

Proteínas de *Mucuna pruriens* con potencial de inhibir el sistema Renina-Angiotensina

16

Mucuna pruriens proteins with potential to inhibit renin-angiotensin system

Evelin Castillo Yam^{1,2}, David Abram Betancur Ancona² y Maira Rubí Segura Campos²

¹Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera Xmatkuil Km 15., Apdo Postal 116, CP 97315, Mérida, Yucatán, México.

²Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico norte Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn, CP 97203, Mérida, Yucatán, México. Email: maira.segura@uady.mx

Enviado: 07/08/2013 Recibido: 14/10/2013

Resumen

Se evaluó la capacidad inhibitoria de la renina y la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), así como el efecto hipotensor de tres hidrolizados obtenidos a partir del concentrado proteínico de *Mucuna pruriens*. Se determinó la composición proximal del concentrado proteínico de *M. pruriens* y se utilizaron las enzimas pepsina y pancreatina para la obtención de hidrolizados extensivos. Se determinó el grado de hidrólisis (GH), el perfil de aminoácidos, la concentración necesaria para inhibir la actividad de la ECA-I y renina en un 50% (IC₅₀) así como el efecto hipotensor en ratas. Los tres hidrolizados tuvieron potencial inhibitorio de la ECA-I (IC₅₀: 8.04-203.64 µg/mL) y renina (IC₅₀: 99.94-252.97 µg/mL), siendo el hidrolizado de pepsina el de mayor bioactividad in vitro. La evaluación en ratas demostró la actividad hipotensora de los hidrolizados después de la semana 7 de tratamiento.

Palabras clave: *Mucuna pruriens*, renina, ECA-I, hipertensión, hidrolizados proteínicos.

Abstract

The renin and angiotensin converting enzyme (ACE-I) inhibitory activities as well as the hypotensive effect of three hydrolysates obtained from *M. pruriens* protein concentrate was evaluated. The proximate composition of *M. pruriens* protein concentrate was determined and the commercial enzymes pepsin and pancreatin were used to obtain extensive hydrolysates. The degree of hydrolysis (DH), the amino acid profile, the concentration required to inhibit the ACE-I and renin activity by 50% (IC₅₀) was determined as well as the hydrolysates hypotensive effect in rats. The three hydrolysates had inhibitory potential of ACE-I (IC₅₀: 8.04-203.64 mg/mL) and renin (IC₅₀: 99.94-252.97 mg/mL) being pepsin hydrolysate, the best in vitro biological activity. The evaluation in rats showed the hypotensive activity of the hydrolysates after seven weeks of treatment.

Keywords: *Mucuna pruriens*, renin, ACE-I, hypertension, protein hydrolysates.

La hipertensión arterial es una enfermedad multifactorial cuyo tratamiento se basa en la inhibición farmacológica del Sistema Renina Angiotensina en tres puntos: Enzima Convertidora de Angiotensina I, acción directa de la Angiotensina II y renina¹. En la actualidad, la industria alimentaria busca mejorar la calidad nutrimental así como mejorar las propiedades biofuncionales de los alimentos con la finalidad de contribuir con el estado de salud de los consumidores; principalmente en el desarrollo de productos preventivos o de control para alteraciones como la diabetes tipo II, HTA y enfermedades cardíacas. La HTA es el principal factor de riesgo en el desarrollo de infarto, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades coronarias, enfermedad vascular periférica y falla renal, cuyo tratamiento ineficiente tiene elevado riesgo de mortalidad^{2,3}. La obtención de péptidos bioactivos debe cumplir dos criterios: 1) añadir valor a proteínas poco convencionales abundantes y 2) usar proteínas con secuencias aminoácidas de interés farmacológico⁴. La *Mucuna pruriens* es una leguminosa tropical utilizada como alimento animal y cultivo de cobertura; posee gran potencial por su calidad nutrimental comparada con otras leguminosas comunes; soporta diferentes condiciones de estrés ambiental; tiene un elevado rendimiento de semillas y su uso está limitado por el contenido de factores antinutrimientales^{5,6}. En los últimos años se han desarrollado tratamientos para la detoxificación de las semillas para su uso alimentario representando un recurso proteínico alternativo⁷. La obtención de concentrados proteínicos de esta leguminosa permite el incremento del 25 al 55% de proteína con la reducción de factores antinutrimientales y la versatilidad de sus propiedades funcionales debidas a su composición aminoácida^{8,9}. Se han reportado cinéticas de hidrólisis enzimática de concentrados de *M. pruriens*, utilizando alcalasa®, flavourizima®, pepsina y pancreatina que indican el potencial de los hidrolizados como fuente de péptidos biofuncionales^{8,10}. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de inhibición, in vitro, sobre la ECA-I y la renina de tres hidrolizados proteínicos de *M. pruriens*, además de evaluar el efecto hipotensor de los mismos utilizando ratas como modelo experimental.

