considerablemente (Roy *et al.*, 2010).

Se han identificado péptidos inhibidores de la ECA a partir de diversas fuentes alimenticias de plantas, como soya, frijol mungo, girasol, arroz, maíz, trigo, trigo sarraceno, brócoli, champiñón, ajo, espinaca y productos como el vino. También los hidrolizados de proteínas de maní, garbanzo y papa muestran una fuerte actividad inhibidora de la ECA (Guang y Phillips, 2009).

Una enzima muy utilizada para la producción de péptidos inhibidores de ECA a partir de fuentes vegetales, como legumbres, es la alcalasa; siendo esta, una enzima comercial producida por *Bacillus licheniformis* L; la cual tiene actividad endopeptidasa y rompe enlaces por delante de aminoácidos hidrofóbicos (López-Barrios *et al.*, 2014).

La actividad inhibitoria dichos péptidos contra la ECA, primeramente, tiene que ser determinada a nivel *in vitro* para determinar la potencia de éstos y puede ser determinada espectrofotométricamente. Li *et al.* (2005) desarrollaron un método espectrofotométrico directo, para determinar la actividad de la ECA en presencia de inhibidores utilizando hippuril-L- histidil-L -leucina (HHL) como el sustrato específico de la ECA. Este método se basa en la determinación espectrofotométrica del contenido de ácido hipúrico (HA) en la orina, en donde se lleva a cabo una reacción colorimétrica específica de HA con cloruro de benceno sulfonilo (BSC) en presencia de quinolina. Este mismo ensayo se aplicó también a la medición de la actividad inhibidora de la ECA de captopril, obteniendo como resultado un IC<sub>50</sub> que correspondió con los datos de la literatura. En este estudio se evaluaron los hidrolizados de proteína de frijol mungo y arroz para determinar la actividad inhibitoria de ECA, como resultado estos hidrolizados mostraron una alta actividad inhibitoria de la ECA. Se demostró así que este método propuesto es directo, sensible, preciso, reproducible y menos costoso sin separación de HA de la mezcla de reacción de ECA, y puede usarse para la selección de péptidos inhibidores de la ECA derivados de proteínas de alimentos.

El caso específico de péptidos de garbanzo, diversos autores han hidrolizado la proteína de esta leguminosa obteniendo los mejores resultados en la inhibición de ECA con intervalos entre 15 y 30% de grado de hidrólisis (GH).

Pedroche *et al.* (2002) realizaron un estudio en donde utilizaron aislados de proteína de garbanzo para la producción de péptidos con actividad inhibitoria de ECA. El mayor grado de inhibición se encontró en un hidrolizado obtenido por 30 minutos de tratamiento con alcalasa, con un 30% de

GH; obteniendo un  $IC_{50}$  de  $190 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; con pesos moleculares entre 1.3 y 21 kDa. Estos resultados muestran que las proteínas del garbanzo son una buena fuente de péptidos inhibidores de la ECA cuando se hidrolizan con la proteasa alcalasa.

Por otro lado, Yust *et al.* (2003) hidrolizaron la fracción de legumina, la principal proteína de almacenamiento del garbanzo, y obtuvo un  $IC_{50}$  de  $180 \mu\text{g mL}^{-1}$  con un GH de 27% y pesos moleculares de los péptidos entre 6-14 kDa, muy similar a los resultados obtenidos por Pedroche *et al.* (2002). De igual forma Medina-Godoy *et al.* (2012) hidrolizaron la proteína de garbanzo y las fracciones de albúmina y globulina por separado y los resultados no tuvieron diferencia significativa en la inhibición de la ECA, la fracción total de proteína tuvo una inhibición competitiva con la de las fracciones, obteniendo un  $IC_{50}$  de  $0.045 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; muy por debajo que lo obtenido por los autores antes mencionados.

Otros autores como Barbana y Boye (2010) y Pedroche *et al.* (2002) realizaron hidrólisis secuencial de la proteína de garbanzo con las enzimas alcalasa y flavourzyme, obteniendo un mayor grado de hidrólisis 65 y 77%, respectivamente, y un  $IC_{50}$  mucho mayor que los hidrolizados solo con alcalasa; lo cual no es deseable. En el caso de Pedroche *et al.* (2002), se observó que con el hidrolizado solo con alcalasa obtenían un mejor  $IC_{50}$  que con la hidrólisis secuencial con las dos enzimas.

#### **2.6.4. Seguridad de los Péptidos Bioactivos**

Los péptidos bioactivos generalmente se consideran seguros (Bhandari *et al.*, 2020). Diversos estudios han demostrado la ausencia de toxicidad de estos péptidos aislados cuando se incorporan en cultivos celulares. También se ha estudiado que las dosis únicas de 2000 mg/kg y las dosis diarias de 1000 mg/kg durante 4 semanas de hidrolizados de caseína que contienen péptidos antihipertensivos, cuando se administraron a ratas, no mostraron efectos adversos en diferentes parámetros clínicos tales como bioquímica sanguínea, hematología histopatológica, etc. o sobre su mortalidad (Anadón *et al.*, 2010). Sin embargo, el consumo de algunos péptidos también puede causar problemas en el sistema biológico que conducen a diversos trastornos como: la alteración de la pared intestinal, la toxicidad de los eritrocitos y linfocitos, la producción de radicales libres,

el daño a los tejidos enzimáticos e inmunopáticos y la citotoxicidad. Por lo tanto, antes de considerar los péptidos biológicamente activos para la producción de alimentos y con fines terapéuticos, primero es necesario evaluar la inmunogenicidad y la toxicidad de los péptidos (Adaptado de Khan *et al.*, 2018).

El potencial bioactivo de los péptidos conduce a la formulación de compuestos o alimentos que los contengan. Sin embargo, además de su potencial beneficioso, también pueden ejercer efectos citotóxicos. Como los eventos citotóxicos pueden ser ejercidos por numerosos agentes orgánicos e inorgánicos que afectan muchas vías bioquímicas diferentes, existen varios sistemas de análisis citoquímicos disponibles para estimar el potencial citotóxico de un compuesto bioactivo específico. La mayoría de estos ensayos también dan una idea del mecanismo o modo de acción. Existen varias pruebas de detección que miden rápidamente los efectos citotóxicos inespecíficos (por ejemplo, ensayo rojo neutro, ensayo lactato deshidrogenasa (LDH)) (Adaptado de Hartmann *et al.*, 2007).

El término "citotoxicidad" implica todos los efectos adversos que el compuesto podría tener en la viabilidad y reproducibilidad de células, lo que significa que un compuesto citotóxico produce un efecto tóxico en las células. En este contexto, se pueden describir los efectos tóxicos como citostático o relacionado con la muerte celular (Hartmann *et al.*, 2007). Aunque los estudios en humanos y las pruebas en animales proporcionan los datos más confiables sobre la toxicidad, incluida la citotoxicidad; los ensayos que miden la citotoxicidad *in vitro* pueden dar una idea del potencial (cito) tóxico *in vivo* de tales los compuestos *in vivo* y también pueden ayudar a comprender el mecanismo de acción (Hartmann *et al.*, 2007).

2.6.4.1. Ensayo de toxicidad con *Artemia salina* L. El ensayo de letalidad de camarones de salmuera se considera una herramienta útil para la evaluación preliminar de la toxicidad. También, se ha sugerido para detectar actividades farmacológicas en extractos de plantas (Carballo *et al.*, 2002). Siendo este un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los compuestos en larvas de *Artemia spp.* Meyer *et al.* (1982), fueron los primeros en introducir el uso de las larvas de *Artemia spp.* en sustitución de animales superiores en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica.

Mediante el ensayo de *Artemia salina* L. es posible llevar a cabo una pre-evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos antitumorales. Inicialmente, se determinó que

existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS(P388) (leucemia *in vivo*). En general, los valores de dosis efectiva (ED<sub>50</sub>) para las citotoxicidades son aproximadamente una décima parte de los valores de la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) encontrados en los ensayos con *Artemia spp.* De este modo es posible detectar la actividad citotóxica mediante la utilización del ensayo de mortalidad de larvas más que otros ensayos *in vivo* o *in vitro* que resultan más tediosos y costosos (Pino Pérez y Jorge Lazo, 2010).

Este ensayo de toxicidad con *Artemia salina* L. tiene las ventajas de ser rápido (24 horas después de la introducción de los camarones), económico y simple (por ejemplo, no se requieren técnicas asépticas). Utiliza fácilmente una gran cantidad de organismos continuamente disponibles para consideraciones estadísticas y no requiere equipo especial o entrenamiento y una cantidad relativamente pequeña de muestra de prueba (50 mg para extractos crudos) (Meyer *et al.*, 1982).

Parra *et al.* (2001), realizaron un estudio comparativo de extractos de 20 plantas para estimar la correlación toxicológica entre la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) con *Artemia salina* L. y la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en ratones; sus resultados mostraron una buena correlación ( $r = 0.85$   $p < 0.05$ ), lo que sugiere que el bioensayo de camarones de salmuera es un modelo alternativo útil en la evaluación de toxicidad de extractos de plantas. En donde además aquellos extractos con un valor de LC<sub>50</sub> inferior a 1000 µg/ml de agua de mar artificial, de acuerdo con Meyer *et al.* (1982) se consideran bioactivos.

### 3. HIPÓTESIS

1. El grado de hidrólisis de los péptidos es menor a 30% y los pesos moleculares entre 3-14 kDa.
2. La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de los péptidos es menor a  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$
3. La capacidad antioxidante del hidrolizado de garbanzo es de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  ET por método ABTS y  $29 \text{ mmol L}^{-1}$  por el método de DPPH.
4. Los péptidos de garbanzo obtenidos con alcalasa, sometidos a simulación GI in vitro, no presentan diferencias significativas en el grado de hidrólisis (% GH), PM y concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) sobre la ECA.
5. La concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de los péptidos es mayor a la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de estos sobre la ECA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Cuantificar la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de angiotensina, así como la capacidad antioxidante y toxicidad *in vitro* de los péptidos de harina extrudida de garbanzo.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Obtener el concentrado proteico a partir de harina extrudida de garbanzo
2. Obtener los péptidos mediante hidrólisis, con la enzima alcalasa, del concentrado proteico.
3. Someter los péptidos obtenidos con alcalasa a digestión gastrointestinal *in vitro* con las enzimas pepsina y pancreatina y evaluar su efecto.
4. Obtener el perfil electroforético de la proteína de harina extrudida de garbanzo, así como de los péptidos obtenidos con alcalasa, antes y después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.
5. Evaluar la inhibición de la ECA y la capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos con alcalasa a partir de harina extrudida de garbanzo antes y después de la digestión gastrointestinal.
6. Evaluar la toxicidad, mediante el bioensayo con *Artemia salina* L., de los péptidos de harina extrudida de garbanzo.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Material Vegetal**

El garbanzo tipo Kabuli y de la variedad “blanco Sinaloa”, se adquirió en el mes de mayo de 2019, en un centro de acopio en Guamúchil, Sinaloa, el cual fue trasladado al laboratorio de alimentos funcionales y nutracéuticos de CIAD Culiacán para ser procesado.

### **5.2. Obtención de la Harina de Garbanzo**

Para la obtención de la harina, el garbanzo se quebró en un molino doméstico, marca “herradura”, con motor eléctrico y el descascarillado se realizó con la ayuda de una criba y un ventilador. Una vez obtenidos los grits, se molieron en el mismo molino hasta obtener la harina, la cual se pasó por tamiz malla 30 para obtener una harina más fina y homogénea, como se muestra en la figura 3. Finalmente, la harina se empacó en bolsas de celofán y se almacenó a temperatura ambiente.



Figura 3. Proceso de obtención de la harina de garbanzo

### 5.3. Extrusión de la Harina de Garbanzo

El proceso de extrusión se llevó a cabo en húmedo, en un extrusor de un tornillo modelo 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, USA) en el laboratorio de bioprocesos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### **5.3.1. Acondicionamiento de la Harina**

Para el tratamiento de extrusión se siguió la metodología descrita por Milán-Carrillo *et al.* (2002). Para lo cual previamente se determinó la humedad de la harina para ajustarla a 26.5%; se preparó una solución con 0.25 g NaCl + 0.75 g NaHCO<sub>3</sub> / 100 ml de agua destilada (p/v) y con la ayuda de un atomizador y una batidora se humectó la harina, se almacenó en bolsas resellables a 4°C en el refrigerador por 18 h para homogenizar la humedad.

### **5.3.2. Extrusión**

Antes del proceso de extrusión la harina acondicionada se puso a temperatura ambiente por 2 h. La extrusión se llevó a cabo siguiendo la metodología de Milán-Carrillo *et al.* (2002) bajo las siguientes condiciones: temperatura de 151°C y velocidad del tornillo de 191 rpm; para ello se programa el equipo y se espera que se establezca la temperatura, antes de procesar la harina de garbanzo, se procesa harina de maíz nixtamalizado para limpiar y preparar el equipo. Una vez preparado el equipo se vertió la harina en la tolva y se alimentó poco a poco con la ayuda de una espátula, el extrudido en forma de tiras se recolectó en una mesa de acero inoxidable.

