

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE
PLASMA DE BOVINO: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA Y
ANTIMICROBIANA

LEIDY JOHANNA GÓMEZ SAMPEDRO

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
2013

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



**PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE
PLASMA DE BOVINO: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIHIPERTENSIVA Y
ANTIMICROBIANA**

LEIDY JOHANNA GÓMEZ SAMPEDRO

Trabajo presentado para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas:
Alimentos

TUTOR

José Edgar Zapata Montoya MSc, Doctor en Biotecnología

MEDELLIN, COLOMBIA

2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que todo a Dios por todas las bendiciones recibidas y la posibilidad que me brindó de llevar a cabo este proceso de aprendizaje.

A toda mi familia, de quienes siempre he recibido un apoyo incondicional y una voz de aliento en el momento más oportuno.

Agradezco al Dr. José Edgar Zapata, por la dirección de esta tesis, y por su acompañamiento en el transcurso de la investigación.

Quisiera también agradecer de forma muy especial a Omar Figueroa, Maritza Fernandez, Andres Pereañes, Vitelbina Nuñez, Gelmy Ciro, Juan Carlos Alarcón y demás integrantes del grupo Ofidismo/Escorpionismo, de quienes recibí valiosos aportes en distintas instancias de este trabajo.

Agradezco al Dr. Juan J. Calvete (Instituto de Biomedicina de Valencia, España) y al Dr. Bruno Lomonte (Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica) por su colaboración en los análisis mediante espectrometría de masas.

Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia, quienes aportaron el apoyo financiero para la realización de este trabajo de investigación, de la misma manera que a COLCIENCIAS (programa de becas Joven Investigador modalidad Virginia Gutiérrez de Pineda 2010-2011).

*A mi mamá
Que es mi motor,
Mi guía y mi apoyo*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Plasma sanguíneo.	17
3.2 Actividad antioxidante.....	18
3.2.1 Radicales libres.	18
3.2.2 Antioxidantes.	19
3.3 Actividad antihipertensiva.....	21
3.3.1 Inhibidores de la ECA (IECA).....	23
3.4 Actividad antimicrobiana.....	25
3.5 Péptidos bioactivos.	27
3.5.1 Péptidos antioxidantes derivados de proteínas alimentarias	29
3.5.2 Péptidos IECA derivados de proteínas alimentarias	33
3.5.3 Péptidos antimicrobianos derivados de proteínas alimentarias.....	36
3.5.4 Biodisponibilidad de los péptidos bioactivos.....	39
3.5.5 Estrategias para la producción de péptidos bioactivos.....	40
3.6 Hidrólisis enzimática.	41
3.6.1 Enzimas	41
3.6.2 Generalidades de la hidrólisis enzimática	45

4. ESTADO DEL ARTE	49
5. MATERIALES Y MÉTODOS	52
5.1 Reactivos y materiales	52
5.2 Caracterización del plasma de bovino.	52
5.2.1 Análisis fisicoquímicos al plasma.....	52
5.2.2 Electroforesis en gel del plasma completo.....	53
5.2.3 Composición total de aminoácidos del plasma.	53
5.3 Hidrólisis enzimática del plasma de bovino.....	54
5.3.1 Determinación de la concentración de proteínas	54
5.3.2 Electroforesis en gel poliacrilamida dodecil-sulfato sódico.	54
5.4 Evaluación de las actividades biológicas	55
5.4.1 Evaluación de la capacidad antioxidante.	55
5.4.2 Evaluación de la capacidad IECA.....	56
5.4.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana	56
5.5 Purificación de los péptidos bioactivos	56
5.6 Análisis mediante espectrometría de masas	57
5.7 Digestión in vitro.....	58
5.8 Análisis estadístico.	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
6.1 Caracterización del plasma de bovino.....	59
6.2 Hidrólisis enzimática del plasma de bovino.....	61
6.3 Efecto del grado de hidrólisis sobre las actividades biológicas	63
6.3.1 Actividad antioxidante.	64
6.3.2 Actividad inhibidora de la ECA (IECA).....	66
6.3.3 Actividad antimicrobiana	67

6.4	Aislamiento de péptidos bioactivos y análisis por espectrometría de masas ...	67
6.4.1	Péptidos antioxidantes.....	68
6.4.2	Péptidos inhibidores de la ECA.	71
6.5	Estabilidad de los hidrolizados bajo condiciones de digestión <i>in vitro</i>	74
7.	CONCLUSIONES	75
8.	PERSPECTIVAS	77
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
10.	ANEXOS	86
	ANEXO I. Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L.....	87
	ANEXO II. Effects of hydrolysis and digestion <i>in vitro</i> over activity of bovine plasma hydrolysates as inhibitors of the angiotensin I converting enzyme.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de peroxidación lipídica iniciada por radical $\cdot\text{OH}$ 19

Figura 2: Mecanismo antirradicalario de moléculas antioxidantes. 20

Figura 3: Sistemas renina-angiotensina y Calicreína-Quinina en la presión arterial..... 23

Figura 4: Estructura cristalina de la enzima convertidora de angiotensina 25

Figura 5: Tipos de inhibición..... 36

Figura 6: Tipos de estructuras de los péptidos antimicrobianos..... 39

Figura 7: Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas por serinproteasas..... 43

Figura 8: Hidrólisis enzimática de una cadena polipeptídica 46

Figura 9: Grado de hidrólisis del plasma de sangre de bovino hidrolizado con Alcalasa 2,4 L. 62

Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE. Marcador peso molecular (línea 1), HPB 3.8, 6.7, 10.8, 15.3 y 19,1% GH (línea 2, 3, 4, 5, y 6) 63

Figura 11: Relación de la actividad inhibidora de la ECA con el GH..... 66

Figura 12: Espectro análisis MALDI-TOF del pico Ia aislado por RP-HPLC..... 70

Figura 13: Espectro análisis ESI/MS-MS del ion m/z 405.2⁺² 71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición fisicoquímica del plasma de bovino.	59
Tabla 2: Contenido proteico del plasma de bovino evaluado por electroforesis en gel de agarosa.....	60
Tabla 3: Composición de aminoácidos totales en el plasma de bovino.....	61
Tabla 4: Capacidad antioxidante (ABTS, FRAP y ORAC) de los HPB en función del GH.....	65
Tabla 5: Capacidad captadora de radicales ABTS [*] de las fracciones peptídicas obtenidas tras los pasos de purificación realizados al HPB con GH 19.1%.	69
Tabla 6: Capacidad IECA de las fracciones peptídicas obtenidas tras los pasos de purificación realizados al HPB con GH 6.7%.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Aminoacido
ABTS [•] :	Radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
C-terminal:	Carboxilo terminal
ECA:	Enzima convertidora de la angiotensina I
ESI/MS-MS:	Espectrometría de masas con fuente de ionización de electrospray
ET:	Transferencia de electrones
FRAP:	Poder antioxidante de reducción del ion hierro
GH:	Grados de hidrólisis
HAT:	Transferencia de átomos de hidrogeno
HPB:	Hidrolizados de plasma de bovino
HTA:	Hipertensión arterial
IC ₅₀ :	Porcentaje de inhibición medio
MALDI/TOF-TOF:	Espectrometría de masas con fuente de Desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
N-terminal:	Amino terminal
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxigeno
RL:	Radicales libres
RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
sECA:	Enzima convertidora de la Angiotensina somática
TEAC:	Capacidad antioxidante equivalente trolox
tECA:	Enzima convertidora de la Angiotensina testicular

Los diferentes aminoácidos se nombraron con el código de tres letras cuando aparecen de manera individual y con el código de una letra cuando se encuentran en el interior de una secuencia peptídica

RESUMEN

La sangre posee un gran valor biológico por su alto contenido de proteínas, las cuales se encuentran en su mayoría en el plasma, que está constituido básicamente por proteínas (7%), Agua (91%) y algunas sales y componentes de bajo peso molecular (1%) (Moure *et al.*, 2003). A pesar de esto, en Colombia, de las 1342 plantas de sacrificio para ganado vacuno registrados ante las autoridades sanitarias, solo unas pocas cuentan con técnicas apropiadas para el manejo de sus desechos comestibles y no comestibles, y solamente el 1% cuenta con tratamiento de aguas residuales (Espinal *et al.*, 2009), de esta manera, si bien es cierto que algunas de las plantas de sacrificio recogen la sangre para darle utilización, principalmente en la nutrición animal, un elevado número de ellas, eliminan este fluido en las fuentes de agua. La subutilización de la sangre de bovino y la problemática ambiental que su vertimiento genera, hace importante ofrecer alternativas para su utilización.

El objetivo de este trabajo fue buscar péptidos con actividad antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y antimicrobiana, a partir de hidrolizados de plasma de bovino. Para alcanzar estos objetivos, el trabajo de investigación se ha estructurado de la siguiente manera: primero se realizó hidrólisis enzimática del plasma de bovino con Alcalasa 2,4 L y se tomó muestra de los hidrolizados a varios grados de hidrólisis, a estos hidrolizados se les midió la actividad antioxidante por medio de los métodos ABTS, FRAP y ORAC, la actividad inhibidora de la ECA mediante un método espectrofotométrico, y la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución en caldo. Por último se realizó el aislamiento de los péptidos mediante ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, para posteriormente secuenciarlos por espectrometría de masas mediante MALDI/TOF-TOF y ESI/MS-MS. Adicional a esto se realizó una simulación de la digestión gastrointestinal para evaluar la resistencia de los hidrolizados y péptidos a las enzimas digestivas.

De acuerdo con los resultados de las pruebas realizadas, podemos decir que el plasma de bovino completo presenta una baja actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, la

cual se ve potenciada con el proceso de hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4 L, mientras que no se encontró actividad antimicrobiana ni en el plasma completo, ni en sus hidrolizados. Las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA presentadas por los hidrolizados de plasma de bovino, mostraron ser dependientes del grado de hidrólisis (GH), siendo mejor un GH alto para la actividad antioxidante, mientras los bajos GH favorecieron la actividad inhibidora de la ECA.

Después de los procesos de purificación realizados a los hidrolizados, se lograron obtener dos fracciones peptídicas Ia y Ic, con potente actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, respectivamente. El pico Ia obtenido a partir del hidrolizado de plasma con GH de 19.1%, mostró una actividad antioxidante comparable con la presentada por algunos antioxidantes comerciales. Con los análisis de espectrometría de masas realizados a este pico, se logró identificar en él, la presencia del octapéptido GAHQPSGR. El pico Ic, obtenido a partir del hidrolizado con GH 6.7%, mostró la mayor actividad inhibidora de la ECA, con un IC₅₀ de 0,18 mg/mL, del cual, mediante el análisis por MALDI/TOF-TOF, se evidenció que contiene péptidos con secuencias AGATGVTISGAG, YSRRHPEYAVS, y otros péptidos menores con secuencias Q(K)AW y L(I)L(I)VR.

Después de la exposición del hidrolizado con GH 19.1% y del pico Ic, a las condiciones de digestión *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante e inhibidora de la ECA, respectivamente, lo que indica la estabilidad de estas muestras a la acción de las enzimas digestivas.

Los datos obtenidos en este trabajo de investigación, pone de manifiesto el potencial biológico que presentan los hidrolizados y los péptidos obtenidos a partir del plasma de bovino, y los presenta como una opción para el reemplazo de algunos aditivos sintéticos en los alimentos o para la formulación en alimentos funcionales y nutracéuticos, lo cual sería una alternativa para estimular el uso del plasma animal, aumentando su valor comercial y por ende estimulando su recolección y procesamiento, repercutiendo en un futuro en disminuir el impacto ambiental que genera su vertimiento.

1. INTRODUCCIÓN

En estos últimos años la sociedad se ha concientizado de la estrecha relación que existe entre dieta y salud. Como consecuencia de ello, han irrumpido con fuerza en el sector alimentario los alimentos funcionales, los cuales han cobrado un gran interés, tanto de la comunidad científica, como de la industria alimentaria, y son definidos como aquellos alimentos que aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar o a reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Burdock *et al.*, 2006).

Las investigaciones realizadas en alimentos funcionales, han dedicado especial atención al estudio del papel fisiológico de las proteínas de la dieta. El estudio de la incorporación de biopéptidos en la formulación de alimentos funcionales inició hace aproximadamente 20 años, y ha experimentado un gran incremento, tanto por su evidente valor terapéutico como por su gran relevancia para la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de productos y de los alimentos que los contengan (Burdock *et al.*, 2006). En general, toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos funcionales, y son muchas las investigaciones que se han realizado en busca de dichos péptidos (Ahn *et al.*, 2012; Di Bernardini *et al.*, 2011; Elias *et al.*, 2008; Lee y Song, 2009; Liu *et al.*, 2010; Pihlanto, 2006; Salgado *et al.*, 2011).

La sangre animal producida en las plantas de sacrificio, es una fuente potencial de proteínas de bajo costo usada en diferentes países en la industria alimentaria (Isaza *et al.*, 2010; Konieczny *et al.*, 2005; Tybor *et al.*, 1975), Sin embargo, en términos generales representa el subproducto más problemático de la industria cárnica debido a los altos volúmenes generados y su potencial efecto contaminante sobre el medio ambiente.

A pesar del alto contenido de proteínas en la sangre animal, aproximadamente 7% (Moure *et al.*, 2003), solamente una pequeña proporción de la sangre obtenida del

sacrificio de los animales es utilizada. Un claro ejemplo de esto se vive en Colombia, donde según reportes de FEDEGAN (2011), al año se sacrifican más de 4 millones de cabezas de ganado vacuno, que equivalen a aproximadamente 8.800 toneladas de proteínas de alto valor biológico y nutricional, sin embargo 33% de las plantas de sacrificio no hacen ningún uso de la de la sangre resultante del proceso del sacrificio de los animales (Chaux *et al.*, 2009). De esta manera, la alta producción de la sangre de bovino en relación con la escasa demanda, señala la subutilización de este producto, lo que lo convierte en un gran problema medioambiental dado que el 93% de las plantas de sacrificio vierte sus aguas residuales directamente a las fuentes de agua (Chaux *et al.*, 2009), lo que es alarmante considerando que la sangre representa una sustancia potencialmente contaminante del medio ambiente, con una demanda bioquímica de oxígeno de 250 g/L y una demanda química de oxígeno de 375 g/L (Konieczny *et al.*, 2005).

Por ser una valiosa fuente de proteínas, la sangre animal tiene muchas posibilidades para ser usada en diferentes campos, debido a que posee un amplio rango de propiedades tecno-funcionales entre las que se destaca la capacidad gelificante, emulsificante y espumante (Isaza *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Además se ha evidenciado que la sangre y en especial el plasma sanguíneo es fuente de diferentes actividades biológicas (Lee y Song, 2003; Lee y Song, 2009; Liu *et al.*, 2010; Park y Hyun, 2002; Salgado *et al.*, 2011).

En cuanto al plasma de bovino, algunos trabajos han evidenciado su potencial como fuente de péptidos bioactivos (Lee y Song, 2003; Salgado *et al.*, 2011; Wanasundara *et al.*, 2002), pero hacen falta estudios más detallados de las características de los péptidos que proveen dicha actividad, de la estabilidad frente a las condiciones gástricas, y de la relación existente entre el GH y las actividades biológicas presentadas por los hidrolizados de plasma de bovino (HPB).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar algunas propiedades bioactivas en el plasma de bovino y sus hidrolizados. Entre ellas escogimos la actividad antimicrobiana debido a la gran preocupación sobre la cada vez más común resistencia de las bacterias a la

mayoría de antibióticos y conservantes alimentarios clásicos (Villarruel, 2006), la antioxidante por el gran problema que representan los radicales libres (RL) tanto a nivel fisiológicos, como en la industria alimentaria (Criado y Moya, 2009), y por último la antihipertensiva ya que la hipertensión constituye uno de los problemas médicos-sanitarios más importantes de la medicina contemporánea (Ahn *et al.*, 2012). Se buscará establecer la relación del GH con las actividades biológicas presentadas, investigar la estabilidad de los hidrolizados y péptidos obtenidos, ante condiciones de digestión *in vitro*, y aislar e identificar los péptidos responsables de cada actividad.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar la actividad antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina I y antimicrobiana, de los hidrolizados de plasma de bovino con Alcalasa 2.4 L.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados de plasma de bovino.
- Evaluar la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* de los hidrolizados de plasma de bovino.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los hidrolizados de plasma de bovino, sobre los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Stafilococo aureus*, *Shigella sonei*, *listeria monocytogenes*, *Salmonella tifimurium*.
- Caracterizar parcialmente las fracciones peptidicas que presenten la mayor actividad antioxidante, inhibidora de la ECA, y/o antimicrobiana.
- Evaluar la estabilidad de los hidrolizados y péptidos con mayor actividad biológica, a las condiciones de una digestión gástrica *in vitro*.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLASMA SANGUÍNEO.

La sangre es el medio interno del organismo encargado del transporte de oxígeno y nutrientes hacia los diferentes tejidos y células, así como de la eliminación de metabolitos, representa en torno a un 5% del peso de un bovino vivo. En cuanto a su composición, está formada por una sustancia intracelular, el plasma, y por diferentes tipos de células en suspensión que forman la fracción celular, glóbulos rojos o eritrocitos (Madrid *et al.*, 1998). La sangre animal se compone de proteínas (7%), agua (91%), sales diversas, y compuestos de bajo peso molecular (Moure *et al.*, 2003).

La sangre se puede separar en primera instancia en dos fracciones: el plasma y la fracción celular, las cuales debido a su contenido en aminoácidos esenciales y a sus propiedades funcionales se han utilizado en diferentes campos (Isaza *et al.*, 2010; Konieczny *et al.*, 2005). El proceso de fraccionamiento de la sangre, para separar el plasma de la fracción celular, consiste en centrifugar la sangre entera, a la cual, previamente se le ha adicionado algún agente anticoagulante como ácido cítrico, citrato sódico o polifosfatos (Madrid *et al.*, 1998).

Aproximadamente el 60% de la sangre es plasma, la mayor parte de las proteínas de la sangre se encuentran en el plasma, las proteínas del plasma comprenden una compleja mezcla de proteínas que se pueden dividir en tres fracciones principales: albumina (42%), Globulinas (56%), fibrinógeno (1%) y otras proteínas minoritarias representan el restante 1% (Moure *et al.*, 2003). Además de ser una buena fuente de proteínas, el plasma sanguíneo puede ser usado como un ingrediente alimentario, ya sea como emulsionante, estabilizante o como componente nutricional (Isaza *et al.*, 2010).

3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

3.2.1 Radicales libres.

Se consideran radicales libres (RL) a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, esta configuración espacial les hace muy inestable, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un gran daño en ellas (Criado y Moya, 2009).

Los RL pueden originarse naturalmente durante el metabolismo y la respiración de los organismos aeróbicos, o por influencias externas cuando nuestro organismo recibe el impacto de diversos contaminantes tales como los gases de automóviles, contaminación ambiental, humo del cigarrillo, pesticidas, algunos fármacos, los rayos ultravioletas del sol, entre otros (Sarmadi y Ismail, 2010). En los sistemas vivos se generan muchos tipos de RL, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno (reactive oxygen species, ROS), así como existen también especies reactivas de nitrógeno (RNS), de cloro (RCIS) y Bromo (RBrS) (Halliwell, 2006).

A pesar de que los RL pueden cumplir numerosas funciones útiles en el organismo, como señalización y prevención contra infecciones (Halliwell, 2006), un desequilibrio en el número de RL y un exceso de éstos, puede dañar nuestras células, dado que por la alta inestabilidad atómica que presentan, colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola y haciendo que pierda su función específica en la célula, causando alteraciones en lípidos, proteínas y ADN (Criado y Moya, 2009). Estos RL han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades neuronales y cardiovasculares (Halliwell, 2006).

El control de los RL no solo es importante a nivel fisiológico, sino también en la industria alimentaria, dado que la oxidación en alimentos afecta lípidos, proteínas y

carbohidratos, causando deterioro en la calidad de los alimentos, lo que conduce a la rancidez y al acortamiento de la vida útil de los productos (Pihlanto, 2006).

La oxidación en alimentos ocurre principalmente en la grasas insaturadas por un proceso mediado por los RL. Los radicales interactúan con el oxígeno molecular para formar radicales lipídicos de peróxido, estos radicales pueden sustraer un átomo de hidrogeno del acido graso adyacente y producir un hidroperóxido y un nuevo radical lipídico, lo cual conlleva a la repetición y aceleración de la reacción en cadena (fig. 1). Moléculas altamente reactivas generadas a través de estos procesos químicos son responsables de producir olores y sabores desagradables e indeseables en los alimentos rancios, además de que pueden destruir los nutrientes presentes, dado que las proteínas alimentarias y los carbohidratos pueden también ser afectados por la oxidación lipídica (Viljanen *et al.*, 2004).

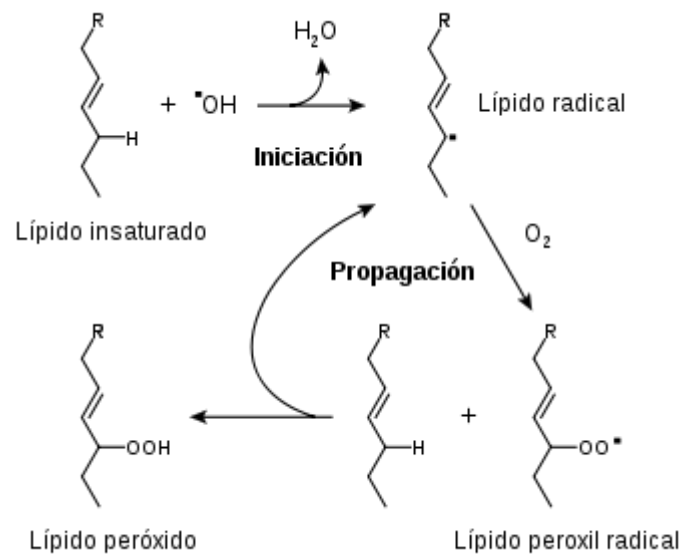


Figura 1: Proceso de peroxidación lipídica iniciada por radical $\cdot\text{OH}$. Tomado de Marnett, 1999.

3.2.2 Antioxidantes.

En términos del efecto en el cuerpo humano, un antioxidante puede ser definido como una sustancia que disminuye significativamente el efecto adverso de las especies reactivas, en las funciones fisiológicas normales (Huang *et al.*, 2005). En términos de

alimentos, los antioxidantes son compuestos capaces de retardar, retrasar o prevenir procesos de oxidación, y la formación de subproductos indeseables derivados del mismo (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

El antioxidante al reaccionar con el RL le cede sus propios electrones, neutralizando su acción oxidante, sin perder su propia estabilidad electroquímica, esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón o átomo de hidrógeno a la especie radicalaria (fig. 2), y la sucesiva formación de un radical derivado del antioxidante (A^\bullet). Para que un antioxidante tenga actividad antirradicalaria, debe cumplir una característica básica, que es generar un radical más estable y menos dañino después de reaccionar con el RL (Starke, 2003).

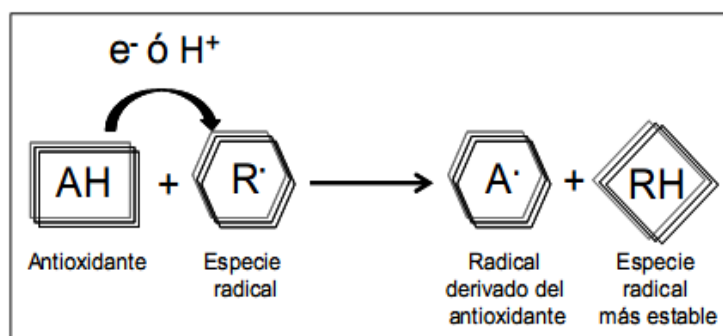


Figura 2: Mecanismo antirradicalario de moléculas antioxidantes. Tomado de Ugartondo, 2009.

Los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción, unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación) (Criado y Moya, 2009). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Barbosa *et al.*, 2008). En general, los antioxidantes se clasifican en “endógenos”, fabricados por la propia célula, y “exógenos”, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (Criado y Moya, 2009).

En los sistemas alimentarios, los antioxidantes juegan un papel importante, ya que son útiles para retardar la peroxidación lipídica y la secundaria formación de productos derivados de esta, lo cual ayuda a mantener el sabor, la textura y en algunos casos, el color del alimento durante el almacenamiento (Elias *et al.*, 2008). Antioxidantes sintéticos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), y el galato n-propil son usados en alimentos para retardar la oxidación lipídica, sin embargo su utilización es regulada por el posible riesgo para la salud (Sarmadi y Ismail, 2010). Por lo que la tendencia actual es utilizar productos naturales antioxidantes cuya actividad se lleve a cabo no sólo en los alimentos envasados, sino también una vez que el alimento ha sido ingerido (Zulueta *et al.*, 2009).

El incremento de la demanda de productos naturales por parte de los consumidores, y la consiguiente necesidad de reemplazar los antioxidantes sintéticos, ha fomentado las investigaciones en busca de fuentes de antioxidante naturales, algunos antioxidantes naturales como la vitamina C, la vitamina E y las carotenoides aparecen como componentes de la dieta diaria. En general las fuentes naturales más estudiadas son las frutas y plantas medicinales, a las cuales se le ha atribuido sus propiedades por la presencia de componentes como flavonoides, polifenoles, alcaloides, vitaminas, terpenoides, entre otros (Zulueta *et al.*, 2009). Se ha comprobado que el consumo regular de antioxidantes naturales pueden disminuir los riesgos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras enfermedades por reducción del estrés oxidativo (Manso *et al.*, 2008; Rajapakse *et al.*, 2005).

3.3 ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.

La hipertensión arterial (HTA) es un síndrome multifactorial de origen genético muy fácil de diagnosticar y de difícil control en el mundo, constituye uno de los problemas médicos-sanitarios más importantes de la medicina contemporánea, y el control de la misma es la piedra angular sobre la que hay que actuar para disminuir, en forma significativa, la morbi-mortalidad por cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares y renales (Ahn *et al.*, 2012). La HTA es un nivel mantenido de la presión

arterial sistodiastólica igual o superior a 140/90 mmHg, y es el primer factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, las cuales han sido reconocidas como la mayor causa de muerte a nivel mundial (Jao *et al.*, 2012)

El tratamiento para la HTA puede ser: (a) tratamiento no farmacológico, que normalmente es la medida inicial en la mayoría de los hipertensos e incluye cambios en el estilo de vida como reducir el consumo de sal, implementar una dieta saludable, incrementar el ejercicio físico, no ingerir alcohol, no fumar, entre otros (Mancia *et al.*, 2007). (b) tratamiento farmacológico, normalmente se utilizan diuréticos y betabloqueantes, así como otros grupos farmacológicos como los inhibidores de la ECA, los antagonistas de los receptores de la angiotensina, los antagonistas del calcio y los alfabloqueantes, cuya utilización está indicada en función de las características especiales de cada paciente (Marín *et al.*, 2008).

Dada la naturaleza multifactorial de la HTA, las sustancias con actividad antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas, siendo la inhibición de la ECA el mecanismo de acción más estudiado, ya que dicha enzima hace parte del sistema renina-angiotensina (Je *et al.*, 2009) y se ha demostrado que la inhibición de la ECA provoca el descenso de la presión arterial en hombres y en animales (Kodera y Nio, 2006; Ren *et al.*, 2011).