Materiales

Los granos de frijol terciopelo (*M. pruriens*) fueron adquiridos del estado de Campeche, México. Las enzimas pepsina (9001-75-6) y pancreatina (8049-47-6) de origen porcino, ortoftaldialdehído (OPA) (643-79-8), Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL) (207386-83-2), ECA-I 2U (9015-82-1), D-L- α -aminobutírico (1492-24-6) y captopril (62571-86-2) provienen de Sigma-Aldrich. El kit Renin Inhibitor Screening Assay se adquirió de Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. El alimento balanceado Harlan Teklad Global Diets® se obtuvo de Harlan Laboratories. Se utilizó una columna cromatográfica C18 en fase reversa, tamaño de partícula 4 μ m, 300x3.9mm marca Nova Pack, modelo WAT011695. Se usaron 30 ratas hembra de la raza Wistar-Kyoto de 60 días de edad y peso 255.4 \pm 21.7g (Bioterio del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi). Se utilizó un electro esfigmomanómetro para ratas, modelo Kent Scientific CODA Standar no-invasivo para presión, adquirido de Científica Senna. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL-FM-UAEM) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), "Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" así como todas las regulaciones federales e institucionales.

Concentrado proteínico

El concentrado proteínico se obtuvo mediante fraccionamiento en húmedo empleando granos de *M. pruriens* descascarillados y molidos para obtener una harina que se suspendió en bisulfito de sodio al 3% en una relación 1:10 p/v. La suspensión resultante se ajustó a pH 11 con NaOH 1N y se agitó por 1h. Se filtró la suspensión en tamices No. 80 y No. 100 para separar la proteína y almidón de la fibra, el residuo se lavó con 1L de la suspensión de bisulfito y el filtrado se incorporó a la mezcla de almidón y proteína. La suspensión de almidón-proteína se dejó reposar hasta la completa sedimentación del almidón. Se separó el sobrenadante rico en proteína del sedimento rico en almidón. Al sobrenadante rico en proteína se le ajustó el pH a 4.6 con HCl 1N y se centrifugó a 1,317g por 15min. El precipitado obtenido se secó a -47°C y 13x10⁻³ mbar en una liofilizadora¹¹.

Composición proximal

La composición química del concentrado proteínico de *M. pruriens* se determinó de acuerdo a los procedimientos oficiales descritos por la A.O.A.C¹² que comprende: humedad (método 925.09), proteína (954.01), grasa (920.39), fibra (962.09), cenizas (923.03) y extracto libre de nitrógeno (ELN) calculado por diferencia.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó utilizando las enzimas pepsina y pancreatina de manera individual y secuencial. Los parámetros usados para la digestión fueron: suspensión del concentrado proteínico al 5% (p/v) de

acuerdo a su contenido en proteína, relación 1:10 v/v de enzima/sustrato, 37°C y 90min de hidrólisis. El pH se ajustó según el tratamiento, pepsina pH 2 y pancreatina pH 7. La hidrólisis secuencial se realizó mediante la digestión en los primeros 45min de pepsina seguida de la incubación con pancreatina en los últimos 45min. La reacción se detuvo por calentamiento a 80°C por 20min. Los hidrolizados obtenidos fueron centrifugados a 16,211g a 4°C por 30min. Los sobrenadantes se secaron a -45°C y 133x10⁻³ mbar en un liofilizadora¹³.

Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó mediante la técnica del O-ftaldialdehído (OPA)¹⁴ con modificaciones, determinando el número de grupos aminos libres mediante la fórmula: $GH = h/h_{tot} \times 100$, donde h es la concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína y h_{tot} es el número de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *M. pruriens*. El factor h_{tot} es dependiente de la composición aminoacídica del material; para el frijol terciopelo $h_{tot} = 7.61$ mmol/g de proteína.

Actividad inhibidora de la ECA-I

Se determinó mediante la hidrólisis de Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL) hasta ácido hipúrico e His-Leu por acción de la ECA-I¹⁵. Este método se basó en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con 2, 4, 6-tricloro-triazina (TT). Se preparó una solución de ECA-I 100mU/mL. El HHL se preparó a una concentración de 0.3% (p/v) en una mezcla de buffer (fosfato de potasio 40μM y cloruro de sodio 300μM, pH 8.3). Se preparó un buffer de fosfato de potasio 0.2M a pH 8.3, así como una solución al 3% (p/v) de TT en dioxano. La inhibición de ECA-I se determinó siguiendo las condiciones establecidas para cada microtubo descrito en la Tabla 1. Una vez adicionado el buffer de fosfato a las muestras, se agitó vigorosamente 10s y se centrifugaron a 10,000g por 20min. La absorbancia se leyó a 382nm. La concentración de hidrolizado en mg de proteína/ml requerido para producir el 50% de inhibición (IC₅₀) de la ECA-I, se calculó con el porcentaje de inhibición de la ECA-I empleando la fórmula:

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

Donde A es la absorbancia de la muestra, B es la absorbancia del testigo y C es la absorbancia del blanco. Se graficó la concentración de hidrolizado en mg proteína/ml contra el porcentaje de inhibición de la ECA-I correspondiente para obtener la ecuación de la recta ($Y = mx + b$) y con ello se calculó la concentración necesaria para inhibir la actividad enzimática en un 50% (IC₅₀) de cada hidrolizado:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Actividad inhibidora de renina

