



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA

Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado de la proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) azufrado Higuera en sistemas biológicos con ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

TESIS

Como requisito parcial para obtener
el grado de:

**Doctorado en Ciencias en
Biotecnología**

PRESENTA

M. en C. Paola Valenzuela García

Guasave, Sinaloa, México

Junio del 2017





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 08 del mes de junio del año 2017, la que suscribe Paola Valenzuela García alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B101548, adscrita al CIIDIR Unidad Sinaloa, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Sergio Medina Godoy y Dr. Ismael Antonio Lares Asef, la autora del presente cede los derechos del trabajo titulado "Evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado de la proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) azufrado Higuera en sistemas biológicos con ratas espontáneamente hipertensas (SHR)", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: valenzuela-garcia@hotmail.com; smedinam@ipn.mx e ismaelares@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and curves, positioned above a horizontal line.

M. en C. Paola Valenzuela García



SIP-13-BIS

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

Guasave, Sinaloa a 9 de junio del 2017

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión Ordinaria No. 6 celebrada el día 08 del mes de Junio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

VALENZUELA
Apellido paterno

GARCIA
Apellido materno

PAOLA
Nombre (s)

Con registro:

B	1	0	1	5	4	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

- 1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
“Evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado de la proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) azufrado Higuera en sistemas biológicos con ratas espontáneamente hipertensas (SHR)”.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

A partir de hidrolizados proteicos de frijol azufrado Higuera se aislará una fracción peptídica de tamaño de 3 kDa, este será el material importante de estudio donde primero se le realizarán estudios de caracterización química y algunas evaluaciones *in vitro* para medir la capacidad iECA, posteriormente se evaluará el efecto antihipertensivo sistemas biológicos con ratas SHR y finalmente se caracterizará la secuencia de los posibles péptidos responsables del efecto antihipertensivo.

- 2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Sergio Medina Godoy y al Dr. Ismael Antonio Lares Asef

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-Sinaloa que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios, Financiados por Fundación Produce Sinaloa, proyecto de seguimiento con apoyo económico desde el año 2008.

- 4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



Dr. Sergio Medina Godoy



Dr. Ismael Antonio Lares Asef



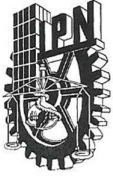
M. en C. Paola Valenzuela García
Aspirante



Dr. Héctor Manuel Esparza Leal
Presidente del Colegio



**CIIDIR IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCIÓN**



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 11 horas del día 06 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa

para examinar la tesis titulada:

"Evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado de la proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) azufrado Higuera en sistemas biológicos con ratas espontáneamente hipertensas (SHR)".

Presentada por el alumno:

Valenzuela	García	Paola
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	5	4	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Sergio Medina Godoy



Dr. Ismael Antonio Lares Asef


Dra. Laura Gabriela Espinosa Alonso


Dr. Cesar Escobedo Bonilla


Dr. Hervey Rodríguez González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles.

Autor.- Thomas Carlyle

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Alimentos Funcionales del Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del Dr. Sergio Medina Godoy y el Dr. Ismael Antonio Lares Asef de CIIDIR Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional. El presente trabajo fue financiado por **Fundación Produce Sinaloa, A. C.** en una tercera y cuarta etapa de investigación (Junio 2010-Mayo 2012), así como también fue financiado por la **Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN)** en el periodo de Enero-Diciembre 2013.

La alumna Paola Valenzuela García agradece la beca otorgada para los estudios de posgrado del presente programa de Doctorado al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada con No. CVU 211595 y al apoyo económico brindado por el Instituto Politécnico Nacional como becaria del **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN)**. La alumna también agradece la beca otorgada por el **Programa de Becas Santander de Movilidad Nacional** para la realización de una estancia de investigación (Julio-Diciembre 2012), también agradece al **Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación (INAPI-SINALOA)** por su apoyo para la terminación de tesis y por último y no menos importante agradece al **Colegio de Sinaloa** por la beca de disertación doctoral edición 2014 y distinción otorgada en el área de Ciencias Biomédicas “Hugo Aréchiga Urtuzuástegui”.

Dedicatoría

Dedico a ti hija Ana Paula cada línea escrita en esta tesis, porque sin modo a tu elección y en un escenario de llantos, chípíleos y ansiosa de tener mi atención tuviste que ser desatendida en más de un sin fin de momentos, se que te tomé prestado nuestras horas de juego y apapachos pero créeme que traté se hacer rendir cada minuto apresurado para regresar a ti y compensarlo. Te pido perdón porque además, sin tú saberlo y sin yo quererlo así, fuiste mi depósito de estrés y frustración, aparte con todo y todo fuiste mi fuente de energía, mi paz, mi motor y mi inspiración en todo momento... gracias mi Amor!. Y ¿cómo no dedicarte a ti este logro hija? pues también es tuyo mi vida, es nuestro y lo celebro contigo porque somos vencedoras, almas fuertes, somos unas guerreras en la vanguardia, muy afortunadas con nuestra familia y muy bendecidas por Dios nuestro Señor...por tí y por cerrar este capítulo y por pasar a uno nuevo contigo...

Te Amo hija

Mamá

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme y abrazarme en todo momento, porque en sus manifestaciones me enseñaron a amar, a tener fe y paz, pero sobre todo a entender la naturaleza de la vida y seguir siempre adelante.

A mis padres Jesús Antonio Valenzuela Valdés y Delia Amparo García de Valenzuela, porque nunca hubiese llegado al fin de este propósito sin el apoyo y comprensión de ustedes, por su amor inagotable como mis padres y ahora abuelitos de Ana Paula. Gracias por impulsarme siempre a llegar a mis metas, porque son invencibles, incondicionales, son mis pilares de apoyo en todo momento y porque una vez mas les digo que ustedes fueron mis primeros maestros que me impartieron la materia de la vida y depositaron en mi los 10 mas grandes tesoros y herramientas que conservo para defenderme de las adversidades de la vida: “Valores, Principios, Humildad, Educación, Honestidad, Respeto, Fortaleza, Aspiraciones, Fe y Amor”.

A mis hermanos Irvin y Daniela, al igual que a mí cuñado Andrés y a mis adorables sobrinos María Andrea y José Sebastián, por recibir siempre de ustedes sus porras y aliento para seguir adelante con mis sueños y proyectos. Gracias por la paciencia y por esperar junto a mí esta larga espera, que sin duda fue más amena teniéndolos a ustedes.