Las tiras de extrudido se enfriaron por 2 h con la ayuda de un ventilador, posteriormente se secaron en el horno a 50 °C durante 24 h. Finalmente se molieron en un molino para café, marca Krups mod. gvx2, para obtener la harina extrudida (Figura 4.).



Figura 4. Proceso de extrusión de harina de garbanzo

#### 5.4. Desgrasado de la Harina Extrudida

La harina de garbanzo extrudida fue desgrasada en dos extracciones sucesivas de 3 h con hexano a temperatura ambiente en agitación constante. El solvente fue removido por decantación y el remanente fue evaporado durante 24 h en una campana de extracción, volteando la harina cuatro veces para permitir la volatilización del hexano, finalmente ésta fue extendida en una charola para una mejor eliminación de los residuos de hexano por 24 h más, se empacó en bolsas de celofán a temperatura ambiente para su posterior uso.

#### 5.5. Extracción Proteica

Para la obtención del aislado proteico de garbanzo se siguió el método descrito por Kaur y Singh (2007), con algunas modificaciones. Se dispersó la harina de garbanzo extrudida en agua destilada

(10% p/v) se ajustó el pH a 9 con NaOH 1M a temperatura ambiente, se agitó durante 1 h y se centrifugó a 8000 g durante 10 min para obtener mayor rendimiento, los procedimientos de extracción y centrifugación se repitieron dos veces en el residuo. Los extractos (sobrenadante) se combinaron y el pH se ajustó a 4.5 con HCl para precipitar la proteína. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 8000 g durante 10 min, seguido de la eliminación del sobrenadante por decantación. El pellet de proteínas se lavó dos veces con agua destilada y se centrifugó a 8000 g durante 10 min, posteriormente se congeló para finalmente liofilizarlo y mantenerlo en el congelador hasta su posterior uso.

### 5.6. Determinación de Proteína por el Método de Micro-Kjeldahl

Se realizó por el método 988.05 de la AOAC (1990), que consiste en la determinación de nitrógeno proteico. Se realizó la digestión de la muestra con ácido sulfúrico, seguido de una destilación en un matraz bola, captando los vapores en un matraz Erlenmeyer con la solución de ácido bórico y finalmente una valoración con HCl 0.1 N. El nitrógeno proteico (%N) se calculó con la siguiente fórmula, y se utilizó un factor de corrección (FC) de 6.25 en cálculo del porcentaje de proteína (P).

$$\%N = \frac{\text{Gasto HCl} \cdot N \cdot \text{Meq. Nitrógeno}}{\text{g de muestra}} * 100 \qquad \%P = \%N \cdot FC$$

N: Normalidad; Meq: Miliequivalentes

### 5.7. Hidrólisis Enzimática

El concentrado proteico se hidrolizó con la enzima alcalasa, la digestión fue durante 30 min siguiendo la metodología de Pedroche *et al.* (2002); con algunas modificaciones, mediante la técnica de pH-stat utilizando los siguientes parámetros de hidrólisis: concentración de sustrato,

10%; relación enzima/sustrato, 0.3 AU/g; pH 9; temperatura 50 °C. La hidrólisis se realizó en un recipiente de reacción de 50 ml, sobre una placa de agitación, termómetro y electrodo de pH. Pasados los 30 min de hidrólisis, la enzima se inactivó por acidificación con HCl llevando el hidrolizado a pH 5. El hidrolizado (HA) se centrifugó a 10000 g a 4 °C por 20 min para eliminar el sustrato insoluble y residuos de enzima, se recuperó el sobrenadante y finalmente se liofilizó y se almacenó a -20 ° C para su uso posterior.

### 5.8. Digestión Gastrointestinal *in vitro*

El HA se sometió a digestión secuencial con pepsina y pancreatina; siguiendo la metodología descrita por Ruiz *et al.* (2004). La digestión con pepsina fue durante 120 min seguida 120 min con pancreatina. Los parámetros de hidrólisis se usaron de la siguiente manera: concentración del sustrato, 10 mg/mL de agua; relación enzima/sustrato, 1:50 (p/p) para pepsina y 1:25 para pancreatina; pH 2 para pepsina y 7.5 para pancreatina a una temperatura de 37°C. La hidrólisis se realizó en un recipiente de reacción equipado sobre una placa de agitación, un termómetro y un medidor de pH. La hidrólisis se detuvo elevando la temperatura a 95°C durante 10 min, se dejó enfriar a 50 °C y se ajustó el pH a 7 con HCl. El hidrolizado se centrifugó a 10000 g por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y liofilizó (HGI) para realizar las evaluaciones correspondientes.

### 5.9. Evaluación de los Péptidos (HA y HGI)

Los péptidos obtenidos fueron evaluados mediante diferentes metodologías, para conocer su calidad, así como su actividad antioxidante y su grado de toxicidad, ya que esto permite asegurar su potencial bioactivo.

### 5.9.1. Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó por el porcentaje de proteína soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) en relación al contenido total de la muestra de acuerdo a Hoyle y Merritt (1994) modificado por e Silva y Silveira (2013). Alícuotas de 500  $\mu$ L de hidrolizado se mezclaron con 500  $\mu$ L de una solución de TCA al 20% para obtener la fracción soluble e insoluble en TCA al 10% después de 30 min de reposo, la mezcla se centrifugó a 3000 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Bradford y el resultado fue expresado en mg de proteína. Se usó albúmina de suero bovino como estándar. El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{GH}\% = \frac{\text{Contenido de proteína soluble en TCA al 10\%}}{\text{Contenido de proteína total (mg)}} \times 100$$

La cuantificación de proteína se realizó siguiendo la metodología de Bradford (1976) con algunas modificaciones, en donde 10  $\mu$ L de las muestras se colocaron en una microplaca, por triplicado, posteriormente se agregaron 250  $\mu$ L de reactivo de Bradford, se dejó reposar 10 min y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó agua como blanco.

### 5.9.2. Perfil Electroforético

Las muestras de proteína fueron, previamente, dializadas con una membrana de 3.5kDa durante 24 h en agitación a 4°C con un recambio de agua; para ello la muestra se disolvió en agua ultrapura y se ajustó el pH a 7 para solubilizarla, se vació en la membrana de diálisis y ésta a su vez se colocó, sostenido en una esponja circular para flotar, en un vaso de precipitado con agua destilada y una barra magnética de agitación, el cual se colocó sobre una placa de agitación bajo condiciones de refrigeración (4°C), pasadas 4 h se hizo un recambio de agua del vaso y se dejó hasta cumplir las 24 h y finalmente se liofilizó.

El perfil de pesos moleculares de la proteína y los péptidos (HA y HGI) se obtuvo por electroforesis de una dimensión en gel discontinuo de poliacrilamida (gel concentrador 6% y gel de resolución 15%), teñido con azul brillante de Coomassie siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Se preparó un gel discontinuo de poliacrilamida, se adicionó primero la solución de poliacrilamida al 15%, luego una capa de alcohol isopropílico y se dejó 15 min, se secó el alcohol con papel filtro y posteriormente se adicionó la solución de poliacrilamida al 6%, se colocó un peine para generar los pozos y se dejó gelificar durante 60 min. Una vez obtenido el gel se colocó en la cámara de electroforesis vertical y la cual se llena con el buffer de electroforesis (tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% y 500 mL de agua ultrapura).

La muestra se preparó en tubos de 0.6 mL con una cantidad equivalente a 20 µg de proteína y se le adicionó buffer Laemmli hasta un volumen de 20 µL total por muestra, se homogenizó y calentó en baño seco a 95°C por 5 min, se dejó enfriar 5 min y se cargó el gel en la parte intermedia con el marcador de peso molecular Presicion Plus Protein Unstained Standart (BIO-RAD), se llenó la cámara con buffer de electroforesis, y se corrió a 120 V durante una hora y media o hasta que llegó al límite del gel. Finalmente se tiñó con azul de Coomassie, el gel se fijó por 2 h con agitación en solución de teñido y luego 4 h en solución de desteñido con un recambio de solución. Finalmente se realizó la captura de la imagen en un fotodocumentador y se analizó en el programa Image Lab Versión 2.0.1. (BIORAD).

### **5.9.3. Capacidad Antioxidante**

5.9.3.1. Inhibición del radical 2,2'-azinobis (ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>). Para el método de ABTS<sup>+</sup> se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Huang *et al.* (2005). Una solución 7 mmol de ABTS se mezcló con persulfato de potasio 2.45 mmol en partes iguales, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 12-16 h hasta que da una solución azul oscura. Esta solución se diluyó en metanol al 80% hasta que la absorbancia alcanzó 0.7 a 734 nm. En un microplaca de 96 pozos se mezclaron 285 µL de la solución resultante con 15 µL de muestra, colocándose en incubación durante 2 h en la obscuridad, transcurrido el tiempo se leyó a 734 nm, los resultados se reportaron como IC<sub>50</sub>, el cual permite conocer la concentración media para inhibir el 50% del radical.

5.9.3.2. Inhibición del radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). El ensayo DPPH se realizó de acuerdo a la metodología de (Shimada *et al.*, 1992) con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL de solución de DPPH 0.1 mM en etanol al 95% con 1 mL de solución de muestra (diferentes concentraciones). Los tubos de reacción se agitaron durante 30 min, en un shaker, protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, la mezcla fue transferida a una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas Epoch de la marca Biotek. Tras la reducción, el color de la solución se desvanece. El porcentaje del DPPH restante se calculó como:

$$\%DPPH = ((Abs\ Inicial - Absorbancia\ final) / Abs\ inicial) * 100$$

El % DPPH es proporcional a las concentraciones de antioxidantes, y la concentración que causa una disminución del 50% en la concentración inicial de DPPH se define como IC<sub>50</sub>.

#### **5.9.4. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)**

Se realizó por el método espectrofotométrico propuesto por Li *et al.* (2005) y modificado por Narai-Kanayama y Aso (2009) con algunas modificaciones. El cual se basa en la reacción colorimétrica específica de ácido hipúrico (HA), liberado de la reacción, con cloruro de benceno sulfonilo (BSC) en presencia de quinolina. Se utilizó Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) como sustrato de la reacción; éstos formaron un complejo que se tiñó de café rojizo y se leyó a una absorbancia de 492 nm. Se mezclaron cincuenta microlitros de solución de HHL 5 mM en tampón borato de Na 100 mM, pH 8.3, que contenía NaCl 300 mM y 20 µL del inhibidor (HA y HGI) en el mismo tampón. A continuación, se añadieron a la solución mixta 10 µL de ECA 200 mU/ml en el mismo tampón. La reacción catalizada por ECA se incubó a 37 °C durante 1 h, y se detuvo mediante la adición de 20 µL de HCl 1M. Posteriormente, el ácido hipúrico (AH) de la mezcla de reacción se coloreó mediante la adición de 150 µL de quinolina y 50 µL de BSC e incubación a 37°C durante 30 min en la oscuridad. Luego el cromógeno AH-quinolina-BSC se diluyó con 150 µL de etanol y se incubó a 37°C durante 30 min en la oscuridad. Se prepararon las muestras A (muestras), B (blanco) y C (control) en tubos Eppendorf color ámbar de 2 mL, como lo indica el cuadro 4. Se tomaron 180 µL de cada muestra y se colocaron en una micro placa de 96 pozos por duplicado y se leyó a 492 nm en un lector de microplacas modelo Epoch de la marca Biotek. El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de ECA} = \frac{B - A}{B - C} \times 100$$

Cuadro 4. Procedimientos de ensayo de actividad inhibitoria de ECA.

Reactivos	Muestra A (μL)	Muestra B (μL)	Muestra C (μL)
<b>ECA (200 mU/mL)</b>	-	-	10
<b>HCl (1 M)</b>	-	-	20
<b>H-H-L (5 mM)</b>	50	50	50
<b>Inhibidor de ECA</b>	20	-	20
<b>Amortiguador (tetraborato 0.1 M, NaCl 0.3 M)</b>	-	20	-
<b>Incubar a 37 °C por 5 min</b>			
<b>ECA (200 mU/mL)</b>	10	10	-
<b>Incubar a 37 °C por 30 min</b>			
<b>HCl (1 M)</b>	20	20	-
<b>Quinolina 98%</b>	150	150	150
<b>BSC 99%</b>	50	50	50
<b>Incubar a 30 °C por 30 min en oscuridad</b>			
<b>Etanol</b>	150	150	150
<b>Incubar a 30 °C por 30 min en oscuridad</b>			

Se estimó el porcentaje de la actividad inhibitoria sobre la ECA y con los resultados se realizó un análisis de regresión y para obtener el IC<sub>50</sub> (Concentración inhibitoria media).