La actividad inhibidora de renina se determinó empleando el kit Renin Inhibitor Screening Assay¹⁶. El buffer de trabajo se preparó disolviendo éste en agua grado HPLC,

1:10 (v/v). El contenido final del buffer de trabajo fue de 50mM de Tris-HCl, pH 8 y 100mM de NaCl. La solución proteínica de renina se diluyó 1:20 (v/v) con este buffer. La solución de renina se atemperó a 37°C. La microplaca se llenó como se indica: blanco (20μL de sustrato, 160μL de buffer de renina y 10μL de agua), actividad máxima (20μL de sustrato, 150μL de buffer de renina y 10μL de agua) y celda de inhibición (20μL de sustrato, 150μL de buffer de renina y 10μL de hidrolizado). La reacción se inició al añadir renina a los pocillos de actividad máxima y celdas de inhibición. La microplaca se agitó por 10s para homogenizar y se dejó incubar por 15min a 37°C. La intensidad de fluorescencia (IF) se midió a 340nm (excitación) y 500nm (emisión). El porcentaje de inhibición se calculó restando el promedio de fluorescencia de la celda blanco a las muestras y la celda de actividad máxima, y se aplicó la ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{IF \text{ de la actividad máxima} - IF \text{ de la muestra}}{IF \text{ de la actividad máxima}} \times 100$$

Se graficó la concentración de hidrolizado en mg proteína/ml contra el porcentaje de inhibición de la renina correspondiente para obtener la ecuación de la recta ($Y = mx + b$) y con ello se calculó el IC₅₀ de la renina:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Composición aminoacídica

Se prepararon disoluciones de las muestras, se tomaron 100μL de las alícuotas con un contenido de proteína de 2μg/μL. Se hidrolizaron en viales con 600μL de HCl 12N y se añadió 10μL de D-L-α-aminobutírico como estándar interno. Las soluciones fueron cerradas bajo atmósfera de nitrógeno, se incubaron en una estufa a 110°C durante 20h y posteriormente, se evaporó el ácido en una estufa con vacío a 80°C. Los aminoácidos fueron determinados mediante derivatización con etoximetilenmalonato de dietilo por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa. Se utilizó un sistema de gradiente binario con los solventes acetato de sodio 25mM (A) (azida de sodio 0.02%, pH 6) y acetonitrilo (B), a una velocidad de flujo de 0.9mL/min. Estas fases móviles se inyectaron en los siguientes intervalos: 0.0-3.0min, gradiente lineal desde 91:9 a 86:14 A/B; 3.0-13.0min, gradiente constante 86:14 A/B; 13.0-30.0min, gradiente lineal desde 86:14 a 69:31 A/B; 30.0-35.0min, gradiente constante 69:31 A/B¹⁷. Para la determinación del triptófano se pesó 3 mg de muestra y se añadió 1mL de NaOH 4N. La hidrólisis se efectuó en viales cerrados bajo atmósfera de nitrógeno a 110°C durante 4h. El contenido del vial se lavó con 2mL de buffer borato de sodio 1M (0.02% azida de sodio, pH 9) y se ajustó a pH 7 con HCl 12N. Se diluyó con buffer borato de sodio aforándolo a 10mL, se filtró e inyectó una alícuota de 20μL para realizar la determinación. Se utilizó una relación de solventes de acetato de sodio 25mM (azida de sodio 0.02%, pH 6) (A) y acetonitrilo (B), a una velocidad de flujo de 0.9mL/min. Se empleó un gradiente isocrático

constituido en una proporción 91:9 A/B, el análisis se realizó a temperatura ambiente¹⁸. Las determinaciones se efectuaron con una columna cromatográfica C18 en fase reversa a 280nm.

Efecto hipotensor

Se utilizaron ratas normotensas (n=6 por tratamiento) colocadas en jaulas individuales de plástico con rejillas de acero inoxidable. Las condiciones ambientales del bioterio fueron de 25°C con ciclos de luz-oscuridad natural durante el experimento. Las ratas tuvieron consumo de agua ad libitum. En la semana de adaptación al sistema experimental los animales se alimentaron con la dieta comercial. Se administraron dietas de los hidrolizados (pepsina, pancreatina y secuencial) y captopril con dosis de 10mg/kg, adicionalmente se contó con un grupo testigo. Se prepararon 7 croquetas para la dosis diaria por semana de cada uno de los animales. Se utilizó alimento pulverizado que se reconstituyó en una relación de 4g de harina, 3mL de agua y 10mg/kg de proteína del hidrolizado en base seca por croqueta de acuerdo al peso de cada rata. Una vez formadas las croquetas se llevaron a la estufa a 80°C por 4h. Los pesos de las ratas fueron registrados una vez por semana para ajustar la dosis con el peso ganado. La medición de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se realizó mediante la técnica del manguito de la cola utilizando un electro esfigmomanómetro. Las mediciones se determinaron una vez a la semana durante ocho semanas, la primera medición correspondió a la basal, cuando las ratas no habían sido administradas con los tratamientos. Se tomaron 10 mediciones efectivas por rata y se determinaron las medias.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Los datos obtenidos de la hidrólisis del concentrado proteínico y de las actividades biológicas se evaluaron mediante análisis de varianza y una comparación de medias por el método de Duncan para establecer las diferencias entre los tratamientos. Todos estos análisis se efectuaron utilizando el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 y de acuerdo a los métodos señalados por Montgomery¹⁹.