A mi familia y amigos, a todos sin mencionar nombre alguno porque de antemano se que son muchos los que han vivido junto a mi esta etapa de mi vida y muchos los interesados porque culmine este propósito académico tan agotador. A ti, que estas leyendo gracias por creer en mi y mis aspiraciones, desde luego gracias por estar siempre conmigo, sin tu apoyo y sin tus buenas vibras estoy segura que me hubiera rendido y no lo hubiese logrado.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR-IPN-Sinaloa), la Institución a la cual permanecí a lo largo de mis estudios de Doctorado.

Al laboratorio de Alimentos Funcionales del CIIDIR-IPN-Sinaloa y su equipo de trabajo conformado por **Dr. Sergio Medina, Dra. Gabriela Espinosa y Dra. Maribel Valdez** y una larga lista de estudiantes y amigos que han pasado durante mi larga

estadía. Desde luego a los **M. en C. Andrés León, Edalhi Quintero y Xiomara Perea** que fueron mis manitos de laboratorio y mis amigos del programa de Doctorado, mil gracias por su apoyo y comprensión como ustedes comprenderán. Y no menos importantes a los alumnos de estancias y prácticas profesionales que me apoyaron tanto con el trabajo de laboratorio gracias **José Pedro, Efrén, Paola Monserrat y Carolina.**

A mi Director de tesis Dr. Sergio Medina Godoy del CIIDIR-IPN-Sinaloa, por apostar y creer en mi desde el inicio cuando postulaba para ingresar al programa de Doctorado, seguro que fue largo el camino para llegar hasta hoy, pero también me voy satisfecha del trabajo de investigación que se logró concretar con el esfuerzo y entusiasmo de muchos. Le agradezco su dirección y asesoría en el proyecto, su tiempo y comprensión, también gracias por siempre darme la libertad de ser yo la vanguardia de mi propio proyecto de tesis, eso me permitió siempre estar inventando que hacer y de buscar siempre la manera de resolver las cosas, pues al final eso y mas ha sido lo que me ha formado como Doctora en Ciencias y lo que me ha fortalecido como persona.

A mi Director de tesis externo Dr. Ismael Antonio Lares Asef del CIIDIR-IPN-Durango, por haberse interesado en mi trabajo de investigación desde el momento que se acercó a preguntarme sobre mi proyecto en aquel seminario de investigación en la Cd. De México, usted no sabía que realmente era yo la mas interesada en conocerlo por su experiencia en su área de investigación y así de inmediato supe que usted sería mi segundo Director de tesis, que aunque fue mucho tiempo hasta culminar mis estudios, realmente no hubo tiempo para realizar muchas de las grandes ideas que teníamos en mente lo cual fue lamentable, aun así, siempre estaré agradecida por sus valiosas aportaciones, por sus siempre admirables consejos, por su comprensión, por su valioso tiempo para apoyarme cuando en sus manos podría estar y sobre todo por regar con su sabiduría y sencillez esa semillita que tengo sembrada desde la raíz de mi formación académica, la inquietud hacia la investigación y al mundo complicado de las Ciencias, infinitas gracias.

A mis asesores de tesis Dra. Laura Gabriela Espinosa Alonso, Dr. Cesar Escobedo Bonilla y Dr. Hervey Rodríguez González, por sus consejos y aportaciones para mejorar siempre mi proyecto de investigación así como el trabajo de tesis de Doctorado.

A la Dra. Melina López Meyer por su apreciable disposición de ser siempre parte de mi comité sinodal como suplente tanto en mi predoctoral como en la defensa de tesis, le agradezco su tiempo y sus siempre admirables consejos y porras, gracias por interesarse y preocuparse por un estudiante.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, (INCMNSZ) y a su equipo de investigación del laboratorio de Nefrología, así como al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, desde luego gracias a la **Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval** por su colaboración y por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo el apoyo posible para llevar a cabo los bioensayos con las ratas SHR, gracias a todo su equipo de trabajo a **Rosalva Pérez Villalba, a Cristino Cruz Rivera, a Victoria Ramírez González y a Octavio Sánchez Villanueva veterinario del Bioterio del INCMNSZ.**

Al Dr. Ángel Valdez Ortiz y a la M. en C. Cindy Fuentes, por su colaboración y aportación valiosa a este trabajo de investigación con la molienda de la harina de frijol y con la determinación de los estudios de iECA *in vitro*.

A mi gran amigo y mi único colega de generación el Dr. Iván Guadalupe Martínez Álvarez, porque iniciamos juntos este viaje y este deseo de superación, porque a jalones y estirones llegamos a la meta, porque cuando uno necesitaba el apoyo del otro ahí estuvimos siempre juntos, porque no todo era tragedia si no mas bien juntos transformábamos las tragedias en comedia. Gracias por tu incondicional apoyo, gracias por regresarme la beca que habíamos perdido, gracias por ser mi amigo en las buenas y en las malas. Te prometo ahora no solo llevarte a los prismas basálticos si no seguir haciendo mas viajes juntos como a Paris.

A mi gran amigo el M. en C. Andrés León Villanueva, porque fuiste mi manito y mi gran apoyo incondicional, vivimos lindas, desgastantes y agotadoras experiencias juntos y te agradezco hayas estado conmigo en todo momento porque de no haber sido así, me hubiera aburrido demasiado sin tu gran sentido del humor y además me hubiera cortado las venas por unos frijoles con una *Jatropha*, tú me entiendes... por eso y mas infinitas gracias.

A mi gran amiga la M. en C. Emma Paulina Báez Valdez por vivir junto conmigo una experiencia mas en nuestras vidas, por preocuparte y por ayudarme con lo que oportunamente estuvo a tu alcance para apoyarme a lograr mi objetivo por eso y por tus porras y mas, siempre estaré agradecida.