El sistema renina-angiotensina, es un sistema hormonal que regula la presión sanguínea y el balance de fluidos, este sistema juega un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca congestiva y la HTA (Jao *et al.*, 2012). El sistema renina-angiotensina se dispara con la disminución en la tensión arterial, la renina es sintetizada en el aparato yuxtaglomerular renal, ésta enzima cataliza la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I (decapeptido inactivo, de secuencia DNVYIHPFHL), en este punto actúa la ECA, debido a que los tres residuos hidrofóbicos C-terminales de la angiotensina I, se acoplan al sitio activo de la ECA, donde se cortan sus dos últimos residuos aminoácidos produciendo la angiotensina II (Je *et al.*, 2009). La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas, y por tanto,

el incremento de la presión arterial, estimula la secreción de la aldosterona, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua, lo que lleva a un incremento de volumen sanguíneo que tiene como resultado un aumento en la presión arterial, neutraliza la producción de renina, evitando así la liberación de la angiotensina I y estimula la actividad del sistema simpático, que tiene también un efecto vasoconstrictor (Erdmann *et al.*, 2008).

La ECA actúa simultáneamente en el sistema quinina-caliceína (Fig. 3), retirando de forma secuencial, dos péptidos carboxiterminales en la estructura de la bradiquinina, catalizando así la degradación de esta molécula con potente acción vasodilatadora y favoreciendo el incremento de la presión arterial (Erdmann *et al.*, 2008).

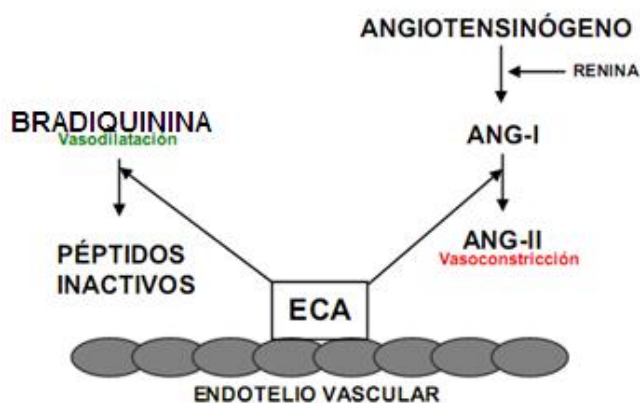


Figura 3: Sistemas renina-angiotensina y Caliceína-Quinina en la presión arterial. Tomado de Domínguez, 2009.

De esta manera, la ECA juega un importante papel fisiológico en la regulación de la presión sanguínea y el balance salino de los fluidos en mamíferos, y una gran parte de los tratamientos actuales para la HTA tienen como objetivo la inhibición de la ECA.

3.3.1 Inhibidores de la ECA (IECA).

Por la participación en los sistemas renina-angiotensina y quinina-caliceína, los inhibidores sintéticos de la ECA han sido utilizados ampliamente como agentes antihipertensivos. Los IECA fueron originalmente sintetizados a partir de compuestos

encontrados en veneno de serpiente, y fueron incorporados al arsenal terapéutico antihipertensivo al comienzo de la década de los ochenta, actualmente IECA sintéticos como el captopril, enalapril, lisinopril, y ramipril son normalmente utilizados en el tratamiento de la HTA en humanos (Marín *et al.*, 2008).

Tras la administración de los IECA, se produce una disminución importante de los valores de angiotensina II y aldosterona, con estímulo secundario de la síntesis de renina. Aunque los valores de angiotensina II y aldosterona se recuperan parcialmente, los efectos vasodilatadores se mantienen, en parte debido a otros mecanismos de acción implicados, como el aumento de los valores de bradiquininas vasodilatadoras por bloqueo en su degradación (Reudelhuber *et al.*, 2007).

Los ensayos clínicos sobre morbilidad y mortalidad cardiovascular realizados con los IECA en pacientes con HTA, han demostrado su saldo positivo en la reducción de la presión arterial y eventos cardiovasculares y cerebrales, mejoría de la calidad de vida, en la función cognitiva y la demencia, y una disminución significativa de la mortalidad; producen una reducción de riesgo de 21% en enfermedad coronaria, 42% de insuficiencia cardíaca, 17% de accidente cerebrovascular, 16% de eventos cardiovasculares mayores, 13% de mortalidad cardiovascular y 10% de mortalidad total. Sus efectos adversos más frecuentes son la tos y la hipotensión (Carey, 2007).

Enzima convertidora de la angiotensina I (ECA).

Esta enzima fue descubierta en 1954 y en principio fue llamada enzima convertidora de hipertensina. Su acción vasoconstrictora fue demostrada mediante ensayos en forma artificial empleando un aislado del riñón, y se comprobó su acción de convertir el péptido inactivo angiotensina I, en el péptido vasoconstrictor angiotensina II (Skeggs *et al.*, 1956), y de allí surgió su nombre actual. En la actualidad se sabe que la ECA se encuentra en la gran mayoría de los mamíferos.

La ECA pertenece a la familia M2 de metalopeptidasas dependientes de zinc, y cataliza la hidrólisis de dipeptidos a partir de carboxilo terminal en una gran variedad de oligopeptidos; esta dipeptidil carboxipeptidasa, conocida también como dipeptidil

dipeptidasa hidrolasa (EC 3.3.15.1), se origina en gran parte de las células endoteliales por un proceso proteolítico, la enzima está presente en corazón, cerebro, vasos capilares, glándulas adrenales, riñones, hígado, órganos reproductivos y pulmones, los cuales están altamente enriquecidos con esta enzima (Schwagar *et al.*, 2003). En la figura 4 se muestra un esquema que representa a la ECA.

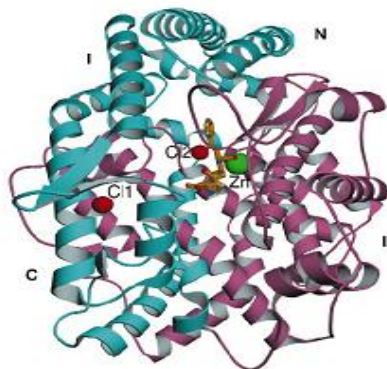


Figura 4: Estructura cristalina de la enzima convertidora de angiotensina. En café una molécula del inhibidor lisinopril unido al centro activo. La esfera verde representa al ion zinc y las rojas los iones cloro. Los números I y II indican los dominios. Tomado de Schwagar *et al.*, 2003.

Existen dos isoformas de la ECA, la somática (sECA) y la testicular (tECA). La sECA, es la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de la angiotensina I y la bradiquinina, es una glicoproteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas sencillas de 1277 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular entre 150-180 kDa (Natesh *et al.*, 2003).

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Un agente antimicrobiano, se define como aquella sustancia producida natural o sintéticamente, para inhibir la supervivencia de microorganismos, y puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión, cuando es evaluado frente a un microorganismo (Mora, 2007).

La amplia propagación de bacterias patógenas con resistencia múltiple a los antibióticos, ha sido reconocida como un importante problema global por la

Organización Mundial de la Salud, este problema se ha generado entre otras cosas, por el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos, lo cual facilita la selección, persistencia y diseminación de microorganismos resistentes (Kunin, 1993). Varios factores influyen en la resistencia adquirida por los microorganismos, tales como, plasticidad genética de los microorganismos, reservorios humanos o ambientales donde pueden persistir o ser transmitidos genes de resistencia u organismos resistentes, uso aumentado e inapropiado de antibióticos, así como cambios sociales y tecnológicos que afectan la transmisión de los organismos; si a esto se suma el aumento de pacientes inmunocomprometidos y de tratamientos con drogas inmunosupresoras, es entendible el incremento y emergencia de infecciones bacterianas y fúngicas (Contreras *et al.*, 2002). Estos eventos han generado un interés creciente en la búsqueda de nuevos antimicrobianos naturales, que tengan un mecanismo de acción diferente al de los antimicrobianos clásicos.

Los antimicrobianos de origen natural, no son importantes solo en el campo farmacéutico, sino también a nivel de la industria alimentaria, y en los últimos tiempos, han cobrado gran interés, dado que se ha asociado el consumo de conservantes químicos como benzoatos, nitritos, nitratos, y anhídrido sulfuroso, entre otros, con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas (Rodríguez, 2011). Esto genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y que posean compatibilidad con el alimento, en esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados, obtenidos principalmente de hierbas, plantas, y especias (Rodríguez, 2011).

Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de nuevos productos naturales, la mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y susceptibilidad de antibióticos (Di Bernardini *et al.*, 2011).

Una variedad de métodos pueden ser utilizados para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a antimicrobianos, entre ellos los más utilizados son (Di Bernardini *et al.*, 2011): (a) Análisis de difusión en agar, en este método el diámetro de la zona de inhibición se incrementa, según sea mayor el efecto antimicrobiano de la muestra evaluada, la cual puede ser ubicada en pozos hechos en el agar, o en discos de papel filtro, (b) Método de dilución en caldo, normalmente utilizado para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada.

El objetivo de una prueba de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos es predecir el modo en que un agente bacteriano va a responder al agente antimicrobiano *in vivo*. Aunque en teoría cualquiera de los métodos anteriores podría utilizarse para hallar la actividad antimicrobiana de una muestra dada, cada uno posee inconvenientes, razón por la cual en el momento de realizar las pruebas se deben hacer modificaciones para que estas metodologías sean adecuadas, reproducibles y fiables (Escobar, 2002).

El método de dilución en caldo, o método turbimétrico depende de la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano, en una solución uniforme del antimicrobiano en medio de cultivo líquido. Este método se realiza para evaluar microorganismos de rápido crecimiento, se mide la turbidez del caldo de cultivo por medio de métodos espectrofotométricos o colorimétricos, y se determina la CMI de un agente antimicrobiano (Martinez, 2005). Los métodos basados en diluciones parecen ser mas reproducibles y fáciles de cuantificar que los basados en difusión, además de tener mejor poder predictivo de la eficiencia *in vivo* (Salomon *et al.*, 1998).

3.5 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos específicos de la proteína que tienen un impacto en las funciones o condiciones del cuerpo y pueden finalmente influir en la salud (Mulero *et al.*, 2011). Desde que se descubrió que los componentes de

la dieta pueden tener un impacto en los procesos biológicos si se consumen en cantidades suficientemente grandes, esta definición es redefinida por dos salvedades: (1) Para ser considerado bioactivo, un componente alimentario debe impartir un efecto biológico medible en un nivel fisiológicamente realista, (2) La bioactividad medida tiene que tener la posibilidad de afectar la salud de una manera beneficiosa, lo que excluye de esta definición, los efectos potencialmente dañinos tales como toxicidad, alergenicidad y mutagenicidad, que son, sin duda, un reflejo de la actividad biológica en su sentido más amplio (Schrezenmeir *et al.*, 2000).

Los péptidos bioactivos son fragmentos de una proteína que están inactivos o presentan baja actividad dentro de la proteína nativa, pero pueden ser liberados tras una hidrólisis y ejercer diversos efectos beneficiosos para el organismo (Mulero *et al.*, 2011). En general son pequeñas secuencias de aminoácidos, entre 2 y 20 residuos, con una masa molecular de menos de 6 kDa (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Basados en sus propiedades estructurales, los péptidos pueden jugar varios roles, antígenotóxica (Park y Hyun, 2002), vinculante de hierro (Lee y Song, 2009), antimicrobianos (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008), antioxidantes (Nalinanon *et al.*, 2011), y antihipertensivos (Ahn *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2012), entre otros. Algunos péptidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados (Erdmann *et al.*, 2008).

Los estudios que investigan los efectos sobre la salud de los péptidos bioactivos se refieren a ellos en dos formas diferentes: ya sea como hidrolizados de proteínas precursoras o como péptidos bioactivos. Los Hidrolizado son una mezcla compuesta principalmente de péptidos y aminoácidos producidos a través de la hidrólisis de proteínas por tratamiento enzimático, ácido o alcalino o por fermentación; los péptidos bioactivos, por otro lado, son varios aminoácidos unidos que han sido purificados a partir de hidrolizados (Sarmadi y Ismail, 2010).

Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden afectar los principales sistemas del cuerpo, es decir, el sistema cardiovascular, digestivo, inmune y nervioso, dependiendo de su secuencia de aminoácidos (Mulero *et al.*, 2011). Así, el potencial de las distintas secuencias de péptidos alimentarios para promover la salud humana,

reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas o aumentando la protección inmunológica natural, ha despertado un gran interés científico en los últimos años.

Los péptidos bioactivos aislados de alimentos, son considerados compuestos seguros y saludables con bajo peso molecular, bajo costo, alta actividad y fácil absorción, incluso ellos presentan propiedades nutricionales y funcionales además de la actividad biológica que posean (Schaafsma, 2009).

Muchos péptidos de origen animal y vegetal con relativo potencial biológico han sido descubiertos y aislados de diferentes proteínas alimentarias como productos lácteos (Pihlanto, 2006), carne (Di Bernardini *et al.*, 2011), pescado (Nalinanon *et al.*, 2011), soya (Kodera y Nio, 2006), vegetales (Ou *et al.*, 2002), entre otras.

3.5.1 Péptidos antioxidantes derivados de proteínas alimentarias.

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, desde que el efecto fue reportado por primera vez por Marcuse (1960), habiéndose identificado numerosos hidrolizados y péptidos de diferentes fuentes alimentarias que presentan actividad antioxidante (Di Bernardini *et al.*, 2011; Je *et al.*, 2009; Nalinanon *et al.*, 2011; Pihlanto, 2006; Rajapakse *et al.*, 2005; Salgado *et al.*, 2011).

En general la actividad antioxidante y biológica de los péptidos bioactivos puede verse afectada por varios factores, entre ellos, las condiciones de operación aplicadas para aislar las proteínas, el grado de hidrólisis, el tipo de proteasa (Peña y Xiong, 2002), la estructura y concentración del péptido (Rajapakse *et al.*, 2005). La actividad antioxidante de péptidos bioactivos, pueden ser atribuida a su capacidad de inactivación de especies reactivas de oxígeno, eliminación de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica, y quelación de iones metálicos prooxidantes (Elias *et al.*, 2008).

Los péptidos antioxidantes pueden tener diferentes aplicaciones: (1) Como ingrediente funcional para controlar el deterioro oxidativo en alimentos. Diferentes estudios han

reportado que la actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas y péptidos aislados de diferentes fuentes alimentarias es superior a la del α -tocopherol y en algunos casos a la de antioxidantes sintéticos usados comúnmente como BHA y BHT (Rajapakse *et al.*, 2005; Samaranayaka y Li-Chan, 2011). (2) Como alimento funcional o nutracéutico. Investigaciones realizadas han proporcionado una amplia evidencia científica sobre beneficios a la salud provocados por péptidos y proteínas derivadas de alimentos, los resultados muestran que estos péptidos antioxidantes podrían tener un impacto en la reducción del estrés oxidativo, y en riesgo de padecer algunas enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, etc., asociadas con el estrés oxidativo (Manso *et al.*, 2008; Rajapakse *et al.*, 2005). No obstante, hacen falta más estudios encaminados a la evaluación del potencial antioxidante biológico de péptidos e hidrolizados proteicos usando cultivos celulares, modelos animales o ensayos clínicos en humanos. (3) En la industria cosmética. Aunque el uso de péptidos antioxidante como cosmético aún no es común, antioxidantes de diferentes fuentes alimentarias como compuestos polifenólicos, vitamina C, licopeno y vitamina E, son actualmente incluidas en muchos productos cosméticos, ellos están siendo comercializados para prevenir el envejecimiento y daño en la piel causado por los rayos UV, así como para tratar las arrugas y eritemas (Allemann y Baumann, 2008).

Relación actividad antioxidante- estructura del péptido.

En general los 20 aminoácidos pueden interactuar con RL si la energía del RL es alta (Eliás *et al.*, 2008). Sin embargo se ha reportado que los péptidos más reactivos incluyen aminoácidos nucleófilos que contienen azufre como la Cys y Met, aminoácidos aromáticos como el Trp, Tyr, y Phe, y la His cuyo grupo funcional es el imidazol (Sarmadi y Ismail, 2010). Esto se debe, a que aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a los electrones deficientes del radical, mejorando así la capacidad de captación de radicales (Rajapakse *et al.*, 2005), en cuanto el grupo SH en la Cys, se ha reportado que tiene una acción antioxidante crucial debido a su interacción directa con radicales (Qian *et al.*, 2008), por otro lado, se propone que la actividad antioxidante que presentan los péptidos que contienen His, está relacionada con la habilidad del grupo imidazol de donación de hidrogeno, atrapamiento de

radicales peroxilo y/o habilidad de quelación de iones metálicos (Rajapakse *et al.*, 2005).

Se ha reportado también que los péptidos antioxidantes a menudo incluyen residuos de aminoácidos hidrofóbicos tales como Val o Leu en el N-terminal del péptido, debido que los aminoácidos hidrofóbicos pueden incrementar la presencia del péptido en interfaces agua-lípidos y facilitar el acceso para eliminar los RL generados en la fase lipídica (Qian *et al.*, 2008).

Adicional a la presencia de los aminoácidos apropiados, su correcta posición en la secuencia peptídica y la hidrofobicidad del péptido, juegan un papel importante en la actividad antioxidante de los péptidos (Rajapakse *et al.*, 2005).

Métodos para evaluación de la capacidad antioxidante.

Diferentes métodos han sido desarrollados para analizar la capacidad antioxidante, dado que no se han desarrollados análisis específicos o estandarizados para medir la capacidad antioxidante de péptidos o hidrolizados, normalmente se utilizan los análisis usados en la literatura para muestras no peptídicas (Di Bernardini *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009).

Los métodos para evaluar actividad antioxidante podrían dividirse en tres grandes grupos (Samaranayaka y Li-Chan, 2011): análisis químicos *in vitro*, análisis biológicos *in vitro* y análisis *in vivo*. Generalmente, los análisis basados en reacciones químicas *in vitro*, envuelven cuantificación de donación de átomos de hidrogeno, transferencia de electrones o habilidad para quelar metales, los análisis biológicos *in vitro*, por su lado, utilizan modelos de cultivos celulares *in vitro* que permiten la detección de la biodisponibilidad, metabolismo y bioactividad de compuestos antioxidantes; los análisis *in vivo* utilizan estudios con modelos animales y ensayos clínicos con humanos, y generalmente son una parte esencial en la obtención de la aprobación por agencias federales para que un componente sea usado en la formulación de alimentos funcionales y nutracéuticos.

Aunque se debe tener en cuenta que las mediciones *in vitro* de la capacidad antioxidante de un compuesto, no puede ser extrapolable a la capacidad *in vivo*, dado que su biodisponibilidad, reactividad, y estabilidad *in vivo*, no es tomada en cuenta en estos análisis (Sarmadi y Ismail, 2010), también se debe considerar, que dado que los estudios *in vivo* son muy costosos, toman mucho tiempo e implican cuestiones éticas, resultan poco adecuados para realizar los estudios iniciales de actividad antioxidante, por tal motivo normalmente se utilizan una vez se haya establecido el potencial antioxidante del compuesto de interés usando los métodos *in vitro* mencionados antes (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Con base a las reacciones químicas, los análisis para medir la capacidad antioxidante mediante métodos *in vitro* son clasificados en dos grupo: métodos basados en transferencia de átomos de hidrogeno (TAH) y métodos basados en transferencia de electrones (TE) (Huang *et al.*, 2005). La mayoría de análisis basados en TAH implican una reacción competitiva, en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxil generados térmicamente. Métodos como capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), análisis de parámetro antioxidante de captura de radicales total (TRAP) y análisis de decoloración del β -caroteno son ejemplos de este tipo de análisis. Los análisis basados en TE miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual sirve para monitorear la acción del antioxidante e indicar el punto final de la reacción, los análisis de la capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC), poder antioxidante de reducción del ion hierro (FRAP) y capacidad de captura de radicales 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) son ejemplos de este tipo de análisis, usados frecuentemente para medir actividad antioxidante de péptido (Zulueta *et al.*, 2009). La siguiente reacción ocurre durante los análisis basados en TE: oxidante + e (del antioxidante) \rightarrow oxidante reducido + antioxidante oxidado (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Adicional a los métodos mencionados, la capacidad antioxidante de una muestra, puede ser también calculada por el estudio de la capacidad de un sustrato a inhibir la oxidación lipídica, normalmente mediante el análisis de sustancia reactiva del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el análisis de valor peróxido (PV) (Liu *et al.*, 2009), o mediante el análisis

de actividad quelante de metales, la cual mide la protección que la muestra ofrece contra la actividad oxidante catalizada por metales de transición (Huang *et al.*, 2005).

Finalmente, aunque hay diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, debido a la complejidad del proceso oxidativo que ocurre en sistemas alimentarios o biológicos, así como los diferentes mecanismos antioxidantes por el cual varios compuestos pueden actuar, hasta la fecha, no hay métodos estandarizados para el estudio de la actividad antioxidante de una sustancia, por esta razón se recomienda el estudio con varias condiciones de oxidación y diferentes métodos antioxidantes (Zulueta *et al.*, 2009).

3.5.2 Péptidos IECA derivados de proteínas alimentarias.

Aunque en el mercado se cuenta con medicamentos de alta eficiencia y bien tolerados en el tratamiento de la hipertensión, estos tienen la desventaja de que por ser medicamentos de origen sintético, son costosos y pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo en su uso, como es el de la tos, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel (Jao *et al.*, 2012). Así, es necesario el desarrollo de medicamentos seguros y naturales, para futuros tratamientos y prevención de la HTA.

Como se menciono antes, los IECA son en el momento actual un grupo farmacológico prioritario para el tratamiento de la hipertensión. La inhibición de la formación de angiotensina II *in vitro*, es además, un test frecuente para evaluar fármacos antihipertensivos (Cushman y Cheung, 1971; Hernández *et al.*, 2011). Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararacá* (Ferreira *et al.*, 1970), desde entonces se ha despertado un gran interés en la investigación de péptidos antihipertensivos de origen alimentario, pues los alimentos funcionales que los contienen pueden representar una nueva estrategia para el tratamiento de la hipertensión (Erdmann *et al.*, 2008).

Comparados con los IECA sintéticos, los péptidos IECA derivados de alimentos presentan ciertas ventajas, entre ellas, pueden controlar la hipertensión y tener un efecto

adverso mínimo, presentan un costo más bajo, y por ser derivados de proteínas alimentarias son naturales y seguros para el consumidor (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Dentro del reino animal y vegetal, la actividad IECA se ha determinado en gran variedad de proteínas alimentarias, entre ellas, plantas medicinales (Je *et al.*, 2009), soya (Kodera y Nio, 2006), queso (Gómez *et al.*, 2004), musculo de pescado (Ko *et al.*, 2012), camarones (He *et al.*, 2006) y sangre animal (Ren *et al.*, 2011).

La actividad inhibidora de los péptidos contra la ECA, no siempre esta correlacionada con su efecto antihipertensivo *in vivo*. Esto se debe, primero a la biodisponibilidad del péptido después de la administración oral, y segundo a que hay otros mecanismos antihipertensivos diferentes a la IECA que pueden intervenir (Vermeirssen *et al.*, 2004). Sin embargo, numerosos estudios en ratas espontáneamente hipertensas, así como en humanos hipertensos voluntarios, han demostrado que varios IECA reducen significativamente la presión sanguínea, después de su administración intravenosa u oral (Kodera y Nio, 2006; Ren *et al.*, 2011). Una observación importante de estos ensayos es que los péptidos estudiados, tienen poco o nulo efecto sobre la presión sanguínea de sujetos normotensos, lo que sugiere que estos péptidos no presentan efecto hipotensor agudo, por lo tanto, los péptidos IECA podrían ser aplicados como un tratamiento inicial en individuos con HTA media o como tratamiento suplementario.

En estudios comparativos con el captopril, se ha identificado que péptidos IECA con acción antihipertensiva, exhiben una actividad *in vivo* mayor que la que se esperaría con su actividad *in vitro*. Los mecanismos exactos que fundamentan esta observación no se han identificado todavía, pero se sugiere que los péptidos bioactivos tienen una mayor afinidad y están sujetos a una eliminación más lenta que el captopril (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Relación estructura-actividad de los péptidos IECA.

Se sabe, que diferencias en la estructura de los péptidos alimentarios, influencia la potencia como IECA (Hernández *et al.*, 2011). La mayoría de los péptidos IECA contienen secuencias relativamente cortas entre 2 y 12 aminoácidos, y se reconoce que

los péptidos cortos (<3 kDa) ofrecen consistentemente una mayor actividad IECA (Hyun & Shin, 2000; Ko *et al.*, 2012;). Natesh *et al.*, (2003) demostraron por estudios cristalográficos, que el sitio activo de la ECA no puede acomodar moléculas peptídicas grandes.

Estudios estructura-actividad de péptidos IECA de diferentes fuentes alimentarias, indican que la secuencia tripeptídica C-terminal, tiene un papel predominante en la unión competitiva al sitio activo de la ECA (Hernández *et al.*, 2011). Así, residuos hidrofóbicos tales como Trp, Tyr, Pro o Phe, en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales, favorecen la unión a estas zonas (Suetsuna, 1998). Adicionalmente, la potencia inhibidora se puede incrementar con la presencia, en esta posición terminal, de las cargas positivas de la Lys (grupo ϵ -amino) y la Arg (grupo guanidino) (Li *et al.*, 2004). Gómez *et al.* (2004), han sugerido que la Leu puede contribuir significativamente al incremento de la IECA, además otros aminoácidos alifáticos de cadena ramificada, como la Ile y la Val son predominantes en péptidos altamente inhibidores. Se ha comprobado también, que la ECA presenta poca afinidad por péptidos que contengan aminoácidos dicarboxílicos en su secuencia (Li *et al.*, 2004). Para los péptidos de cadena larga, se espera que la conformación del péptido, es decir, la estructura adoptada en el entorno específico del sitio de unión, influya en la unión a ECA (Hernández *et al.*, 2011).

Estudios en animales, revelan que péptidos con Thr en el C-terminal produce una baja, pero prolongada disminución en la presión arterial sistólica, comparado con dipeptidos con Phe en el C-terminal, los cuales causan una reducción más rápida y de más corta duración (Suetsuna, 1998). Se ha identificado también, que péptidos con presencia de Pro y Hyp en el C-terminal, son usualmente resistentes a la degradación de enzimas digestivas (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Modo de acción de los péptidos IECA.

Muchos estudios han producido y aislado con éxito péptidos IECA a partir de proteínas de varios alimentos (Ahn *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2012; Kodera y Nio, 2006; Lignitto *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011). En general se ha reportado que los péptidos IECA pueden

actuar como inhibidores competitivos, no competitivos e incompetitivos (Jao *et al.*, 2012). El modo de inhibición de los péptidos IECA es evaluado usando graficos Lineweavere-Burk.

Los inhibidores competitivos generalmente, compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima uniéndose a este para bloquearlo o pueden también unirse a otro sitio de unión de la enzima para alterar su conformación, de tal manera que el sustrato ya no se une al sitio activo (Hong *et al.*, 2008). En los sistemas de inhibición no competitiva, el inhibidor se puede unir tanto a la enzima sola, como al complejo enzima-sustrato, y ambos, el inhibidor y el sustrato pueden ser enlazados a la enzima en cualquier momento dado. Cuando el sustrato y el inhibidor están unidos, el complejo enzima-sustrato-inhibidor no puede formar un producto, pero puede convertirse nuevamente en complejo enzima-sustrato o enzima-inhibidor (Si *et al.*, 2009). En el sistema de inhibición incompetitiva, el inhibidor puede unir solo el complejo sustrato-enzima y disminuir la actividad de la enzima, de modo que se necesita más tiempo para que el sustrato o producto dejen el sitio activo (Jao *et al.*, 2012).