Composición proximal

El análisis de la composición proximal del concentrado proteínico de *M. pruriens* se realizó por duplicado. El contenido de humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas y ELN fue de 4.36±0.08%, 53.24±0.08%, 17.08±0.22%, 1.85±0.48%, 13.34±0.22% y 14.49±0.56%, respectivamente. El concentrado proteínico presentó una cantidad de proteína, grasa cruda y fibra cruda similar a la reportada por Tovar⁸ y Galicia¹⁰, excepto por el contenido

de cenizas. Bressani²⁰ señala que existe una variación considerable en los niveles de minerales para este género. El mayor contenido en cenizas del concentrado obtenido en este experimento puede deberse a una mayor cantidad de minerales presentes.

Grado de hidrólisis

La hidrólisis enzimática del concentrado proteínico a 90 min registró valores de GH de 15.34±0.23, 17.80±0.32 y 21.36±0.39% para pepsina, pancreatina y pepsina-pancreatina (secuencial), respectivamente. Se encontró diferencia estadística significativa (p<0.05) entre los tres hidrolizados. De acuerdo con Pedroche y col.²¹, los tres hidrolizados se clasificaron como extensivos ya que registraron un GH >10 % y por tanto son una alternativa como fuente de péptidos bioactivos. Las diferencias significativas en los valores de GH de los distintos tratamientos puede deberse a la actividad hidrolítica de las enzimas utilizadas. Tal como lo señalan Megías y col.¹³, la actividad hidrolítica de la pepsina es muy alta en los primeros 10 minutos de la reacción y disminuye conforme avanza el tiempo, mientras que la actividad proteolítica de la pancreatina se puede observar después de 3 h de incubación debido a que la pancreatina es un conjunto de enzimas (amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa) cuya acción combinada permite la hidrólisis del sustrato por más tiempo. Los resultados obtenidos en los hidrolizados de *M. pruriens* concuerdan con las actividades proteolíticas de las enzimas, observándose un menor GH con el tratamiento de pepsina y el mayor con el tratamiento secuencial.

Actividad inhibitoria de la ECA-I

La actividad inhibitoria de la ECA-I de los hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo registró valores de IC₅₀ en un rango de 8.04-203.64µg/mL de proteína (Fig. 1). Estudios previos con *M. pruriens* determinaron los valores de IC₅₀ para la ECA-I de hidrolizados con sistemas alcalasa[®] y flavourzima[®], así como con pepsina y pancreatina. Los IC₅₀ obtenidos en este estudio son menores a los reportados para alcalasa 120min (589µg/mL de proteína)¹⁰, flavourzima 120min (630µg/mL de proteína)¹⁰ y alcalasa-flavourzima 90min (940µg/mL de proteína)¹⁰, así como para el hidrolizado de pepsina 10min (2630µg/mL de proteína)⁸ y pancreatina 120min (4300µg/mL de proteína)⁸. La diferencia entre los resultados se debe a dos factores, las distintas proteasas utilizadas y el tiempo de hidrólisis. Las enzimas pueden favorecer la liberación de ciertos péptidos, debido a los distintos sitios de corte de cada enzima en particular. Se ha demostrado que las enzimas gastrointestinales son capaces de liberar péptidos inhibidores de ECA-I²². Por tal razón, es posible que los péptidos liberados por la alcalasa[®] y flavourzima[®] tengan una actividad inhibitoria para ECA-I menor a las registradas en este trabajo. El tiempo también es fundamental en la obtención de hidrolizados extensivos¹³, ya que permite mayor cantidad de cortes por acción de

la enzima en los sustratos lo que resulta en la obtención de péptidos de menor tamaño asociados con actividad inhibitoria de la ECA-I^{4,22}. De tal modo, el tiempo de hidrólisis pudo ser el principal factor que generó mayor actividad biológica en el presente estudio con respecto al estudio realizado por Tovar⁸. Frente a otras fuentes vegetales, los hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* registraron un potencial inhibidor de la ECA-I similar a la de biopéptidos de *Phaseolus vulgaris* (0.11-319.91 µg/mL)²³ y *Phaseolus lunatus* (6.9-56 µg/mL)²⁴.