### 5.9.5. Ensayo de Toxicidad

Se realizó con el crustáceo *Artemia salina* L. como modelo de estudio, siguiendo la metodología de Meyer *et al.* (1982); la cual consistió en la incubación de los huevos de *Artemia* en salmuera, en un recipiente conteniendo un litro de agua de mar artificial estéril; preparada con sal de marina (38 gL<sup>-1</sup>) y ajustando el pH a 8.5 con NaOH 1M, bajo aireación constante durante 48 h. Después de la eclosión las larvas activas libres de cáscaras de huevo se recogieron de la porción más brillante

de la cámara de eclosión. Diez nauplios o larvas se colocaron en cada vial que contenía 4.5 mL de solución de salmuera más 5 mL de la solución de péptidos en las diferentes concentraciones, manteniendo a temperatura ambiente durante 24 h bajo la luz, pasado el tiempo de exposición se contaron las larvas sobrevivientes con la ayuda de un estereoscopio modelo S8AP0 de la marca Leica. Se usó podofilotoxina como control positivo en cada experimento y se usaron 7 diferentes concentraciones, tomando como referencia el IC<sub>50</sub>, con dos repeticiones por cada una de éstas. Los valores de LC<sub>50</sub> se obtuvieron por regresión lineal, representada por el logaritmo de la concentración vs porcentaje de letalidad.

### 5.10. Diseño Experimental

El diseño estadístico de los experimentos se resume en el cuadro 5, los cuales se analizarán en el paquete estadístico Minitab 18.

Cuadro 5. Diseño de los experimentos para la evaluación de HA y HGI.

Ensayo	Diseño	Factores	Niveles	Variable de respuesta
<b>Grado de hidrólisis</b>	ANOVA de una vía, con un factor totalmente al azar	Porcentaje de nitrógeno soluble	1. Hidrolizado A 2. Hidrolizado GI	Grado de hidrólisis
<b>Capacidad antioxidante</b>	Dos factores totalmente al azar, por regresión cuadrática	1. Concentración de inhibidor 2. Porcentaje de inhibición del radical	6 concentraciones (mg mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub>
<b>Inhibición de ECA</b>	Dos factores totalmente al azar, por regresión cuadrática	1. Concentración de inhibidor 2. Porcentaje de inhibición de ECA	5 Concentraciones (mg mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub>
<b>Toxicidad</b>	Dos factores totalmente al azar, por regresión lineal	1. Concentración del inhibidor. 2. Porcentaje de letalidad	6 concentraciones Incluyendo el IC <sub>50</sub> de la ECA	LC <sub>50</sub>

Además, se hizo un ANOVA y una comparación de medias por Tukey del IC<sub>50</sub> de la capacidad antioxidante y la inhibición de ECA, entre el concentrado proteico el HA y el HGI.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Determinación de Proteína

Los resultados de porcentaje de proteína en las harinas (extrudida y sin extrudir) y el concentrado proteico se muestran en la figura 5. El porcentaje de proteína de la harina de garbanzo sin extrudir se encuentra dentro de los intervalos de 17.2 y 26.7% reportados por Kaur y Singh (2007) y Paredes-López *et al.* (1991). Así también, se observó un incremento en el porcentaje de proteína después de extrudir la harina, como lo ha reportado Milán-Carrillo *et al.* (2002). Este hecho se puede atribuir a que la harina extrudida contiene un mayor porcentaje de sólidos totales que la harina sin extrudir.

En cuanto al concentrado proteico, se obtuvo un 85.43% de proteína; este porcentaje es superior al porcentaje de referencia (70%) para ser considerado como concentrado proteico (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013). Además, este porcentaje obtenido es superior a los reportados por Barbana y Boye (2010); Medina-Godoy *et al.* (2012) y Paredes-López *et al.* (1991), de 76.15%, 60.28% y 84.8%, respectivamente para concentrado proteico de harina de garbanzo.

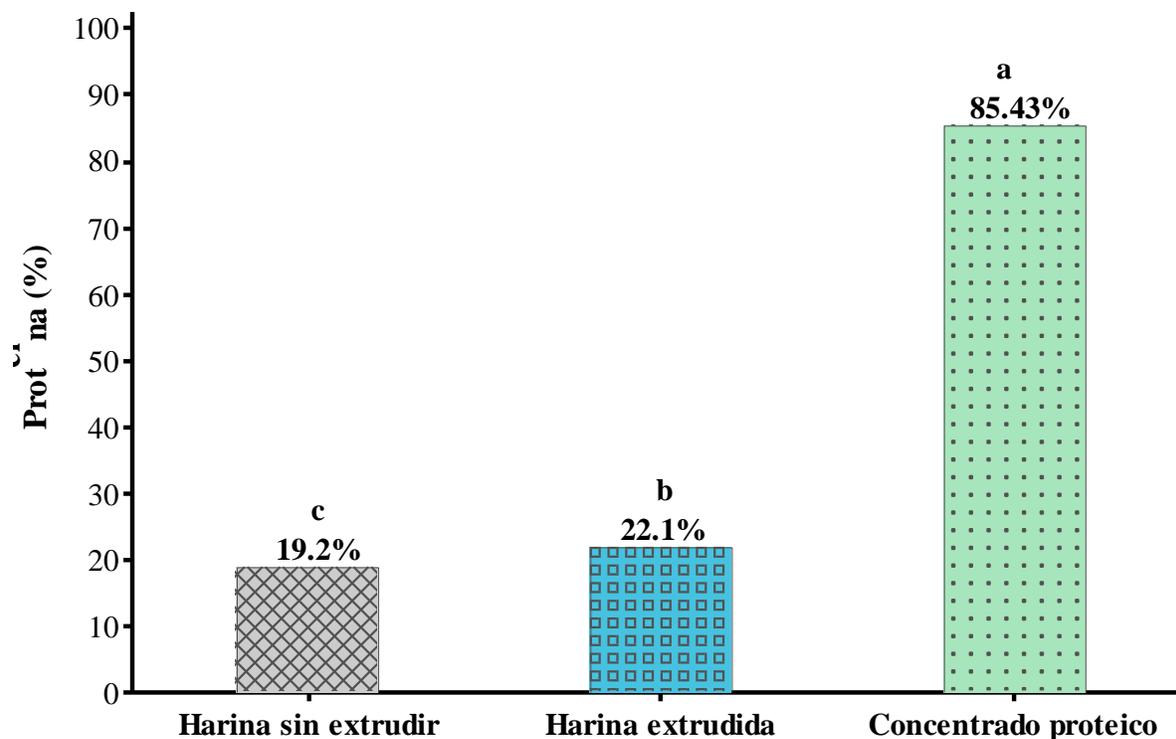
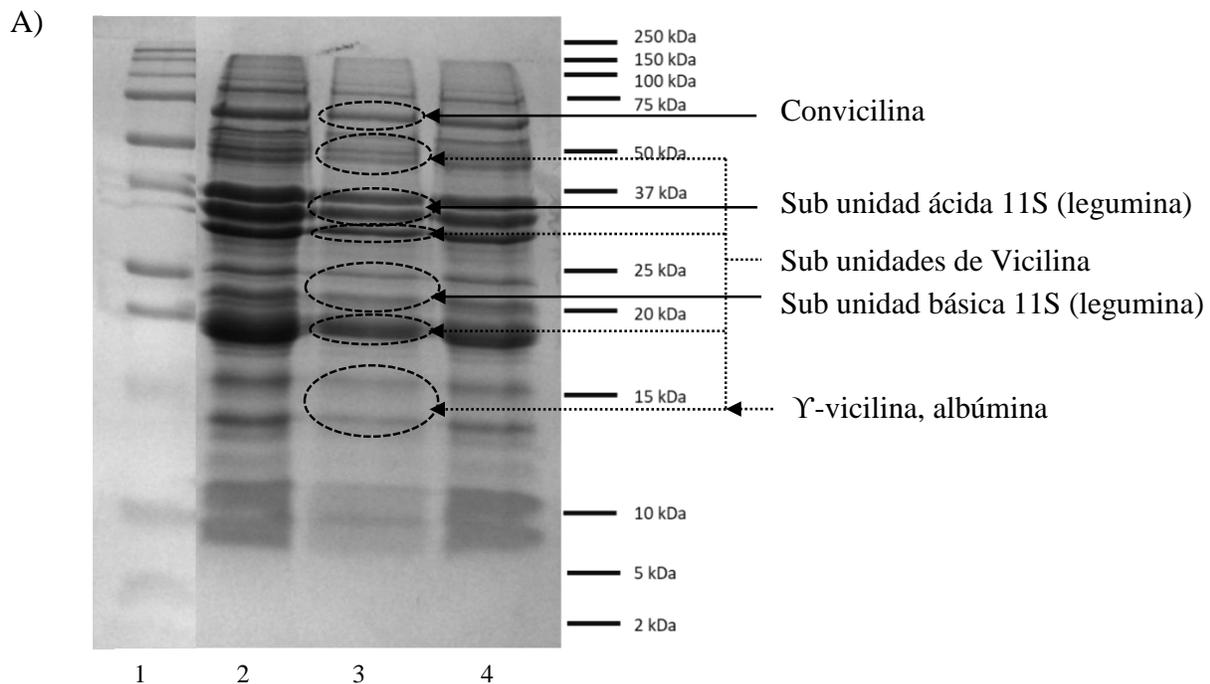


Figura 5. Porcentaje de proteína en las harinas y el concentrado proteico de garbanzo.

## 6.2. Perfil Electroforético

En cuanto a la comparación de los perfiles electroforético de la proteína de garbanzo con y sin extrusión de la figura 6 se puede observar que, tras haber sido sometida al proceso de extrusión se obtuvo un perfil idéntico al de la proteína sin extrudir, por lo tanto se puede asumir que ésta molécula no sufrió hidrólisis pues se encontró íntegra para proceder a realizar la hidrólisis con la enzima alcalasa y así atribuirle este hecho solo a la enzima y no al tratamiento de extrusión, el cual tuvo como objetivo darle un pre-tratamiento a la harina para eficientar el proceso de extracción proteica, así como la hidrólisis enzimática. Se ha descrito que el proceso de extrusión causa la gelatinización del almidón, así como la desnaturalización parcial de las proteínas, provocando con ello un incremento de la solubilidad del almidón y con ello se facilita la separación de la matriz que forman estas dos macromoléculas, facilitando así el proceso de extracción de la proteína (Riaz, 2000). (Riaz, 2000) Además se ha descrito ampliamente que el proceso de extrusión afecta la estructura de las proteínas lo que facilita la acción de las enzimas durante los procesos de hidrólisis (Steel *et al.*, 2012).

En la figura 6 se muestran los resultados del perfil electroforético del concentrado proteico A) sin extrudir y B) extrudido. En la imagen del gel de electroforesis se muestran tres carriles en donde se aprecia con más claridad el perfil de la proteína de garbanzo en los dos casos, sin extrudir y extrudido; las cuales muestran un perfil típico de las proteínas que componen la proteína de garbanzo, lo cual coincide con perfiles de aislados proteicos de garbanzo reportados por otros autores (Barbana y Boye, 2010; Chang *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 1999; Ghribi, Gafsi, *et al.*, 2015). En ambos perfiles se observan bandas de diferente intensidad, que van desde 9 hasta 80 kDa; las bandas entre 20-25 y 38-43 kDa correspondientes a las subunidades básica y ácida de legumina, respectivamente, la principal proteína del garbanzo (Barbana y Boye, 2010); las bandas señaladas en los pesos moleculares ~13, 16, 19, 34 y 50 kDa corresponden a subunidades de vicilina (13, 16.5, 19.2, 34.6 y 51), la banda con peso molecular de 63 kDa corresponde a convicilina y las bandas que se observan alrededor de 5 a 10 kDa puede ser una mezcla de polipéptidos de albúmina (5.3 y 8 kDa) y  $\gamma$ -vicilina (8 kDa) (Chang *et al.*, 2011).