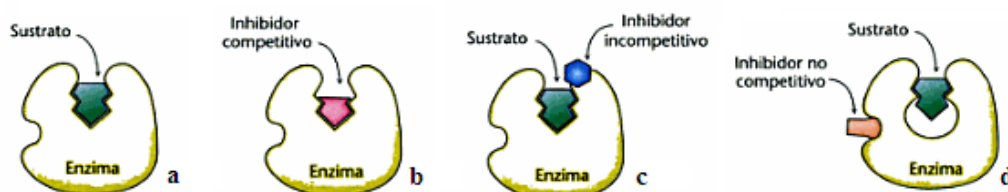


Figura 5: Tipos de inhibición. (a) Complejo enzima-sustrato, (b) Inhibidor competitivo se une al centro activo, (c) Inhibidor incompetitivo se une únicamente al complejo enzima-sustrato, (d) Inhibidor no competitivo no impide la unión del sustrato. Tomado de Berg *et al.*, 2008.

3.5.3 Péptidos antimicrobianos derivados de proteínas alimentarias.

Los seres vivos, como las plantas y los animales sobreviven ante la amenaza diaria del medio ambiente representada por bacterias, hongos y virus que pueden causarles la muerte. Por lo anterior, las especies biológicas han desarrollado varias estrategias para

evitar enfermedades. Una de ellas es la síntesis de péptidos naturales antimicrobianos como parte de la respuesta inmune innata (Villarruel, 2006).

Los péptidos antimicrobianos se clasifican en dos categorías, los obtenidos desde hidrólisis de proteínas, actualmente llamados criopéptidos, y los obtenidos por síntesis ribosomal que constituyen un aporte significativo de la inmunidad innata (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008). Se ha demostrado también que dichos péptidos poseen actividad anticancerígena, antiviral, e incluso, la habilidad para modular la respuesta inmune innata (Powers y Hancock, 2003).

Los primeros péptidos que presentaron actividad antimicrobiana fueron descubiertos en anfibios, insectos y plantas en la década de los 70 (Csordas y Michl, 1970), estos descubrimientos generaron un creciente interés por el aislamiento e identificación de otros péptidos antimicrobianos. Desde entonces se han realizado muchos estudios en hidrolizados proteicos de diferentes fuentes alimenticias, los sustratos más estudiados, son aquellos que proceden de la leche y productos lácteos (Mulero *et al.*, 2011), otras fuentes animales y vegetales también han sido investigadas, entre ellas, hemoglobina de bovino (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008), carne (Di Bernardini *et al.*, 2011), y soya (Kodera y Nio, 2006). Los péptidos encontrados, han evidenciado una alta actividad antimicrobiana y se presentan como una promisoriosa alternativa de antimicrobianos de origen natural (Powers y Hancock, 2003).

Se habla de que la actividad antimicrobiana de los péptidos, puede ser ejercida al menos mediante tres mecanismos distintos: (a) Secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias, (b) Produciendo alteraciones en la pared bacteriana y (c) Mediante la estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos; Además de esto, los péptidos antimicrobianos ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos de destino, mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos (Mulero *et al.*, 2011). Estudios *in vivo* muestran efectos protectores por parte de derivados de la caseína, frente a *S. aureus* y *Candida albicans* en ratones y frente a mastitis en vacas y ovejas (Marshall, 2004).

Los péptidos antimicrobianos, pueden presentar actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y virus envueltos (Hartmann y Meisel, 2007). Debido al mecanismo de acción que presentan los péptidos antimicrobianos, resulta difícil para los microorganismos modificar la estructura de su membrana para evadir y crear resistencia, por lo que estos péptidos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos efectivos (Villarruel, 2006).

Relación actividad antimicrobiana-estructura de los péptidos.

Los péptidos antimicrobianos, son generalmente definidos como péptidos de menos de 50 aminoácidos residuales, con un peso molecular menor de 10 kDa, característicos por la presencia de múltiples residuos de Lys y Arg, y una substancial porción (50% o más) de residuos hidrofóbicos (Powers y Hancock, 2003). Hasta la fecha un gran número de péptidos antimicrobianos han sido caracterizados químicamente, sin embargo, pocas estructuras de alta resolución están disponibles. El estudio de la relación estructura-actividad de estos péptidos revela dos requerimientos principales para la actividad antimicrobiana, una carga catiónica y una conformación anfipática inducida (Powers y Hancock, 2003).

Estas características fisicoquímicas en los péptidos antimicrobianos les permite la interacción con los microorganismos. Así, el hecho de poseer una carga neta positiva, les permite su interacción con los fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana o de otros patógenos, y su anfipaticidad, es decir presencia de regiones apolares (con aminoácidos hidrofóbicos) y regiones con cargas positivas (aminoácidos catiónicos, Arg, Lys o His), les facilita que posterior a la interacción de las regiones catiónicas con los fosfolípidos aniónicos, las regiones polares interaccionen con las cadenas polares de los fosfolípidos, lográndose la inserción del péptido en la membrana microbiana. Los péptidos antimicrobianos son flexibles, lo cual permite la interiorización de los mismos hacia el citoplasma bacteriano y conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (Villarruel, 2006).

Los péptidos se clasifican según su estructura en cuatro clases: β -plegados, α -helicoidales, lazo y péptidos extendidos (fig. 6). Siendo las dos primeras clases las más

comunes en la naturaleza. La conformación α -helicoidal de péptidos activos, a menudo es esencial con respecto a su mecanismo de acción frente a los microorganismos sensibles (Powers y Hancock, 2003).

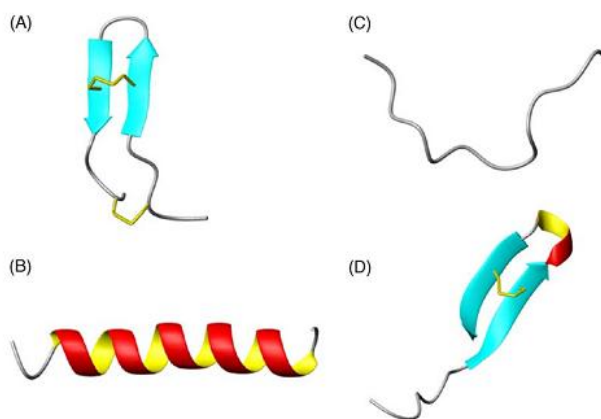


Figura 6: Tipos de estructuras de los péptidos antimicrobianos. (a) β -plegados, (b) α -helicoidales, (c) lazo, y (d) péptidos extendidos. Tomado de Powers y Hancock, 2003.

3.5.4 Biodisponibilidad de los péptidos bioactivos.

El potencial de los péptidos bioactivos, depende de su capacidad para alcanzar intactos los órganos donde van a realizar su función. Es difícil establecer una relación directa entre la capacidad *in vitro* y la actividad *in vivo*, por tanto, el estudio de la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos es fundamental a la hora de diseñar alimentos funcionales con propiedades fisiológicas (Li *et al.*, 2004).

En general, después de la administración oral, los péptidos pueden mantener su estructura intacta, o ser hidrolizados por acción de las enzimas digestivas, por este motivo, la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*, es un método experimental simple y económico usualmente usado para imitar el efecto *in vivo* (Jao *et al.*, 2012). A pesar de que ésta simulación, no siempre asegura su actividad *in vivo*, es un buen método para evaluaciones preliminares que ayudan a entender los posibles cambios en la estructura de los péptidos y dan una proyección de la potencia de los péptidos (Vermeirssen *et al.*, 2004).

La literatura científica evidencia que los péptidos bioactivos pueden escapar a la digestión y ser absorbido en una forma intacta (Hernández *et al.*, 2011), sin embargo, la capacidad de los compuestos para entrar en el sistema linfático intestinal se ve afectado por su permeabilidad, tamaño molecular y solubilidad en lípidos. Una vez absorbidos los péptido, el elevado número de peptidasas presentes en la sangre, hace que el tiempo en el que dichos péptidos, permanecen estables en el plasma, sea muy corto, pero existen algunas evidencias de que algunos péptidos con actividad biológica, pueden ser transportados por el torrente circulatorio sin ser hidrolizados por las proteasas sanguíneas (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Investigaciones indican que péptidos pequeños (2-6 aminoácidos) son absorbidos más rápidamente en comparación a las proteínas y los aminoácidos libres, y que son generalmente resistentes a la degradación por enzimas digestivas (Vermeirssen *et al.*, 2004). Se ha reportado también, que algunos péptidos largos (10-51 aminoácidos) pueden atravesar la barrera intestinal intactos y exhibir sus funciones biológicas a nivel tisular, sin embargo, con el incremento del peso molecular, sus oportunidades para pasar la barrera intestinal disminuyen (Erdmann *et al.* 2008).

Debido a compleja biodisponibilidad de los péptidos después de la ingestión oral, un péptido con alta actividad biológica *in vitro*, puede ejercer poca o no ejercer actividad *in vivo*, de igual manera, es posible que la actividad *in vivo* sea más alta que la actividad *in vitro*. En estos casos se ha sugerido, que los péptidos bioactivos pueden ejercer sus funciones biológicas por otros mecanismos diferentes a los evaluados en el experimento (Erdmann *et al.* 2008), y que además, la fuerte actividad *in vivo* puede deberse, a una mayor actividad de los péptidos obtenidos tras la acción de las proteasas gastrointestinales al péptido inicial (Li *et al.*, 2004).

3.5.5 Estrategias para la producción de péptidos bioactivos.

Los péptidos biológicamente activos pueden ser generados de la proteína precursora de múltiples maneras, que incluyen: (a) Digestión gastrointestinal *in vivo*, (b) Hidrolisis *in*

vitro por acción de enzimas digestivas, proteolíticas u otras enzimas derivadas de microorganismos o plantas y (c) Fermentación microbiana (Sarmadi y Ismail, 2010).

La manera más común para producir péptidos bioactivos es a través de hidrólisis enzimática de las proteínas completas (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Muchos de los péptidos bioactivos conocidos han sido producidos usando enzimas gastrointestinales, usualmente pepsina y tripsina (Nalinanon *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2011; Vermeirssen *et al.*, 2004). Otras enzimas digestivas y diferentes combinaciones de proteasas, incluyendo quimotripsina, pancreatina y pepsina, así como enzimas de fuentes microbianas han sido también utilizadas para generar péptidos bioactivos de varias proteínas (Ahn *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008).

Como resultado de los cambios moleculares tras la hidrólisis, las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas, tanto las propiedades tecno-funcionales, como las propiedades bio-funcionales, las cuales pueden ser subdivididas en nutricional y fisiológica. Las propiedades nutricionales de la hidrólisis reflejan por ejemplo su digestibilidad aumentada y alergenicidad disminuida comparado a las proteínas nativas, las propiedades fisiológicas abarcan bio-actividades potenciales del hidrolizado, las cuales se originan de la liberación de péptidos bioactivos, finalmente, las propiedades tecno-funcionales representan funcionalidad tecnológica, tales como solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes (Benitez *et al.*, 2008).

3.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

3.6.1 Enzimas.

Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad (Berg *et al.*, 2008). Son moléculas proteicas globulares capaces de catalizar y acelerar reacciones químicas específicas, en un factor de 10^{12} a 10^{20} respecto a las reacciones no catalizadas, con una

actividad molar muy elevada, una molécula de enzima puede transformar hasta 600.000 moléculas de sustrato por segundo, enzimáticamente (Whitaker 1994).

Todos los animales, vegetales, hongos bacterias y levaduras sintetizan enzimas, actualmente se conoce la existencia de más de 2000 enzimas, de las cuales muchas ya han sido aisladas, purificadas y cristalizadas. Todas las enzimas son proteínas, tienen una estructura tridimensional globular y su especificidad de catálisis es única, están formadas normalmente por una cadena polipeptídica y solo logran ser activas cuando los polímeros desarrollan una conformación que permite establecer su centro activo, definido como aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación del sustrato (Badui, 2006).

Existen un grupo de enzimas llamadas enzimas proteolíticas o proteasas, las cuales hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad (Berg *et al.*, 2008). En los últimos años se ha empezado a emplear diversas proteasas para la modificación de proteínas con el objeto de impartirles ciertas propiedades funcionales que de otra manera no tienen, pudiéndose incrementar la capacidad de emulsificación, espumado, solubilidad, viscosidad, etc. (Liu *et al.*, 2010; Nalinanon *et al.*, 2011).

Enzimas proteolíticas.

Las proteasas pueden ser clasificadas de diferentes maneras (Guadix *et al.*, 2000): (a) Según su origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico, (b) Por su modo de acción catalítica, en endo o exo-proteasas, las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína y las exoproteasas, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos, (c) Con base en su sitio catalítico en serin-, metalo-, cistein-, o aspartato- proteinasas, la naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato.

El centro activo contiene aminoácidos o cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, o metaloproteasas

según intervienen los aminoácidos Ser, Cys, Asp o un catión metálico, respectivamente (Berg *et al.*, 2008). Todas las serinproteasas tienen actividad endo y tienen su máxima actividad catalítica a pH alcalino, las cisteínproteasas poseen en su centro catalítico un grupo -SH y su máxima actividad se encuentra a pH alcalino, aunque más cercanos a la neutralidad que en el caso de las serinproteasas. Contrariamente las metaloproteasas son principalmente exoproteasas y su pH óptimo se sitúa alrededor de la normalidad, su actividad y estabilidad se ve afectada por la presencia de cationes Ca^{2+} y agentes quelantes como el EDTA, que eliminan el átomo de Zn. Las aspartatoproteasas por su lado, presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido (Whitaker 1994).

Las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinproteasas, que se dividen en dos tipos principales: las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y las de actividad catalítica tipo subtilisina (Prieto, 2007). En ambos casos, las serinproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico formando un complejo acil-enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre, tal como se aprecia en la figura 7.

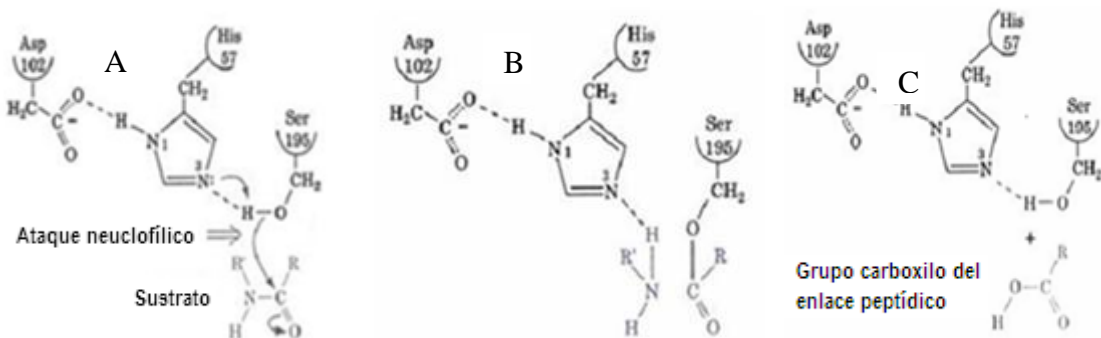


Figura 7: Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas por serinproteasas. (a) ataque nucleofílico, (b) complejo acil-enzima, (c) ruptura del complejo. Tomado de Prieto, 2007.

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, actualmente, cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. Las proteasas más comunes con aplicación industrial son preparados enzimáticos, que suelen ser mezclas de estas

enzimas y compuestos añadidos para estabilizar el producto, normalmente en estado líquido o en polvos secos (Prieto, 2007).

La especificidad de enzima afecta el tamaño, la cantidad, y composición de péptidos y aminoácidos libres, así como su secuencia de aminoácidos obtenida durante la hidrólisis (Doucet *et al.*, 2003). Peña y Xiong (2002), reportaron que el uso de diferentes enzimas resulta en la formación de una mezcla de péptidos con diferentes GH y en consecuencia diferentes rangos de actividad biológica.

Generalidades sobre la Alcalasa.

La Alcalasa es una enzima industrial de grado alimentario, producida por una cepa seleccionada de *B. licheniformis*, su principal componente enzimático es la subtilisina Carlsberg, una serinproteasa alcalina preparada y cristalizada por primera vez por Guntelberg y Ottesen, (1952). Consiste en una cadena peptídica de 274 aminoácidos sin enlaces disulfuro, y su peso molecular es de 27277 Da con un punto isoelectrico de 9,4. La enzima tiene amplia especificidad, hidrolizando la mayoría de los enlaces peptídico, preferentemente aquellos que contienen residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Doucet *et al.*, 2003).

Algunas investigaciones, han demostrado que mayores GH pueden ser alcanzados con Alcalasa, en comparación con otras enzimas (Ko *et al.*, 2012; Lee y Song, 2003). Esto se debe, a que la Alcalasa contiene varias proteinasas, cada una con diferentes especificidades, debido a que es un extracto bacteriano relativamente crudo de *B. licheniformis*, lo cual fue confirmado por Doucet *et al.* (2003), quienes reportan un patrón electroforético para la Alcalasa, donde pueden ser diferenciadas por lo menos cuatro bandas diferentes, confirmando así, la presencia de varias proteínas.

En diferentes estudios, se han evidenciado ventajas de la utilización de la Alcalasa en comparación con otras enzimas, se informa que los péptidos producidos por Alcalasa tienen diversas actividades biológicas y que en comparación con otras proteasas, proporciona rendimientos más altos y desarrolla péptidos más cortos, produciendo así, péptidos bioactivos más resistentes a las enzimas digestivas (Sarmadi y Ismail, 2010).

Así, Qian *et al.* (2008) probaron que la actividad antioxidante de hidrolizados derivados de Alcalasa es mayor que la de otros hidrolizados. De manera análoga, en otro estudio se seleccionó la Alcalasa como la proteasa más adecuada para la producción de péptidos IECA a partir de las proteínas de plasma de sangre en comparación con la neutrasa, pepsina y papaína (Hyun y Shin, 2000), igualmente Ko *et al.* (2012), probaron que la Alcalasa produce hidrolizados con mayor actividad IECA, con valores IC_{50} menores que los obtenidos con hidrolizados de otras proteasas.

La Alcalasa es también ventajosa con respecto a la economía de la producción industrial, dado que el costo de esta enzima grado alimenticio, es más bajo que el de otras proteasas también grado alimenticio, y mucho menor que el de preparaciones enzimáticas crudas como tripsina, pepsina, papaína (Hyun y Shin, 2000).

3.6.2 Generalidades de la hidrólisis enzimática.

Una reacción de hidrólisis proteica, implica la ruptura de un enlace peptídico por acción del agua y catálisis enzimática, ácida o básica. Esta reacción produce cambios en las características moleculares de las proteínas y conlleva a cambios en sus propiedades funcionales (Benitez *et al.*, 2008). Debido al proceso de hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

La hidrólisis enzimática de proteínas se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso; el sustrato, es disuelto o resuspendido en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan, a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que la reacción progresa se produce una disminución del pH debido a la liberación de iones H^+ producidos en la rotura de los enlaces peptídicos, para la hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH, con una combinación de ambos, o puede ser retirada del medio mediante

filtración (Benítez *et al.*, 2008). La figura 8 muestra una reacción de hidrólisis catalizada por una proteasa (Tardioli *et al.*, 2005).

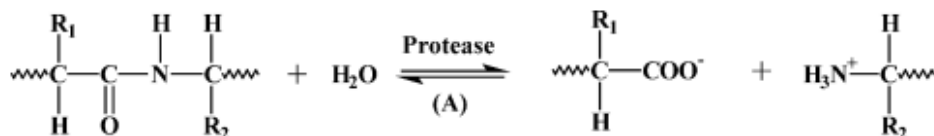
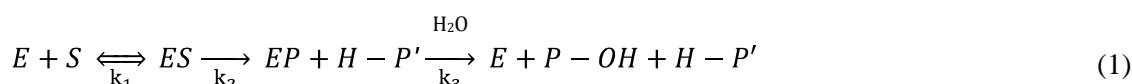


Figura 8: Hidrólisis enzimática de una cadena polipeptídica. Tomado de Tardioli *et al.*, 2005.

La hidrólisis enzimática de proteínas transcurre a través de un conjunto de etapas en serie, dando péptidos de tamaño decreciente: *Proteínas* → *proteosas* → *peptonas* → *péptidos* → *aminoácidos*. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas (ecuación 1). Primero la formación de un complejo enzima- proteína, después la ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido, finalmente el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (Benítez *et al.*, 2008).



E: enzima, S: sustrato, P y P': péptidos resultantes, k_x : constante velocidad de reacción

En comparación con los métodos tradicionales (hidrólisis ácida y alcalina), la hidrólisis enzimática ofrece indudables ventajas, como la no existencia de procesos de degradación del sustrato ya que las enzimas son selectivas para un tipo de enlace, los valores de pH y temperaturas son moderadas (pH están comprendidos entre 5-8 y las temperaturas entre 40-60 °C), se mantiene o mejora el valor nutritivo, cosa que no pasa con la hidrólisis alcalina, que destruye los aminoácidos arginina y cisteína, mientras que la hidrólisis ácida hace lo mismo con el triptófano (Guadix *et al.*, 2000).

Métodos de cuantificación de la hidrólisis.

Las reacciones de hidrólisis deben ser cuidadosamente controladas con el fin de mantener una calidad uniforme en los productos finales. El GH, definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación de los enlaces peptídicos totales en la proteína original (Márquez y Vázquez, 1999), es comúnmente usado para describir la hidrólisis de las proteínas y sirve como parámetro de control para la reacción de hidrólisis (Figueroa *et al.* 2012; Tardioli *et al.*, 2005), es una propiedad fundamental de los hidrolizados y va a determinar en gran medida las restantes características de los mismos y por lo tanto su posible uso.

El GH está determinado por las condiciones utilizadas, como la concentración del sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis, es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el GH, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.*, 2008). El GH se define como:

$$GH = \frac{n^{\circ} \text{enlaces peptidicos hidrolizados}}{n^{\circ} \text{total enlaces peptidicos}} \times 100 \quad (2)$$

Para la determinación del GH se utiliza el método de la valoración del protón ó método del pH-estado, que consiste en mantener constante el pH del medio de reacción por la adición de base, para neutralizar los protones (grupos α -amino) que son liberados en la reacción de hidrólisis (Guadix *et al.*, 2000). Este es uno de los métodos más utilizados en estudios de cinética enzimática de proteínas (Figueroa *et al.* 2012; Tardioli *et al.*, 2005).

El consumo de base, puede ser relacionado con el GH según la ecuación 3 (Márquez y Vázquez, 1999).

$$GH = \frac{BN_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} 100 \quad (3)$$

Donde h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa, B el volumen consumido de base en L, MP la masa de la proteína en kg, NB la normalidad de la base en Eqv/L y α es el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción, valor que está dado en función del pH y la temperatura de reacción.

4. ESTADO DEL ARTE

En los últimos años comenzó a recibir una gran atención el estudio de las proteínas alimentarias como componentes beneficiosos no solo desde el punto de vista nutricional, sino funcional, ya que no solo proporcionan los aminoácidos esenciales al organismo, sino que son fuentes de péptidos funcionales (Mulero *et al.*, 2011).

Diferentes estudios han sido realizados para el aislamiento de péptidos bioactivos a partir de proteínas de origen vegetal, entre estos se cuentan las proteínas de soja (Kodera y Nio, 2006), de plantas medicinales (Je *et al.*, 2009), de leche y productos lácteos (Pihlanto, 2006), de huevo (Manso *et al.*, 2008), de sangre animal (Liu *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011), de carne (Di Bernardini *et al.*, 2011), y de derivados de pescado (Ahn *et al.*, 2012).

En general, la proteína intacta, puede no presentar o presentar poca actividad, y es necesaria la liberación de algunos fragmentos de la secuencia de estas proteínas, para exhibir actividad biológica, normalmente mediante hidrólisis (Sarmadi y Ismail, 2010). Del estudio de la hidrolisis enzimática de proteínas se ha establecido la posibilidad de obtener péptidos con actividad antimicrobiana (Di Bernardini *et al.*, 2011), antioxidante (Salgado *et al.*, 2011), antihipertensiva (Ahn *et al.*, 2012), vinculante de hierro (Lee y Song, 2009), antigenotóxica (Park y Hyun, 2002), entre otras.

Muchas proteínas de origen animal y vegetal pueden ser usadas como materiales para producir hidrolizados proteicos. Sin embargo desde el punto de vista de protección del medio ambiente, una manera factible y económica para producir hidrolizados de proteína, es el uso de materiales de desecho de fincas y plantas alimentarias. La sangre animal producida durante el sacrificio es una valiosa fuente de proteína, y se ha encontrado que produce varios péptidos bioactivos. Algunos aislados de hidrolizados de hemoglobina, han presentando capacidad antimicrobiana (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008), inhibidora de la ECA (Ren *et al.*, 2011), antioxidante (Chang *et al.*, 2007), entre otros. En cuanto al plasma sanguíneo, se ha confirmado la existencia de péptidos con actividad antigenotóxica (Park y Hyun, 2002), capacidad de unión del hierro (Lee y Song, 2009),

actividad antioxidante (Liu *et al.*, 2010) y capacidad inhibidora de la ECA (Lee y Song, 2003).

Acerca de péptidos antioxidantes en plasma sanguíneo, existen algunos estudios con plasma proveniente de diferentes fuentes como porcino (Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010), humano (Prior *et al.*, 2003) y equino (Martinez *et al.*, 2006), que evidencian la potente actividad que podría encontrarse en este tipo de péptidos. Liu *et al.*, (2009), hacen un análisis detallado de cómo la actividad antioxidante presentada en plasma de porcino se ve afectada por el tiempo de hidrólisis y la concentración de proteínas, así también hace una comparación de la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos con respecto a algunos antioxidantes comerciales. En cuanto a plasma de bovino, realmente son escasas las investigaciones, solo algunos autores como Salgado *et al.* (2011), han realizado investigaciones al respecto. Ellos evaluaron como la incorporación de hidrolizados de plasma bovino, mejora la capacidad antioxidante de biofilms de proteínas de soya. Sin embargo, hasta ahora no hay reportes de las características de los péptidos que proveen dicha actividad, ni de la estabilidad frente a condiciones digestivas.

De manera análoga, son pocas las investigaciones que se han llevado a cabo, para identificar hidrolizados y péptidos con actividad IECA a partir plasma de sangre de porcino y de bovino (Hyun y Shin, 2000; Lee y Song, 2003; Park y Song, 1998; Wanasundara *et al.*, 2002); Estos autores, han reportado varios hidrolizados y péptidos de plasma de bovino con buena actividad IECA, y en algunos casos han identificado los péptidos responsables. No obstante, en ninguna investigación se hace un estudio detallado de la relación del GH con la actividad IECA usando la Alcalasa 2.4 L para la hidrólisis, a pesar de que diversas investigaciones la han definido como la enzima más efectiva para la obtención de péptidos IECA (Ahn *et al.*, 2012; Hyun y Shin, 2000; Ko *et al.*, 2012), además no se han reportado algunas características importantes de estos péptidos como la estabilidad ante condiciones de digestión *in vitro*. En cuanto a péptidos antimicrobianos, no hay ningún reporte de investigaciones realizadas al respecto en hidrolizados de plasma sanguíneo.