A mi apreciable amigo Dr. José de J. Berríos por su valiosa ayuda incondicional en la corrección y traducción del artículo, por compartirme su experiencia y consejos en este complicado e interminable mundo científico, mil gracias por llegar a mi vida en un momento tan crucial como el que estaba viviendo, sin duda es un capítulo al final de este trabajo que jamás olvidaré y que siempre estaré infinitamente agradecida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS-----	Pág. i
ÍNDICE DE TABLAS-----	Pág. iii
RESUMEN-----	Pág. iv
ABSTRACT-----	Pág. vi
I. INTRODUCCIÓN-----	Pág. 1
II. ANTECEDENTES-----	Pág. 3
2.1 Hipertensión arterial-----	Pág. 3
2.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona-----	Pág. 4
2.2.1 Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (iECA)-----	Pág. 6
2.2.2 Mecanismo de inhibición de los iECA-----	Pág. 7
2.2.3 Efectos adversos de los iECA-----	Pág. 9
2.3 Péptidos bioactivos como alternativas naturales de los iECA-----	Pág. 10
2.4 Actividad antihipertensiva de hidrolizados proteicos y péptidos aislados de leguminosas-----	Pág. 15
2.5 Potencial bioactivo del frijol común <i>Phaseolus vulgaris</i> L.-----	Pág. 16
2.6 Generalidades de producción y consumo de frijol común <i>Phaseolus vulgaris</i> L.--	Pág. 19

III. JUSTIFICACIÓN-----	Pág. 22
IV. HIPÓTESIS-----	Pág. 23
V. OBJETIVO GENERAL-----	Pág. 24
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	Pág. 24
VII. MATERIALES Y MÉTODOS-----	Pág. 25
7.1 Materiales-----	Pág. 25
7.2 Métodos-----	Pág. 25
7.2.1 Preparación de concentrados proteicos de frijol-----	Pág. 25
7.2.2 Preparación del hidrolizado proteico -----	Pág. 25
7.2.3 Análisis electroforético del hidrolizado-----	Pág. 26
7.2.4 Análisis proximal-----	Pág. 27
7.2.5 Análisis de Aminoácidos-----	Pág. 27
7.2.6 Análisis de la actividad inhibidora de ECA-----	Pág. 27

7.2.7 Efecto antihipertensivo a corto-plazo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)-----	Pág. 28
7.2.8 Efecto antihipertensivo a largo-plazo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)-----	Pág. 32
7.2.9 Espectrometría de masas y análisis de datos-----	Pág. 33
7.3 Análisis estadístico-----	Pág. 34
VIII. RESULTADOS-----	Pág. 35
8.1 Obtención de concentrado proteico-----	Pág. 35
8.1.1 <i>Caracterización proximal del concentrado proteico</i> -----	Pág. 35
8.2 Hidrolizado de la proteína de frijol-----	Pág. 35
8.2.1 <i>Análisis electroforético (SDS-PAGE) del hidrolizado del concentrado proteico</i> -----	Pág. 36
8.2.2 <i>Efecto antihipertensivo del hidrolizado a corto-plazo en SHR</i> -----	Pág. 37
8.3 Obtención del hidrolizado BP3-----	Pág. 37
8.3.1 <i>Caracterización proximal del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 37
8.3.2 <i>Perfil de aminoácidos del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 38
8.3.3 <i>Análisis Electroforético SDS-PAGE del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 39
8.3.4 <i>Espectrometría de masas y análisis de datos</i> -----	Pág. 40
8.3.5 <i>Actividad Inhibitoria de ECA del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 41
8.3.6 <i>Efecto antihipertensivo del hidrolizado BP3 a corto-plazo en SHR</i> ---	Pág. 42
8.3.6.1 <i>Evaluación preliminar del efecto antihipertensivo de diferentes dosis de BP3</i> -----	Pág. 42
8.3.6.2 <i>Evaluación del efecto antihipertensivo de 500 mg/kg de peso corporal de BP3</i> -----	Pág. 43
8.3.7 <i>Efecto antihipertensivo a largo-plazo en SHR</i> -----	Pág. 44
IX. DISCUSIÓN-----	Pág. 46
9.1 Obtención de concentrado proteico-----	Pág. 46
9.1.1 <i>Caracterización proximal del concentrado proteico</i> -----	Pág. 46
9.2 <i>Análisis electroforético (SDS-PAGE) del hidrolizado del concentrado proteico</i> ----	Pág. 46

9.2.1 <i>Efecto antihipertensivo del hidrolizado a corto-plazo en SHR</i> -----	Pág. 46
9.3 Obtención del hidrolizado BP3-----	Pág. 47
9.3.1 <i>Caracterización proximal del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 48
9.3.2 <i>Perfil de aminoácidos del hidrolizado BP3</i> -----	Pág. 48

9.3.3 Espectrometría de masas y análisis de datos-----	Pág. 48
9.3.4 Actividad Inhibitoria de ECA del hidrolizado BP3-----	Pág. 49
9.3.5 Efecto antihipertensivo del hidrolizado BP3 a corto-plazo en SHR---	Pág. 50
9.3.5.1 Evaluación preliminar del efecto antihipertensivo de diferentes dosis de BP3 -----	Pág. 50
9.3.5.2 Evaluación del efecto antihipertensivo de 500 mg/kg de peso corporal de BP3-----	Pág. 51
9.3.6 Efecto antihipertensivo a largo-plazo en SHR-----	Pág. 52
X. CONCLUSIONES-----	Pág. 55
XI. PERSPECTIVAS-----	Pág. 58
XII. REFERENCIAS-----	Pág. 61
XIII. ANEXO-----	Pág. 68
13.1 Artículo publicado en Journal of Cereal Chemistry. “Antihypertensive Effect of Protein Hydrolysate from Azufrado Beans in Spontaneously Hypertensive Rats” -----	
-----	Pág. 68

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema del sistema renina angiotensina aldosterona.----- Pág. 5
- Figura 2. Bloqueo de la enzima convertidora de angiotensina I mediante el fármaco iECA Captopril.----- Pág. 8
- Figura 3. Diagrama general del potencial bioactivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ----- Pág. 17
- Figura 4. Escenario del ensayo a corto-plazo (invasivo) montado *in vivo* con rata SHR cateterizada y conectada a los dispositivos de monitoreo de presión y temperatura.----- Pág. 30
- Figura 5. Administración oral del hidrolizado BP3 vía intragástrica en el ensayo a corto-plazo (invasivo) montado *in vivo* con ratas SHR.----- Pág. 31
- Figura 6. Administración vía oral del hidrolizado BP3 en el ensayo a largo-plazo (no invasivo) montado *in vivo* con ratas SHR.----- Pág. 32
- Figura 7. Escenario durante el ensayo a largo plazo (no invasivo) en ratas SHR. Se observa la cola de la rata en la medición de su presión arterial dentro de una cámara plestimógrafa y conectada al dispositivo traductor de señal, dando como resultado la PAS graficada.----- Pág. 33
- Figura 8. Monitoreo de la hidrólisis de la proteína de frijol Azufrado Higuera en electroforesis de primera dimensión (SDS-PAGE). ----- Pág. 36
- Figura 9. Electroforesis *SDS-PAGE*, con un gel Tris-tricine (10-20%), en cada poso del gel se depositaron 15 μ L tanto del marcador de peso molecular (M) como del BP3 a (1mg/mL).----- Pág. 40
- Figura 10. Huella digital de masas de péptidos contenidos en el hidrolizado de frijol común (BP3) por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.----- Pág. 41
- Figura 11. Actividad inhibitoria de ECA en el hidrolizado BP3 tratado con enzima alcalasa. Los valores son medias de mediciones por triplicado.----- Pág. 42
- Figura 12. Evaluación preliminar a corto plazo del efecto antihipertensivo de diferentes dosis (50, 200 y 500 mg/kg) de BP3 por el método del transductor de presión durante 5 horas de evaluación en ratas SHR. ----- Pág. 43
- Figura 13. Efecto antihipertensivo a corto plazo del hidrolizado proteico de frijol común (BP3) en SHR, por el método del transductor de la presión durante 5 h de evaluación, las diferentes letras representan la diferencia estadística de acuerdo al método LSD por