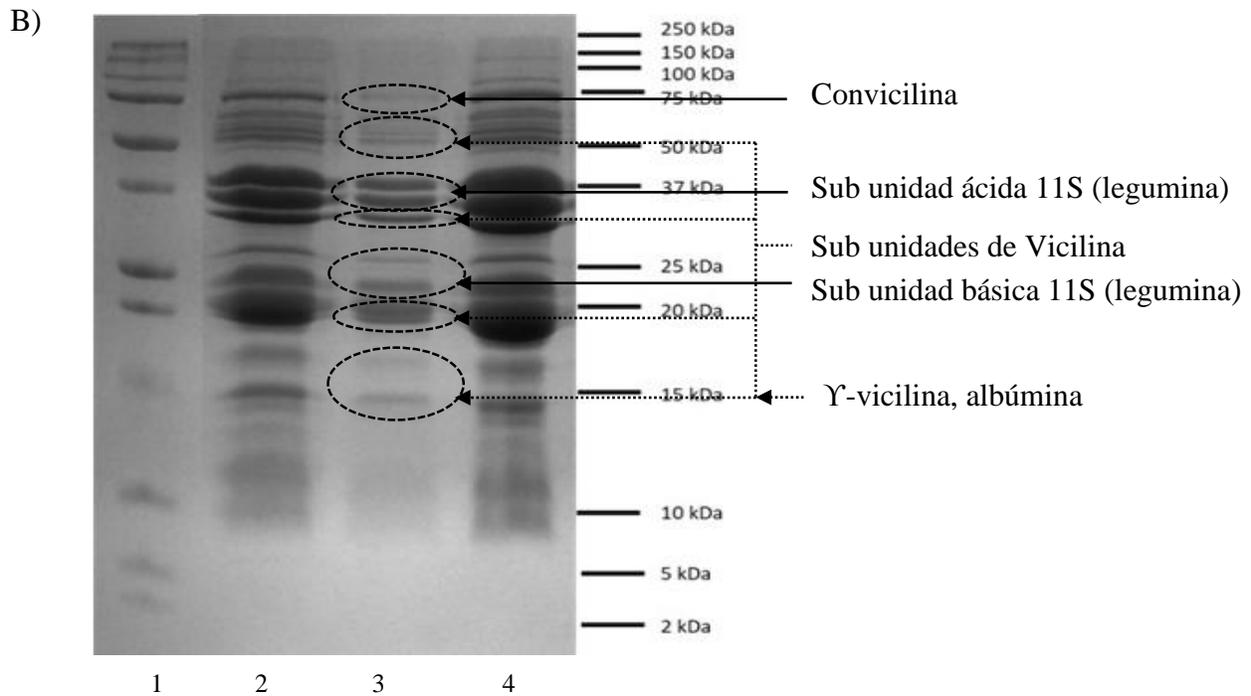


Figura 6. Perfil electroforético del concentrado proteico de garbanzo. A) Sin extrudir. Carril 1: marcador molecular; carril 2, 3, y 4: volumen de 15, 10 y 5  $\mu$ L, respectivamente (dilución 1:15). B) Extrudido. Carril 1: marcador molecular; carril 2 y 3: 10 y 5  $\mu$ L (dilución 1:20) y carril 4: 10  $\mu$ L (dilución 1:10).

En la figura 7, se puede observar en los dos carriles siguientes después del marcador molecular, que corresponden a dos diluciones del hidrolizado con la enzima alcalasa (HA), que la proteína fue hidrolizada casi en su totalidad. Después de la hidrólisis con alcalasa se observan bandas correspondientes a los péptidos, los cuales tienen pesos moleculares de entre 5 y 12 kDa. Las dos bandas siguientes señaladas como HGI, corresponden al HA sometidos a simulación gastrointestinal, el perfil muestra que los péptidos del HA no sufrieron una hidrólisis significativa cuando fueron sometidos a la acción de las enzimas digestivas, puesto que se observa una banda más densa alrededor de 10 kDa de a la misma altura que las del HA; esto da un primer indicio de que los péptidos de garbanzo obtenidos con la enzima alcalasa presentan resistencia a la digestión gastrointestinal "in vitro"; y que las enzimas gastrointestinales hidrolizaron el resto de la proteína y péptidos de mayor tamaño.

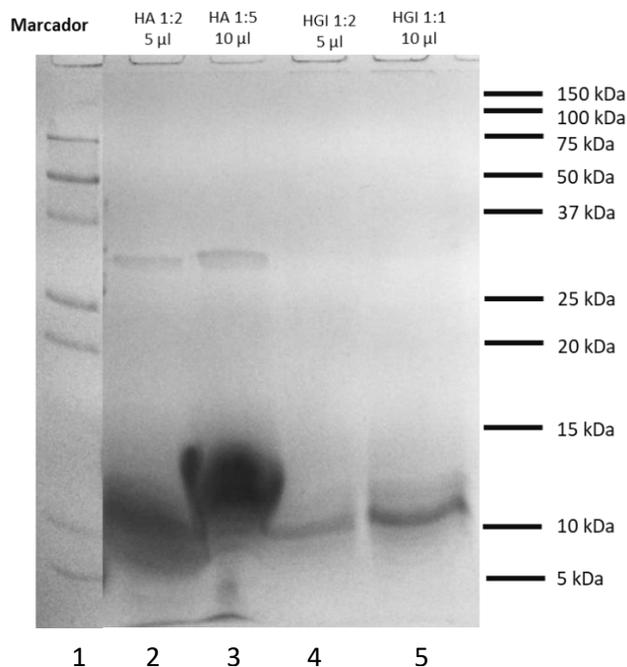


Figura 7. Perfil electroforético del HA y HGI. Carril 1: marcador molecular; carril 2: 5 µL de HA (Dilución 1:2); carril 3: 10 µL de HA (Dilución 1:5); carril 4: 5 µL de HGI (Dilución 1:2) y carril 5: 10 µL de HGI (Dilución 1:1).

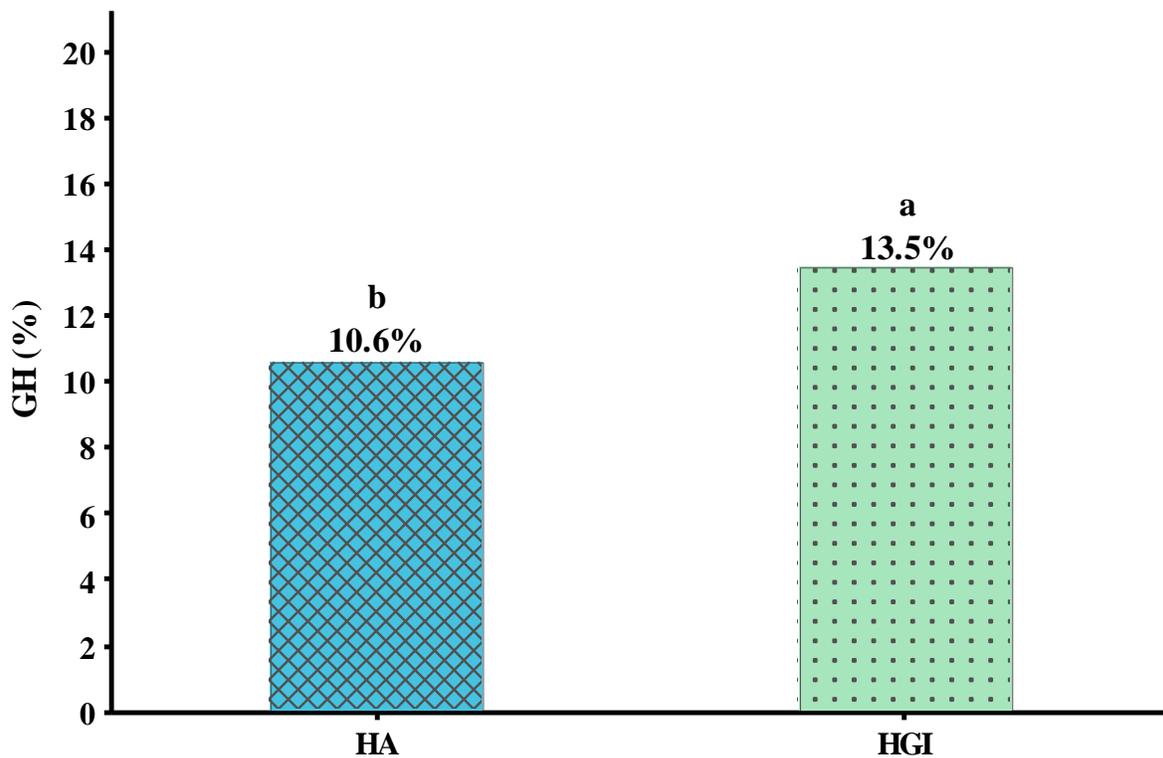
Los pesos moleculares ( $\approx 10$  kDa) de los péptidos obtenidos con alcalasa (HA) se encuentran dentro de los intervalos de pesos moleculares reportados por Barbana y Boye (2010); Pedroche *et al.* (2002); Yust *et al.* (2003) de 1.4-28; 1.3, 3.3 y 21 y 6-14 kDa, respectivamente.

### 6.3. Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) de proteínas es el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos por la acción de las enzimas. Este parámetro se determinó para medir el efecto de la acción de las enzimas sobre la proteína y obtener los péptidos inhibidores de ECA.

En la figura 8 se muestra el grado de hidrólisis (GH) del hidrolizado con la enzima alcalasa (HA), los péptidos de interés, y del HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI). Para el primero se obtuvo un GH de 10.6% y después de haberlo sometido a la acción de las enzimas digestivas el GH fue de 13.5%. A pesar de que sí hubo diferencia numérica, esta no fue estadísticamente

significativa ( $P \leq 0.05$ ), lo que indica que estos péptidos de garbanzo obtenidos con la enzima alcalasa presentaron gran estabilidad frente a las proteasas gastrointestinales. Diversos autores (Boschin *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 1998; Jao *et al.*, 2012; Vermeirssen *et al.*, 2005) han mencionado que esta enzima produce péptidos con fuerte actividad inhibitoria de ECA resistentes a la acción de las enzimas digestivas.



HA (Hidrolizado con alcalasa)  
HGI (Hidrolizado gastrointestinal)

Figura 8. Grado de hidrólisis (%) del hidrolizado con la enzima alcalasa (HA) y hidrolizado HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI).

Algunos autores hidrolizaron proteína de garbanzo con alcalasa, como Medina-Godoy *et al.* (2012); Yust *et al.* (2003) y Pedroche *et al.* (2002); los cuales reportaron GH de 15.59, 27 y 30%, respectivamente. A pesar de que se siguieron las mismas condiciones de hidrólisis del último autor mencionado, el grado de hidrólisis obtenido en este proyecto fue mucho menor (10.6%) esta diferencia puede deberse al método utilizado, en este caso se obtuvo por la cuantificación del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 20%, mientras que Pedroche *et al.* (2002) utilizó el

método de cuantificación de grupos amino libres por reacción con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). En este caso el método utilizado se ajusta bien al tipo de hidrolizado debido a que se usó una enzima con actividad endopeptidasa. Esta teoría se basa en el hecho de que la acción de una exopeptidasa no dará como resultado el mismo aumento en solubilidad como cuando el mismo número de enlaces peptídicos son escindidos por una endopeptidasa (Nielsen *et al.*, 2001) .

#### 6.4. Capacidad Antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante de los péptidos de garbanzo extrudido hidrolizados con la enzima alcalasa (HA) y aquellos sometidos a digestión gastrointestinal (HGI) se llevó a cabo por los métodos de captación de radicales ABTS<sup>+</sup> y DPPH. Estos ensayos se basan en la transferencia de electrones para estabilizar a los radicales libres y son utilizados con frecuencia para medir la actividad antioxidante de los péptidos (Sarmadi y Ismail, 2010). Diversos autores han descrito que los péptidos son excelentes antioxidantes, sin embargo, su capacidad depende del peso molecular, tipo y secuencia de aminoácidos. En este estudio, en el HA se obtuvieron péptidos con pesos moleculares entre 5 y 12 kDa determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida. En general, se ha descrito ampliamente que los péptidos con mayor capacidad antioxidante son aquellos que presentan pesos moleculares menores a 5 kDa, como lo obtenidos por Li *et al.* (2008) y Kou *et al.* (2013) los cuales hicieron hidrólisis con alcalasa durante 40 min el primero y el segundo hidrólisis secuencial de albúmina de garbanzo con alcalasa y flavourzima por un total de 3 h; a diferencia de este proyecto en donde se hidrolizó el concentrado proteico por solo 30 min con la enzima alcalasa, debido a que el objetivo fue obtener péptidos inhibidores de ECA.

##### **6.4.1. Inhibición del Radical 2,2'-azinobis (Ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>)**

En la inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> se utilizaron seis concentraciones para construir la curva de

captación del radical por regresión y a través de la ecuación obtener el IC<sub>50</sub> tanto del concentrado proteico como del HA y el HGI; como se muestra en las figuras 9, 10 y 11. Las tres curvas de captación del radical ABTS<sup>+</sup> tuvieron una tendencia dependiente de la dosis y en los tres casos el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) se obtuvo por arriba de 98%; esto es que el modelo utilizado se ajusta muy bien a los datos obtenidos. Estos resultados demuestran que los péptidos de garbanzo extrudido (HA) actúan como donantes de hidrógeno o electrones para neutralizar los radicales ABTS<sup>+</sup> y mejoran esta capacidad después de someterlos a digestión gastrointestinal.