Varios estudios *in vivo* con animales de experimentación, y ensayos con humanos, han demostrado la potente acción de los péptidos IECA para reducir significativamente la presión sanguínea, después de su administración intravenosa u oral (Kodera y Nio, 2006; Ren *et al.*, 2011), así como la eficiencia de péptidos antioxidantes para reducir el riesgo de padecer algunas enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (Manso *et al.*, 2008; Rajapakse *et al.*, 2005).

Actualmente, los péptidos bioactivos son componentes fundamentales de muchos productos o ingredientes comercializados como alimentos funcionales o nutracéuticos. En estos productos los péptidos bioactivos son añadido o enriquecidos por modificación del proceso de fabricación habitual. En efecto, varios hidrolizados de proteínas vegetales, pueden ser incorporados en alimentos específicos como aditivos alimentarios, y son permitidos como ingredientes alimentarios en la mayoría de los países (Schaafsma, 2009). Así mismo, péptidos antihipertensivos de bajo peso molecular, derivados de proteínas alimentarias, han sido bien establecidos y están disponibles en el mercado (Hartmann y Meisel, 2007). Los péptidos bioactivos derivados de alimentos también tienen un enorme potencial como ingredientes farmacéuticos, por ejemplo, capsulas para disminuir la PA han sido elaboradas a partir del oligopéptido LKPNM obtenido del bonito seco (Vasotensin 120TTM por Metagenics, USA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS Y MATERIALES.

El plasma en estado líquido, se obtuvo de un proveedor comercial en Medellín-Colombia, tomando muestras de 6 lotes de producción diferentes, las cuales se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. Para la hidrólisis enzimática, se utilizó Alcalasa 2,4 L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Dinamarca), cuya actividad ($2,45 \pm 0,07$ AU/g) se verificó con el método de Takami, *et al.*, (1989), modificado. Los reactivos ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri-2-pyridyl-s-triazine (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), La ECA de pulmón de conejo (EC 3.4.15.1, 6 U/mg) y el substrato HHL (hippuryl-histidyl-leucine), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Para las pruebas de actividad antimicrobiana se usaron cepas ATCC de interés en la industria alimentaria, tres Gram positivas (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) y tres Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Shigella sonnei* ATCC 29930). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PLASMA DE BOVINO.

5.2.1 Análisis fisicoquímicos al plasma.

Los contenidos de humedad y de grasa total (extracto etéreo) fueron determinados mediante el protocolo sugerido por la GTC 1, numerales 1.14 y 6.1, respectivamente (GTC, 1994). Los contenidos de cenizas totales, nitrógeno y proteínas (usando 6.25 como factor de conversión) fueron determinados siguiendo los métodos 923.03 y 954.01, respectivamente de la AOAC (2005).

5.2.2 Electroforesis en gel del plasma completo.

La separación de las proteínas del plasma de bovino se efectuó por electroforesis en gel de agarosa tamponado (pH 8.5) mediante un sistema de hydragel protein K20 (Ref. 3000, Sebia, Alemania), según la metodología descrita por Wieme (1965), con algunas modificaciones. Las proteínas separadas fueron fijadas mediante una mezcla ácido/alcohol y teñidas con una solución de negro amido, el exceso de colorante fue eliminado con una solución ácida. Las separaciones electroforéticas teñidas fueron evaluadas visualmente y se usó un densitómetro/escáner (GELSCAN™ ref. 1206, Sebia, Alemania) con una longitud de onda de 570 nm para la cuantificación relativa de las proteínas individuales. La lectura de los datos se hizo por medio de un ordenador con el programa Phoresis (Ref. 1110, Sebia, Alemania).

5.2.3 Composición total de aminoácidos del plasma.

El plasma completo de sangre de bovino fue sometido a una hidrólisis ácida con el fin de liberar todos los aminoácidos (AA) presentes, para esto, 5 mg de proteína de la muestra fueron hidrolizados con 5 mL de HCl 6 N con 0.1% de fenol. La hidrólisis se realizó a 110°C durante 24 h (Sanchez, 2012).

Los AA fueron analizados por HPLC (Agilent Technologies Series 1200, con detector UV/VIS con arreglo de diodos DAD), operado con columna analítica de 5 µm, (ZORBAX Eclipse AAA-C18, 4.6x150 mm), se utilizó una fase móvil en forma de gradiente preparada por bomba cuaternaria al mezclar las soluciones agua, metanol, acetonitrilo y 40 mM Buffer NaH₂PO₄, ajustado el pH a 7.8 con solución de NaOH (10 N), una temperatura de 40 °C y un flujo de 2.0 mL/min. Previo a los análisis, las muestras fueron derivatizadas en línea usando o-phthalaldehyde (OPA) para AA primarios y 9-fluorenyl-methyl chloroformate (FMOC) para AA secundarios. Los AA primarios son detectados a 338 nm y los secundarios a 262 nm. La recta de calibración se elaboró empleando una mezcla de estándares de AA entre 90 y 900 pmol/µL de Agilent Technologies (Sanchez, 2012).

5.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL PLASMA DE BOVINO.

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor de vidrio durante 2 h. Se prepararon 800 ml de una solución de plasma con 8 mg de proteína /ml, la cual fue llevada a condiciones de pH 8.0 y temperatura de 60 °C. La hidrólisis se realizó con Alcalasa 2,4 L a una relación enzima/sustrato de 8% (p/p). El control de pH y temperatura se hizo con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrando 842 marca Metrohm, operado por un ordenador (software Tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se mantuvo en agitación constante (200 rpm), usando un agitador magnético 801 (Metrohm). La reacción fue monitoreada con la determinación del GH, utilizando el método del pH-estático antes descrito. El cálculo del GH se hizo según la ecuación 4, y se empleó un α de 0.93 y un h_{tot} de 8.3 Eqv/Kg que ha sido reportado para proteínas de la sangre (Adler-Nissen, 1986). Al final de cada ensayo el medio de reacción se llevó a 85 °C por 10 min para detener la hidrólisis, el hidrolizado fue luego centrifugado a 6000 rpm durante 20 min para precipitar la fracción no hidrolizada.

Para evaluar si la actividad biológica de los HPB, aumenta indefinidamente con el GH, se realizó una hidrólisis por duplicado, bajo las mismas condiciones ya descritas, en la que se dejó la reacción por un tiempo prolongado (6 h) con el fin de alcanzar un GH significativamente mayor.

5.3.1 Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteína fue determinada mediante el método de absorción ultravioleta a 280 nm (Stoscheck, 1990), usando un espectofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA).

5.3.2 Electroforesis en gel poliacrilamida dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE).

Se realizó un análisis de electroforesis SDS-PAGE al plasma completo y a hidrolizados del plasma con diferentes GH. Se usó un gel 12% en poliacrilamida (Laemmli, 1970).

El proceso se desarrolló bajo condiciones no reducidas, en una cámara para electroforesis vertical, todas las corridas fueron efectuadas a 130 V por 1 h. Se usó azul de Coomassie como colorante y ácido acético al 10% como decolorante. Los pesos moleculares de las proteínas y los péptidos fueron estimados usando un marcador de amplio rango entre 5-250 kDa (Fermentas # SM 1881, USA).

5.4 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.

5.4.1 Evaluación de la capacidad antioxidante.

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos de transferencia de electrones (TE): el ABTS siguiendo la metodología descrita por Re *et al.*, (1999), y el FRAP según el método descrito por Pulido *et al.*, (2000). Ver detalles de la metodología en el anexo I.

Adicionalmente, se realizó el ensayo basado en reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (TAH), el método ORAC, análisis contratado en el grupo de investigaciones en sustancias bioactivas- GISB de la Universidad de Antioquia. Para el desarrollo del método ORAC-FL se siguió la metodología descrita por Ou *et al.*, (2001). Una mezcla de 150 μ L de fluoresceína 1 μ M (sustrato fluorescente) y 25 μ L de los HPB (diluidos en buffer fosfato 10 mM a pH 7.4 hasta una concentración de proteínas de 0.2 mg/mL), fue preincubada por 30 min a 37 °C. Luego, 25 μ L de una solución de 2,2'-azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH) 250 mM fue adicionada. La intensidad de fluorescencia fue medida cada 2 min durante 120 min, con longitudes de onda de excitación y emisión fijadas en 485 y 520 nm, respectivamente.

Para todas pruebas, los resultados fueron expresados como micromoles de equivalentes trolox por gramo de proteína (μ molET/g). Para lo cual, soluciones acuosas de trolox a concentraciones entre 0 y 500 M, se utilizaron para realizar la curva de calibración.

5.4.2 Evaluación de la capacidad IECA.

La actividad IECA se determinó mediante el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (1971), ver detalles de la metodología en el anexo II. En esta prueba el dipéptido His-Leu se convierte en ácido hipúrico (AH) debido a la eliminación hidrolítica del C-terminal del dipéptido por acción de la ECA, así, la inhibición de la ECA se ve reflejado con una menor formación de AH. El IC₅₀ se define como la concentración de inhibidores de ECA necesaria para inhibir el 50% de su actividad.

5.4.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana.

Se empleó el método de microdilución en caldo colorimétrico propuesto por Abate *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Para la preparación del inóculo, cada cepa bacteriana fue incubada durante 24 h a 32 °C en caldo Mueller-Hilton, y ajustada a una densidad final de 10⁸ UFC/mL (estándar de McFarland de 0.5). Se realizaron diluciones de los HPB con diferentes GH, a concentraciones proteicas de 0.6, 1.2, 2.5 y 5 mg/mL. Se utilizaron microplatos de 96 pozos fondo plano, mezclando en cada pozo 20 µL de los HPB de menor a mayor concentración, 220 µL de caldo Mueller-Hinton y 10 µL del inóculo. Como control positivo y negativo, se usó nisina y agua respectivamente, y cada muestra se evaluó por triplicado. Los microplatos fueron incubados aeróbicamente a 35 °C durante 4 h. La lectura se realizó adicionando 25 µL de colorante vital bromuro de 3-(4,4-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a 0.8 mg/mL a cada uno de los pozos, e incubando a 37 °C durante 1 h, para permitir a las células vivas metabolizar el MTT. Un cambio de color de amarillo a azul intenso indica crecimiento del microorganismo, por consiguiente la CMI es la menor concentración del los HPB donde no se evidencie ningún cambio de color.

5.5 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

Los hidrolizados que mostraron mayor actividad biológica, fueron fraccionados en membranas de ultrafiltración de 3 kDa y 10 kDa, obteniéndose tres fracciones (<3 kDa,

3-10 kDa y >10 kDa). Las actividades biológicas de estas fracciones fueron nuevamente determinadas y la fracción con mayor actividad, fue fraccionada por cromatografía de intercambio aniónico con una columna DEAE- Sephadex (20 x 100 mm). Los picos cromatográficos que presentaron mayor actividad, fueron separados por RP-HPLC en una columna octadecilsilica (C18) (250 x 10 mm; Restek, Pennsylvania, USA) con el fin de purificar el péptidos de interés. Para ver la metodología detallada de la obtención de los péptidos antioxidantes e IECA, ver el anexo I y anexo II, respectivamente.

5.6 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Las fracciones purificadas anteriormente, que presentaron mayor actividad biológica, fueron analizadas mediante espectrometría de masas para identificar las secuencias de los péptidos allí presentes, este análisis se contrató en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. Varias diluciones de las muestras fueron mezcladas en partes iguales con una solución saturada de ácido α -cianohidroxicinámico (α -CHCA), disuelta en acetonitrilo al 50% en agua, con 0.1% de ácido trifluoroacético. Se colocó gotas de 1 μ l de estas mezclas sobre una placa metálica para ionización MALDI (OptiTOF-384), las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF 4800-Plus (Applied Biosystems), en modo reflector positivo. La calibración externa para los modos MS y MS/MS se realizó mediante la mezcla de estándares CalMix-5 (ABSciex). Los espectros se obtuvieron usando un total de 1625 disparos/espectro y una intensidad de láser de 3000. Hasta un máximo de 10 precursores fueron seleccionados automáticamente para obtener espectros de fragmentación TOF-TOF mediante disociación inducida por colisión, con una intensidad de láser de 3000 y 500 disparos/espectro. Los espectros resultantes fueron analizados mediante el programa ProteinPilot 4.0.8 (ABSciex) frente a la base de datos UniProt/SwissProt (20120518), para obtener las probables secuencias de los péptidos.

Complementariamente, se intentó la fragmentación de los péptidos mediante nESI-MS/MS en forma manual, por infusión directa. La muestra (10 μ L) se cargó en un

capilar metalizado (Proxeon) y se sometió a 1200 voltios, para su análisis en un instrumento QTrap 3200 (Applied Biosystems) equipado con una fuente nano-spray.

5.7 DIGESTIÓN *In vitro*.

Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la capacidad de los péptidos obtenidos, para soportar condiciones similares a las que se tiene en el sistema gástrico, sin perder su capacidad. El modelo de la digestión *in vitro* fue adaptado de Yagoub *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Para esto, la muestra de interés, fue incubada con 10 µg de pepsina/mg de proteína (E.C. 3.4.23.1; ≥ 250 U mg⁻¹ sólido; Sigma, St. Louis, USA), a un pH de aproximadamente 2 por adición de HCl, durante 3 h a 37 °C. Luego se ajustó el pH de la mezcla entre 7.5 - 8.0 empleando NaOH (0.2 N), y se adicionó una solución de buffer fosfato (pH 7.4) que contenía 1 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃ y 13 µg de pancreatina/mg de proteína (Sigma, No. P1750). Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h y finalmente la actividad de interés fue nuevamente determinada mediante los métodos antes descritos.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los ensayos de hidrólisis se hicieron por sextuplicado para determinar la desviación estándar del GH. Los análisis de actividad antioxidante por los métodos ABTS y FRAP, fueron realizados por sextuplicado con el fin de determinar la reproducibilidad de los métodos, y se utilizó un test de rango múltiple de Duncan para determinar diferencias significativas entre las medias. De manera análoga, los análisis de la actividad antioxidante por el método ORAC, actividad IECA y actividad antimicrobiana, fueron realizados por triplicado y se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) para determinar diferencias entre las medias. Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL PLASMA DE BOVINO.

En la tabla 1 se muestra el resultado de los análisis fisicoquímicos realizados al plasma de bovino. En general el contenido en grasa y en minerales (cenizas) es bajo, mientras que posee un alto contenido en proteínas ($8.58 \pm 0.02\%$), lo que posibilitaría el uso de estos residuos como materia prima en diferentes procesos y reafirma la importancia de darle una utilidad para aprovechar su valor nutricional. Estos niveles son similares a valores reportados para plasma bovino, por la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA, 2012).

Tabla 1: Composición fisicoquímica del plasma de bovino.

Determinación	% m/m
Humedad	90.08 ± 0.09
Minerales Totales	0.44 ± 0.04
Grasa Total	0.03 ± 0.006
Proteína total (Nx6,25)	8.58 ± 0.02

Se realizó también un análisis electroforético en gel de agarosa para analizar el contenido proteico del plasma de bovino. Los resultados se muestran en la tabla 2, se puede observar la presencia de globulinas, albumina, y fibrinógeno en menor porcentaje, lo cual está en concordancia con lo reportando en la literatura (Moure *et al.*, 2003), sin embargo presenta un porcentaje de globulinas (66.7%) y de fibrinógeno (4.5%), un poco más elevado de lo que se ha reportado normalmente, así como un menor porcentaje de albumina (33.3%). Estas diferencias en las concentraciones proteicas, pueden ser atribuibles a la variabilidad implícita de la muestra por tratarse de un sustrato biológico.

Tabla 2: Contenido proteico del plasma de bovino evaluado por electroforesis en gel de agarosa

Fracción	%	g/dL
Albumina	33.3	2.33
α 1-Globulinas	5.4	0.38
α 2-Globulinas	11.9	0.83
β -Globulinas	11.8	0.83
γ -Globulinas	37.6	2.63
Fibrinógeno	4.5	0.32

Adicionalmente, se evaluó el contenido total de aminoácidos en el plasma de bovino entero, los resultados se muestran en la tabla 3. En general se encontraron altos niveles de Asp/Asn, Glu/Gln, Leu y Ser, además de niveles medios de Lys, Val, Thr, Gly y Ala. La ausencia del Trp se debe al proceso de hidrólisis acida, el cual degrada este aminoácido (Guadix *et al.*, 2000). Desde el punto de vista nutricional, esta muestra, posee un elevado contenido de aminoácidos esenciales, y se evidencia una composición de aminoácidos de buena calidad, dada la relación de aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales. El Comité Mixto FAO/OMS/UNU, según criterio de las necesidades humanas de aminoácidos, propone un perfil de requerimientos de aminoácidos esenciales a diferentes edades (FAO/WHO/UNU, 1985), si se comparan estos valores con los aminoácidos esenciales presentes en el plasma de bovino, a pesar de la ausencia de la Met y el Trp, los demás aminoácidos están presentes en cantidades que sobrepasan los requerimientos de preescolares en adelante. Estos resultados indican que la proteína de plasma de bovino tiene un gran potencial para reducir el déficit de aminoácidos que son frecuentes en las dietas de muchos países en desarrollo. En efecto, Tybor *et al.* (1975) afirman, que las proteínas de la sangre animal se encuentran próximas a las proteínas consideradas como bien equilibradas, donde los aminoácidos esenciales se encuentran en proporciones adecuadas.

Tabla 3: Composición de aminoácidos totales en el plasma de bovino.

Nombre	mg/g proteína	%
<i>AA esenciales</i>		41.3
Isoleucina	30.6 ± 0.3	2.9
Leucina	101.1 ± 1.5	9.6
Lisina	75.7 ± 4.8	7.2
Fenilalanina	54.0 ± 0.6	5.1
Valina	68.4 ± 1.1	6.5
Histidina	30.8 ± 0.7	2.9
Treonina	73.0 ± 1.2	7.0
<i>AA no esenciales</i>		58.7
Aspartato ^a	103.6 ± 1.2	9.9
Glutamato ^b	171.2 ± 2.3	16.3
serina	78.6 ± 1.2	7.5
Glicina	37.0 ± 0.6	3.5
Arginina	65.9 ± 1.1	6.3
Alanina	53.5 ± 0.8	5.1
Tirosina	52.6 ± 0.7	5.0
Cistina	5.5 ± 0.04	0.5
Prolina	47.6 ± 2.0	4.5
<i>Relación AA esenciales/AA no esenciales</i>		0.7

^a Representa la suma de aspartato y asparagina

^b Representa la suma de glutamato y glutamina

6.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL PLASMA DE BOVINO.

En la figura 9, se reporta el GH en función del tiempo, para la hidrólisis de plasma de sangre de bovino, con Alcalasa 2,4 L, durante 120 min. La curva de hidrólisis obtenida es típica en la hidrólisis enzimática de proteína alimentarias (Figuerola *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Tardioli *et al.*, 2005). En esta, se observa un incremento acelerado en el GH de 10.1% en los primeros 15 min, en los siguientes 55 min la velocidad decrece

paulatinamente con un aumento en el GH cercano al 7%, después de este tiempo, la pendiente se vuelve casi nula, de modo que en los restantes 50 min el GH solo aumenta 1.9%. A las 2 h de reacción el GH alcanza un valor de 19.1% con una desviación estándar del 0.23.

La figura 9 muestra como la reacción alcanza una fase de estado estacionario, según Márquez y Vázquez (1999) la disminución en la velocidad de hidrólisis de la reacción responde generalmente a tres factores: (a) Disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas, (b) Posible inhibición de las enzimas causada por el sustrato de hidrólisis; (c) Desnaturalización térmica de la enzima. Siendo el primero de estos, el factor que posiblemente actúa con mayor intensidad en este caso, dado que la concentración de sustrato no se incrementa en el transcurso de la reacción y la temperatura utilizada es la recomendada por el proveedor.

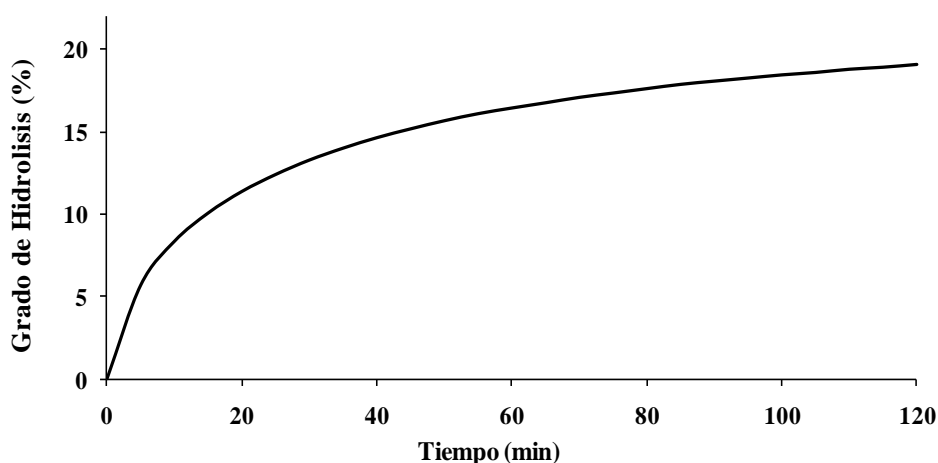


Figura 9: Grado de hidrólisis del plasma de sangre de bovino hidrolizado con Alcalasa 2,4 L.

En la figura 10 se muestran los perfiles electroforéticos de los HPB a diferentes GH. Como se puede observar (líneas 2-6) los compuestos de alto peso molecular (>50 kDa) como albumina, globulina y fibrinógeno desaparecen y aparecen especies de bajo peso molecular (<50 kDa) como es de esperarse, dado que la hidrólisis enzimática implica la ruptura de los enlaces peptídicos, lo cual produce cambios de las características y disminución en el pesos moleculares de las proteínas (Benitez *et al.*, 2008). Se puede notar que a medida que aumenta el grado de hidrólisis, las bandas en pesos moleculares

medios (entre 10 y 50 kDa) van disminuyendo, lo que indica la formación de péptidos más pequeños (<10 kDa) que no alcanzan a mostrarse en el gel. Se puede observar una banda pronunciada por encima de los 50 kDa en todos los hidrolizados, dicha banda puede corresponder a una proteína de difícil acceso para la enzima. Patrones electroforéticos similares de HPB han sido obtenidos anteriormente (Salgado *et al.*, 2011).

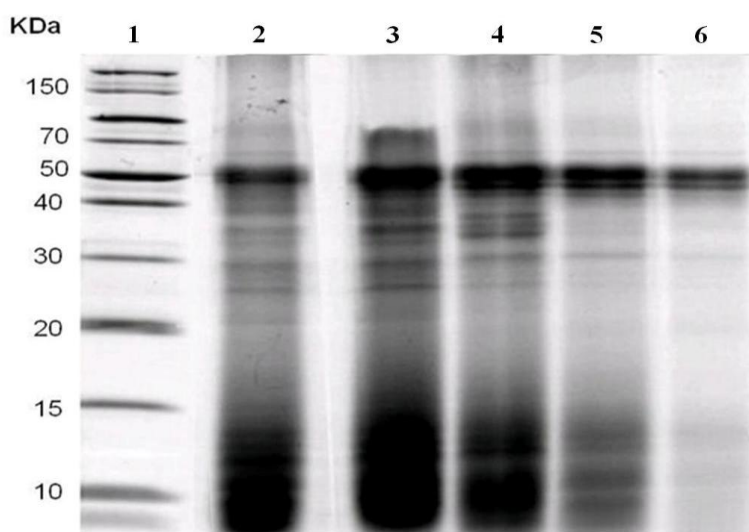


Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE. Marcador peso molecular (línea 1), HPB 3.8, 6.7, 10.8, 15.3 y 19,1% GH (línea 2, 3, 4, 5, y 6).

6.3 EFECTO DEL GRADO DE HIDRÓLISIS SOBRE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.

A continuación se describen los resultados obtenidos al determinar diferentes tipos de actividades biológicas para el plasma de bovino y sus hidrolizados a diferentes GH. La actividad inhibidora de la ECA, se expresó como el porcentaje en el que se inhibe la actividad de la enzima, y la actividad antioxidante, se expresa como $\mu\text{molTE/g}$, que representa las μmol de Trolox equivalentes por g de proteína.

6.3.1 Actividad antioxidante.

En la literatura se encuentra ampliamente referenciada la necesidad de utilizar más de una técnica cuando se evalúa la capacidad antioxidante de un compuesto, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes, dependiendo del sistema de reacción o de la fuente radicalaria (Zulueta *et al.*, 2009). En el presente trabajo de investigación, se evaluó la capacidad antioxidante mediante tres métodos. Dos técnicas de TE, FRAP y ABTS, los cuales miden la capacidad de reducción del ion férrico, y la capacidad de capturar RL preformados, respectivamente, y una técnica de TAH, ORAC, que evalúa la capacidad de la muestra para competir cinéticamente por radicales peroxilo.

Los resultados detallados de las pruebas ABTS y FRAP, en relación con el GH se pueden ver en el anexo I y en la tabla 4 se presentan los resultados agrupados. En dicha tabla se puede observar que para estas dos técnicas, la actividad antioxidante se incrementa en función del grado de hidrólisis, obteniéndose la mayor actividad a un GH de 19,1%, después de lo cual no se observa un aumento significativo en la actividad antioxidante. Para el ensayo ORAC, los resultados muestran una tendencia similar, donde al igual que para los análisis de TE, la capacidad de captación de radicales peroxilo incrementa con el aumento del GH, sin embargo, la actividad disminuye significativamente después de 19.1% de GH, el cual presenta el mayor valor de actividad antioxidante. La disminución en la actividad antioxidante por hidrólisis excesivas, puede ser atribuida a la disminución de péptidos activos y aumento de aminoácidos libres, los cuales no son efectivos como antioxidantes por si solos (Elias *et al.*, 2008). Todos los resultados de la capacidad antioxidante, están expresados en equivalentes Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E. Sin embargo, se debe resaltar, que aunque distintos métodos expresen sus resultados en equivalentes Trolox, los valores no son comparables entre sí, dado que estos métodos están basados en diferentes reacciones de los antioxidantes, por tanto las comparaciones entre resultados de capacidad antioxidante sólo se pueden hacer para un mismo método (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Tabla 4: Capacidad antioxidante (ABTS, FRAP y ORAC) de los HPB en función del GH.

GH	Actividad antioxidante ($\mu\text{molTE/g}$)		
	ABTS	FRAP	ORAC
0	174.0 \pm 6.7 ^a	18.5 \pm 2.5 ^a	141.0 \pm 16.3 ^a
3.8	783.4 \pm 7.6 ^b	68.3 \pm 3.2 ^b	672.1 \pm 30.0 ^b
6.7	887.2 \pm 9.6 ^c	80.1 \pm 1.9 ^c	680.1 \pm 24.0 ^b
10.8	1032.6 \pm 9.0 ^d	91.6 \pm 4.2 ^d	708.9 \pm 20.9 ^b
15.3	1126.7 \pm 20.2 ^e	96.8 \pm 5.5 ^d	775.3 \pm 11.1 ^c
19.1	1389.0 \pm 19.5 ^f	122.6 \pm 4.4 ^e	869.8 \pm 37.8 ^d
25.0	1413.3 \pm 20.3 ^f	125.7 \pm 4.0 ^e	801.0 \pm 62.6 ^c

^{a-f} Medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

En estos análisis se puede observar una mejor correlación para los métodos ABTS y ORAC, que para los métodos FRAP y ORAC. De manera análoga Ou *et al.* (2002) reportaron baja correlación en la actividad antioxidante evaluada con las técnicas FRAP y ORAC, mientras que Awika *et al.* (2003) observaron una alta correlación entre ABTS, DPPH, y ORAC. Es además evidente que la capacidad para reducir el ión ferrico Fe^{3+} de los hidrolizados, es menor a la capacidad para captar radicales ABTS^{*} y radicales peroxilo. Estos resultados pueden deberse, a que las condiciones de trabajo del método FRAP (pH de 3.6) no son favorables para los hidrolizados proteicos y puede verse disminuida su actividad, cuando se compara con los métodos ABTS y ORAC que trabajan a pH neutro.