la prueba de rangos múltiples ($\alpha=0.05$) con un nivel de confianza de 95%----- Pág. 44

Figura 14. Efecto antihipertensivo a largo plazo del hidrolizado proteico de frijol común (BP3) en SHR, por el método de medición de presión arterial en la cola de la rata con pletismógrafo durante 45 días de evaluación, las diferentes letras representan la diferencia estadística de acuerdo al método LSD por la prueba de rangos múltiples ($\alpha=0.05$) con un nivel de confianza de 95%.----- Pág. 45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antihipertensiva <i>in vivo</i> de péptidos derivados de hidrolizados lácteos.- -----	Pág. 11
Tabla 2. Actividad antihipertensiva <i>in vivo</i> de péptidos derivados de la fuente proteica del huevo.-----	Pág. 12
Tabla 3. Actividad antihipertensiva <i>in vivo</i> de péptidos derivados de distintas fuentes de origen animal.-----	Pág. 12
Tabla 4. Actividad antihipertensiva <i>in vivo</i> de péptidos derivados de distintas fuentes de origen vegetal.-----	Pág. 14
Tabla 5. Actividad antihipertensiva en ensayos <i>in vitro</i> (IC ₅₀) y ensayos <i>in vivo</i> (con ratas) de hidrolizados de distintas fuentes de leguminosas.-----	Pág. 16
Tabla 6. Investigación realizada en la búsqueda de hidrolizados o péptidos con potencial antihipertensivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en frijol común <i>Phaseolus vulgaris</i> L. -----	Pág. 18
Tabla 7. Evaluación de la capacidad inhibitoria de ECA <i>in vitro</i> de tres distintas variedades de frijol común azufrado sinaloense.-----	Pág. 19
Tabla 8. Caracterización proximal de harina de frijol y concentrado proteico.-----	Pág. 35
Tabla 9. Evaluación preliminar del efector reductor de presión arterial del hidrolizado de frijol común azufrado Higuera en SHR.-----	Pág. 37
Tabla 10. Caracterización proximal del hidrolizado BP3.-----	Pág. 38
Tabla 11. Composición de aminoácidos del concentrado proteico y BP3 (mg de aminoácidos por gramo de proteína) y su distribución clasificada de acuerdo a las propiedades de su cadena de aminoácidos lateral.-----	Pág. 39
Tabla 12. Masa molecular de los péptidos contenidos en el hidrolizado de frijol común por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF, secuenciación por Novo sequencing y estimación de su bioactividad <i>in silico</i> .-----	Pág. 41
Tabla 13. Análisis de varianza (ANOVA) por la prueba de comparación de muestras múltiples.-----	Pág. 45

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antihipertensivo del hidrolizado de proteínas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. variedad azufrado Higuera. A partir de la harina del frijol se obtuvo un concentrado proteico el cual fue hidrolizado por la enzima alcalasa, seguido de un proceso de ultrafiltración (MWCO 3000) y finalmente liofilizado; el producto derivado fue nombrado BP3. El hidrolizado BP3 fue caracterizado por su composición proximal y de aminoácidos, demostrando que el hidrolizado BP3 tiene altos porcentajes de proteína (71.4 %) y de cenizas (18.6 %). La concentración y distribución de aminoácidos identificados en el hidrolizado BP3, reveló la mayor concentración de aminoácidos hidrófobos (267.1 mg/g). La hidrofobicidad de los aminoácidos es una característica muy importante de los péptidos con capacidad antihipertensiva. Se determinó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (iECA) y fue representada como la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀). La IC₅₀ de ECA fue de $3.68 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$, que es la concentración de péptidos necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de ECA en ensayos *in vitro*. El efecto antihipertensivo *in vivo* se evaluó en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) mediante dos distintos ensayos. El fármaco Captopril se utilizó como compuesto de referencia y el agua como control. El primer ensayo consistió en la administración oral de 500 mg del hidrolizado BP3/kg de peso corporal (PC) el cual fue evaluado a corto plazo durante 5 h de análisis y los resultados mostraron una reducción máxima de la presión arterial media de -41 ± 5 mmHg en ratas SHR 3 h después de su administración. El segundo ensayo consistió en evaluar 500 mg del hidrolizado BP3/kg PC/12h, por 45 días de administración oral del hidrolizado BP3. Este experimentó mostró una disminución significativa en la presión arterial sistólica de -24 ± 5 mmHg en ratas SHR a los 45 días después de la administración del BP3. En ambos experimentos, el tratamiento con hidrolizado BP3 mostró un efecto antihipertensivo sobre ratas SHR, de forma similar que el tratamiento con Captopril. Este es el primer estudio que muestra la capacidad antihipertensiva de un hidrolizado de proteína de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) administrado vía oral en ratas SHR bajo dos modelos de ensayos *in vivo* a corto y largo plazo. Las secuencias de los péptidos más abundantes presentes en el hidrolizado BP3 fueron determinados por espectrometría de masas y fueron identificados como KFPWVK, GADFRKK y PQSPCKRVNRHS. Estos péptidos también son reportados por primera vez en frijol común *Phaseolus vulgaris* L. variedad azufrado Higuera y probablemente son los