Actividad inhibitoria de renina

La actividad inhibitoria de la renina registró valores de IC₅₀ en un rango de 99.94-252.97 µg/mL de proteína y se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los tres hidrolizados (Fig. 1). Algunos estudios de hidrolizados proteínicos de linaza con tripsina y pronasa reportan IC₅₀ para la actividad inhibitoria de renina con valores moderados (1220-2810 µg/mL de proteína)¹⁶, también se ha reportado la presencia de péptidos inhibidores de renina en hidrolizados de chícharos y semillas de cáñamo⁴. De las leguminosas reportadas en la literatura, *Vigna unguiculata* (360 µg/mL)²⁵ y *Phaseolus vulgaris* (270-420 µg/mL)²⁵ tienen la mayor actividad biológica para la inhibición de renina. De acuerdo con estos estudios, los hidrolizados de *M. pruriens* tienen una capacidad de inhibición de renina superior respecto a otras fuentes, siendo el hidrolizado de pepsina el que posee el menor valor de IC₅₀. La composición aminoacídica del concentrado proteínico de *M. pruriens* y las enzimas utilizadas en la hidrólisis parece justificar la mayor actividad biológica en este estudio. Por otra parte, los valores de IC₅₀ reportados por Takahasi y col.²⁵ se obtuvieron de extractos de *Vigna unguiculata* y *Phaseolus vulgaris* y no mediante hidrólisis enzimática como en este estudio.

Composición aminoacídica

El perfil de aminoácidos de los hidrolizados proteínicos (Tabla 2) indicó que la tirosina fue el aminoácido mayoritario en los mismos registrando valores de 35.53, 45.85 y 50.49g/100g de proteína para el hidrolizado de pepsina, pancreatina y secuencial, respectivamente. El hidrolizado de pepsina presentó la mayor cantidad de lisina (5.76g/100g de proteína), arginina (4.38g/100g de proteína), triptófano (1.38g/100g de proteína) y fenilalanina (1.00g/100g de proteína). Mientras que el hidrolizado de pancreatina presentó la mayor cantidad de prolina (0.58g/100g de proteína), leucina (1.47g/100g de proteína) e isoleucina (3.38g/100g de proteína). La mayoría de los péptidos inhibidores de la ECA-I son secuencias relativamente cortas que contienen de 2-12 aminoácidos. Los inhibidores más efectivos contienen tirosina, fenilalanina, triptófano o prolina en el extremo -COOH. Además, los aminoácidos alifáticos leucina, isoleucina y valina son predominantes en éstos; la carga positiva de la lisina y arginina en el extremo -COOH contribuye a la potencia inhibitoria debido a que los biopéptidos cargados positiva-

mente pueden interactuar con sitios aniónicos uniéndose alostéricamente a la ECA-I^{4,16,22}. Las evidencias encontradas por Li y Aluko¹⁶ sugieren que la presencia de aminoácidos con carga positiva contribuye a una mayor inhibición de la actividad de renina. Otros estudios demuestran que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos de bajo peso molecular en el extremo -NH₂ (isoleucina, leucina, valina y alanina) y aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) son requeridos en el extremo -COOH para potenciar su acción contra la renina humana⁴. Estos hallazgos indican una similitud estructural en los péptidos inhibidores de ECA-I e inhibidores de renina, aunque no se ha encontrado asociación en las actividades inhibitorias de éstos. La predominancia de tirosina en los hidrolizados de *M. pruriens* parece permitir la inhibición de la ECA-I, hecho confirmado con los valores IC₅₀ obtenidos. De los aminoácidos relacionados con la capacidad de inhibición de la ECA-I y renina, el triptófano, la lisina, arginina y fenilalanina se presentaron en niveles más elevados en el hidrolizado de pepsina, lo que pudo favorecer su actividad biológica en ambas enzimas respecto a los otros hidrolizados. La prolina, leucina e isoleucina fueron los aminoácidos relacionados con efectos antihipertensivos encontrados en niveles más elevados en el hidrolizado de pancreatina.

Efecto hipotensor

El efecto de la ingesta a largo plazo de los hidrolizados sobre la presión arterial diastólica (PAD) y sistólica (PAS) se muestra en la Figura 2. El efecto del tratamiento farmacológico sobre la PAD y PAS se observó a la semana seis del tratamiento mostrando una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre el grupo que recibió el tratamiento de captopril con respecto al resto de los tratamientos. El efecto hipotensor de los hidrolizados se confirmó a la semana siete de tratamiento, demostrándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo testigo y los hidrolizados en la PAS y PAD. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la disminución de la PAS y PAD entre el grupo administrado con captopril y los hidrolizados. Aunque históricamente se ha hecho énfasis en el tratamiento de la PAD por considerarse el principal riesgo de eventos cardiovasculares, se ha demostrado que la PAS también es un importante factor de riesgo para dichas enfermedades³. Los efectos fisiológicos de los biopéptidos dependen de su habilidad para llegar en su forma activa a los órganos blancos. Esto implica que deben resistir la hidrólisis por las enzimas gastrointestinales y las peptidasas de las células epiteliales ciliadas, así como la absorción en el epitelio intestinal. Se ha demostrado que varios péptidos son resistentes a todos estos procesos y llegan a la circulación²². Isshiki y col.²⁶ han estudiado el efecto crónico y agudo de un fármaco antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas, demostrando el descenso significativo de la presión arterial media y la resistencia periférica total por el tratamiento agudo y a largo plazo en ambas cepas de ratas. Numero-