A pesar de que en términos de costo y tiempo el análisis ORAC presenta desventajas con respecto a los otros dos métodos (Awika *et al.*, 2003), es importante su evaluación, no solo porque se trata de un análisis basado en un mecanismo de reacción diferente (TAH), sino porque utiliza una fuente de radicales relevante biológicamente (Prior *et al.*, 2003).

6.3.2 Actividad inhibidora de la ECA (IECA).

Las proteínas y péptidos que tienen actividad IECA, inhiben una proteasa, que es clave en la regulación de la presión arterial, en tanto que su actividad está directamente relacionada con la HTA. Los resultados detallados del efecto del GH sobre la actividad IECA se pueden ver en la sección 3.1 del anexo II. En la figura 11 se muestra gráficamente la relación entre el GH y la actividad IECA, se puede observar que el plasma de bovino sin hidrolizar, presenta una actividad IECA mínima. Después de la hidrólisis con Alcalasa 2,4 L, la actividad IECA aumenta rápidamente con el incremento del GH, alcanzando la mayor actividad a GHs entre 6.7% y 10.8%, después de lo cual, el porcentaje de IECA comienza a disminuir paulatinamente. De manera análoga, Hernández (2002), evidenció que después de cierto GH, la actividad IECA disminuye, lo que podría deberse a que una hidrólisis prolongada conlleva a la degradación de los péptidos activos ya formados, liberándose secuencias inactivas.

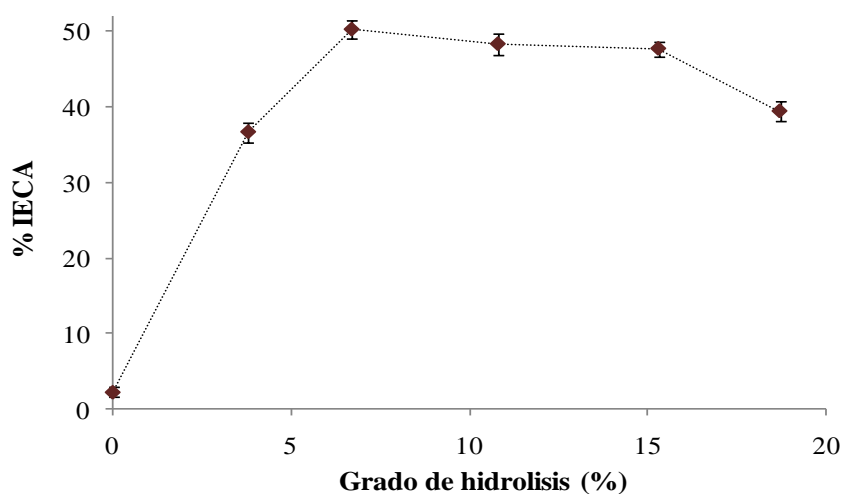


Figura 11: Relación de la actividad inhibidora de la ECA con el GH.

Con estos resultados, se demuestra que bajos GH son suficientes para la liberación de péptidos bioactivos, dado que el HPB con GH 6.7%, obtenido bajo las condiciones de éste estudio, presenta un IC_{50} de 0.4 mg/mL, mayor a otros hidrolizados de plasma bovino antes descritos (Wanasundara *et al.*, 2002; Hyun y Shin, 2000), y el cual, comparado con los valores reportados previamente por He *et al.*, (2006) para

hidrolizados de proteínas alimentarias (IC₅₀ entre 0.18 y 246.7 mg/mL), exhibe una actividad promisorio.

6.3.3 Actividad antimicrobiana.

A pesar de que el plasma de bovino cuenta con una alta proporción de inmunoglobulinas, glucoproteínas responsables de la respuesta inmune humoral, cuya función principal es unirse de forma específica a un determinado antígeno y facilitar su eliminación (Álvarez *et al.*, 2005), y las cuales han sido usadas ampliamente en la medicina por su capacidad para eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos (Horo y Safdar, 2009; Xu *et al.*, 2006). Después de la determinación de la capacidad antimicrobiana *in vitro*, evaluada al plasma completo y los HPB contra 6 cepas bacteriana, tres Gram-negativas (*E. coli*, *S. sonnei* y *S. typhimurium*) y tres Gram-positivas (*L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus*), no se evidenció ningún tipo de actividad para ninguna de las muestras.

En otras investigaciones se ha reportado la potente actividad antimicrobiana *in vitro* de la inmunoglobulina G, aisladas a partir de calostro de bovino contra bacterias patógenas (Xu *et al.*, 2006), sin embargo los resultados acá obtenidos, dan muestra de que la hidrólisis enzimática del plasma de bovino, no ayuda a potenciar la actividad antimicrobiana de las inmunoglobulinas allí presentes, probablemente porque la alteración de su estructura y modificaciones al sitio de unión con el antígeno, impide su interacción con los microorganismos de interés.

6.4 AISLAMIENTO DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Los hidrolizados que exhibieron mayor actividad biológica, fueron sometidos a diferentes procesos de separación, con el fin de aislar los péptidos responsables de dicha actividad, para luego por medio de un análisis de espectrometría de masas identificar las secuencias de aminoácidos en dichos péptidos.

6.4.1 Péptidos antioxidantes.

El HPB con GH de 19.1%, el cual mostró la mayor actividad antioxidante, fue sometido a diferentes pasos de separación para aislar los péptidos responsables de la actividad, los resultados detallados pueden verse en el anexo I.

Primero se realizó un proceso de ultrafiltración, del cual se obtuvieron tres fracciones con diferentes pesos moleculares (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa). En la tabla 5 se puede ver como la actividad antioxidante se incrementa con la disminución del peso molecular. Así, los péptidos menores de 3 kDa exhiben una actividad significativamente mayor que las demás fracciones y que el hidrolizado completo. Lo que concuerda con reportes de literatura en los que péptidos antioxidantes derivados de fuentes alimentarias tienen un peso molecular entre 500 y 1800 Da (Nalinanon *et al.*, 2011).

La fracción con peso molecular menor de 3 kDa fue separada por medio de cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE. Los perfiles de elución pueden verse en la Figura 3 del anexo I. Los picos obtenidos tras esta separación fueron nuevamente evaluados mediante el método ABTS. Los resultados se muestran en la tabla 5, donde se puede ver que la mayor actividad la presentó el pico I (eluido a 0% de B), Sin embargo, se debe resaltar que la actividad antioxidante presentada por dicho pico (1677.6 ± 12.4), no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), con la actividad presentada por la fracción menor de 3 kDa completa (1692.3 ± 15.0).

El pico I fue posteriormente separado por medio de RP-HPLC, y se evaluó la actividad antioxidante de las tres fracciones más representativas (Ia, Ib y Ic) (fig. 4, anexo I). La fracción Ia mostró una potente actividad antioxidante, incrementándose 25 veces respecto a la que presentaba el plasma de bovino sin hidrolizar.

Tabla 5: Capacidad captadora de radicales ABTS[•] de las fracciones peptídicas obtenidas tras los pasos de purificación realizados al HPB con GH 19.1%.

Pasos purificación	μmolTE/g
ULTRAFILTRACIÓN	
> 10 kDa	905.0 ± 17.9 ^a
3-10 kDa	1379.1 ± 21.8 ^b
< 3 kDa	1692.3 ± 15.0 ^c
DEAE	
I	1677.6 ± 12.4 ^c
II	1510.2 ± 22.0 ^d
III	1351.8 ± 23.1 ^b
RP-HPLC	
Ia	4457.9 ± 72.5 ^e
Ib	1096.1 ± 19.1 ^f
Ic	922.7 ± 37.2 ^a

^{a-f} Medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

Con el objetivo de comparar la capacidad antioxidante presentada por el pico Ia con antioxidantes de uso comercial, se evaluó la capacidad captadora de radicales ABTS[•] del pico Ia, del L-acido ascórbico y del Trolox. Los resultados mostraron que la actividad antioxidante del pico está en el mismo orden de magnitud que la actividad presentada por los antioxidantes comerciales, obteniéndose un IC₅₀ de 32 ± 2 , 29 ± 0.1 y 40 ± 1 μg/mL para el pico Ia, el L-acido ascórbico y el Trolox, respectivamente (ver detalles en el anexo I). El IC₅₀ se define como la cantidad de muestra necesaria para disminuir la absorbancia del radical ABTS en un 50%. Estos resultados ponen de manifiesto la potencial aplicación de este péptido como un antioxidante natural, que puede incluso sustituir antioxidantes sintéticos, con la ventaja de que puede presentar propiedades nutricionales y funcionales, además de su actividad antioxidante (Schaafsma, 2009), además por ser obtenido a partir de proteínas alimentarias de origen natural, su aplicación en alimentos, posee menos restricciones que los antioxidantes

sintéticos, cuya utilización es regulada por el posible riesgo para la salud (Sarmadi y Ismail, 2010).

El material presente en el pico Ia se analizó mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF en modo reflector positivo, en el ámbito de m/z entre 700 y 4000. En la figura 12, se puede ver la presencia de varios iones monocargados con masas inferiores a los 1700 Da, donde sobresale un precursor intenso de 879.6 Da y otros también representativos de 868.5, y 1058.2 Da (masas monoisotópicas). Se realizó una fragmentación de estos tres precursores mediante MALDI-TOF-TOF, y los espectros resultantes se sometieron a una búsqueda frente a la base de datos UniProt/SwissProt (201202). Los resultados sugieren la secuencia Q(K)Q(K)PVRDQ(K), con 95% de confianza, para el precursor 879.6 Da, pero esta secuencia no tiene una correspondencia del 100% con ninguna proteína del género Bos en la base de datos MS-BLAST. Los otros dos precursores no generaron espectros de fragmentación claros en el análisis por MALDI-TOF-TOF.

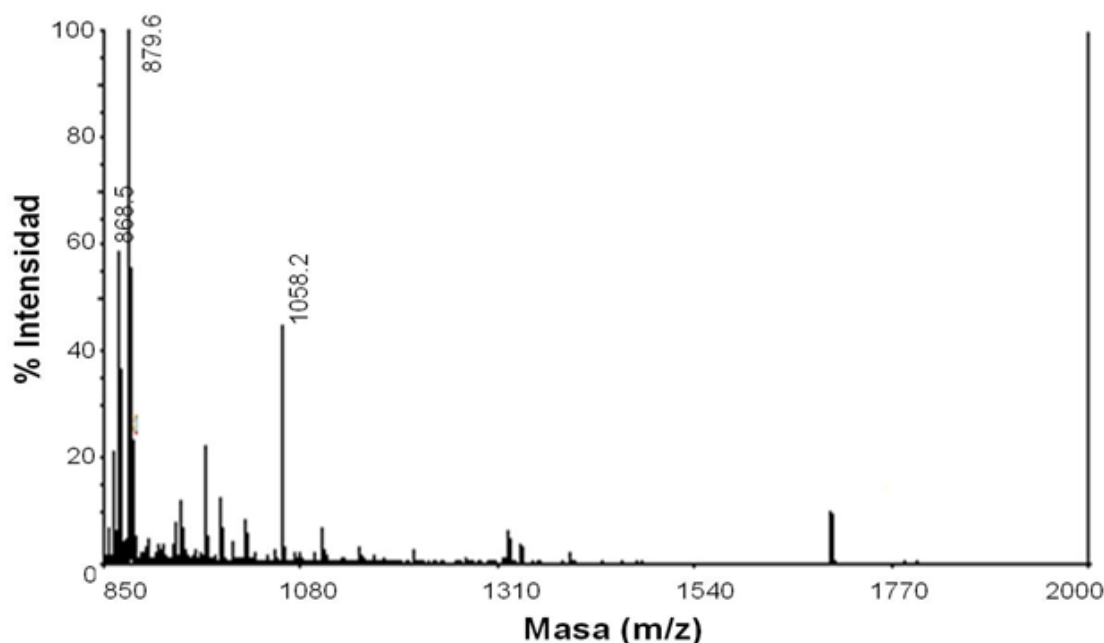


Figura 12: Espectro análisis MALDI-TOF del pico Ia aislado por RP-HPLC.

Complementariamente, se realizó la fragmentación de los péptidos mediante nESI-MS/MS en forma manual. Un precursor de 405.2^{+2} ($M+H^+ = 809.4$) generó un espectro

de fragmentación completo correspondiente a la secuencia del octapéptido GAHQPSGR (Fig. 13), compatible con la proteína hypothetical BOS_23161.

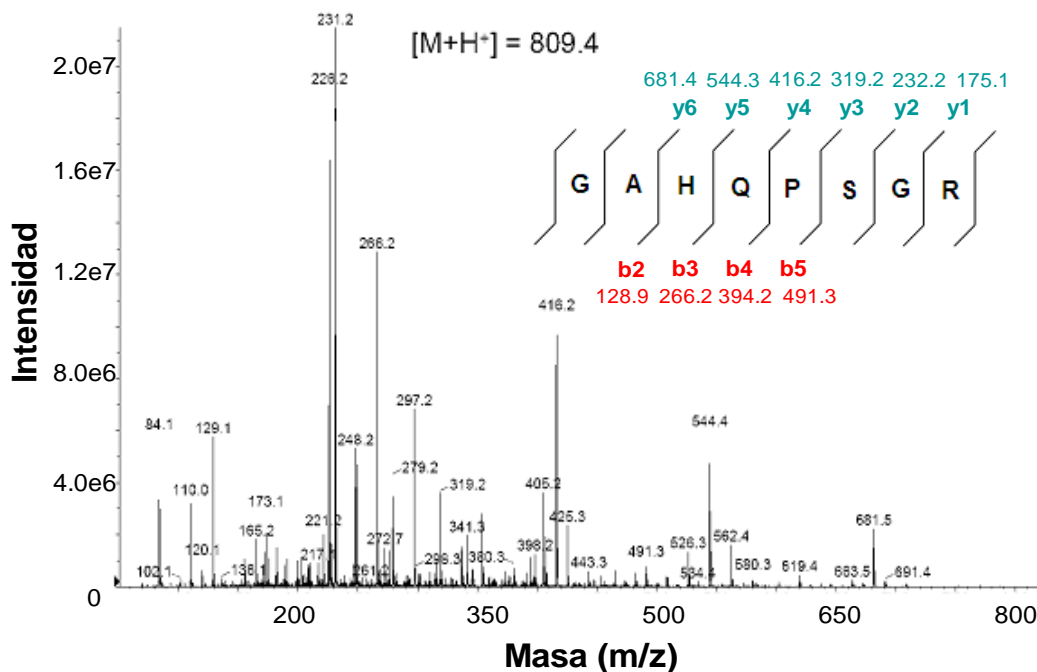


Figura 13: Espectro análisis ESI/MS-MS del ion m/z 405.2⁺².

6.4.2 Péptidos inhibidores de la ECA.

Para aislar los péptidos responsables de la actividad IECA, el HPB con GH de 6.7% fue sometido a diferentes pasos de separación, los resultados detallados pueden verse en la sección 3.2 del anexo II.

El proceso de ultrafiltración del hidrolizado con GH 6.7%, produjo tres fracciones con diferente peso molecular (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa). Los resultados se pueden ver en la tabla 6, donde se observa como al igual que la actividad antioxidante antes descrita, la actividad IECA también se incrementa con la disminución del peso molecular. Así, los péptidos menores de 3 kDa exhiben una actividad significativamente mayor que las demás fracciones. Estos resultados revelan que los péptidos de pequeño tamaño son los principales responsables de la actividad biológica presentada en los HPB, lo cual ha sido reportado previamente en la literatura, donde se ha determinado,

que en general los péptidos bioactivos son pequeñas secuencias de aminoácidos con una masa molecular de menos de 6 kDa (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

La fracción de menos de 3 kDa fue separada por medio de cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE. Los perfiles de elución pueden verse en la Figura 3 del anexo II. Los picos obtenidos tras esta separación fueron nuevamente evaluados y los resultados muestran, que el pico I posee el mayor % IECA (53.9 ± 1.7), seguido por el pico II el cual también posee una buena actividad IECA ($45.6 \pm 1.7\%$). Los picos III y IV, eluidos con mayores porcentajes de NaCl, mostraron una mínima actividad (tabla 6), posiblemente debido a la presencia de aminoácidos o péptidos ácidos, para los cuales se ha reportado poca afinidad con la ECA (Li *et al.*, 2004). Como ocurrió para los péptidos antioxidantes, ninguno de los picos obtenidos tras la cromatografía de intercambio aniónico presenta una actividad IECA mayor a la fracción menor de 3 kDa completa, esto podría entenderse si se considera que los péptidos responsables de la actividad parecen estar divididos en los picos I y II, los cuales presentan actividades IECA elevadas.

El pico I fue posteriormente separado por medio de RP-HPLC, y se evaluó la actividad IECA de las tres fracciones más representativas. La fracción Ic mostró el mayor actividad IECA y fue nuevamente purificada mediante RP-HPLC bajo las mismas condiciones con un gradiente diferente para obtener un pico más puro (ver perfiles de elución en la Fig. 4 y 5, anexo II). Este pico, mostró una alta actividad de IECA, incrementándose 30 veces respecto al plasma de bovino sin hidrolizar (ver tabla 6), y presentó un IC_{50} de 0.18 mg/mL.

El pico Ic que presentó la mayor actividad IECA, fue analizado mediante MALDI-TOF-TOF (ver detalles en la sección 3.3 del anexo II). En dicho análisis, se evidencio la presencia de iones con masas inferiores a los 1700 Da, sobresaliendo tres precursores intensos de 960.6, 1046.6 y 1363.8 Da (masas monoisotópicas). La fragmentación de estos tres iones sugiere las secuencias AGATGVTISGAG (S1) y YSRRHPEYAVS (S2) para el primero y tercero, respectivamente, mientras el segundo precursor no resultó en un espectro de fragmentación claro. La secuencia S1 se identifica con la proteína *host*

cell factor, mientras que la secuencia S2 identifica con la albúmina sérica bovina. Otros péptidos menores en la muestra presentaron las secuencias Q(K)AW y L(I)L(I)VR.

Tabla 6: Capacidad IECA de las fracciones peptídicas obtenidas tras los pasos de purificación realizados al HPB con GH 6.7%.

Pasos purificación	% IECA
ULTRAFILTRACIÓN	
> 10 kDa	39.3 ± 1.5 ^a
3-10 kDa	51.4 ± 1.3 ^b
< 3 kDa	65.8 ± 1.9 ^c
DEAE	
I	53.9 ± 1.7 ^b
II	45.6 ± 1.7 ^d
III	2.1 ± 0.7 ^e
IV	21.3 ± 1.3 ^f
RP-HPLC	
Ia	17.2 ± 1.2 ^g
Ib	26.1 ± 0.8 ^h
Ic	59.8 ± 1.2 ⁱ
RP-HPLC (Pico Ic)	
Ic	69.9 ± 1.1 ^j

^{a-j} Medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

Todos los péptidos identificados en el pico Ic, poseen secuencias peptídicas cortas, lo cual es importante si se trata de un mecanismo de inhibición competitivo, dado que el sitio activo de la ECA no puede acomodar moléculas peptídicas grandes (Natesh *et al.*, 2003). Los péptidos identificados en este estudio, no han sido previamente reportados, ni en la base de datos BIOPEP (responsable de coleccionar toda la información acerca de péptidos bioactivos de la literatura académica), ni en investigaciones previas donde se ha aislado diferentes péptidos IECA de proteínas de plasma sanguíneo (Lee y Song,

2003; Park y Song 1997, Wanasundar *et al.*, 2002). Se necesitan posteriores análisis para identificar la actividad IECA de cada uno de los péptidos identificados en el pico Ic.

6.5 ESTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS BAJO CONDICIONES DE DIGESTIÓN IN VITRO.

El HPB con 19.1% de GH, fue sometido a una simulación de la digestión gástrica *in vitro*, con el fin de evaluar la resistencia de los péptidos allí presentes a estas condiciones. Posteriormente, se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y FRAP del hidrolizado antes y después de la digestión (ver tabla 2 del anexo I). En los resultados se pudo observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los HPB con y sin digestión *in vitro*. Estos resultados, señalan el posible desempeño de los HPB en un sistema biológico y su potencial resistencia a la digestión fisiológica después de ser ingeridos (Vermeirssen *et al.*, 2004). Esta resistencia a las condiciones de digestión *in vitro*, podrían ser atribuidas a limitaciones en los enlaces péptidos disponibles para la pepsina y la pancreatina, dado que se trata una muestra previamente hidrolizada con Alcalasa 2,4 L, con un GH alto, y se ha comprobado que la alcalasa produce péptidos más cortos, en comparación con otras proteasas, y por ende más resistentes a las enzimas digestivas (Sarmadi y Ismail, 2010).

De la misma manera, se realizó el proceso de digestión *in vitro* para el HPB con GH de 6.7%, y para el pico Ic obtenido a partir de este hidrolizado (ver detalles sección 3.4 del anexo II). En los resultados, se pudo observar una disminución en la actividad IECA del 18.7% para el HPB después de la digestión *in vitro*. La actividad IECA del pico Ic, por su parte, no mostró diferencias significativas antes y después de la digestión *in vitro*, poniéndose de manifiesto, la estabilidad de esta fracción peptídica frente a las enzimas digestivas, lo cual es muy razonable dado que se trata de péptidos muy pequeños (<1700 Da) y se ha reportado que péptidos de este tipo, pueden atravesar la barrera intestinal intactos y exhibir sus funciones biológicas (Vermeirssen *et al.*, 2004).

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de investigación entregan las siguientes conclusiones:

- Los hidrolizados de plasma de sangre de bovino con GH 19%, obtenidos con Alcalasa 2,4 L, presentan una potente actividad antioxidante, llegando a ser 8 veces la del plasma sin hidrolizar.
- La actividad antioxidante es directamente proporcional al GH, hasta alcanzar valores de GH cercanos al 19.1%, después del cual la actividad antioxidante se mantiene estable o disminuye.
- La hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4 L, aumenta la capacidad de inhibición de la ECA del plasma de bovino, lográndose obtener hidrolizados con una actividad 20 veces mayor que el plasma sin hidrolizar.
- La actividad IECA mostró ser dependiente del GH, obteniéndose la mayor actividad para GHs entre 6.7% y 10.8%, después del cual la actividad comienza a disminuir.
- Las fracciones peptídicas de los HPB con mayor actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, tienen un peso molecular inferior a 3 kDa.
- Mediante los métodos de ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, y RP-HPLC, aplicados al HPB con 19.1% de GH, se logró aislar una fracción peptídica (pico Ia), con potente capacidad captadora de radicales ABTS[•].
- Mediante espectrometría de masas, se pudo comprobar que el pico Ia, está compuesto por péptidos menores de 1700 Da, y se logró identificar la presencia del octapéptido GAHQPSGR.

- Se logró obtener una fracción peptídica con potente capacidad IECA a partir del HPB con GH de 6.7% (pico Ic), la cual posee un IC_{50} de 0.18 mg/mL.
- Mediante análisis por MALDI-TOF-TOF, se logró identificar en el pico Ic, la presencia de péptidos con secuencias AGATGVTISGAG, YSRRHPEYAVS, Q(K)AW y L(I)L(I)VR.
- La capacidad captadora de radicales ABTS^{*} presentada por el HPB con GH de 19.1%, no se vio afectada por el proceso de digestión *in vitro*.
- El pico Ic aislado del HPB con GH de 6.7%, presentó estabilidad ante las condiciones de digestión *in vitro*, dado que no disminuyó su capacidad inhibidora de la ECA.

8. PERSPECTIVAS

- Futuras investigaciones deben estar orientadas a determinar la actividad antioxidante y antihipertensiva en los hidrolizados de plasma, mediante métodos *in vivo*, que permitan determinar su biodisponibilidad, reactividad, y estabilidad ante condiciones fisiológicas.
- Evaluar la estabilidad de los hidrolizados o las fracciones peptídicas con actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, a las variaciones de pH y temperatura.
- Sintetizar los péptidos encontrados en la fracción peptídica con mayor actividad IECA para evaluar la actividad de cada uno por aparte, e identificar el tipo de inhibición que presentan.
- Sintetizar el péptido encontrado en la fracción peptídica con mayor actividad antioxidante y evaluar nuevamente su actividad.
- Diseñar un reactor en continuo con un sistema de membranas para el proceso de hidrólisis, que permita obtener las fracciones con el peso molecular de interés.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abate G., Mshana R.N. & Miorner H. (1998). Evaluation of colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc lung Dis*, 2, 1011-1016.

Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Londres: Elsevier.

Ahn C.B., Jeon Y.J., Kim Y.T. & Je J.Y. (2012). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochem. In press*.

Allemann I.B. & Baumann L. (2008). Antioxidants used in skin care formulations. *Skin Therapy Letter*, 13, 5-9.

Álvarez A., Muñiz D., Riera F., Álvarez R., Menéndez C. (2005). Estabilidad de proteínas lácteas. *inmunoglobulinas. Alimentación, Equipos y Tecnología*, 199, 68-76.

Association of Official Agricultural Chemists AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of the AOAC International (18th edition). Maryland USA: Horowitz W. & Latimer G.W. Ed. Association of Analytical Chemists.

Awika J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L. & Cisneros-Zevallos, L., (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.

Badui S. (2006). Química de los alimentos (4ª edición). México: Person ediciones.

Barbosa K.B., Bressan J., Zulet M.A. & Martinez J.A. (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An Sist Sanit Navar*, 31, 259-280.

Benítez R., Ibarz A. & Pagan J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications, *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42, 227-36.

Berg J.M, Stryer L. & Tymoczko J.L. (2008). Bioquímica (6ª edición). Barcelona: Reverté.

Burdock G.A., Carabin I.G. & Griffiths J.C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221, 17-27.

Carey, R.M. (2007). Angiotensin Receptors and Aging. *Hypertension*, 50, 33-34.

Chang C.Y., Wu K.C. & Chiang S.H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543.

Chaux G., Rojas G. & Bolaños L. (2009). Producción más limpia y viabilidad de tratamiento biológico para efluentes de mataderos en pequeñas localidades caso: municipio del tambo (colombia). *Facultad de ciencias agropecuarias*, 7 (1), 102-114.

Contreras L., Fica A., Figueroa O., Enríquez N., Urrutia P. & Herrera P. (2002). Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y su asociación con factores clínicos y epidemiológicos. *Rev Méd Chile*, 130, 26-34.

Criado C. & Moya M. (2009). Vitaminas y antioxidants. Madrid: Saned.

Csordas A. & Michl H. (1970). Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species. *Monatsh Chem*, 101, 182-189.

Cushman D.W. & Cheung, H.S. (1971). Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, 20, 1637-1648.

Di Bernardini R., Harnedy P., Bolton D., Kerry J., O'Neill E., Mullen A.M. & Hayes M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124, 1296-1307.