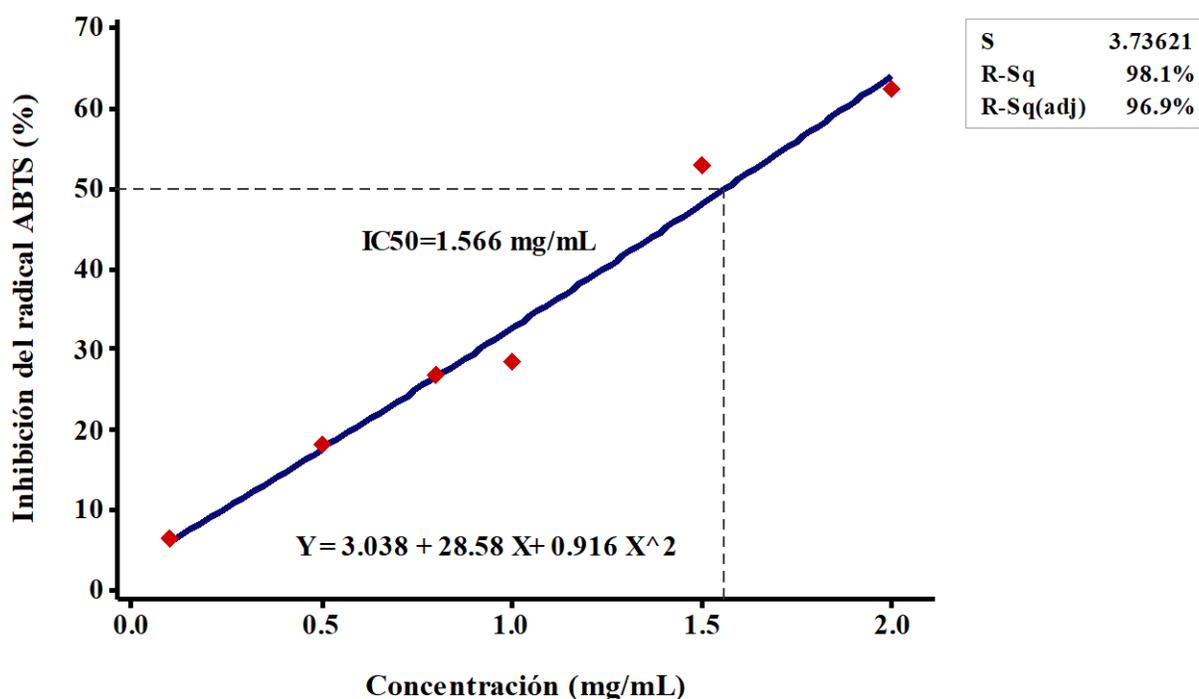


Figura 9. Inhibición de radicales ABTS<sup>+</sup> del concentrado proteico. Concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, y 2.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

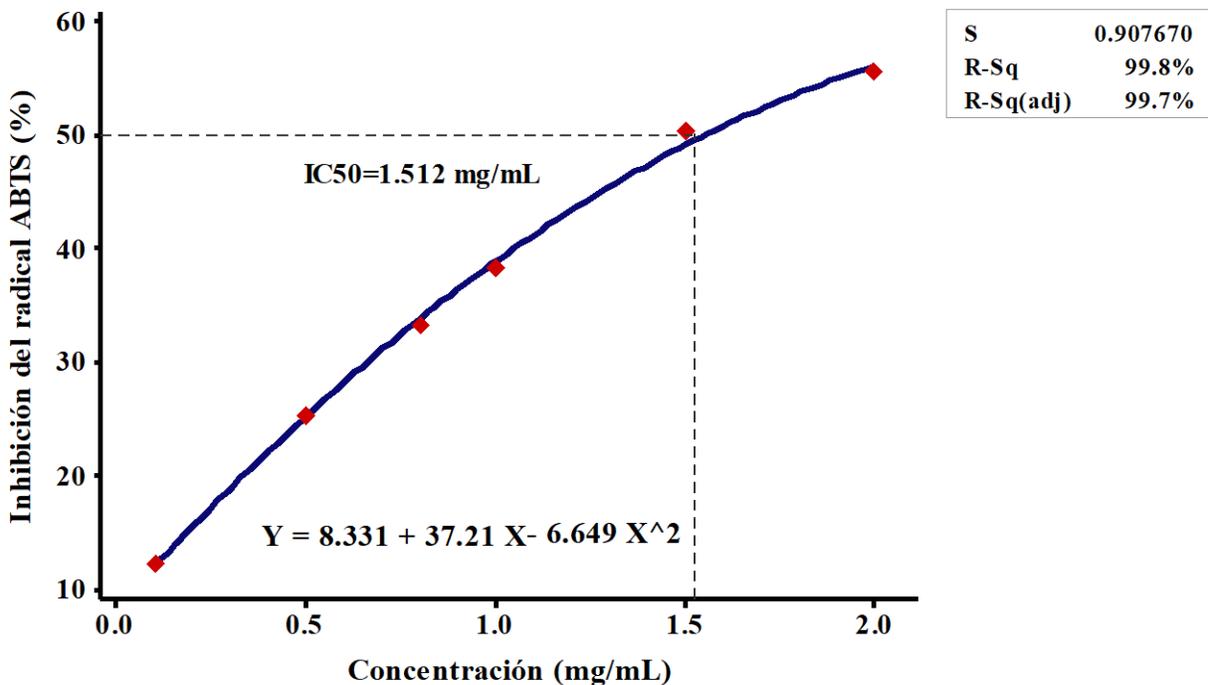


Figura 10. Inhibición de radicales ABTS<sup>+</sup> del HA. Concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, y 2.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

Tanto en las figuras 9 y 10 y de manera resumida en el cuadro 6 se muestran los resultados de IC<sub>50</sub> del concentrado proteico y del HA los cuales son de 1.566 y 1.512 mg/mL respectivamente, en los que no hay diferencia significativa, según los resultados del ANOVA. Cabe señalar que las proteínas son moléculas que muestran buena capacidad antioxidante pero debido a su gran tamaño no pueden atravesar las membranas celulares y así no pueden actuar como compuestos bioactivos; es por ello que es necesario hidrolizar para obtener péptidos antioxidantes. En este sentido aunque no haya diferencia significativa en la captación de radicales ABTS, entre el concentrado proteico y el HA, este último sí puede actuar como antioxidante debido a la reducción del tamaño de la molécula (Kou *et al.* (2013).

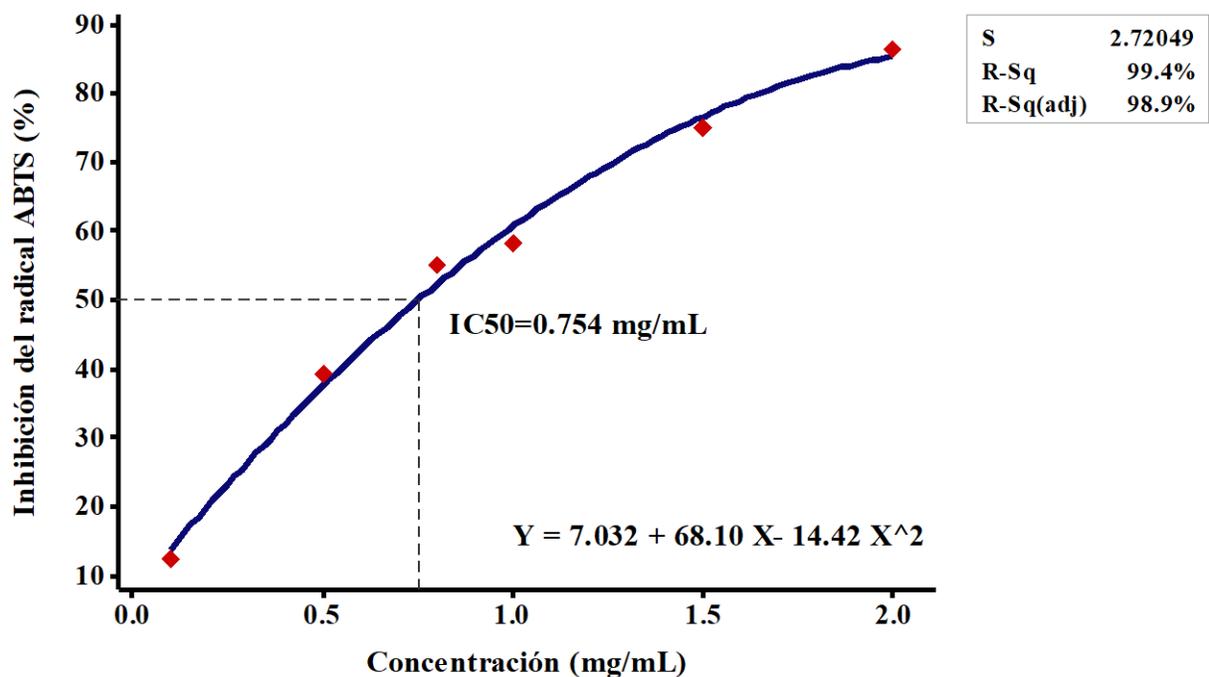


Figura 11. Inhibición de radicales ABTS<sup>+</sup> del HGI. Concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, y 2.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

En las figuras 10 y 11 se puede apreciar que cuando el HA fue sometido a digestión gastrointestinal (HGI) el IC<sub>50</sub> se redujo a la mitad, de 1.512 a 0.754 mg/mL, esto demuestra que el hidrolizado con alcalasa mejoró su capacidad antioxidante en la captación de radicales ABTS<sup>+</sup> una vez que fue sometido a digestión gastrointestinal, lo cual tiene congruencia con los resultados de grado de hidrólisis que pasó de 10.6 a 13.5% (figura 8), esto es que las enzimas digestivas hidrolizaron aquella proteína resistente y algunos péptidos de mayor tamaño como se aprecia también en los resultados de electroforesis (figura 7).

Fuente	IC <sub>50</sub> (mg/mL) para ABTS <sup>+</sup>
Concentrado Proteico	1.566 ± 0.0714 <sup>a</sup>
Hidrolizado con alcalasa (HA)	1.512 ± 0.198 <sup>a</sup>
HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI)	0.754 ± 0.0881 <sup>b</sup>

Estos resultados concuerdan con autores (Kou *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008; Yust *et al.*, 2012) que mencionan que los péptidos de menor tamaño, como en este caso el HGI, tienen mejor capacidad antioxidante que péptidos de mayor tamaño (HA). Para el caso de Kou *et al.* (2013) realizaron hidrólisis de garbanzo de manera secuencial con alcalasa y flavourzima y el hidrolizado fue separado, en tres fracciones, por cromatografía, de las cuales la fracción de menor peso molecular fue la que mostró una mayor capacidad antioxidante incluyendo la captación de radicales ABTS<sup>+</sup>.

#### **6.4.2. Inhibición del Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

Para el ensayo de inhibición del radical DPPH se utilizaron seis concentraciones para el concentrado proteico y cinco para el HA y el HGI; esto para construir la curva de captación del radical por regresión, y a través de la ecuación obtener el IC<sub>50</sub>; como se muestra en las figuras 12, 13 y 14. Las tres curvas de captación del radical DPPH tuvieron una tendencia dependiente de la dosis y en los tres casos el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) se obtuvo por arriba de 93%; esto es que el modelo utilizado se ajusta muy bien a los datos obtenidos. Estos resultados demuestran que los péptidos de garbanzo extrudido (HA) actúan como donantes de protones para neutralizar los radicales DPPH.