responsables del efecto antihipertensivo de BP3. Con base en estos resultados, se concluyó que las secuencias de los péptidos mayoritarios del hidrolizado BP3 pueden ser valiosas para la industria nutracéutica, ya que podrían tener un impacto social en la salud humana para evitar y controlar la hipertensión arterial. El frijol común azufrado Higuera podría ser utilizado como un ingrediente o aditivo en forma de hidrolizado proteico, aportando así también un gran valor agregado a esta leguminosa.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antihypertensive potential of common bean *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysate. Protein concentrate were obtained and hydrolysed by alcalase enzyme, it was ultrafiltrated (3000 MWCO), and finally it was lyophilized; the derivative product was named BP3. The BP3 hydrolyzate was characterized by its proximal and amino acid composition; The results of the characterization showed that the BP3 hydrolyzate is composed of a high protein value (71.4 %) and a high percentage of ash (18.6 %). And the concentration and distribution of amino acids identified in BP3 hydrolyzate revealed the highest concentration detected in amino acids with hydrophobic properties (267.1 mg/g) and is an interesting observation since the hydrophobicity of amino acids is a very important characteristic of peptides with antihypertensive capacity. The inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) was determined and was represented as the mean maximal inhibitory concentration (IC₅₀). The IC₅₀ value was 3.68 ± 0.07 g / mL, which in other words indicated the concentration of peptides necessary to inhibit 50% of the ACE activity as *in vitro* assays. The antihypertensive effect *in vivo* was evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) by two different assays. The drug Captopril was used as reference compound and water as a control. The first assay consisted of oral administration of 500 mg of BP3/kg body weight (bw) which was evaluated in the short term for 5 h of analysis and the results showed a maximum decline in mean arterial pressure of -41 ± 5 mmHg in SHR rats after 3 h of study. While the second assay consisted of the evaluation of 500 mg of BP3/kg body weight/12h during a long-term study by 45 days of oral administration of BP3 and a significant decrease in systolic blood pressure was observed -24 ± 5 mmHg in SHR after 45 days of administration. In both assays, BP3 treatment showed antihypertensive effect over SHR, similar than Captopril treatment. The sequences of the most abundant peptides present in BP3 as determined by mass spectrometry were: KFPWVK, GADFRKK and PQSPCKRVNRHS. These peptides are reported for the first time in Azufrado Higuera common beans and they are most likely responsible for the antihypertensive effect of BP3. Based on the results of this study, it was concluded that the now known sequences of BP3 major peptides may be valuable for food science and biomedicine, as they could have a social impact on human health to avoid and control High blood pressure. Higuera common bean could be used in the nutraceutical industry as an ingredient or additive in the form of a protein hydrolyzate and also contributing a great added value to this legume.

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HA) es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y enfermedades renales crónicas, es la primera causa de muerte en el mundo, con un estimado de 9.4 millones de personas fallecidas por año (OMS 2014). Según lo reportado por Ondetti y Cushman (1984), dos investigadores pioneros en el estudio de la estructura y mecanismo de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), ellos reportaron que ECA es una metalopeptidasa de zinc que juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial, es responsable de catalizar la conversión de la angiotensina de un decapeptido inactivo llamado angiotensina I a un potente octapéptido vasoconstrictor denominado angiotensina II e inactiva la bradicinina, la cual juega un papel crucial en el aumento de la permeabilidad capilar y dilatación arterial, lo que la lleva ser un péptido vasodilatador y antihipertensivo. Los fármacos inhibidores de la ECA más conocidos de un gran número en la lista de fármacos sintéticos son: Captopril, Enalapril, Alacepril y Lisinopril, siendo Captopril y Enalapril los que se usan con mayor frecuencia en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca en Humanos (Ridker *et al.* 2015). La búsqueda de inhibidores naturales de la ECA como alternativa a los fármacos sintéticos es de gran interés entre los investigadores, donde el enfoque actual ha sido el aislamiento de fuentes naturales y alimentos ricos en proteína. Los péptidos bioactivos aislados de fuentes alimentarias están empezando a tener un impacto en el tratamiento de la hipertensión debido a propiedades multifuncionales y menos efectos secundarios como tos, cosquilleo en la garganta, rinitis y angioedema (Dykewicz *et al.* 2004), tienen potencial antihipertensivo y fácil absorción (Udenigwe & Aluko 2012).

Diferentes estudios han identificado varios péptidos inhibidores de la ECA obtenidos de la hidrólisis enzimática de diversas fuentes naturales tales como productos lácteos (García-Tejedor *et al.* 2015), productos marinos (Huang *et al.* 2016), productos vegetales tales como soya (Vallabha and Tikku, 2014) y arroz (Wang *et al.* 2017).

Las leguminosas son una fuente económica y accesible de proteínas. En la actualidad, los principales esfuerzos de investigación se han centrado en el aislamiento de péptidos inhibidores de la ECA de distintas leguminosas tales como chícharos (Li *et al.* 2011; Jakubczyk & Baraniak 2014), lentejas (Boye *et al.* 2010), garbanzos (Medina-Godoy *et al.* 2012) y en frijol común (Valdez-Ortiz *et al.* 2012; Rui *et al.* 2013; Mojica *et al.* 2015).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa cultivada en todo el mundo y se considera un alimento nutracéutico y una buena fuente de proteína. En la última década las leguminosas han ganado atención en la producción de hidrolizados y aislamientos de péptidos bioactivos (Luna-Vital *et al.* 2015). Los autores reconocen los esfuerzos de varios investigadores por sus estudios enfocados en la búsqueda de otros potenciales biológicos de los hidrolizados de proteínas y péptidos del frijol común: tal es el caso de la capacidad antioxidante y propiedades antidiabéticas (Oseguera-Toledo *et al.* 2015), actividad antimicrobiana (Ariza-Ortega *et al.* 2014), y la actividad de inhibición de las células tumorales (Luna-Vital *et al.* 2014). Es importante mencionar que hay un mayor número de reportes científicos con ensayos *in vitro* y pocos estudios enfocados a ensayos *in vivo*, como el efecto antihipertensivo evaluado en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