Doucet D., Otter D.E., Gauthier S.F. & Foegeding E.A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J. Agric. Food chem.*, 51, 6300-6308.

Domínguez, M.A.J. (2009). Aislamiento de biopéptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina-I a partir de hidrolizados de *P. lunatus*. (Tesis inédita de Doctorado). Instituto Politécnico Nacional, México.

Elias R.J., Kellerby S.S. & Decker E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 48, 430-441.

Erdmann K., Cheung B. & Schroder H. (2008). The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem*, 19, 643-654.

Escobar A. (2002). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. En http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_sucep.pdf

Espinal C.F., Martínez H.J. & Acevedo X. (2009). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrociudades Colombia. Recuperado en: <http://www.agrociudades.gov.co>

Federación Nacional de Ganaderos de Colombia, FEDEGAN. (2012). Estadísticas producción. Recuperado en: http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1760323&_dad=portal&_schema=PORTAL

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

Figueroa O.A., Zapata J.E. & Gutiérrez G.A. (2012). Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista EIA*, 17, 71-84.

Food and Agriculture Organization, World Health Organization, United Nations University, FAO/WHO/UNU Expert Consultation. (1985). Energy and proteins requirements. *Geneva Report*, 724, 10-14.

Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, FEDNA. (2012). Plasma animal. Recuperado en: http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/plasma-animal-78

- Gomez J.A., Ramos M. & Recio I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int Dairy J* 2004, 14(12),1075-1080.
- Guadix A., Guadix E., Páez M., González P. & Camacho F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- Guntelberg A.V. & Ottesen M. (1952). Preparation of crystals containing the plakalbumin-forming enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature*, 170, 802.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312-322.
- Hartmann R. & Meisel H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 163-69.
- He H.L., Chen X.L., Sun C.Y., Zhang Y.Z. & Gao P.J. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresour Technol*, 97, 385-390.
- Hernández, B.L. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas Mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. (Tesis inédita de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Hernández B., Contreras M. & Recio I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 23-35.
- Hong F., Ming L., Yi S., Zhanxia L., Yongquan W. & Chi L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs. *Peptides*, 29(6), 1062-1071.
- Horo J. & Safdar N. (2009). The role of immunoglobulin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(6), 663-667.
- Huang D., Ou B., & Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hyun C.K. & Shin H. K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36, 65-71.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. (1994). Manual de métodos analíticos para el control de calidad de la industria alimentaria. Santafé de Bogotá: GTC 1.
- Isaza J.M., Londoño L.M., Restrepo D.A., Cortes M., & Suárez H. (2010). Producción y propiedades funcionales de plasma bovino hidratado en embutido tipo salchichón. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 23,199-206.
- Jao C.L., Huang S.L. & Hsu K.C. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects. *BioMedicine*; in press.

- Je J.Y., Park P.J., Kim E.K. & Ahn C.B. (2009). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in Liguamen. *Food Chemistry*, 113, 932–935.
- Ko S.C., Lee J.K., Byun H.G., Lee S.C. & Jeon Y.J. (2012). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochemistry*, 47, 34-40.
- Kodera T. & Nio N. (2006). Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. *J Food Sci*, 71, C164-C173.
- Konieczny P., Uchman W., Krysztofiak K. & Przyborski J. (2005). Some selected properties of protein preparations made by enzymatic treatment of animal blood red cell fraction. *Technol. Aliment.*, 42(2), 111-118.
- Kunin CM. (1993). Resistance to antimicrobial drugs a worldwide calamity. *Ann Int Med*, 118, 557-61.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, S.H. & Song, K.B. (2003). Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Irradiated Bovine Blood Plasma Protein Hydrolysates. *journal of food science.*, 68(8), 2469-2472.
- Lee S.H. & Song K.B. (2009). Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry*, 44, 378-381.
- Li G.H., Le G.W., Shi Y.H. & Shrestha S. (2004). Angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res*, 24, 469-486.
- Liu Q., Kong B., Jiang L., Cui X. & Liu J. (2009). Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 956-962.
- Liu Q., Kong B., Xiong Y.L. & Xia X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118, 403-410.
- Madrid A., Madrid J.M. & Madrid R. (1998). Tecnología de los subproductos cárnicos. Madrid: A.M.V. ediciones.
- Mancia G., Backer G., Dominiczak A., Cifkova R., Fagard R., Germano G., *et al.* (Task Force of the European Society of Hypertension and of the European Society of Cardiology). (2007). Guidelines for the management of arteria hypertension. *Journal of Hypertension*, 25(6), 1105-1187.
- Manso M.A., Miguel M., Even J., Hernández R., Aleixandre A., & López-Fandino R. (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 109, 361–367.
- Marcuse R. (1960). Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*, 186, 886-887.

- Marín R., Álvarez R. & Fernández F. (2008). Bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona en hipertensión arterial, diabetes y nefropatía. *Rev Esp Cardiol Supl*, 8, 30E-38E.
- Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424(1-2):83-95.
- Márquez, M. & Vázquez, M. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35(1), 111-117.
- Marshall K (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev*, 9, 136-156.
- Martinez R. (2005). Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. (Trabajo de grado química farmacéutica). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Martinez S., Valek L., Resetic J. & Ferenc D. (2006). Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity - Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 588, 68-73.
- Mora J. (2007). Implementación y desarrollo de la técnica de potencia microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox S.A. (Trabajo de Grado Ingeniería en Biotecnología). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.
- Moure F., Rendueles M. & Díaz M. (2003). Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. *Meat Science*, 64, 391-398.
- Mulero J., Zafrilla P., Martínez-Cachá A., Leal M. & Abellán J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clin Invest Arterioscl*, 23(5), 219-227.
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. & Shahidi F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem*, 124, 1354-1362.
- Natesh R., Schwager S.L., Sturrock E.D. & Acharya K.R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Letters to Nature*, 421, 551-554.
- Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adjé E.Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., *et al.* (2008). Bovine haemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29, 969-77.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. & Prior R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A. & Deemer E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.
- Park E. & Song K.B. (1997). Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from pig blood. *Agric Chem Biotech*, 40, 39-42.
- Park E. & Song K.B. (1998). Partial purification of ACE inhibitory peptide isolated from supernatant of bovine plasma treated by trichloroacetic acid. *J Food Sci Nutr*, 3, 379-81.

- Park K. & Hyun C. (2002). Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 633-638.
- Peña E.A. & Xiong Y.L. (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolyzates in a liposomal system. *J Food Sci*, 67,2952-2956.
- Pihlanto A. (2006). Review Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
- Powers J.P.S. & Hancock R.E.W. (2003). The relationship between peptide structure and bacterial activity. *Peptides*, 24, 1681-1691.
- Prieto C.A. (2007). Diseño y optimización de un reactor de membranas discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas. (Tesis inédita de Doctorado). Universidad de Granada, Granada.
- Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., *et al.* (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3273-3279.
- Pulido R., Bravo L. & Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402
- Qian Z.J., Jung W.K. & Kim S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour Technol*, 99, 1690-1698.
- Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y., Kim S.K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int*, 38, 175-182.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A.S., Yang M. & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ren Y., Wan D.G., Lu X.M., Chen L., Zhang T. & Guo J.L. (2011). Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor peptides derived from porcine hemoglobin. *Scientific Research and Essays*, 6(30), 6262-6269.
- Reudelhuber T., Bernstein K. & Delafontaine P. (2007). Is Angiotensin II a Direct Mediator of Left Ventricular Hypertrophy? Time for Another Look. *Hypertension*, 49(6), 1196-1201.
- Rodríguez E.N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Salgado P.R., Fernández G.B., Drago S.R. & Mauri A.N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1433-1440.

- Salomon S.A., Watts J.L. & Aarestrup F.M.. (1998). Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *Journal Dairy Science*, 81, 570-578.
- Samaranayaka A.G.P. & Li -Chan E.C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3, 229-254.
- Sánchez C.P. (2012). Protocolo, Procedimientos para la determinación de aminoácidos por HPLC. Medellín: Universidad de Antioquia (Datos no publicados).
- Sarmadi B.H. & Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Schaafsma G. (2009). Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1161-1168.
- Schrezenmeir J., Korhonen H., Williams M., Gill H.S. & Shah N.P. (2000). Foreword. *Br J Nutr*, 84 (S1).
- Schwagar S.L.U., Sturrock E.D. & Acharya K.R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin converting enzyme lisinopril complex. *Letters to nature*, 421, 552-554.
- Si D., Wang Y., Zhou Y.H., Guo Y., Wang J., Zhou H., et al. (2009). Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab Dispos*, 37, 629-634.
- Skeggs L.T., Kahn J.R. & Shumway N.P. (1956). The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med*, 103, 295-299.
- Starke-Reed P. (2003). Antioxidantes, nutrición del instituto nacional de estudios sobre el envejecimiento. Maryland, Estados Unidos.
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-69.
- Suetsuna K. (1998). Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J Nutr Biochem*, 9, 415-419.
- Takami H., Akiba T. & Horikoshi K. (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 120-124.
- Tardioli P.W., Sousa R., Giordano R. & Giordano R.L.C. (2005). Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase ® immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 555-564.
- Tybor P., Dill C. & Landmann W. (1975). Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *J of Food Sci*, 40, 155-59.
- Ugartondo, V. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. (Tesis inédita de Doctorado). Universidad de Barcelona, Barcelona.

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

Viljanen K., Kivikari R. & Heinonen M. (2004). Protein–lipid interactions during liposome oxidation with added antocyanin and other phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 52, 1104–1111.

Villarruel R., Huizar R. & Sánchez T. (2006). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. Mexico: Red Investigación en Salud.

Wanasundara P.K.J.P.D., Ross A.R.S., Amarowicz R., Ambrose S.J., Pegg R.B. & Shand P.J. (2002). Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ECA) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem*, 50, 6981–6998.

Whitaker J.R. (1994). Principles of enzymology for the food sciences (2nd Edition). New York: Marcel Dekker.

Wieme R.J. (1965). Agar electrophoresis. Amsterdam: Elsevier.

Xu L.B., Chen L., Gao W. & Du K.H. (2006). Bovine immune colostrum against 17 strains of diarrhea bacteria and in vitro and in vivo effects of its specific IgG. *Vaccine*, 24, 2131–2140.

Yagoub A.A., Mohamed E.B., Ahmed A.H.R. & Tinay A.H. (2004). Study on fururndu, a Traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins. *J. Agric. Food Chem*, 52, 6143–6150.

Zulueta A., Esteve M.J. & Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*, 114, 310–316.

10. ANEXOS

ANEXO I

Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L

Leidy J. Gómez, Omar A. Figueroa y José E. Zapata

Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Calle 67 N° 53-108 Of. 2-103, Medellín- Colombia. (e-mail: joha965@yahoo.es, omfimo22@gmail.com, jedgar_4@yahoo.es)

Información tecnológica, 24 (1): 33-42 (2013)

Resumen

Se ha evaluado la actividad antioxidante de hidrolizados de plasma de bovino (HPB) obtenidos con Alcalasa 2.4 L a diferentes grados de hidrólisis. Los HPB se fraccionaron a través de membranas de ultrafiltración y se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, con una posterior cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa. Los resultados mostraron que los HPB obtenidos bajo las condiciones de hidrólisis planteadas, poseen una fuerte capacidad de captación de radicales ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico y un alto poder de reducción comparado con las proteínas de plasma no hidrolizadas. Se encontró además, que la actividad antioxidante se incrementa en función del grado de hidrólisis, y que dicha actividad se mantiene después de someter los hidrolizados a condiciones de digestión *in-vitro*. Los procesos descritos permiten obtener un péptido con una actividad antioxidante similar a la presentada por algunos antioxidantes comerciales.

Palabras clave: plasma bovino, hidrólisis enzimática, péptidos antioxidantes, Alcalasa

Antioxidant Activity of Bovine Plasma Enzymatic Hydrolysates Obtained by Effect of Alcalase® 2.4 L

Abstract

The antioxidant activity of bovine plasma hydrolysates (BPH) obtained with Alcalasa 2.4 L at different hydrolysis degrees was evaluated. The hydrolysates were fractionated through ultrafiltration membranes and were purified by ion-exchange chromatography, with subsequent reverse-phase high performance liquid chromatography. The results showed that the hydrolysates of bovine plasma obtained under the established hydrolysis conditions, had strong scavenging ability on 2,2'-azino bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid free radicals and a great reduction power compared with proteins of non-hydrolyzed plasma. Additionally, it was found that the antioxidant activity increases as function of the hydrolysis degree, and that this activity remains after *in-vitro* digestion. The processes described allow obtaining a peptid with antioxidant activities similar to that of conventional commercial antioxidants.

Keywords: bovine plasma, antioxidant activity, antioxidant peptides, Alcalase

INTRODUCCIÓN

La oxidación es uno de los problemas más importantes en la conservación de alimentos, por el efecto que tiene sobre la estabilidad de lípidos, proteínas y carbohidratos, debido a la rancidez que produce, y el consecuente acortamiento de la vida útil del producto (Pihlanto, 2006). Por otro lado, los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico, dado que los procesos oxidativos pueden dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades como derrame cerebral, arteriosclerosis, diabetes y cáncer (Bray, 2000).

Una alternativa para reducir la oxidación la constituyen los antioxidantes sintéticos, sin embargo, el uso de estos compuestos sintéticos ha sido altamente cuestionado, debido a los riesgos que representan para la salud (Saiga *et al.*, 2003), por lo que la tendencia actual es utilizar productos naturales como antioxidantes, que potencien esta actividad en el alimento antes y después que éste haya sido ingerido.

Una posible fuente de compuestos naturales con actividad antioxidante, lo constituyen los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas (Chang *et al.*, 2007). El estudio de estos péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado buena actividad en numerosos hidrolizados de diferentes fuentes alimentarias (Bernardini *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2009; Nalinanon *et al.*, 2011; Pihlanto, 2006; Xie *et al.*, 2008).

La actividad antioxidante de péptidos bioactivos puede ser atribuida a su capacidad para la eliminación de radicales, la inhibición de la peroxidación lipídica y a las propiedades de quelación de iones metálicos (Sarmadi y Ismail, 2010). Aunque se ha asociado la actividad antioxidante a la presencia de varios aminoácidos, se sabe que la presencia de estos no es suficiente para exhibir la actividad, sino que está relacionada también con la estructura primaria de los péptidos, de modo que su secuencia de aminoácidos puede afectar dichas propiedades (Saiga *et al.*, 2003), así como la enzima empleada en la reacción de hidrólisis (Bernardini *et al.*, 2011). No obstante hasta el momento el mecanismo exacto por el cual los péptidos antioxidantes ejercen su actividad y la relación estructura-actividad no está completamente esclarecido.

La sangre animal producida en las plantas de sacrificio es una fuente potencial de proteínas de bajo costo ya que estas constituyen uno de sus componentes principales (Hoyo *et al.*, 2008), sin embargo generalmente representa el subproducto más problemático de la industria cárnica. En Colombia, por ejemplo, según reportes de FEDEGAN (FEDEGAN, 2011), al año se sacrifican más de 4 millones de cabezas de ganado vacuno, que equivalen a aproximadamente 8.800 toneladas de proteínas de alto valor biológico y nutricional, al tiempo que se cuenta solo con 7 plantas procesadoras de subproductos legalmente reconocidas. De esta manera, la alta producción de la sangre de bovino en relación con la escasa demanda, señala su subutilización, lo que la convierte en un problema medioambiental dado que gran parte de este subproducto es arrojado a las fuentes de agua (Falla *et al.*, 2002).

Bajo este panorama el plasma de bovino representa una buena fuente de proteínas hidrolizables, no solo por la importancia de ofrecer alternativas para su utilización, sino porque la sangre y en especial el plasma sanguíneo son fuentes reconocidas de péptidos con propiedades bioactivas tales como antimicrobiana, opioide, antihipertensiva, antioxidante, entre otras (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008; Wang *et al.*,

2010; Yu *et al.*, 2006). Acerca de péptidos antioxidantes en plasma no son muchas las investigaciones realizadas, existen algunos estudios con plasma proveniente de diferentes fuentes como porcino, humano y equino (Chatterjee *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2006), en cuanto al plasma de bovino, solo algunos autores como Salgado *et al.* (2011), han realizado investigaciones acerca de su actividad antioxidante, pero hasta ahora no hay reportes de las características de los péptidos que proveen dicha actividad, ni de la estabilidad frente a condiciones digestivas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades antioxidantes de los HPB, el efecto que el grado de hidrólisis (GH) tiene sobre dicha capacidad antioxidante y la persistencia de dicha propiedad luego de una digestión gástrica *in-vitro*.

MATERIALES Y MÉTODO

Reactivos y materiales

El plasma en estado líquido, se obtuvo de un proveedor comercial en Medellín-Colombia (Frigodan Ltda.), tomando muestras de 6 lotes de producción diferentes, las cuales se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. Para la hidrólisis enzimática, se utilizó alcalasa 2,4 L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Dinamarca), cuya actividad (2,45 ± 0,07 AU/g) se verificó con el método de Takami, *et al.*, (1989), modificado. Los reactivos ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri-2-pyridyl-s-triazine (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

Hidrólisis del plasma

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor de vidrio durante 2 h. Se prepararon 800 mL de una solución de plasma con 8 mg/mL de proteína, la cual fue llevada a condiciones de pH 8,0 y temperatura de 60 °C, con relación enzima sustrato de 8% (p/p). El control de pH y temperatura se hizo con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrand 842 marca Metrohm, operado por un ordenador (software Tiamo 1.2.1). La reacción fue monitoreada con la determinación del GH, utilizando el método del pH-estato, que consiste en mantener constante el pH del medio de reacción por la adición de base, para neutralizar los protones que son liberados en la reacción de hidrólisis (Guadix *et al.*, 2000).

El consumo de base, puede ser relacionado con el GH según las ecuaciones 1a y 1b (Márquez y Vázquez, 1999).

$$GH = \frac{BN_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} 100 \quad (1a)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (1b)$$

Donde h_{tot} el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa, B es el volumen consumido de base en L, M_P la masa de la proteína en kg, N_B la Normalidad de la base en Eqv/L y α es el grado de disociación de los grupos aminos

liberados en la reacción, valor que está dado en función del pH y la temperatura de reacción, para este experimento se empleó un α de 0.93 y un h_{tot} de 8.3 Eqv/kg que ha sido reportado para proteínas de la sangre (Adler-Nissen, 1986).

Al final de cada ensayo el medio de reacción se llevó a 85 °C por 10 min para detener la hidrólisis, el hidrolizado fue luego centrifugado a 6000 rpm durante 20 min para precipitar la fracción no hidrolizada.

Para evaluar si la actividad antioxidante de los hidrolizados de plasma de bovino aumenta indefinidamente con el GH, se realizó una hidrólisis por duplicado, bajo las mismas condiciones ya descritas, en la que se dejó la reacción por un tiempo prolongado (6 h) con el fin de alcanzar un GH significativamente mayor (25%), y a estos hidrolizados se les evaluó la actividad antioxidante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

En el análisis de electroforesis SDS-PAGE se usó un gel 12% en poliacrilamida (Laemmli, 1970). El proceso se desarrolló bajo condiciones no reducidas, en una cámara para electroforesis vertical. Todas las corridas fueron efectuadas a 120 V por 1 h. Se usó azul de Coomassie como colorante y ácido acético al 10% como decolorante. Los pesos moleculares de las proteínas y los péptidos fueron estimados usando un marcador de amplio rango entre 5-250 kDa (Fermentas # SM 1881, USA).

Medición de FRAP

Se llevó a cabo con la metodología descrita por Pulido *et al.* (2000), en la que 900 μL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl y buffer de acetato de sodio) recién preparado y calentado a 37 °C, se mezclan con 90 μL de agua destilada y 30 μL de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se lee la absorbancia a 595 nm. Las soluciones acuosas de concentraciones Trolox (entre 0 y 500 M) se utilizan para la calibración. Los resultados se expresan como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET/g}$).

Medición de ABTS

Se realizó siguiendo el método descrito por Re *et al.* (1999), en el cual 100 μL de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 1 mL de la solución ABTS* e incubados a 30 °C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm. Las soluciones acuosas de concentraciones Trolox (entre 0 y 500 M) se utilizan para calibración. Los resultados son expresados como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET/g}$).

Digestión in-vitro

Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la capacidad de los péptidos obtenidos en la hidrólisis de soportar condiciones similares a las que se tienen en el sistema gástrico, sin perder su capacidad antioxidante. El modelo de la digestión *in-vitro* fue adaptado de Yagoub *et al.* (2004), con algunas modificaciones. En este 35 mg de la proteína se colocan en 3.5 mL de una solución de HCl (0.1 N), con 3 mg de pepsina (E.C. 3.4.23.1; ≥ 250 U mg^{-1} sólido; Sigma, St. Louis, USA). Se incuban a 37 °C durante 3 h, luego se ajusta el pH de la mezcla entre 7.5 a 8.0 empleando NaOH (0.2 N). Se adiciona una solución de buffer fosfato (875 μL , pH 7.4) con, 0.46 mg de pancreatina (Sigma, No. P1750), 1 mM CaCl y 0.01% NaN_3 . Esta

mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h y finalmente la actividad antioxidante del hidrolizado se determina nuevamente mediante los métodos de FRAP y ABTS.

Purificación de péptidos con actividad antioxidante

El hidrolizado que mostró mayor actividad antioxidante, fue fraccionado en membranas de ultrafiltración (Amicon ultra-4, millipore, USA) con peso molecular de corte de 3 kDa y 10 kDa. Tres fracciones (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa) fueron separadas y almacenadas a -20 °C. La actividad antioxidante de estas fracciones fue nuevamente determinada mediante los métodos de FRAP y ABTS.

Las fracciones obtenidas de la ultrafiltración con mayor actividad antioxidante fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio aniónico con una columna DEAE-sephadex (20 x 100 mm), equilibrada con buffer fosfato 0.01 M pH 7.8 y eluida con gradiente lineal de NaCl a concentraciones entre 0 y 1 M. La elución fue monitoreada por medida de la absorbancia a 280 nm. La actividad antioxidante de los picos cromatográficos fue nuevamente determinada mediante el método ABTS. El pico obtenido en la cromatografía de intercambio aniónico, que mostró mayor capacidad antioxidante, fue separado por RP-HPLC en una columna octadecilsilica (C18) (250 x 10 mm; Restek, Pennsylvania, USA), usando un gradiente de acetonitrilo que contiene 1% de ácido trifluoroacético (TFA) a un flujo de 2 mL/min. Los picos eluidos fueron detectados por UV a una absorbancia de 280 nm.

Comparación con antioxidantes comerciales

La actividad antioxidante del péptido purificado que exhibió la mayor actividad, fue comparada con los antioxidantes comerciales L- ácido ascórbico y Trolox, como parámetros de referencia.

Análisis estadístico

Los ensayos de hidrólisis se hicieron por sextuplicado para determinar la desviación estándar del GH. Los análisis de actividad antioxidante fueron realizados por sextuplicado con el fin de determinar su reproducibilidad. Se utilizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% para evaluar la influencia del grado de hidrólisis sobre la actividad antioxidante y un test de rango múltiple de Duncan para determinar diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hidrólisis del plasma

En la fig. 1, se reporta el GH en función del tiempo para la hidrólisis de plasma de sangre de bovino, con Alcalasa 2,4 L, durante 120 min. En los primeros 15 min, se observó un incremento en el GH de 10,1%, en los siguientes 55 min la velocidad decrece paulatinamente con un aumento en el GH cercano al 7%, después de este tiempo, la pendiente se vuelve casi nula, de modo que en los restantes 50 min el GH solo aumenta 1,9%. A las 2 h de reacción el GH alcanza un valor de 19,1% con una desviación estándar del 0,23.

La curva de hidrólisis obtenida es típica en la hidrólisis enzimática de proteína alimentarias (Lamsal *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), y muestra que la reacción alcanza una fase de estado estacionario. Investigaciones anteriores (Márquez y Vázquez,

1999) indican que la disminución en la velocidad de hidrólisis de la reacción responde generalmente a tres factores: (a) Disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas, (b) Posible inhibición de las enzimas causada por el sustrato de hidrólisis; (c) Desnaturalización térmica de la enzima. Siendo el primero de estos, el factor que posiblemente actúa con mayor intensidad en este caso, dado que la concentración de sustrato no se incrementa en el transcurso de la reacción y la temperatura utilizada es la recomendada por el proveedor. Adicionalmente se puede estar presentando una desactivación de la enzima, como se ha demostrado en estudios previos de este grupo (Figuerola *et al.* 2012).

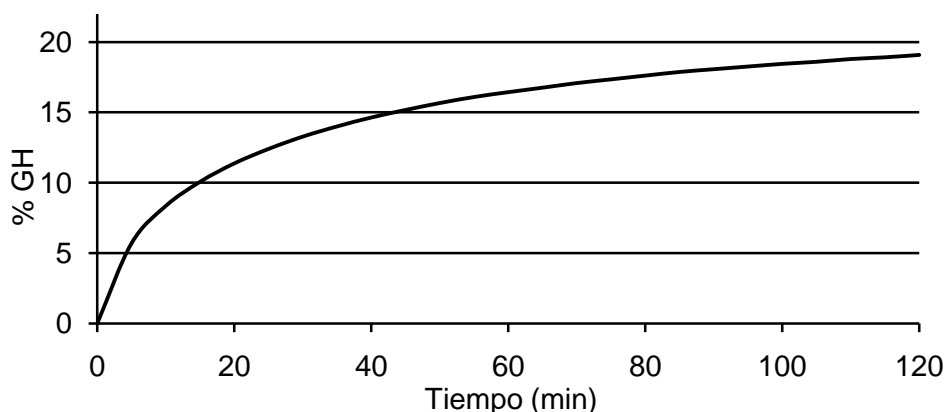


Fig. 1: Grado de hidrólisis del plasma de sangre de bovino hidrolizado con Alcalasa 2,4L a 8 mg/mL de proteína, pH 8,0 y 60 °C.

Efecto del grado de hidrólisis en la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos, el ABTS y el FRAP, ambos catalogados entre los métodos de transferencia de electrones, los cuales se distinguen por ser simples, rentables, fáciles de interpretar y reproducibles (Arnao, 2000). Para analizar la precisión de los métodos de análisis de actividad antioxidante, se evaluó la desviación estándar relativa de 6 muestras de HPB con GH 19,1%. Los valores promedio de actividad antioxidante fueron de 1343,5 y 118,1 $\mu\text{molET/g}$ para los métodos ABTS y FRAP, con desviación estándar relativa de 0,030 y 0,053 respectivamente.

En la tabla 1 se muestra la actividad de captación de radicales ABTS^{*} y el poder reductor de HPB, en relación con el grado de hidrólisis (GH). Como se puede apreciar, la actividad antioxidante aumenta en función del GH, manifestando incrementos de hasta 6 veces para el hidrolizado con GH de 19,1%, con respecto al plasma no hidrolizado. La alta actividad antioxidante presentada por los hidrolizados puede ser atribuida, en parte, a los cambios estructurales de las proteínas, dado que la hidrólisis enzimática promueve la apertura y exposición de residuos de aminoácidos activos y capaces de reaccionar con oxidantes (Kong y Xiong, 2006), este mismo comportamiento ha sido reportado en investigaciones realizadas a plasma de porcino (Liu *et al.*, 2009).