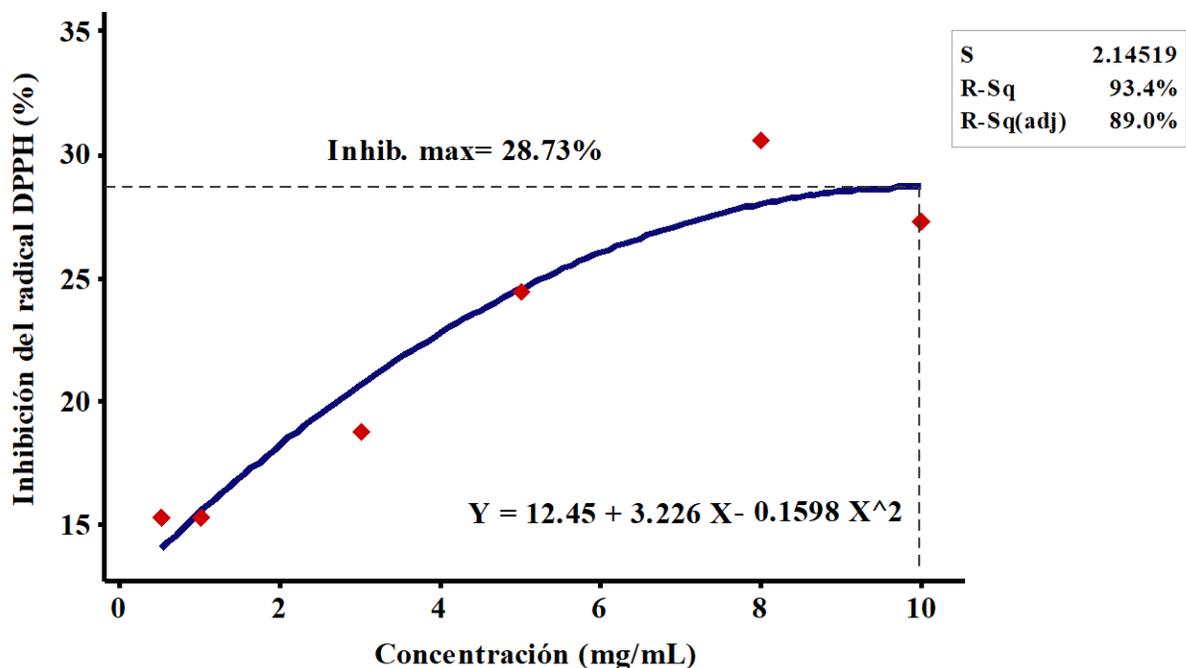


Figura 12. Inhibición de radicales DPPH del concentrado proteico. Se usaron concentraciones de 0.5, 1.0, 3, 5, 8 y 10 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

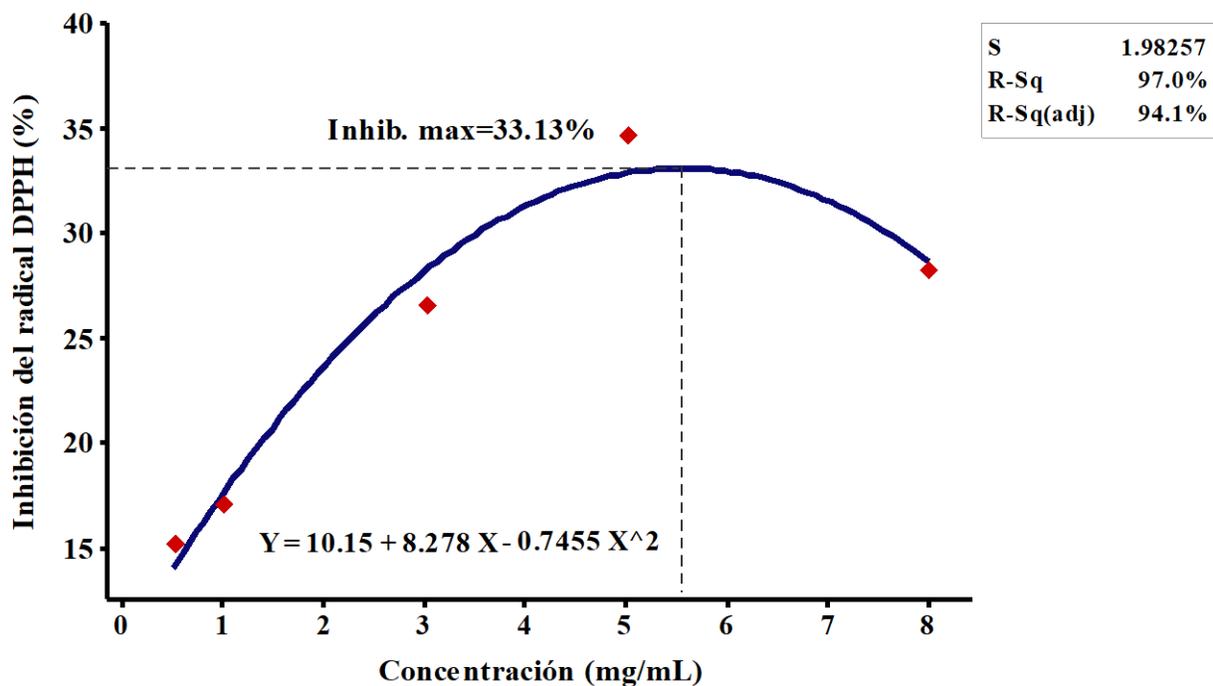


Figura 13. Inhibición de radicales DPPH del HA. Se usaron concentraciones de 0.5, 1.0, 3, 5, y 8 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

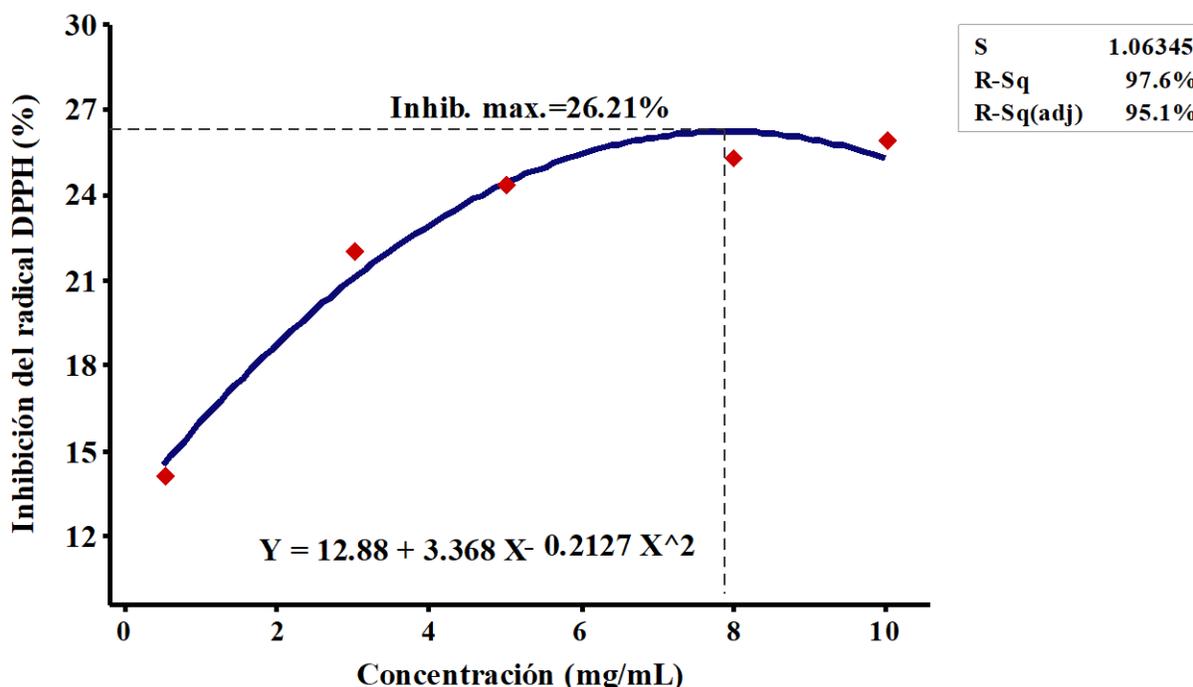


Figura 14. Inhibición de radicales DPPH del HGI. Se usaron concentraciones de 0.5, 3, 5, 8 y 10 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

Como se muestra en el cuadro 7, el concentrado proteico tuvo una captación máxima de DPPH del 28.73% con una concentración de 10 mg/mL, el HA 33.13% con 5.56 mg/mL y 26.21 % con 7.9 mg/mL. El HA tuvo un mayor porcentaje de captación del radical con una menor concentración de péptidos y una vez que fue sometido a digestión gastrointestinal esta disminuyó esa capacidad máxima a 26.21%.

Cuadro 7. Inhibición de radicales DPPH por los hidrolizados y el concentrado proteico.

Fuente	Inhibición máxima de DPPH
Concentrado Proteico	28.73% con 10 mg/mL
Hidrolizado con alcalasa (HA)	33.13% con 5.56 mg/mL
HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI)	26.21 % con 7.9 mg/mL

Yust *et al.* (2012) realizaron hidrólisis con alcalasa y flavourzima, tan solo con la alcalasa durante una hora de hidrólisis, este tuvo aumentó en la captación de DPPH de hasta en un 50% con una

concentración de 10 mg/mL. En nuestro proyecto con hidrólisis con alcalasa por 30 min se alcanzó un 33.13% con 5.56 mg/mL (cuadro 7), aproximadamente la mitad de la concentración que usó el autor antes mencionado. Por otro lado Ghribi, Sila, *et al.* (2015) con una concentración de péptidos similar a la de HA de este proyecto tuvieron una mayor captación del radical de hasta 80%, pero ellos hidrolizaron la proteína por 220 min obteniendo un grado de hidrólisis de 14.67% y nuestro hidrolizado fue de 10.6%. Esto es que para obtener una mejor captación de radicales DPPH se requiere hacer hidrólisis por más de 30 min y con un grado de hidrólisis mayor al obtenido en el presente proyecto.

### 6.5. Inhibición de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

El objetivo principal de este proyecto fue la obtención de péptidos inhibidores de ECA. Algunos autores han descrito que la hidrólisis de la proteína de garbanzo con la enzima alcalasa durante 30 min tiene excelentes resultados en la obtención de péptidos con esta característica. Esto, tanto por la especificidad de la enzima por ser una endopeptidasa que corta por delante de aminoácidos hidrofóbicos que son característicos en el extremo c-terminal de péptidos inhibidores de ECA; como por la fuente de la proteína, debido a su composición de aminoácidos. También se tienen que considerar otros aspectos no menos importantes como el peso molecular de los péptidos, así como la secuencia de aminoácidos en ellos.

En las figuras 15, 16 y 17 se muestran las gráficas de inhibición de ECA. Para la construcción de las curvas se usaron cinco concentraciones de péptidos tanto para en concentrado proteico, HA y HGI (HA sometido a digestión gastrointestinal), esto para construir la curva de inhibición enzimática por regresión, y a través de la ecuación obtener el  $IC_{50}$ . En los tres casos las curvas tuvieron un comportamiento dependiente de la dosis y solo para la de concentrado proteico, cuando la concentración superó los 2 mg/mL, según la tendencia de la curva, la inhibición comienza a decrecer. En las tres curvas se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor de 98%; esto es que el modelo utilizado se ajusta muy bien a los datos obtenidos.

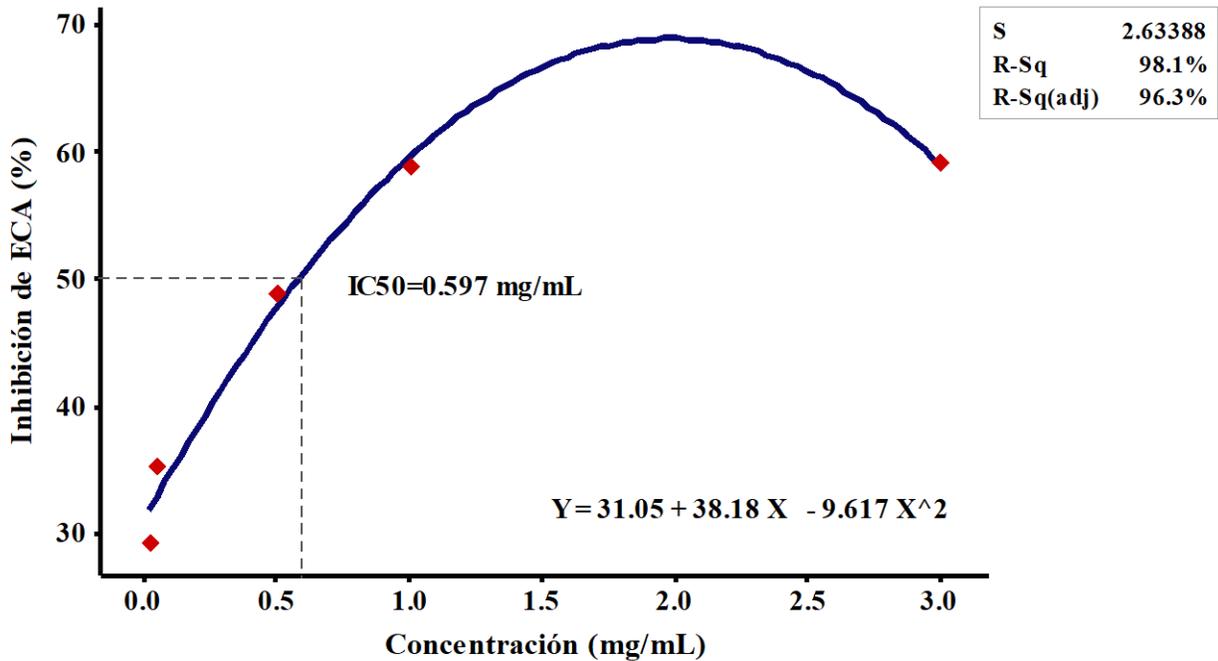


Figura 15. Inhibición de ECA del concentrado proteico. Se usaron concentraciones de 0.02, 0.05, 0.5, 1.0 y 3.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

El IC<sub>50</sub> de inhibición de ECA del concentrado proteico es de 0.597 mg/mL (figura 15), este resultado es muy bueno considerando que algunos autores como Barbana y Boye (2010) reportaron un IC<sub>50</sub> de 0.316 mg/mL de un hidrólisis secuencial de garbanzo con alcalasa y flavourzima. Pero ya se ha mencionado que las proteínas por ser moléculas de gran tamaño no pueden atravesar las membranas celulares y por tanto no pueden fungir como compuestos bioactivos. Es por ello que se hace necesario hidrolizar la proteína para producir péptidos de menor tamaño con capacidad de inhibición de ECA.