El frijol Azufrado Higuera (*P. vulgaris* L.) es una variedad de frijol común azufrado y amarillo, cultivado y consumido en el noroeste de México y se considera una fuente importante de proteína. Anteriormente, Valdez-Ortiz *et al.* (2012) demostraron que tres variedades de hidrolizados de frijol azufrado tuvieron actividad inhibidora de la ECA en ensayos *in vitro*. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antihipertensivo del hidrolizado de proteína de frijol Azufrado Higuera administrado vía oral en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y determinar la secuencia de los péptidos bioactivos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HA) es la primera causa de muerte en el mundo, con un estimado de 9.4 millones de personas fallecidas por año, es también identificada como la principal enfermedad cardiovascular que en conjunto con otras, causa aproximadamente 17 millones de muertes por año a nivel mundial (OMS 2014). La hipertensión es un término definido como una enfermedad crónica, controlable de etiología multifactorial, caracterizada por aumento sostenido de las cifras de presión arterial (PA), presión sistólica (PS) igual o mayor a 140 mmHg y/o presión diastólica (PD) igual o mayor a 90 mmHg (Aoki *et al.* 2014). En cuanto a su relación con las enfermedades cardiovasculares, se sabe que la hipertensión es una condición que aumenta el riesgo de enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular y enfermedad renal (Sowers *et al.* 2001). El tipo de hipertensión idiopática es la común, pues representa alrededor del 90% de los casos y es muy característico porque las causas del aumento de la presión arterial son desconocidas. El control de la hipertensión idiopática está regulado por algunos cambios en el estilo de vida como por ejemplo: actividad física, dejar de fumar, reducir el consumo de sodio, mejorar la dieta y reducir los niveles de estrés (Kearney *et al.* 2004).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, ENSANUT (2016), uno de cada 4 adultos en México padecen hipertensión arterial (25.5%) y se presenta ligeramente más en mujeres (26.1%) que en hombres (24.9%). El grupo de edad menos afectado es el de 20 a 29 años, mientras que la prevalencia más alta está en el grupo de 70 a 79 años. No hubo diferencia significativa en la presencia de hipertensión entre regiones de la república mexicana o por tipo de localidad (zona rural o urbana).

Solamente el 60% de la población con hipertensión arterial tenía conocimiento previo de que padecía esta enfermedad. Por tanto, 4 de cada 10 personas fue diagnosticada al momento que la ENSANUT 2016 se llevó a cabo. Previamente a la encuesta, siete de cada 10 mujeres (70.5%) y cinco de cada 10 hombres (48.6%) tenía un diagnóstico de hipertensión.

De las personas que tenían un conocimiento previo de su condición, seis de cada 10 (58.7%) controla su presión arterial (<140/90mmHg), y ocho de cada 10 (79.3%) está bajo tratamiento farmacológico.

Otro estudio estimó que los estados del norte de México como Sinaloa, Sonora, Durango y Nuevo León tienen la mayor predisposición a sufrir padecimientos de hipertensión arterial (Molina *et al.* 2006).

2.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El sistema renina angiotensina o también conocido como sistema renina angiotensina aldosterona es un sistema hormonal responsable de la presión arterial, en él interactúan varias hormonas y enzimas para formar la angiotensina II que finalmente tiene varios efectos en el cuerpo (Figura 1). La liberación de la hormona renina inicia el proceso. Esto ocurre cuando un tejido especializado del riñón, el aparato yuxtaglomerular detecta ciertos cambios en la sangre y mide la presión arterial en la arteriola aferente, la concentración de sal en la orina y algunas hormonas reaccionan a señales del sistema nervioso vegetativo. Las células mioepiteliales de los vasos aferentes sintetizan y almacenan la renina en vesículas. La renina es liberada por los riñones y pasa a la sangre donde ejerce su función como proteasa y actúa sobre el angiotensinógeno (proteína secretada en el hígado), un péptido producido por el hígado, convirtiéndolo en angiotensina I (DRVYIHPFHL) y necesita la acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) para convertirse en angiotensina II (DRVYIHPF). Primeramente, la angiotensina II actúa sobre sus receptores en los vasos sanguíneos más finos donde origina vasoconstricción lo que lleva directamente al aumento de la presión sanguínea. En la corteza adrenal la angiotensina II causa la liberación de aldosterona, una hormona esteroide producida en la zona glomerulosa de este órgano. La aldosterona aumenta la resorción de agua y NaCl desde la orina lo que aumenta el volumen sanguíneo y por ende la elevación de la presión arterial. En la hipófisis, la aldosterona estimula la liberación de la hormona antidiurética (HAD o ADH) conocida también con el nombre vasopresina, la cual inhibe la excreción del agua por parte de los riñones. El conjunto de estas hormonas es capaz de actuar sobre el sistema nervioso central y producir la sensación de hambre, de consumir sal y de sed. De esa manera, las hormonas del sistema renina angiotensina ayudan a compensar pérdidas de sal o de agua mediante la retención inmediata de NaCl y H₂O, y a largo plazo mediante la ingesta elevada, para que finalmente la presión sanguínea idónea puede ser restablecida. El sistema es desactivado mediante una retroalimentación negativa, así que una presión arterial elevada, angiotensina II y aldosterona inhiben la liberación de la renina (Botey 2006).