Se puede observar, que el incremento de la actividad antioxidante se detiene cuando el GH llega a valores cercanos al 19%, por encima del cual no se observan incrementos significativos de dicha actividad (véase tabla 1). Es posible que para este GH, la mayor parte de los aminoácidos activos estén expuestos, por lo que un

incremento en el GH no se manifiesta como un aumento significativo en la actividad antioxidante. Se ha reportado incluso, que una hidrólisis excesiva de proteínas alimentarias puede disminuir la actividad antioxidante (Kong y Xiong 2006; Salgado *et al.*, 2011), dado que conllevan a una disminución de péptidos y un aumento de aminoácidos libres, los cuales no son efectivos como antioxidantes por si solos, en tanto que son necesarias las propiedades químicas y físicas conferidas por la secuencia aminoacídica, especialmente la estabilidad de los radicales peptídicos que no inician o propagan más reacciones oxidativas (Elias *et al.*, 2008).

Tabla 1: Capacidad antioxidante ABTS y FRAP de los HPB en función del GH.
^{a-f} Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

GH	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
0	174,0 \pm 6,7 ^a	18,5 \pm 2,5 ^a
3,8	783,4 \pm 7,6 ^b	68,3 \pm 3,2 ^b
6,7	887,2 \pm 9,6 ^c	80,1 \pm 1,9 ^c
10,8	1032,6 \pm 9,0 ^d	91,6 \pm 4,2 ^d
15,3	1126,7 \pm 20,2 ^e	96,8 \pm 5,5 ^d
19,1	1389,0 \pm 19,5 ^f	122,6 \pm 4,4 ^e
25,0	1413,3 \pm 20,3 ^f	125,7 \pm 4,0 ^e

En general las diferencias en los resultados de la actividad antioxidante evaluadas con diferentes métodos a un mismo sustrato, se deben al mecanismo de acción antioxidante que se mide y a las condiciones usadas en los diferentes análisis. El pH del medio y la solubilidad del antioxidante, por ejemplo, juegan un papel importante en la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto (Samaranayaka, 2010). En este caso, la capacidad reductora de los hidrolizados, es menor a la capacidad para captar radicales ABTS* (tabla 1), situaciones similares han sido repostadas por otros autores para hidrolizados de proteínas alimentarias (Chang *et al.*, 2007). Estos resultados pueden deberse, entre otras cosas, a que las condiciones de trabajo del método FRAP (pH de 3,6) no son favorables para los hidrolizados proteicos y puede verse disminuida su actividad, cuando se compara con el método ABTS que trabaja a pH neutro.

Para las posteriores etapas de fraccionamiento y purificación de los péptidos, se utilizará el hidrolizado con GH de 19,1%, por ser el GH para el que se tiene actividad antioxidante significativamente mayor.

Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

En la fig. 2 se muestran los perfiles electroforéticos del plasma completo y el HPB con GH de 19,1%. Como se puede observar para HPB (línea 3), los compuestos de alto peso molecular (>50 kDa) como albumina, globulina y fibrinógeno desaparecen y aparecen especies de bajo peso molecular (<50 kDa) como es de esperarse, dado que la hidrólisis implica la ruptura de los enlaces peptídicos por acción enzimática en este caso, lo cual produce cambios de las características y disminución en el pesos moleculares de las proteínas (Benitez *et al.*, 2008).

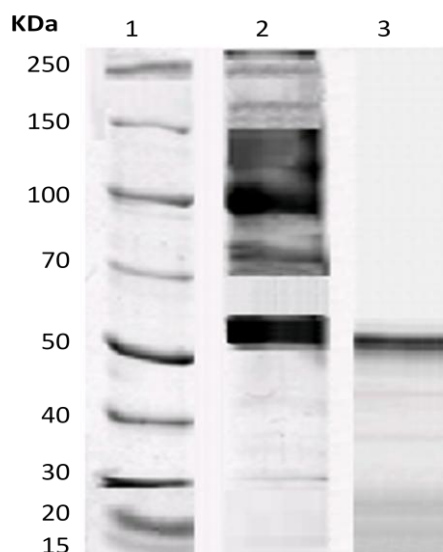


Fig. 2: SDS-PAGE gel 12%. Marcadores de alto peso molecular (línea 1), plasma de bovino completo (línea 2) y HPB 19,1% GH (línea 3).

Estabilidad de la actividad antioxidante bajo condiciones de digestión in-vitro

En la tabla 2 se presentan los resultados del análisis antioxidante de los HPB sometidos al proceso de digestión *in-vitro*. En esta tabla se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los HPB con GH 19,1% antes y después de la digestión *in-vitro*, estos resultados podrían ser atribuidos a limitaciones en los enlaces péptidos disponibles para la pepsina y la pancreatina, dado que se trata una muestra previamente hidrolizada con Alcalasa, con un GH alto. Con esta prueba se pone de manifiesto, la estabilidad del hidrolizado de plasma de bovino frente a las enzimas digestivas, lo cual sugiere que el hidrolizado podría ser resistente a una digestión fisiológica después de ser ingerido (Matsui *et al.*, 2002).

Tabla 2: Análisis ABTS y FRAP realizados al HPB con GH 19,1% antes y después de la digestión *in-vitro*

^a Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Muestra (GH: 19,1%)	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
Sin Digestión	1389,0 \pm 19,5 ^a	122,6 \pm 4,7 ^a
Con Digestión	1380,6 \pm 12,5 ^a	119,8 \pm 4,4 ^a

Fraccionamiento de péptidos con actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las tres fracciones de ultrafiltración con diferente peso molecular (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa) se muestran en la tabla 3. Los péptidos con peso molecular de menos de 3 kDa exhiben actividad con valores de 1692 y 137 $\mu\text{molET/g}$ para el análisis ABTS y FRAP respectivamente. Este valor es mayor que el de las demás fracciones y el del hidrolizado completo ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren que la actividad antioxidante de los péptidos de plasma de bovino depende de su peso molecular, lo cual ha sido reportado en otras investigaciones donde se relaciona la actividad antioxidante con el peso molecular de los péptidos, en dichas investigaciones se evidencia además, que la mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de fuentes alimentarias tienen un peso molecular entre 500 y 1800 Da (Guo *et al.*, 2009; Je *et al.*, 2005; Nalinanon *et al.*, 2011).

Tabla 3: Actividad antioxidante de los péptidos del HPB (GH: 19,1%) con diferentes pesos moleculares.

^{a-c} Las medias de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Fracción	ABTS $\mu\text{molTE/g}$	FRAP $\mu\text{molTE/g}$
>10 kDa	905,0 \pm 17,9 ^a	89,1 \pm 3,6 ^a
3-10 kDa	1379,1 \pm 21,8 ^b	128,4 \pm 3,8 ^b
<3 kDa	1692,3 \pm 15,0 ^c	137,6 \pm 4,4 ^c

La fracción menor 3 kDa fue separada por medio de cromatografía de intercambio aniónico en tres picos: I, II y III (fig. 3). El pico I mostró el mayor poder antioxidante (ABTS 1677 $\mu\text{molTE/g}$), dicho pico eluyó a 0% de B, de modo que la mayor actividad la tienen los aminoácidos o péptidos básicos (cargados positivamente) presentes en la fracción de menos de 3 kDa del HPB con GH de 19,1%.

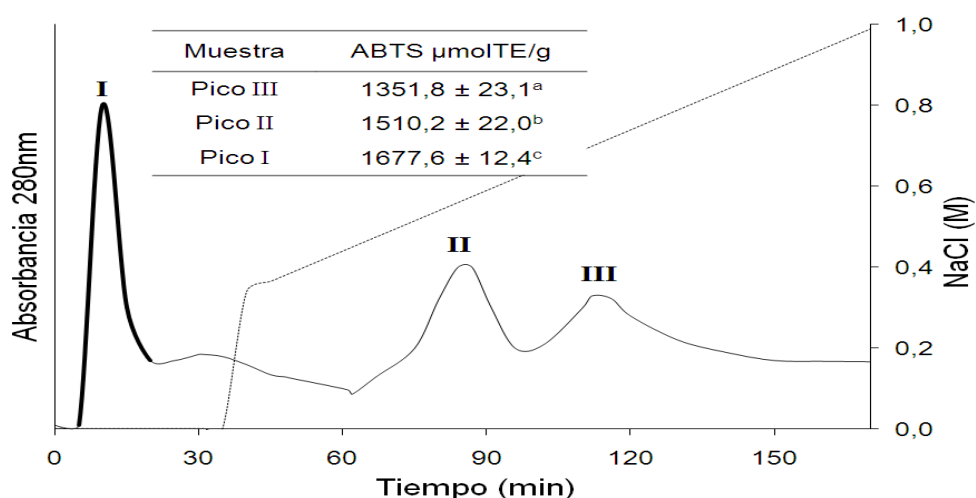


Fig. 3: Perfil de elución de los HPB (GH: 19,1%, <3 kDa) en cromatografía de intercambio aniónico columna DEAE, y actividades antioxidantes de los picos medidas por el método ABTS.

El pico I fue luego separado por medio de RP-HPLC, y se evaluó la actividad antioxidante de las tres fracciones más representativas (I_a , I_b y I_c) (fig. 4). La fracción I_a mostró la más alta actividad antioxidante incrementándose 25 veces respecto a la que presentaba el plasma de bovino sin hidrolizar. La gran actividad captadora de radicales ABTS[•] mostrada por el pico I_a , sugiere que dicho pico contiene péptidos o aminoácidos donadores de electrones y pueden reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables y terminar la reacción en cadena del radical (Binsan *et al.*, 2008).

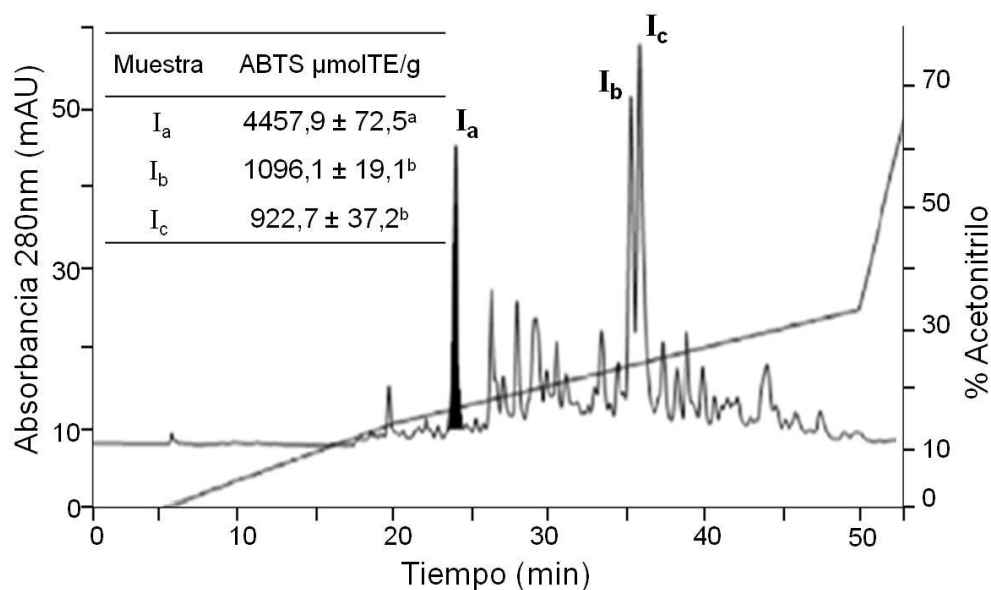


Fig. 4: Perfil de elución RP-HPLC en una columna C-18 de la fracción I eluida en cromatografía de intercambio aniónico, y actividades antioxidantes de los picos medidas por el método ABTS.

Comparación con antioxidantes comerciales

En la tabla 4 se presenta la capacidad captadora de radicales ABTS^{*} de dos antioxidantes comerciales L-acido ascórbico y Trolox, con el fin de compararlos con la actividad presentada por el pico I_a purificado por RP-HPLC (fig. 4). Como se puede observar, la capacidad antioxidante presentada por el pico I_a tiene valores que están en el mismo orden de magnitud que la actividad presentada por los antioxidantes comerciales.

Dada la tendencia actual a utilizar productos naturales antioxidantes cuya actividad se lleve a cabo no sólo en los alimentos envasados, sino también una vez que el alimento ha sido ingerido, los péptidos bioactivos han tenido un enorme apogeo y son incluso componentes fundamentales de muchos productos o ingredientes comercializados como alimentos funcionales. En efecto, varios hidrolizados de proteínas vegetales, pueden ser incorporados en alimentos específicos como aditivos alimentarios (FDA, 2011). Los resultados mostrados en la tabla 4, ponen de manifiesto la potencial aplicación de este péptido como un conservante natural, que puede incluso sustituir antioxidantes sintéticos, con la ventaja de que por tratarse de un péptido, puede presentar propiedades nutricionales y funcionales, además de su actividad antioxidante (Xie *et al.*, 2008), además por ser obtenido a partir de proteínas alimentarias de origen natural, su aplicación en alimentos, posee menos restricciones que los antioxidantes sintéticos, cuya utilización es regulada por el posible riesgo para la salud (Saiga *et al.*, 2003).

Tabla 4: Comparación de capacidad de captación de radicales ABTS^{*} entre el pico I_a y diferentes antioxidantes comerciales.

	L-acido ascórbico	Trolox	Pico I _a
ABTS (IC ₅₀ mg/mL)	0,029 \pm 0,0001	0,04 \pm 0,001	0,032 \pm 0,0002

CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante del plasma de bovino puede ser incrementada por hidrólisis enzimática con Alcalasa 2,4 L a 8 mg/mL de proteína, pH 8 y 60 °C, alcanzando valores máximos cuando el GH se encuentra alrededor del 19%.

Se logró determinar que la capacidad antioxidante del hidrolizado de plasma bovino con GH 19,1%, obtenido a las condiciones de hidrólisis del presente estudio, no sufre modificaciones significativas cuando es sometido a un proceso de digestión *in-vitro*.

A las condiciones del presente trabajo se pueden obtener péptidos provenientes de plasma de bovino, con alta capacidad captadora de radicales ABTS*, similar a la encontrada en el L-ácido ascórbico e incluso superior a la actividad presentada por el Trolox.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo financiero de este trabajo fue proporcionado por CODI, Universidad de Antioquia (MDC 09-1-05) y COLCIENCIAS (programa de becas Joven Investigador modalidad Virginia Gutiérrez de Pineda 2011). Agradecemos al Programa de Ofidismo/Escorpionismo y todos sus integrantes por el apoyo brindado, igual que al Dr. José Contreras (Universidad de Antioquia).

REFERENCIAS

Adler-Nissen, J., Enzymic hydrolysis of food proteins, 116-124. Elsevier, Londres, Inglaterra (1986).

Arnao, M.B., Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, Trends Food Sci. Technol.: 11, 419-421 (2000).

Benítez, R., A. Ibarz, y J. Pagan, Protein hydrolysates: processes and applications, Acta Bioquím Clín Latinoam.: 42, 227-36 (2008).

Bernardini, R.D., y otros seis autores, Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and byproducts: Review, Food Chem: 124, 1296-1307 (2011).

Binsan, W., y otros 5 autores, Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Food Chemistry: 106 (1), 185-193 (2008).

Bray, T.M, Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress, Nutrition: 16, 578-81 (2000).

Chang, C.Y., K.C. Wu y S.H. Chiang, Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. Food Chemistry: 100(4), 1537-1543 (2007).

Chatterjee, S., T. Poduval, J. Tilak y T. Devasagayam, A modified, economic, sensitive method for measuring of total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*), Clinica Chimica Acta: 352, 155-163 (2005).

Elias, R.J., S.S., Kellerby y E.A. Decker, Antioxidant activity of proteins and peptides, *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*: 48, 430-441 (2008).

Falla, L.H., Desechos de Matadero como Alimento Animal en Colombia, Frigorífico Guadalupe S.A., Seminario Industrias Cárnicas, residuos, su tratamiento y prevención de la contaminación, Santafé de Bogotá, Colombia, (2002).

FDA, (2011). Listing of food additive status part II (en línea), <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm>, acceso: 1 de mayo (2011).

Federación Nacional de Ganaderos de Colombia (FEDEGAN). Estadísticas producción (en línea), http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1760323&_dad=portal&_schema=PORTAL. Acceso: 9 de agosto (2012).

Figuroa O.A, J.E. Zapata y G.A. Gutiérrez, Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino, *Revista EIA*: 17, 71-84 (2012).

Guadix, A., E. Guadix, M. Páez, P. González y F. Camacho, Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*: 41(1), 79-89 (2000).

Guo, H., Y. Kouzuma y M. Yonekura, Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein, *Food Chemistry*: 113, 238-245 (2009).

Hoyo, P., M. Rendueles y M. Diaz, Effect of processing on functional properties of animal blood plasma, *Meat Science*: 78, 522–528 (2008).

Je, J.Y., S.Y. Kim y S.K. Kim, Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes, *European Food Research and Technology*: 221, 157-162 (2005).

Kong, B.H. y Y.L. Xiong, Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 54, 6059-6068 (2006).

Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*: 227, 680-685 (1970).

Lamsal, B.P., S. Jung, y L.A. Johnson, Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*: 40, 1215-1223 (2007).

Liu, Q., B. Kong, L. Jiang, X. Cui y J. Liu. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer, *LWT-Food Science and Technology*: 42, 956-962 (2009).

Márquez, M. y M. Vázquez, Modeling of enzymatic protein hydrolysis, *Process Biochemistry*: 35(1), 111–117 (1999).

Martinez, S., L. Valek, J. Resetic y D. Ferenc, Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods, *Journal of Electroanalytical Chemistry*: 588, 68-73 (2006).

Matsui, T., y otros cinco autores, Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR, *J. Nutr. Biochem*: 13, 80-86 (2002).

Nalinanon, S., S. Benjakul, H. Kishimura y F. Shahidi, Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna, *Food Chem*: 124, 1354-1362 (2011).

Nedjar-Arrume, N. y otros ocho autores, Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial Peptides, *peptides*: 29, 969-977 (2008).

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

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

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

Saiga, A., S. Tanabe y T. Nishimura, Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, 3661-3667 (2003).

Salgado, P.R., G.B. Fernández y S.R. Drago, A.N. Mauri, Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films, *Food Hydrocolloids*: 25, 1433-1440 (2011).

Samaranayaka, A.G.P., Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysates with antioxidative properties. Doctor of Philosophy in The Faculty of Graduate Studies (Food Science), The University of British Columbia (Vancouver) (2010).

Sarmadi, B.H. y A. Ismail, Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides*: 31(10), 1949-1956 (2010).

Takami, H., T. Akiba y K. Horikoshi, Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101, *Applied Microbiology and Biotechnology*: 30, 120-124 (1989).

Wang, J., B. Sun, Y. Cao y C. Wang, Wheat bran feruloyl oligosaccharides enhance the antioxidant activity of rat plasma, *Food Chemistry*: 123(2), 472-476 (2010).

Xie, Z., J. Huang, X. Xu y Z. Jin, Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate, *Food Chem*: 111, 370-376 (2008).

Yagoub, A.A., E.B. Mohamed, A.H.R. Ahmed y A.H. El Tinay, Study on furundu, a Traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro

protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins, J. Agric. Food Chem: 52, 6143-6150 (2004).

Yu, Y., J. Hu, Y. Miyaguchi, X. Bai, Y. Du y B. Lin, Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin, peptides: 27, 2950-2956 (2006).

ANEXO II

Effects of Hydrolysis and Digestion *In vitro* Over Activity of Bovine Plasma Hydrolysates as Inhibitors of the Angiotensin I Converting Enzyme

Bovine Plasma Hydrolysates ACE Inhibitors

Leidy J. Gómez ^{a,*}, José E. Zapata ^a

^a Programa Ofidismo/Escurpionismo, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

* Corresponding author. Tel.: +574 2196649. E-mail address: joha965@yahoo.es (L. Gómez)

Brazilian Archives of Biology and Technology (Sometido)

ABSTRACT

The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibiting activity of bovine plasma hydrolyzates obtained by Alcalase 2,4 L at different degrees of hydrolysis (DH) was evaluated. For the evaluation of ACE inhibition (ACEI) was used Hippuryl-His-Leu as substrate and the amount of hippuric acid liberated by non-inhibiting ACE was determined by spectrophotometry at 228 nm. The results showed that enzymatic hydrolysis increases the ACEI activity compared with the unhydrolyzed plasma, there was obtained the greatest activity with a DH of 6.7%. The peptide fractions with the greatest activity were isolated using ultrafiltration membranes, ion exchange chromatography and high performance liquid chromatography on reverse phase (RP-HPLC). The fraction with higher ACEI activity, showed an IC₅₀ of 0.18 mg/mL and contains peptides with sequences AGATGVTISGAG, YSRRHPEYAVS, Q(K)AW and L(I)I(I)VR which were determined by MALDI-TOF-TOF. It was also found that after submitting such fraction to digestion conditions in vitro, the ACEI activity remains constant.

Keywords: enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, angiotensin I-converting enzyme inhibitors, peptide sequence.

INTRODUCTION

Foods are currently being considered not only as nutrients but also as a source for obtaining physiologically active compounds. This trend in food patterns has generated a great increase in the study of functional foods because of their therapeutic value and their relevance as well as for their great economic repercussion and for the foods that contain them (Burdock et al. 2006). In this new field of food industry, there stand out bioactive peptides, which are defined as specific fragments of a particular protein which are inactive, or present low activity within the native protein, but which may be liberated after a hydrolysis and thus exert various effects beneficial for one's body (Meisel and Fitzgerald 2003).

Artery hypertension (AHT) is a multifactorial syndrome of genetic origin that constitutes one of the most important medical-sanitary problems of current medicine in developed countries, and there is strongly felt need to control it in order to significantly reduce the morbidity and the mortality of coronary cardiopathy and cerebral, vascular and renal diseases (Eriksson et al. 2007). Although there is a wide variety of highly efficient and tolerable pharmacological treatments for hypertension, they are expensive and may produce certain short-and-long term alterations as they are used, like coughing, taste alterations and skin rash (Cooper et al. 2006). Therefore, there has been recently an increasing interest in the research of anti-hypertensors of natural origin, among them, alimentary anti-hypertensive peptides, which may represent a new strategy for the prevention and/or treatment of hypertension (Aleixandre et al. 2008).

Given the multifactorial nature of the AHT, substances with hypertensive activity may act in different ways, where ACE inhibition is the action mechanism most studied, since has been demonstrated that the ACEI causes the decrease in artery pressure in men and animals (Laffan et al. 1978). The ACE is an enzyme that works hydrolyzing the decapeptide angiotensin I to produce octapeptide angiotensin II which is vasoconstrictor. On the other hand, it works degrading the vasodilator peptide bradiquinina. Therefore, the ACEI is directly related with the reduction of artery pressure.

Clinical trials over cardiovascular morbidity and mortality realized with ACEI on patients with AHT, have demonstrated positive results in the reduction of artery pressure and cardiovascular-and-cerebral events, progress in life quality, cognitive function and dementia, and a significant decrease of mortality (Carey 2007).

The first peptide identified with the inhibiting activity of ACE was discovered in 1970, isolated from the venom of the Bothrops jararacá snake (Ferreira et al. 1970). Since then, many peptides of hydrolyzates from food sources with ACEI activity have been identified (Ahn et al. 2012; Ko et al. 2012; Kuba et al. 2005; Lignitto et al. 2010).

A feasible and economical way to produce protein hydrolyzates, from an environmental point of view is by using waste materials from food plants and from farms in general. Animal blood produced during the sacrifice is one of these cases; it is additionally a valuable source of protein (Del Hoyo et al. 2008), and it has been found to produce various bioactive peptides, not only from its cellular fractioning, but also from the plasma (Catiau et al. 2011; Gómez et al. 2013; Lee and Song 2009; Liu et al. 2009). To propose alternatives to use animal blood even represents a solution to an environmental, since, in many cases, a great part of this by-product is thrown to water fountains, which is something alarming if we consider that blood is a potentially polluting substance for the environment.

Some research has been carried out to identify hydrolyzates and peptides with ACEI activity from pig and bovine blood plasma (Hyun and Shin 2000; Lee and Song 2003; Park and Song 1997; Wanasundar et al. 2002). Despite there has been identified various peptides and mixtures of peptides with a good ACEI activity, none of the researches has determined the stability of these peptides before digestion conditions, nor there is any relationship between the DH and the ACEI activity using the Alcalase 2,4 L for hydrolysis.

The purpose of this study was to evaluate the ACEI capacity of bovine plasma hydrolysates (BPH) with Alcalase 2,4 L, the effect that the DH has over such capacity, and the persistence of said property after a gastric digestion *in vitro*. Additionally, it was searched to identify the peptides that present the greatest ACEI activity.

MATERIALS AND METHODS

Reactives and materials

Liquid plasma was obtained from a commercial supplier in Medellín, Colombia, by taking samples of three different production batches. They were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the moment of hydrolysis. For the enzymatic hydrolysis, it was used Alcalase 2,4 L alimentary degree (Novo Nordisk Co., Dinamarca), whose activity ($2,45 \pm 0,07\text{ AU/g}$) was verified with the method of Takami et al. (1989) modified. The ACE from rabbit lung (EC 3.4.15.1, 6 U/mg) and the substrate HHL (hippuryl-histidyl-leucine) were bought at Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). The remaining reactives and solvents were of a standard analytic degree.

Plasma Hydrolysis

The hydrolysis was carried out in a glass reactor during 2 hours. There were prepared 800 mL of a plasma solution with 8 mg of protein/mL, which were taken to conditions of pH 8,0 and a temperature of $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The hydrolysis was realized with Alcalase 2,4 L at a relation enzyme/substrate of 8% (p/p). The pH control and the temperature were done with a glass-combined electrode, connected to a Metrohm Titrand 842 operated by a PC (software Tiamo 1.2.1). The reaction system was maintained in permanent agitation (200 rpm) by a magnetic agitator 801 (Metrohm). The reaction was monitored together with the determination of the DH, by using pH-estato method that consists of maintaining constant the pH of the reaction medium due to the addition of base, in order to neutralize the protons released in the hydrolysis reaction.

The base consumption can be related to the DH according to equation 1 (Márquez and Vázquez 1999).

$$\text{DH} = (\text{BN}_B / M_p \alpha h_{\text{tot}}) * 100 \quad (1)$$

Where h_{tot} is the total number of peptide bonds present in the native protein, B is the consumed volume of base in L, M_p is the protein mass in kg, N_B is the base normality in Eqv/L and α is the degree of dissociation of the amino acid groups released in the reaction, value that is given in function of the pH and the temperature of reaction. For this experiment it was used an α of 0,93 and a h_{tot} de 8,3 Eqv/kg that has been reported for blood proteins (Adler-Nissen 1986).

At the end of each trial the reaction medium was taken to $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min in order to deactivate the enzyme, The hydrolysate was later spinned at 6000 rpm for 20 min in order to precipitate the non-hydrolyzed fraction.