Una vez que el concentrado proteico de garbanzo fue hidrolizado con la enzima alcalasa por 30 min a las condiciones ya mencionadas en el punto 9.7; se produjeron péptidos (HA) con mejor capacidad de inhibición de ECA, ya que el IC<sub>50</sub> pasó de 0.597 a 0.0675 mg/mL (figuras 15 y 16).

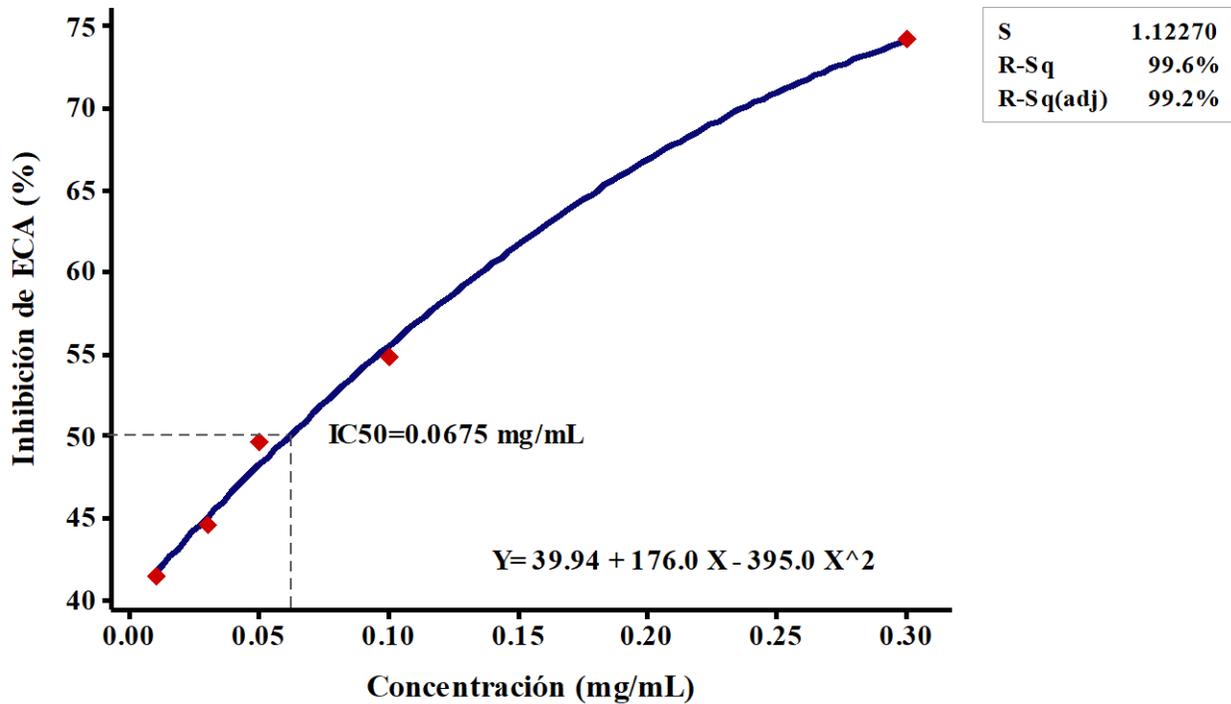


Figura 16. Inhibición de ECA del HA. Se usaron concentraciones de 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, y 0.3 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

Algunos estudios de péptidos de garbanzo inhibidores de ECA han obtenido excelentes resultados en la inhibición *in vitro* de esta enzima, que es clave en el desarrollo del proceso hipertensión arterial. Es importante tomar en cuenta que cuando estos péptidos se ingieren pueden sufrir hidrólisis por la acción de las enzimas gastrointestinales; es por ello que, en este proyecto, los péptidos inhibidores de ECA obtenidos con alcalasa fueron sometidos a digestión gastrointestinal, bajo condiciones simuladas. La figura 16 y 17 nos revela que la digestión redujo la capacidad de inhibición de los péptidos, esto lo podemos observar ya que el  $IC_{50}$  pasó de 0.0675 a 0.173 mg/mL. Es importante mencionar que entre menor es el valor de  $IC_{50}$  la capacidad de inhibición es mayor; ya que es la concentración necesaria para inhibir el 50% de la ECA.

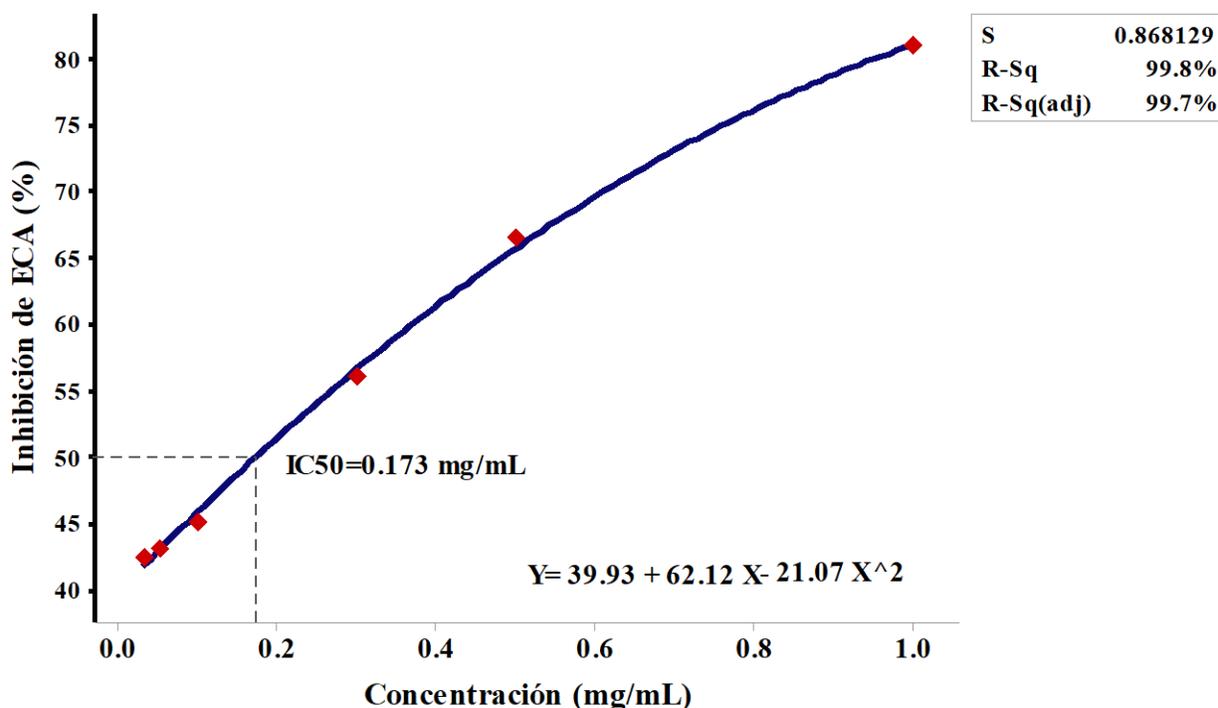


Figura 17. Inhibición de ECA del HGI. Se usaron concentraciones de 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/mL, los ensayos se hicieron por duplicado y se usó la media para construir la curva de regresión.

A pesar de que los péptidos de garbanzo hidrolizados con alcalasa (HA) redujeron su capacidad de inhibición de ECA al someterse a la acción de las enzimas digestivas (HGI), esta diferencia, según el resultado del ANOVA, no fue significativa (Cuadro 8), lo cual sugiere que estos péptidos tienen resistencia a la hidrólisis por las enzimas digestivas. Bhaskar et al. (2018) sometieron a digestión gastrointestinal *in vitro* péptidos de frijol verde (*Macrotyloma uniflorum*) hidrolizados con alcalasa y estos mantuvieron su estabilidad tras el proceso, así como su capacidad de inhibición de la ECA. (Norris y FitzGerald, 2013) señala que los péptidos que contienen residuos de prolina e hidroxiprolina en su estructura tienden a ser más resistentes a la hidrólisis, así como aquellos péptidos glicosilados o que han sufrido la formación de productos de reacción de Maillard.

Cuadro 8. Inhibición de ECA por los hidrolizados y el concentrado proteico.

Fuente	IC <sub>50</sub> (mg/mL) de ECA
Concentrado Proteico	0.597 ± 0.00212 <sup>a</sup>
Hidrolizado con alcalasa (HA)	0.0675 ± 0.0262 <sup>b</sup>
HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI)	0.173 ± 0.0410 <sup>b</sup>

En cuanto a los péptidos de interés (HA), obtenidos en este trabajo, la concentración inhibitoria media de la ECA ( $IC_{50}=0.0675$  mg/mL) dio mejores resultados que lo reportado por Pedroche *et al.* (2002); Yust *et al.* (2003) y Barbana y Boye (2010); los cuales obtuvieron un  $IC_{50}$  de 0.190, 0.180 y 0.316 mg/mL respectivamente. Cabe señalar que entre más pequeño es el valor del  $IC_{50}$  es mejor ya que se trata de la concentración necesaria para inhibir el 50% de la enzima a nivel *in vitro*. Inclusive, aún después de someter el HA a simulación gastrointestinal (HGI) se mantiene el  $IC_{50}$  (0.173 mg/mL) por debajo de lo reportado por los autores mencionados. Pedroche *et al.* (2002) y Yust *et al.* (2003) hidrolizaron proteína de garbanzo con alcalasa y bajo condiciones similares a las utilizadas en este estudio, y obtuvieron resultados mas cercanos a los nuestros. Barbana y Boye (2010) realizaron hidrólisis secuencial con dos enzimas, alcalasa y flavourzima, por un tiempo total de 150 min, obteniendo un hidrolizado extensivo con GH de hasta 77%, esto que indica que se obtienen mejores resultados para la obtención de peptidos inhibidores de ECA utilizando la enzima alcalasa de manera individual y con un grado de hidrólisis parcial menores al 30%.

#### 6.6. Ensayo de Toxicidad con *Artemia salina* L.

El ensayo de toxicidad con el camarón de salmuera *Artemia salina* L. se considera una herramienta útil para realizar pruebas preliminares de toxicidad antes de usar ensayos celulares o con animales. En este proyecto se usaron diferentes concentraciones incluyendo el  $IC_{50}$  de inhibición de ECA, que fue la concentración de interés, y concentraciones máximas de 1000 y 1500  $\mu\text{g/mL}$  como se muestra en el cuadro 9, esto para obtener la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de los péptidos sobre *Artemia salina* L. Se usó podofilotoxina como control positivo de muerte, para esta se usaron concentraciones menores y mayores al  $LC_{50}$  reportado por Meyer *et al.* (1982) el cual fue de 2.4  $\mu\text{g/mL}$

Cuadro 9. Concentraciones de péptidos para ensayo de toxicidad con *Artemia salina* L.

<b>Fuente</b>	<b>Concentraciones (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>Concentrado Proteico</b>	100, 300, 597, 800, 1000 y 1500
<b>Hidrolizado con alcalasa (HA)</b>	10, 50, 67, 200, 500, 1000 y 1500
<b>HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI)</b>	50, 100, 173, 300, 500, 1000 y 1500
<b>Podofilotoxina</b>	0.5, 1, 1.5, 2.4, 3, 3.5

Los resultados de toxicidad se muestran en el cuadro 10, en los cuales no se produjeron muertes, del camarón de salmuera en cuestión, aún por arriba de la concentración de 1000 µg/mL; lo cual de acuerdo con el índice de toxicidad de Meyer, extractos con  $LC_{50} < 1000$  µg/mL son considerados como tóxicos y  $LC_{50} > 1000$  µg/mL son considerados como no tóxicos (Meyer *et al.*, 1982).

Cuadro 10. Concentración letal media ( $LC_{50}$ ) de péptidos sobre *Artemia salina* L.