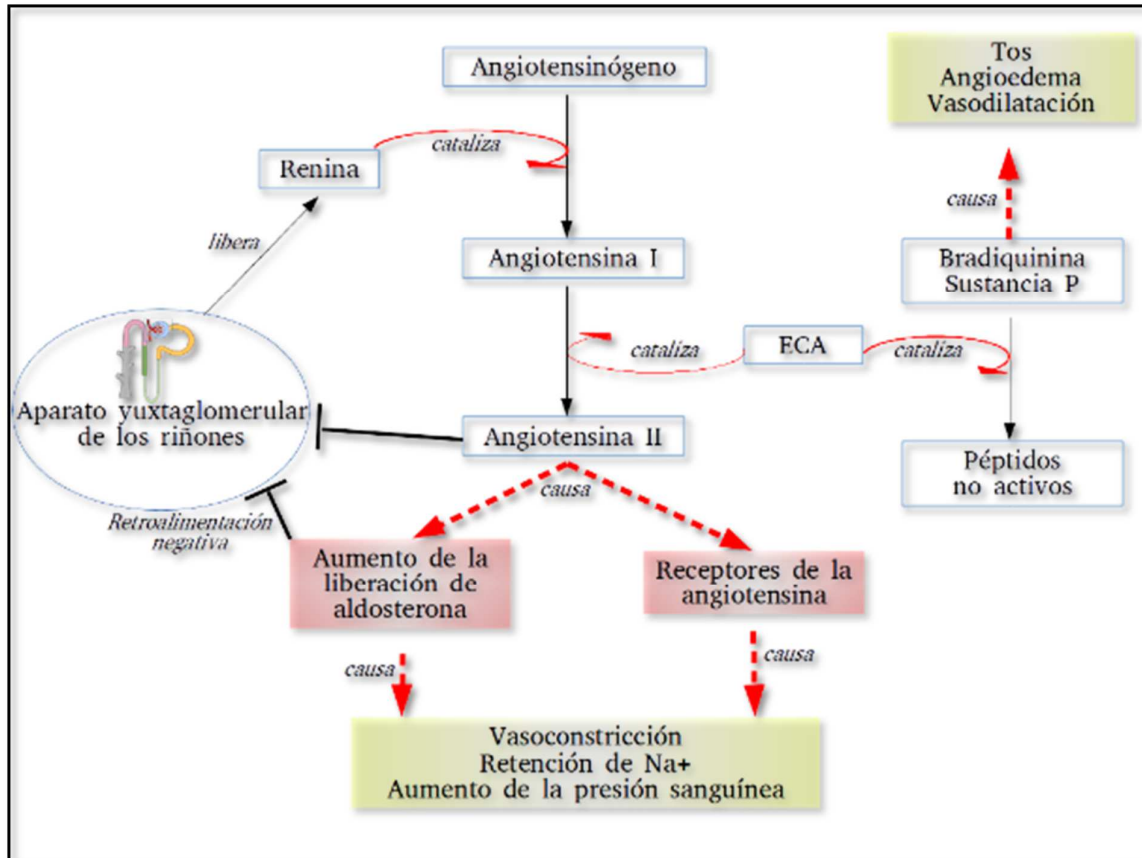


Figura 1. Esquema del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (www.MediciABC.com).

Se han desarrollado varios fármacos que interfieren con el sistema renina angiotensina que se emplean en el tratamiento de la hipertensión u otras condiciones. Entre ellos encontramos:

- Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (iECA), que inhiben la formación de la angiotensina II.
- Antagonistas de la angiotensina o bloqueadores de sus receptores, que previenen que la angiotensina ejerza su función.
- Inhibidores de la enzima renina.
- Antagonistas de la hormona aldosterona.

2.2.1 Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (iECA)

Los iECA son fármacos que se emplean principalmente en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardíaca crónica y forman parte de la inhibición de una serie de reacciones que regulan la presión sanguínea: el sistema renina angiotensina aldosterona. Las sustancias inhibitoras de ECA se descubrieron por primera vez en venenos de serpientes. El primer péptido con capacidad iECA fue descubierto por Ferreira (1970), aislado de veneno de la Jararaca o víbora lanceolada (*Bothrops jararaca*) y probado en ensayos *in vitro* con resultados exitosos. Este péptido fue caracterizado como un pentapéptido (BPP5a). No obstante, se observó que era muy inestable en el organismo y su efecto era de corta duración, ya que el cuerpo lo elimina con mucha rapidez. Esta molécula ha sido modificada en varias ocasiones para prolongar la duración del efecto. Entre tales cambios están la sustitución de la secuencia de triptófano-alanina-prolina (WAP) por una secuencia similar pero más estable de fenilalanina-alanina-prolina (FAP). La aportación de una estructura análoga al ácido succínico o al ácido glutárico proporcionó más estabilidad y reforzó las propiedades inhibitoras en la ECA. En 1971 se consiguió un primer éxito más estable con el descubrimiento del efecto inhibidor de ECA del nonapéptido teprotido el cual tuvo efectos hipotensores muy similares al pentapéptido BPP5a del veneno de la Jararaca. No obstante, para el año 1973 se abandonó el posterior desarrollo clínico del teprotido por falta de interés comercial del fabricante (VandenBurg *et al.* 1981).

A partir de estos descubrimientos se desarrollaron nuevos iECA, existen diversos compuestos inhibidores los cuales se clasifican de acuerdo al grupo químico que interactúa con el zinc de la ECA. Hasta el momento hay tres grupos: los compuestos sulfidrílicos representados por el Captopril, los compuestos carboxílicos del tipo del Enalapril y los compuestos fosfóricos, Fosinopril y Ceranapril. En el mercado farmacéutico se encuentran agentes que ya están en uso clínico, así como las especificaciones de sus dosis diarias usuales ya están bien establecidas. Los fármacos con compuestos carboxílicos, son más potentes que los que tienen compuestos sulfidrílicos como el Captopril, lo que se demuestra porque poseen valores de IC₅₀ (concentración de iECA capaz de inhibir el 50% de la ECA) significativamente menores. Sin embargo, los compuestos carboxílicos tienen poca absorción por vía oral, por lo que la investigación farmacéutica, creó prodrogas que se absorben casi en su totalidad y luego son transformadas al iECA activo en el plasma. Además de estas diferencias

químicas y farmacocinéticas, se ha mencionado que también difieren en la capacidad de penetrar en algunos tejidos. Esto tiene que ver con la lipofilicidad que en mayor o menor grado, poseen estos compuestos. Por ejemplo: el Enalapril no inhibe la ECA en el líquido cefalorraquídeo porque es hidrófilo y no atraviesa la barrera hematoencefálica, mientras que el Ramipril sí lo hace por su mayor liposolubilidad (Unger & Gohlke 1994).

La absorción es muy variable entre los iECA (25-75%), y la ingesta puede no tener efecto, o reducir la velocidad, pero no el grado de absorción. Algunos iECA son profármacos y permanecen inactivos hasta que son convertidos en metabolitos activos por hidrólisis en el hígado o en el tejido gastrointestinal (Brown & Vaughan 1998). El pico de concentración plasmática del fármaco se alcanza de 1 a 4 h después de su ingestión. Los profármacos son más lipofílicos y tienen un acceso más fácil al tejido diana donde son convertidos en el compuesto activo. La mayoría de los iECA y sus metabolitos son excretados principalmente por vía renal, mientras que el Fosinopril, Zofenopril, Trandolapril y Espirapril presentan una eliminación repartida entre las vías renal y hepática. El Captopril se elimina más rápidamente del organismo, lo que explica su corta duración de acción (menor de 6 h), mientras que el Ramiprilato (el metabolito activo del Ramipril) y especialmente el Tandrolaprilato se eliminan más lentamente que otros iECA (López-Sendón *et al.* 2004).