Los estudios en ratas han sido diseñados para demostrar el efecto hipotensor de péptidos inhibidores de la ECA-I provenientes de proteínas de leche. Algunos estudios a largo plazo demuestran la atenuación de la hipertensión en SHR hasta la semana seis²⁷. Sipola y col.²⁸ han demostrado el efecto antihipertensivo de tripéptidos derivados de la leche y leche fermentada después de doce semanas de administración. Miguel y col.² han demostrado la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) con la administración de leches fermentadas después de diez semanas. Los bioensayos de preparaciones vasculares en ratas sugieren que el mecanismo antihipertensivo de los tripéptidos derivados de la leche es la inhibición de la ECA-I, señalando la existencia de otros mecanismos²⁸. Udenigwe y col.²⁹ sugieren que la presencia de arginina en los péptidos antihipertensivos permite la regulación de la presión arterial mediante la formación de óxido nítrico (NO) en el endotelio vascular por la vía de L-arginina-NO, donde la arginina es convertida a NO que posee propiedades vasodilatadoras. Algunos estudios del efecto antihipertensivo agudo en SHR con biopéptidos de fuentes vegetales demuestran efecto con la administración de 200mg/kg de peso corporal de hidrolizados de semillas de cáñamo y linaza^{4,29}. El efecto hipotensor a largo plazo se consiguió en la semana siete, demostrando que los biopéptidos generados por la hidrólisis enzimática de *M. pruriens* fueron resistentes a las enzimas gastrointestinales y peptidasas del epitelio intestinal. Los resultados obtenidos demuestran una disminución de la PAD y PAS con la administración de 10mg/kg de peso corporal de los hidrolizados. Estos resultados son alentadores pues otros estudios de fuentes vegetales requieren de dosis mayores para observar el efecto antihipertensivo. Se ha reportado el desarrollo de efectos secundarios adversos con la administración oral de fármacos inhibidores de la ECA-I, tales como el aumento en los niveles de potasio, disfunción renal, tos, angioedema, erupciones en la piel y anomalías fetales²⁹. El efecto hipotensor del captopril y de los hidrolizados no presentó diferencias significativas en la semana siete, de manera que la administración de hidrolizados frente al fármaco mostró el mismo efecto con la ventaja de ser de un producto natural que ofrece seguridad y el beneficio adicional de los péptidos como fuente de aminoácidos esenciales⁴.

Tabla 1. Orden de adición de reactivos para la inhibición de la ECA-I

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

Tabla 2. Composición aminoacídica de los hidrolizados de *M. pruriens*.

Aminoácido	Pepsina	Pancreatina	Secuencial
Ácido aspártico	10.18	11.43	10.31
Ácido glutámico	8.48	7.92	7.51
Serina	7.98	5.91	5.32
Histidina	4.08	2.11	2.25
Glicina	4.48	5.18	3.23
Treonina	8.01	2.10	2.67
Arginina	4.38	2.28	2.37
Alanina	2.35	2.99	1.60
Prolina	0.37	0.58	0.52
Tirosina	35.53	45.85	50.49
Valina	ND	ND	ND
Metionina	ND	ND	ND
Cisteína	2.40	3.74	2.5
Isoleucina	2.32	3.38	2.52
Triptófano	1.38	0.43	2.59
Leucina	1.31	1.47	1.41
Fenilalanina	1.00	0.91	0.43
Lisina	5.76	3.74	4.27

ND: No detectado

Figura 1. Valores de IC₅₀ registrados al evaluar la actividad inhibitoria de la ECA y renina de hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens*.
^{a-c} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa (p<0.05).