ACE Inhibiting (ACEI) activity

The ACEI activity was determined through the spectrophotometric method of Cushman and Cheung (1971), modified by Kim et al. (1999). In this test the dipeptide His-Leu turns into hippuric acid (HA) due to the hydrolytic elimination of the C-terminal of the dipeptide by action of the ACE, thus the ACEI becomes reflected with a minor formation of HA. A 100 μL of the substrate solution, made up of 10 mM of HHL dissolved in a potassium phosphate tampon pH 8,3, there was added 20 μL of the sample and 5 mU of ACE dissolved in glycerol at 50%. The mixture was incubated at

37 °C for 30 min. The enzyme was deactivated by decreasing the pH, through the addition of 200 µL of HCl 1 N. The hippuric acid formed in the reaction was extracted by adding 600 µL of ethyl acetate, with a further centrifugation at 6700 rpm during 10 min and eliminating the ethyl acetate through a heating process at 95 °C for 10 min. The absorbance of the hippuric acid residuary was measured at 228 nm in a spectrophotometer. The ACEI percentage was determined through equation 2, by using the samples at a concentration of 0,4 mg of protein/mL.

$$\% \text{ ACEI} = (A_c - A_s) / (A_c - A_b) * 100 \quad (2)$$

Where A_c is the absorbance of the HA formed after the ACE action without inhibitor, A_b is the absorbance of the HHL that has not reacted and that has been extracted with the ethyl acetate, and A_s is the absorbance with the HA formed after the action of the ACE in presence of inhibiting substances. The IC_{50} is defined as the concentration of ACE inhibitors needed to inhibit the 50% of its activity.

Purification of peptides with ACEI activity

After evaluating the ACEI activity of the BPH with different DHs, the hydrolyzate with greater activity was fractioned by ultrafiltration, by using membranes with molecular weight (MW) cutoff of 3 and 10 kDa (Amicon ultra-4, Millipore, USA). Three fractions (<3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa) were separated and stored at -20 °C. The ACEI activity of these fractions was determined once again.

The peak obtained from ultrafiltration with greater ACEI activity was fractioned by anion exchange chromatography with a DEAE-Sephadex (20 x 100 mm), balanced with phosphate buffer 0,01 M (pH 7,8) eluted with a linear gradient of NaCl at concentrations between 0 and 1 M. The elution was monitored by measuring the absorbance at 280 nm. The ACEI activity of chromatographic peaks was determined once more.

The peak obtained in the anion exchange chromatography that showed greater ACEI capacity was separated by RP-HPLC in an octadesilic column (C18) (250 x 10 mm; Restek, Pennsylvania, USA), at a flow of 2 mL/min. There was used trifluoroacetic acid 0,1% (TFA) as solvent A, and Acetonitrile/TFA 0,1% (99:1 v/v) was solvent B. The sample was eluted by using a gradient of B as follows: 0-5 min, 0% B; 5-20 min, 0-15% B; 20-50 min, 15-35% B; and 50-53 min, 35-70% B. The eluted peaks were detected by UV at an absorbance of 280 nm. The peak with grater ACEI activity was rechromatographed again under same conditions of RP-HPLC, except for the gradient, in order to obtain a relatively pure peak. The new gradient applied was 0-5 min, 0-20% B; 5-20 min, 20-25% B; and 20-22 min, 25-27% B.

Analysis of the ACEI peptides by mass spectrometry

Several dilutions of a sample with purified peptides were mixed in equal parts with a saturate solution of α -cianodihoxycinamic acid (α -CHCA), dissolved in acetonitrile at 50% in water with 0,1% of TFA. There were put drops of 1 µL of these mixtures over a metallic plate for ionization MALDI, which were left to dry at room temperature. The samples were analyzed in a mass spectrometer MALDI-TOF-TOF 4800-Plus (Applied Biosystems), in a positive reflector mode. External calibration for modes MS and MS/MS was realized through a mixture of CalMix-5 (ABSciex) standards. The spectra

were obtained by using a total of 1625 shots/spectrum and a laser intensity of 3000. Up to a maximum of 10 precursors were automatically selected in order to obtain fragmentation spectra TOF-TOF through collision induced dissociation, with a laser intensity of 3000 and 500 shots/spectrum. The resulting spectra were analyzed by the ProteinPilot 4.0.8 (ABSciex) program against the UniProt/SwissProt (20120518) data base, in order to obtain the probable peptide sequences.

In vitro digestion

This procedure was carried out for the purpose of evaluating the capacity of the peptides obtained in the hydrolysis to support conditions similar to those which are taken into the gastric system without losing their ACEI capacity. The *in vitro* digestion model was adapted from Yagoub et al. (2004), with some modifications. The hydrolysate with greater ACEI activity and the peptide fraction obtained from the same after taking the purification steps, were incubated with 10 µg of pepsin/mg of protein (E.C. 3.4.23.1; ≥ 250 U mg⁻¹ solid; Sigma, St. Louis, USA), at a pH of approximately 2 per addition of HCl, during 3 h. Then there was adjusted the pH of the mixture between 7,5 and 8,0 by using NaOH (0,2 N), and it was added a buffer phosphate solution (pH 7,4) containing 1 mM CaCl₂, 0,01% NaN₃ and 13 µg of pancreatin/mg of protein (Sigma, No. P1750). This mixture was incubated at 37 °C during 24 h and finally the ACEI activity was determined again through the above mentioned method.

Statistic analysis

The hydrolysis tests were made triplicate in order to determine the standard deviation of the DH. The analysis of the ACEI activity were also made triplicate to determine its reproducibility. There was used a variance analysis with a confidence level of 95%, in order to evaluate the influence of DH over the ACEI activity and a multiple range test to determine significant differences between the samples. In this case the Stagraphics Centurion XV statistics program was used.

RESULTS AND DISCUSION

Effects of the degree of hydrolysis in the ACEI activity

The hydrolysis was performed according to the procedure described, after two hours of reaction, the DH reaches a value of 19,1% with a standard deviation of 0,23. As it is observed in table 1, the non-hydrolyzed bovine plasma, presents a minimal ACEI activity, after the hydrolysis with Alcalase 2,4 L, the ACEI activity was increased with the DH. The greatest activity was reached at 6.7% DH, after which the ACEI activity begins to decrease. Likewise, Ledesma (2002) also observed that after certain DH, the ACEI activity diminishes, which could be explained by the fact that a prolonged hydrolysis ends up in the degradation of the active peptides already formed, and therefore inactive sequences are liberated.

Table 1 - ACEI activity bovine plasma hydrolysates in function of DH.

DH (%)	ACEI (%)
0	2,3 ± 0,6 ^a
3,8	36,7 ± 1,3 ^b
6,7	50,2 ± 1,2 ^c
10,8	48,3 ± 1,4 ^{c,d}
15,3	47,7 ± 0,9 ^d
19,1	39,4 ± 1,3 ^b

^{a-d} The means with different hyperindex are significantly different (p<0,05).

Despite there has been reported a greater ACEI activity to high DH (Kuba et al. 2005; Wanasundara et al. 2002), in this study it is shown that low DHs are sufficient for the liberating bioactive peptides, as has been reported also by other researchers (Ahn et al. 2012; Ledesma 2002). The BPH with DH of 6,7% that was obtained under the conditions of this study presents an IC₅₀ of 0,4 mg/mL, greater than other hydrolysates of bovine plasma previously described (Hyun and Shin 2000; Wanasundara et al. 2002). By Comparing it with the previously reported values for the hydrolysates of alimentary proteins which have a rank in the IC₅₀ between 0,18 and 246,7 mg/mL (He et al. 2006), this BPH shows a promising activity.

The rest of the analysis and separation processes of this study were realized with BPH of 6.7% DH, because its greater activity.

Purification of peptides with ACEI activities

With the process of ultrafiltration of the hydrolysate with 6.7% DH, there results three fractions with different MW <3 kDa, 3-10 kDa y >10 kDa, the ratio of each fraction in the hydrolysate was 37,2%, 25,1% and 34,2%, respectively. As it was expected, because it is a hydrolysate with low DH, the appearance of peptides of high MW is quite representative, however the amount of peptides of less than 3 kDa is also high, which demonstrates the fast peptide formation and could explain the high ACEI activity found in this hydrolysate.

In table 2 we can see that the ACEI activity increased as the MW diminished, therefore peptides less than 3 kDa show a % ACEI significantly greater than the rest of the fractions (65,8 ± 1,9%). These results suggest that the peptides coming from the bovine plasma hydrolysis with ACEI activity, are found in a certain range of MW, witch has been reported in other research works (Hyun and Shin 2000; Ko et al. 2012; Lignitto et al. 2010) where the ACEI activity was associate with MW less than 3 kDa.

Table 2 - Purification of ACEI peptides from the BPH with DH 6,7%.

PURIFICATION STEPS	ACEI (%)
ULTRAFILTRATION	
> 10 kDa	39,3 ± 1,5 ^a
3-10 kDa	51,4 ± 1,3 ^b
< 3 kDa	65,8 ± 1,9 ^c
DEAE	
I	53,9 ± 1,7 ^b
II	45,6 ± 1,7 ^d
III	2,1 ± 0,7 ^e
III	21,3 ± 1,3 ^f
RP-HPLC (Peak I)	
Ia	17,2 ± 1,2 ^g
Ib	26,1 ± 0,8 ^h
Ic	59,8 ± 1,2 ⁱ
RP-HPLC (Peak Ic)	
Ic	69,9 ± 1,1 ^j

^{a-j} The means with different hyperindex are significantly different ($p < 0,05$).

The fraction minor of 3 kDa was separated by means of anion exchange chromatography in DEAE column, after which yielded four peaks (fig. 1). As it is shown in table 2, the peak I presented the higher ACEI activity ($53,9 \pm 1,7\%$), followed by peak II which also has a good ACEI activity ($45,6 \pm 1,7\%$). Peaks III and IV, which were eluted with higher percentages of NaCl showed a minimal activity, maybe due to the presence of amino acids or peptides negatively charged, for which there has been reported little affinity with the ACE (Li et al. 2004).

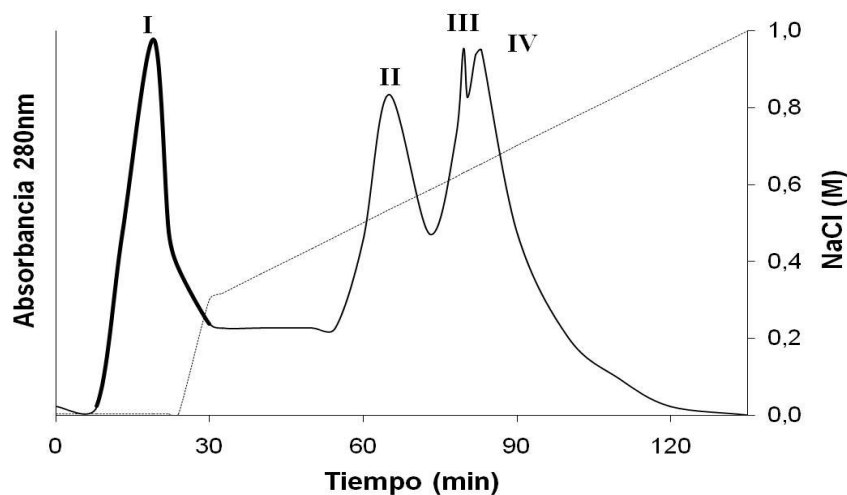


Figure 1- Elution anion exchange chromatography profile of BPH (DH 6,7%, <3 kDa).

Peak I was later separated by means of RP-HPLC (fig. 2), and the ACEI activity of the three most representative peptide fractions was evaluated. Fraction Ic showed the greatest ACEI activity (table 2). This fraction was purified once again through RP-HPLC under the same conditions with a different gradient, from where it was possible to obtain an Ic peak relatively pure, which showed a high ACEI activity, increasing 30 times respect of non-hydrolyzed bovine plasma.

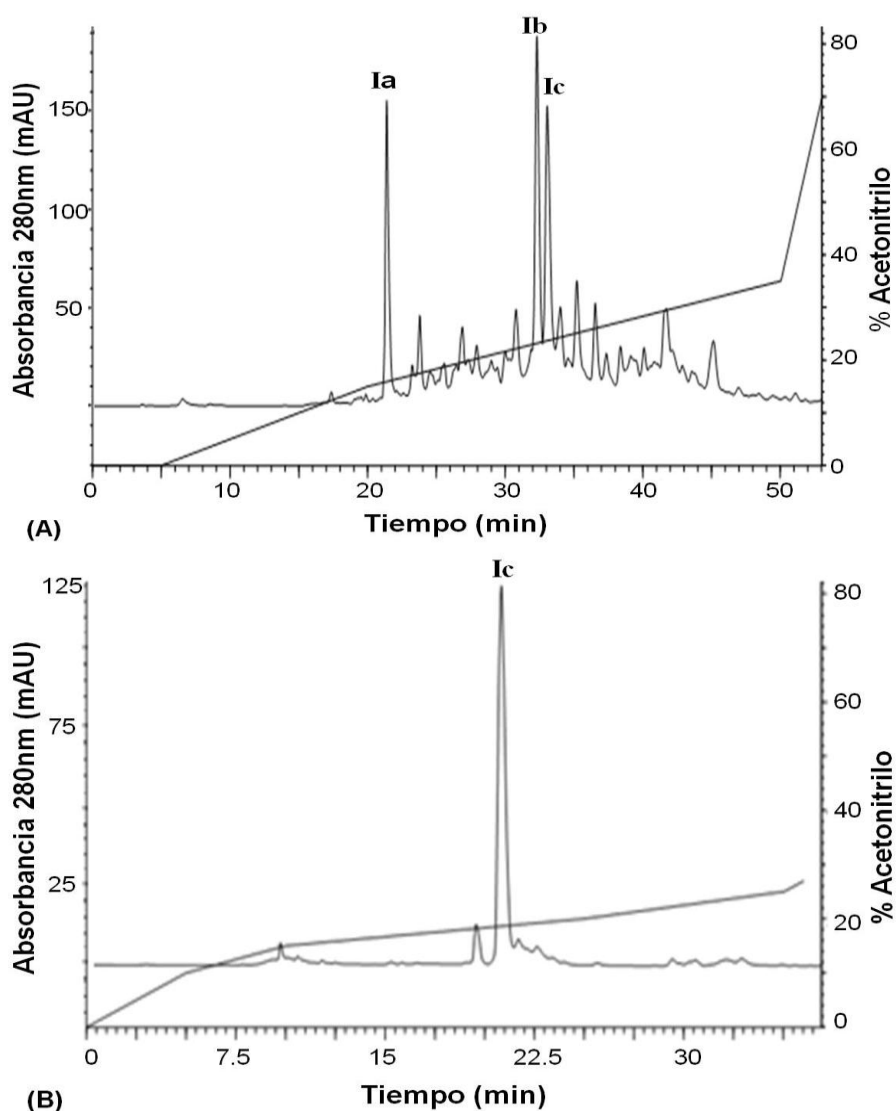


Figure 2 - Reverse-phase HPLC profile of peak I (A) and peak Ic (B).

Analysis of the ACEI peptides through MALDI-TOF-TOF

The analysis of the Ic peak through MALDI-TOF-TOF in the context m/z between 700 and 4000, showed the presence of ions with mass inferior to the 1700 Da (fig. 3), three intense precursors of 960,6, 1046,6 and 1363,8 Da (mono-isotopic masses) stood out. The fragmentation of these three ions suggest the sequences, AGATGVTISGAG (S1)

and YSRRHPEYAVS (S2) for the first and third precursors respectively, while the second one did not result in a clear fragmentation spectrum. Other minor peptides in the sample presented the sequences Q(K)AW (S3) and L(I)L(I)VR (S4).

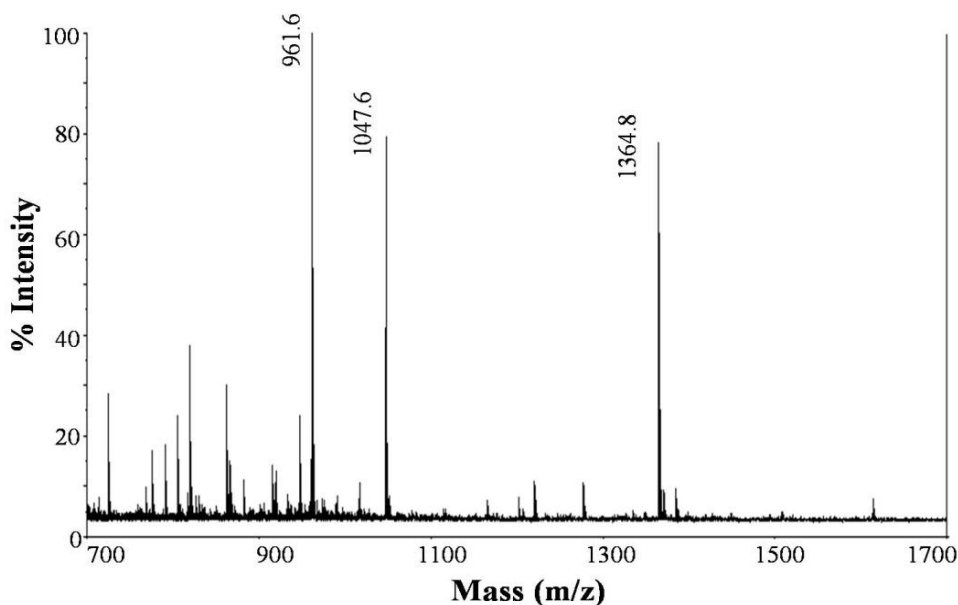


Figure 3 - MALDI-TOF-TOF of peak Ic isolated by RP-HPLC.

The peptide fraction (peak Ic) obtained under the conditions of this study, presented a good ACEI activity with an IC_{50} of 0,18 mg/mL, although further studies are needed to confirm the individual ACEI activity of each peptide identified in peak Ic, we can speculate a bit if we take into account the characteristics of the sequences identified. Thus, for example, it can be noted that sequence S4 has R in its C-terminal, which has been related with the increase of the ACEI activity (Hernández et al. 2008), it additional presents in its sequence residues of L(I) and V, aminoacids which are predominant in ACEI peptides (Gomez et al. 2004). Likewise sequence S3 has a W in its C-terminal, and it has been proved that hydrophobic amino acids in this position, favor the link of the peptide with the ACE (Vinderola et al. 2008), furthermore, dipeptide AW was identifies like a powerful ACEI (Nakagomi et al. 2000). Now concerning peptides S1 and S2, they have A in the tripeptide C-terminal sequence, which as it was mentioned above, because of being a hydrophobic amino acid, favor the union of peptide with the ACE, and also have presence of V in its sequence, amino acid predominant in ACEI peptides.

All the peptides identified in peak Ic, have short peptide sequences, which is in accordance with former research studies, where it has been reported that, in general, ACEI peptides have sequences among 2 and 12 aminoacids (Ahn et al. 2012; Kuba et al. 2005; Lignitto et al. 2010). Above, because the ACE active site cannot locate large peptide molecules, this was demonstrated by means of crystallographic studies (Natesh et al. 2003).

Different ACEI peptides of blood protein of plasma have been previously isolated (Lee and Song 2003; Nakagomi et al. 2000; Park and Song 1997; Wanasundara et al. 2002), however, none of the identified peptide sequences in peak Ic, have been found in the

above mentioned studies, nor has there been any of them reported in a data base BIOPEP, which is responsible for collecting all the information concerning bioactive peptides with the academic literature, and which further has a list of 556 ACEI peptide sequences. This may be due to the differences in the substrate and the specificity of the enzyme used. In this study, it was used the Alcalase 2,4 L for the hydrolysis, an alkaline serine protease characterized by having a wide specificity, that hydrolyses the majority of peptide bonds, preferably those containing residues of aromatics and hydrophobic amino acids. This has been reported as the most effective enzyme for obtaining the ACEI peptides (Ahn et al. 2012; Hyun and Shin 2000; Ko et al. 2012).

ACEI stability under digestion conditions *in vitro*

Table 3 shows the analysis results of ACEI activity of BPH (DH 6,7%) and peak Ic, submitted to process of digestion *in vitro*. It is observed a decrease in ACEI activity of 18,7% for the BPH after the digestion *in vitro*, as compared with the hydrolysate without digestion. The ACEI activity of peak Ic, did not show significant differences before and after the digestion *in vitro*, which reflects the stability of this peptide fraction against digestive enzymes, and suggests that it could resist a physiological digestion after being ingested (Matsui et al. 2002).

Table 3 - ACEI activity of BPH (DH 6,7%) and peak Ic before and after digestion *in vitro*.

SAMPLE	ACEI (%)
BPH (DH 6,7%) without Digestion	50,2 ± 1,2 ^a
BPH (DH 6,7%) with Digestión	40,8 ± 1,0 ^b
Peak Ic without Digestión *	28,4 ± 1,4 ^c
Peak Ic with Digestión *	31,3 ± 1,3 ^c

^{a-c} The means with different hyper index are significantly different (p<0,05).

* ACEI activity obtained at the concentration of 0,1 mg/mL of proteins.

These results indicate that the BPH still has enough peptide bonds available for the action of pepsin and pancreatin, in as much as the hydrolysis of active peptides can be appearing. However there can be noted a high ACEI even after digestion (40,8 ± 1,0%). Peak Ic, on the contrary, seems not to have peptides susceptible to being degraded by digestive enzymes, which is quite reasonable since we are dealing with very little peptides (<1700 Da) and it has been reported that this kind of peptides can cross the intestinal barrier intact and they can show their biological functions (Vermeirssen et al., 2004). On the other hand, the cleavage sites for typical gastrointestinal proteinases have been well studied already, aminoacids F, L and E in the C-terminal for pepsin, peptide bonds with lateral aromatic or hydrophobic chains (Y, W, F and M) on the carboxyl end of the bond for the α -chymotrypsin, and peptide bonds with R or K in the C-terminal for the trypsin (Qi and He 2006). If we observe peptides present in peak Ic, we can notice that sequences S1 and S2, which could be the most susceptible to degradation by digestive enzyme because of having longer peptide sequences, they do not present the

preferred amino acids for this type of the enzymes in its C-terminal, which could make them stable before digestion *in vitro*.

We must point out that despite the simulation of gastric digestion not always ensures its activity *in vivo* of the sample analyzed, it is a good method for preliminary evaluation that helps understanding the possible changes in the structure and activity of peptides (Kouno et al. 2005).

CONCLUSIONS

In this study it was demonstrated that ACEI capacity of the bovine plasma can be increased by enzymatic hydrolysis with Alcalase 2,4 L, thus reaching maximum values when the DH is found around 6,7%, in this value the BPH presents an IC_{50} of 0,4mg/mL. It was possible identify a peptide fraction with great ACEI activity ($IC_{50} = 0,18$ mg/mL) which is made up of short peptides with consequences of 12 or less amino acid residues and molecular weights lower than 1700 Da. Additionally, we demonstrated that this fraction is resistant to digestion conditions *in vitro*.

AKNOWLEDGMENTS

We thank the Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) of Antioquia University (MDC 09-1-05) for funding, and the sustainability program 2013-2014. We also thank Dr. Juan J. Calvete (Instituto de Biomedicine de Valencia, España) and Dr. Bruno Lomonte (Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica) for their collaboration in the analysis through mass spectrometry.

REFERENCES

- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. Londres: Elsevier; 1986.
- Ahn CB, Jeon YJ, Kim YT, Je JY. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochem.* Forthcoming 2012.
- Aleixandre A, Miguel M, Muguerza B. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutr Hosp.* 2008; 23(4): 313-318.
- Burdock GA, Carabin IG, Griffiths JC. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology.* 2006; 221: 17-27
- Carey RM. Angiotensin Receptors and Aging. *Hypertension.* 2007; 50: 33-34.
- Catiau L, Traisnel J, Delval V, Chihib NE, Guillochon D, Nedjar N. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides.* 2011; 32(4): 633-638.
- Cooper WO, Hernandez S, Arbogast PG, Dudley JA, Dyer S, Gideon PS, et al. (2006). Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N Engl J Med.* 2011; 354(23): 2443-2451.
- Cushman DW, Cheung HS. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 1971; 20: 1637-1648.
- Eriksson J, Forsen T, Kajantie E, Osmond C, Barker D. Childhood Growth and Hypertension in Later Life. *Hypertension.* 2007; 49(6): 1415-1421.
- Ferreira SH, Bartelt DC, Greene L. Isolation of bradykininpotentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry.* 1970; 9: 2583-2593.
- Gomez JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int Dairy J.* 2004; 14: 1075-1080.

- Gómez LJ, Zapata JE, Figueroa OA. Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por Efecto de alcalasa® 2.4 L. Inf. Tecnol. Forthcoming 2013.
- He HL, Chen XL, Sun CY, Zhang YZ, Gao PJ. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresour Technol.* 2006; 97: 385-390.
- Hernández B, Recio I, Amigo L. β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids.* 2008; 35: 257-265.
- Hernández BL. Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas Mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2002.
- Del Hoyo P, Rendueles M, Diaz M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Sci.* 2008; 78: 522-528.
- Hyun C K, Shin HK. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* 2000; 36: 65-71.
- Kim YK, Yoon S, Yu DY, Lönnnerdal B, Chung BH. Novel angiotensinI-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α 1-casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.* 1999; 66: 431-439.
- Ko SC, Lee JK, Byun HG, Lee SC, Jeon YJ. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochem.* 2012; 47: 34-40.
- Kouno K, Hirano S, Kuboki H, Kasai M, Hatae K. Effects of dried bonito (*katsuo*) and captopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, on rat isolated aorta: a possible mechanism of antihypertensive action. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69: 911-915.
- Kuba M, Tana C, Tawata S, Yasuda M. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem.* 2005; 40: 2191-2196.
- Laffan RJ, Goldberg ME, High JP, Schaffer TR, Waugh M H, Rubin B. Antihypertensive activity in rats of SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *J Pharmacol Exp Ther.* 1978; 204: 281-288.
- Lee SH, Song KB. Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Irradiated Bovine Blood Plasma Protein Hydrolysates. *J food Sci.* 2003; 68(8): 2469-2472.
- Lee SH, Song KB. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysate s of porcine blood plasma protein. *Process Biochem.* 2009; 44: 378-381.
- Li GH, Le GW, Shi YH, Shrestha S. Angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res.* 2004; 24: 469-486.
- Lignitto L, Cavatorta V, Balzan S, Gabai G, Galaverna G, Novelli E, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water soluble extracts of asiago d'allevo cheese. *Int Dairy J.* 2010; 20(1): 11-17.
- Liu Q, Kong B, Jiang L, Cui X, Liu J. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *LWT-Food Sci Technol.* 2009; 42: 956-962.
- Márquez M, Vázquez M. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem.* 1999; 35(1): 111-117.
- Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *Nutr Biochem.* 2002; 13: 80-86.
- Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 1289-1295.
- Nakagomi K, Yamada R, Ebisu H, Sudakane Y, Akizawa T, Tanimura T. Isolation of acein-2, a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from a tryptic hydrolysate of human plasma. *FEBS Lett.*, 2000; 467: 235-238.
- Natesh R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature.* 2003 Jan 30; 421(6922): 551-554.
- Park E, Song KB. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from pig blood. *Agric Chem Biotech.* 1997; 40: 39-42.
- Qi W, He Z. Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Front Chem China.* 2006; 1(3): 308-314.

- Takami H, Akiba T, Horikoshi K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biot.* 1989; 30(2): 120-124.
- Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr.* 2004; 92: 357-366.
- Vinderola G, LeBlanc A, Perdígón G, Matar C. Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. In: Farnworth E, editor. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Ratón: CRC Press; 2008. p. 177-201.
- Wanasundara PKJPD, Ross ARS, Amarowicz R, Ambrose SJ, Pegg RB, Shand PJ. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ECA) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 6981-6998.
- Yagoub AA, Mohamed EB, Ahmed AHR, Tinay AH. Study on fururndu, a Traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 6143-6150.