<b>Fuente</b>	<b><math>LC_{50}</math> (µg/mL)</b>
<b>Concentrado Proteico</b>	>1000
<b>Hidrolizado con alcalasa (HA)</b>	>1000
<b>HA sometido a digestión gastrointestinal (HGI)</b>	>1000
<b>Podofilotoxina</b>	0.73

Para el caso de la podofilotoxina para la que sí se registraron muertes de *Artemia salina* L. se obtuvo el  $LC_{50}$  obteniendo el porcentaje de letalidad, que es el número de muertes respecto al número total de organismos expuestos, contra el logaritmo en base diez de las concentraciones, para un mejor manejo de los datos, los cuales se analizaron en el paquete estadístico Minitab. Se obtuvo el valor que da la línea de intersección de la recta, obtenida por regresión, con el 50% de mortalidad (-0.132), a este valor se le aplicó el antilogaritmo para obtener el  $LC_{50}$ , dando como resultado 0.73 µg/mL.

EL  $LC_{50}$  de 0.73 µg/mL obtenido para la podofilotoxina es menor a lo reportado por Meyer *et al.* (1982). Esta diferencia puede deberse a que la preparación de la muestra en el laboratorio, ya que la muestra fue sonicada para lograr una mejor disolución, debido a que esta sustancia no es hidrosoluble.

Diversos autores mencionan que en general los péptidos son seguros (Bhandari *et al.*, 2020). Anadón *et al.* (2010) realizó un ensayo *in vivo* con ratas, administrando hidrolizado de caseína con péptidos antihipertensivos, las cuales no presentaron efectos adversos en los diferentes parámetros clínicos analizados; sin embargo antes de considerar a los péptidos biológicamente activos para la producción de alimentos o con fines terapéuticos es necesario evaluar la toxicidad.

Este ensayo de toxicidad del HA y HGI con *Artemia salina* L. en el presente proyecto, se puede considerar como un ensayo preliminar de que no existe toxicidad aguda y éstos péptidos pueden ser sujetos a uso en pruebas *in vivo* ya que autores como Carballo *et al.* (2002) reportaron que existe

una correlación entre el presente ensayo con ensayos con células humanas; además Parra *et al.* (2001), encontraron una muy buena correlación, de  $r=0.85$ , entre el ensayo de camarón de salmuera y ensayos con ratones.

## 7. CONCLUSIONES

Los péptidos de harina extrudida de garbanzo hidrolizados con alcalasa tuvieron un grado de hidrólisis menor al 30% y los pesos moleculares se encuentran en los intervalos que se establecieron de acuerdo a la literatura.

Se obtuvo una muy buena concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) sobre la ECA, por debajo de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual fue lo esperado, ya que se requiere una menor cantidad de los péptidos para la inhibición de la enzima. Esto demuestra que estos péptidos de harina extrudida de garbanzo, tuvieron buena capacidad inhibitoria, y que esa capacidad se mantuvo aún después de que fueron sometidos a digestión gastrointestinal, lo cual sugiere que mostraron resistencia a la acción de las enzimas gastrointestinales, esto puede abonar a la bioaccesibilidad de los mismos.

El  $IC_{50}$  de los péptidos, de harina extrudida de garbanzo hidrolizados con alcalasa, sobre la inhibición de radicales  $ABTS^+$  fue superior al de la inhibición de ECA. Sin embargo, tomando como referencia el  $IC_{50}$  de inhibición de la ECA después de la digestión gastrointestinal se puede inhibir hasta un 18.4% de este radical y hasta un 13.4% de DPPH.

Considerando los resultados de inhibición de ECA y de capacidad antioxidante, se puede concluir que los péptidos de garbanzo con un grado de hidrólisis de 10.6% y pesos moleculares entre 5 y 12 kDa, mostraron la capacidad de inhibición de ECA esperada, pero no tuvieron buena capacidad antioxidante por los métodos analizados. Esto también puede atribuirse a que ya se ha descrito ampliamente que los péptidos con mejor capacidad antioxidante son péptidos obtenidos de una hidrólisis extensiva y con pesos moleculares menores de 3 kDa.

Debido a los resultados de inhibición de ECA y a los resultados ausencia de toxicidad con el test de *Artemia salina* L. estos péptidos en su conjunto (HA) pueden ser candidatos para su uso como ingrediente activo en alimentos, o para el aislamiento de péptidos con potencial antihipertensivo para estudios posteriores.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Debido a que solo se realizó la hidrólisis por un tiempo definido de 30 min con la enzima alcalasa, obteniendo un grado de hidrólisis de 10.6% por NS-TCA, se recomienda realizar hidrólisis a diferentes tiempos y por consiguiente grados de hidrólisis y contrastar la inhibición de la ECA para obtener el grado de hidrólisis en el que éstos muestran una mejor inhibición de la enzima.
2. Realizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro* con células humanas sanas para constatar que los péptidos, de harina extrudida de garbanzo, no muestran toxicidad a nivel celular.
3. Someter los péptidos, de harina extrudida de garbanzo, a ensayos de bioaccesibilidad para determinar si estos serán capaces de absorberse a través de alguna sección gastrointestinal y llegar al torrente sanguíneo para ejercer su actividad biológica.
4. Realizar pruebas fisicoquímicas a los péptidos de harina extrudida de garbanzo obtenidos con la enzima alcalasa, antes y después de someterlos a digestión gastrointestinal; para generar información complementaria sobre estos.

## 9. REFERENCIAS

- Aguilar-Raymundo, V., & Vélez-Ruiz, J. 2013. Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 7(2), 25-34.
- Aluko, R. E. 2015. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science*. 4, 44-50.
- Anadón, A., Martínez, M., Ares, I., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M., Contreras, M., Ramos, M., & Recio, I. 2010. Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90–94) and (143–149) from  $\alpha$ s1-casein. *Food Chemical Toxicology*. 48(7), 1836-1845.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Method 988.05. 70.
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. 2010. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. *Food Research International*. 43(1), 140-147.
- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C., & Boschini, G. 2015. The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34(1-3), 144-168.
- Asif, M., Rooney, L. W., Ali, R., & Riaz, M. N. 2013. Application and opportunities of pulses in food system: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(11), 1168-1179.
- Barbana, C., & Boye, J. I. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*. 43(6), 1642-1649.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. 2020. A review on bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research*. 26(1), 139-150.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1), 248-254.
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., & Barquera, S. 2018. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Ensanut MC 2016. Salud Pública de México*. 60, 233-243.
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Rojas-Martínez, R., Pedroza, A., Medina-García, C., & Barquera-Cervera, S. 2013. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública de México*. 55, S144-S150.
- Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2(1), 17.
- Chang, Y.-W., Alli, I., Konishi, Y., & Ziomek, E. 2011. Characterization of protein fractions from

- chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. *Food Research International*. 44(9), 3094-3104.
- Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J., & Millán, F. 1999. Production of Extensive Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates with Reduced Antigenic Activity. *Agricultural and Food Chemistry*. 47(9), 3776-3781.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. 2017. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*. 9(4), 316.
- e Silva, A. C. S., & Silveira, J. N. 2013. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology*. 8(1), 1-16.
- El-Adawy, T. A. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57(1), 83-97.
- FAO. (2016 ). Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible. 2016 año internacional de las legumbres (O'Broin, S., Tucci, L. R., Salas, M., & Boni, E. Eds. Primera Edición ed.). Inglaterra: Departamento de Comunicación Corporativa de la FAO.
- FAOSTAT. Food Agriculture Organization. Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) statistical division. . In URL:<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Fecha de consulta: 18/03/2019.
- Gallegos Tintoré, S. M., Chel Guerrero, L., & Martínez Ayala, A. L. 2013. Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. . M. Segura Campos, L. C. G. D. B. A. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. *OmniaScience*. Barcelona. pp. 111-122
- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., & Besbes, S. 2015. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*. 187, 322-330.
- Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhlouf, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A., & Besbes, S. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Functional Foods*. 12, 516-525.
- Guang, C., & Phillips, R. D. 2009. Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Agricultural Food Chemistry*. 57(12), 5113-5120.
- Hanafi, M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul-Hamid, A., & 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.
- Hartmann, R., Wal, J.-M., Bernard, H., & Pentzien, A.-K. 2007. Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 13(9), 897-920.
- Hatree, E. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 48, 422-427.
- Hoyle, N. T., & Merritt, J. H. 1994. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea*

- harengus*). Food Science. 59(1), 76-79.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Agricultural Food Chemistry. 53(6), 1841-1856.
- Infoagro. 2019. Cultivo del Garbanzo. In: URL: <http://www.infoagro.com/herbaceos/legumbres/garbanzo.htm>. Consultado el 18/03/2019.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. 2014. Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety. 13(2), 114-134.
- Kaur, M., & Singh, N. 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Food Chemistry. 102(1), 366-374.
- Khan, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. 2018. Toxicity of biologically active peptides and future safety aspects: an update. Current Drug Discovery Technologies. 15(3), 236-242.
- Knights, E. J., & Hobson, K. B. 2016. Chickpea Overview. Reference Module in Food Science. Elsevier.
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. LWT - Food Science and Technology. 50(2), 591-598.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259), 680-685.
- Li, G.-H., Liu, H., Shi, Y.-H., & Le, G.-W. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 37(2), 219-224.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry. 106(2), 444-450.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. 2014. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. Food Science. 79(3), R273-R283.
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A., & Hrelia, S. J. I. j. o. m. s. 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. 15(11), 21120-21135.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, D. L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. Science of Food Agriculture. 92(9), 1974-1981.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D. j., & McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta medica. 45(05), 31-34.
- Milán-Carrillo, J., Valdez-Alarcon, C., Gutiérrez-Dorado, R., Cardenas-Valenzuela, O., Mora-Escobedo, R., Garzon-Tiznado, J., & Reyes-Moreno, C. 2007. Nutritional properties of quality protein maize and chickpea extruded based weaning food. Plant Foods for Human

Nutrition. 62(1), 31.

- Milán-Noris, A. K., Gutiérrez-Urbe, J. A., Santacruz, A., Serna-Saldívar, S. O., & Martínez-Villaluenga, C. 2018. Peptides and isoflavones in gastrointestinal digests contribute to the anti-inflammatory potential of cooked or germinated desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry*. 268, 66-76.
- Milán-Carrillo, J., Reyes-Moreno, C., Camacho-Hernández, I. L., & Rouzaud-Sandez, O. 2002. Optimisation of extrusion process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L.) into a useful product. *Science of Food Agriculture*. 82(14), 1718-1728.
- Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E., & Boye, J. I. 2009. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science Emerging Technologies*. 10(3), 342-347.
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 23(5), 219-227.
- Narai-Kanayama, A., & Aso, K. 2009. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligo-tyrosine peptides synthesized by  $\alpha$ -chymotrypsin. *Enzyme and Microbial Technology*. 44(4), 235-241.
- Nasri, M. 2017. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier. pp. 109-159
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66(5), 642-646.
- Norris, R., & FitzGerald, R. J. 2013. Antihypertensive peptides from food proteins. Bioactive food peptides in health and disease. InTech Publishers. pp. 45-72
- Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C., & Olivares-Vazquez, M. 1991. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Food Science*. 56(3), 726-729.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buela, L. I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 8(5), 395-400.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. 2002. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Science of Food Agriculture*. 82(9), 960-965.
- Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 25(1), 34-43.
- Riaz, M. N. (2000). *Extruders in food applications*: CRC press.
- Rivera López, S., & Gutiérrez Hernández, M. 2019. Análisis de la producción y competitividad del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de México. *Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales*(junio).

- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*. 43(2), 432-442.
- Ruiz, J. Á. G., Ramos, M., & Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*. 14(12), 1075-1080.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31(10), 1949-1956.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(6), 945-948.
- SIACON. 2019. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta.
- Silvestre, M. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 60(2), 263-271.
- Soetan, K., & Oyewole, O. 2009. The need for adequate processing to reduce the antinutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. *African Journal of food Science*. 3(9), 223-232.
- Steel, C. J., Leoro, M. G. V., Schmiele, M., Ferreira, R. E., & Chang, Y. K. J. T. e. 2012. Thermoplastic extrusion in food processing. 265.
- Torres-Fuentes, C., del Mar Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 180, 194-202.
- Valdez-Flores, M., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Medina-Godoy, S., Norzagaray-Valenzuela, C., Hernández-Verdugo, S., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. 2016. Improving bioactivities of *Jatropha curcas* protein hydrolysates by optimizing with response surface methodology the extrusion cooking process. *Industrial Crops Products*. 85, 353-360.
- Valls, P. 1993. IX curso de especialidad FEDNA, investigación el proceso de extrusión en cereal de habas de soja. Barcelona dictada el 8 y 9 de noviembre de 1993. URL: [http://www.fundacionfedna.org/publicaciones\\_1993](http://www.fundacionfedna.org/publicaciones_1993).
- Yust, M. a. M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*. 81(3), 363-369.
- Yust, M. d. M., Millán-Linares, M. d. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., & Pedroche, J. 2012. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Science of Food Agriculture*. 92(9), 1994-2001.