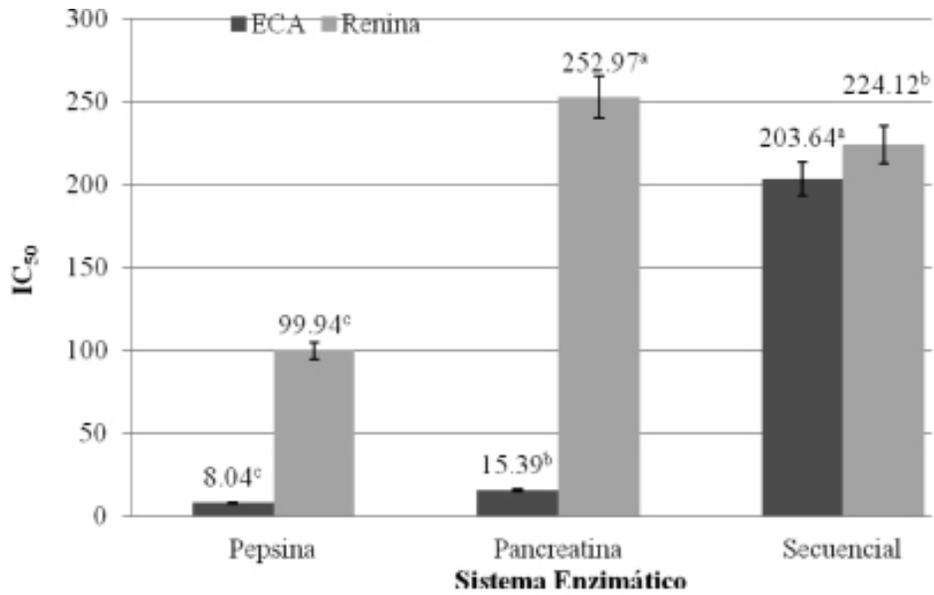
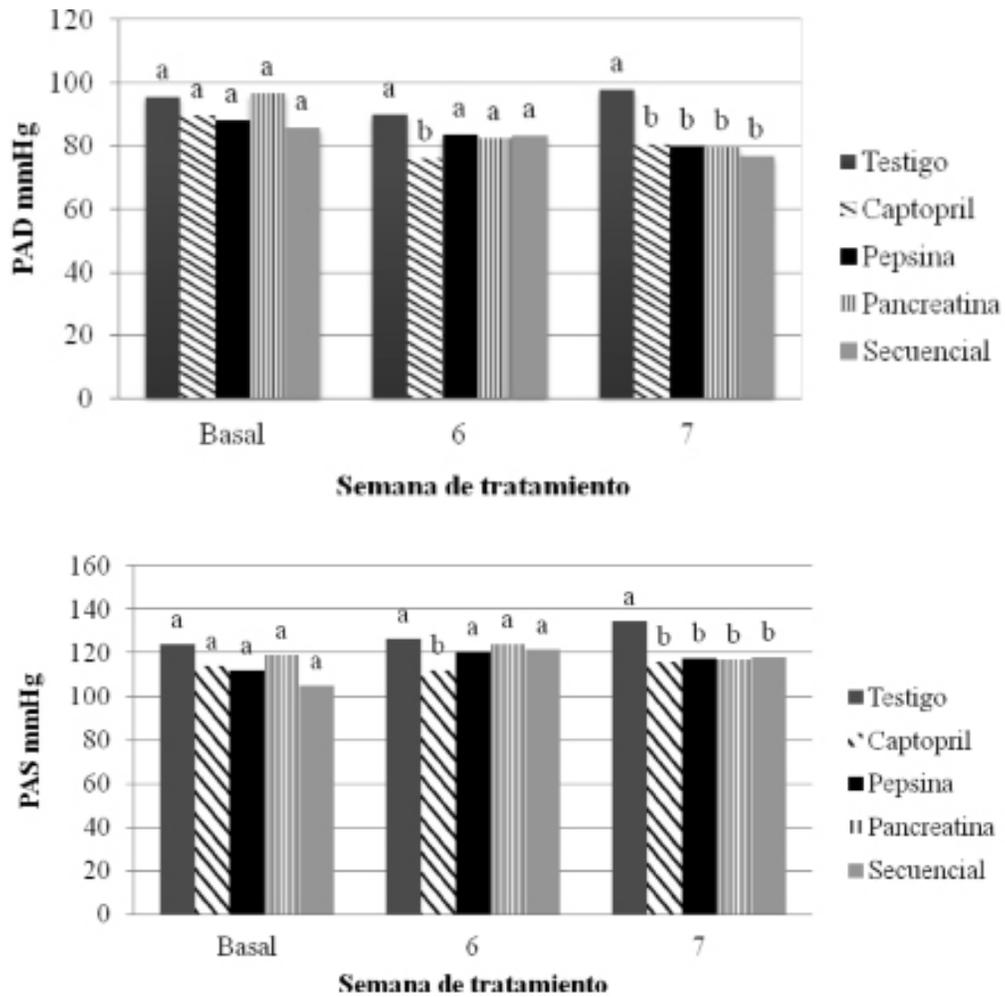


Figura 2. Efecto de la ingesta a largo plazo de los hidrolizados de *M. pruriens* en la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de ratas normotensas. Los datos representan la media de n=6 en cada grupo. ^{a-b} Letras diferentes en la misma semana indican diferencia estadística significativa (p<0.05).



La inhibición enzimática del sistema renina-angiotensina *in vitro* con hidrolizados de *M. pruriens* registró valores comparables a otras fuentes vegetales reportadas en la literatura. La composición aminoacídica demostró el potencial de los hidrolizados de *M. pruriens* como fuente de péptidos antihipertensivos debido a la presencia de tirosina como aminoácido mayoritario y principal contribuyente de la potencia inhibidora de la ECA-I y renina. El estudio *in vivo* en ratas normotensas puso de manifiesto el efecto biológico hipotensor de los hidrolizados, así como su estabilidad y resistencia a las enzimas gastrointestinales y peptidasas de las células epiteliales intestinales. La hidrólisis enzimática con pepsina del concentrado proteínico registró el mayor potencial inhibidor de la ECA-I y renina resultando una alternativa viable como alimento funcional o nutraceutico en la prevención y/o tratamiento de la hipertensión. Debido a que la hipertensión es una patología crónica que requiere un tratamiento cotidiano, la administración a largo plazo de productos funcionales sin efectos adversos es una posibilidad muy atractiva en el tratamiento de la misma, siendo el frijol terciopelo una alternativa promisoriosa en la obtención de péptidos antihipertensivos.

Agradecimientos

Al proyecto CONACYT-Ciencia básica (154307): Investigación científica dirigida al desarrollo de derivados proteínicos de *Mucuna pruriens* con potencial actividad biológica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas asociadas al sobrepeso y la obesidad. Al CONACYT por el otorgamiento de la beca (320489).

Referencias

1. Gradman, A.H., Kad, R. (2008). Renin inhibition in hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 (5).
2. Miguel, M., Mugerza, B., Sánchez, E., Delgado, M.A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M.A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Bri. J. Nutr.* 94, 36-43.
3. Lloyd-Jones, D.M., Evans, J.C., Larson, M.G., O'Donnell, C.J., Roccella, E.J., Levy, D. (2000). Differential control of systolic and diastolic blood pressure: factors associated with lack of blood pressure control in the community. *Hypertension.* 36, 594-599.
4. Udenigwe, C., Aluko, R. (2011). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potencial health benefits. *J. Food Sci.* 00 (0) R1-R14.
5. Pugalenti, M., Vadivel, V., Siddhuraju, P. (2005). Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis- a review. *Plant Foods Hum Nutr.* 60, 201-218.
6. Eilitä, M., Carsky, R.J. (2003). Efforts to improve the potencial of *Mucuna* as a food and feed crop: background to the workshop. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 1, 47-55.
7. Ahenkora, K., Dadzie, M., Osei-Bonsu, P. (1999). Composition and functional properties of raw and heat processed velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC. var utilis) flours. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34 (2) 131-135.
8. Tovar Benítez, T. (2011). Tecnofuncionalidad y biofuncionalidad de hidrolizados proteínicos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.
9. Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S., Martínez, J.A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum Nutr.* 51, 331-342.
10. Galicia Martínez, S.G. (2011). Evaluación *in vivo* de la actividad antihipertensiva de hidrolizados proteínicos de la leguminosa *Mucuna pruriens*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.
11. Betancur, A.D., Gallegos, T.S., Chel, G.L. (2004). Wet fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1193-1201.
12. AOAC International. (1997). Official Methods of Analysis of AOAC International. Washinton, D.C. William Horwitz Editor.
13. Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide alters hydrolysis of sunflower (*Helianthus annus* L.) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 52 (7) 1928-1932.
14. Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.* 66 (5), 642-646.
15. Hayakari, M., Kondo, Y., Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay for Angiotensin- converting enzyme. *Anal. Biochem.* 84, 361-369.
16. Li, H, Aluko, R. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11471-11476.
17. Alaiz, M., Navarro, J.L., Girón, J., Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *J. Chromatogr.* 591, 181-186.
18. Yust, M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J., Millán, F., Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chem.* 85, 317-320.
19. Montgomery, D.C. (2012). Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley.
20. Bressani, R. (2002). Factors influencing nutritive value in food grains legumes: *Mucuna* compared to other grain legumes. En Flores, M., Eilittä, M., Myhrman, R., Carew, L., Carsky, R., Food and Feed from *Mucuna* current uses and the way forward. Proceedings of an international workshop: (164-188). Tegucigalpa, Honduras.
21. Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., Alaiz, M., Millán, F. (2003). Plant protein hydrolysates and Tailor-made foods. *Elect. J. Env. Agricult. Food Chem.* 2 (1) 233-235.
22. Hernández-Ledesma, B., Contreras, M.M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 165, 23-35.
23. Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J, Gutiérrez-Dorado, R, Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained

from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT-Food Sci Technol.* 46, 91-96.

24. Torruco, J.G. (2009). Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol Jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México, Distrito Federal.
25. Takahashi, S., Hori, K., Kumagai, M., Wakabayashi, S. (2007). Human renin inhibitory activity in legumes. *J. Biol. Macromol.* 7 (3) 49-54.
26. Isshiki, T., Pegram, B. L., Frohlich, E.D. (1988). Immediate and prolonged hemodynamic effects of TA-3090 on spontaneously hypertensive [SHR] and normal Wistar-Kyoto [WKY] rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2 (4) 539-547.
27. FitzGerald, R.J, Murray, B.A., Walsh, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134, 980S-988S.
28. Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., Norminen, M.L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 52 (4) 745-754.
29. Udenigwe, C.C., Adebisi, A.P., Doyen, A., Li, H, Bazinet, L., Aluko, R. (2012). Low molecular weight flaxseed protein derived arginine containing peptides reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats faster than amino acid from arginine and native flaxseed protein. *Food Chem.* 132, 468-475.
30. Bamdad, F., Dokhani, Sh., Keramat, J., Zareie, R. (2009). The impact of germination and in vitro digestion on the formation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared with whey proteins. *Int J Biol Life Sci,* 5 (2) 52-62.