2.2.2 Mecanismo de inhibición de los iECA

ECA es una enzima del tipo metalopeptidasa que en su estructura contiene un átomo de Zinc y en su sitio activo lleva consigo un par de aminoácidos que son característicos en ella histidina-glutamina. Existen dos tipos de ECA una es la somática que se encuentra en la superficie externa de las células membranales y tiene dos sitios activos (dominio-N y dominio-C terminal), el otro tipo de ECA es de tipo testicular la cual solo se encuentra en los testículos de adultos y contiene un solo sitio (dominio-C). Dentro de las metalopeptidasas ECA es la única que se activa por iones monovalentes de Cloro, cabe destacar que en el dominio C la concentración del ión Cl es mayor que en el dominio N, es por ello que ambos dominios sintetizan los mismos péptidos pero a diferentes velocidades, por lo que el dominio C es más rápido que el dominio N, si no hubiera presencia de Cl en estos dominios simplemente no se activarían. El dominio N está más cargado negativamente y está involucrado en sintetizar otros péptidos bioactivos no

inhibidores de ECA, pero este a su vez influencia al dominio C a que se involucre en el sistema renina angiotensina ya que este dominio tiene más influencia en la estructura completa de ECA. La entrada al sitio activo de ECA está bloqueada por 3 élices la cual evita la entrada de péptidos grandes mayores de 20 aminoácidos, es por ello; que es posible la entrada de solo los péptidos pequeños como dipéptidos o tripéptidos de dos o tres aminoácidos. La unión de los compuestos inhibidores con ECA se da por medio de la interacción de dos grupos histidinos de los grupos aminos y un oxígeno del grupo carboxilo de ECA y un oxígeno del grupo carboxilo del compuesto inhibidor. La carga positiva del grupo amino de la lisina y arginina aumenta la potencia inhibitoria de los péptidos (Figura 2). Así mismo los aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina y prolina están involucrados en favorecer la unión a los subsitios. Pero por otro lado, si la secuencia N está involucrada y esta presenta en su secuencia los aminoácidos valina e isoleucina la potencia inhibitoria disminuirá o no se dará. Lo mismo ocurrirá si hay presencia de aminoácidos di-carboxilos en la secuencia o prolina como último aminoácido (Georgios-Spyroulias *et al.* 2004).

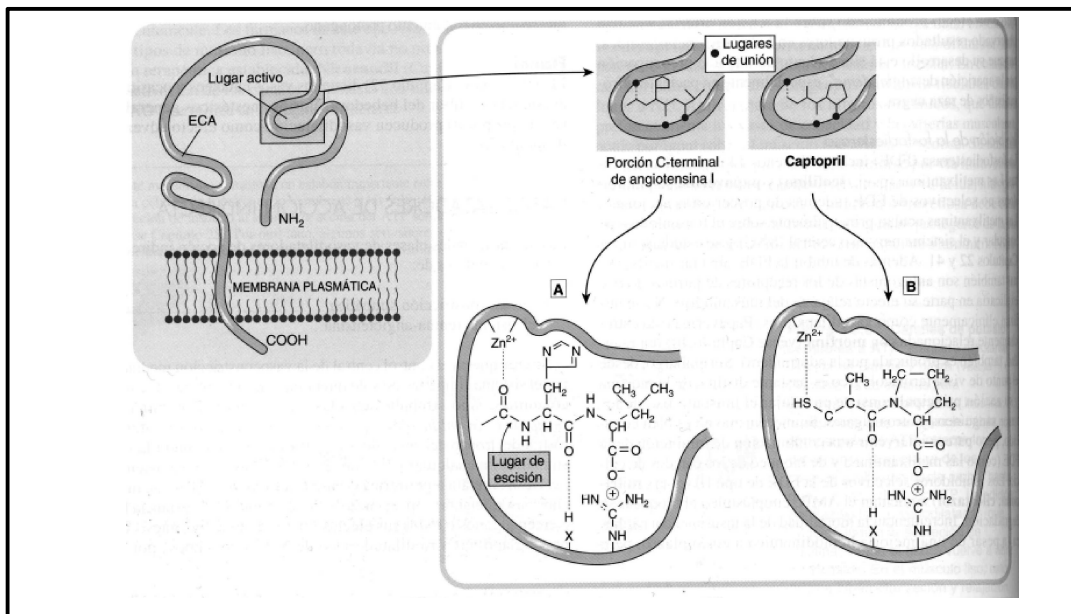


Figura 2. Bloqueo de la enzima convertidora de angiotensina I mediante el fármaco iECA Captopril.

2.2.3 Efectos adversos de los iECA

Los expertos acuerdan que los iECA son fármacos seguros, bien tolerados y son fármacos de primera línea en el tratamiento de diversas patologías (López-Sendón *et al.* 2004). El primer iECA aprobado para su uso en los Estados Unidos fue el Captopril en 1981, el cual se comenzó a utilizar para el tratamiento de la hipertensión refractaria y en dosis superiores al doble de la actualmente aceptada como dosis máxima. Ello llevó a una incidencia mayor de efectos adversos relacionados con la dosis. Dado que inicialmente algunos efectos adversos fueron más notorios con Captopril que con enalapril, en especial disgeusia la cual es responsable de la alteración en la percepción relacionada con el sentido del gusto, otro efecto común son las reacciones cutáneas como rash, se llegó a teorizar que ello podría deberse a la presencia de un grupo sulfhidrilo en la molécula del primer fármaco. Revisiones posteriores subrayaron que la explicación a las diferencias encontradas podría residir, al menos en buena medida, en la comparación de dosis no equivalentes (Parish & Miller 1992; Alderman 1996).

Si bien se acepta que los grupos sulfhidrilo, carboxilo y fosforilo que determinan las categorías en que se dividen los iECA pueden generar diferencias entre cada compuesto en particular, la importancia clínica de estas variaciones no se ha probado y se desconoce si realmente existen (López-Sendón *et al.* 2004). Curiosamente, la tos no se identificó inicialmente como un efecto adverso de los iECA (Parish & Miller 1992; Alderman 1996). Se ha propuesto como explicación que la tos es un síntoma muy frecuente y que tradicionalmente no se relacionaba con el uso de fármacos (Sebastián *et al.* 2010).

El mecanismo por el cual se produce la tos permanece incierto. Si bien se han propuesto varias teorías, hasta ahora ninguna ha logrado explicar de manera concluyente la aparición de este efecto indeseable. Posiblemente, la acumulación de bradicininas, sustancia P y otros productos normalmente degradados por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) desencadenarían, o al menos facilitarían, la aparición de tos. La tos debida al empleo de iECA es de tipo seca, no productiva, generalmente persistente y muchas veces se presenta junto con una sensación de picazón, cosquilleo o simplemente “desagradable” en la garganta (Sebastián *et al.* 2010). En ocasiones puede estar asociada con rinitis o con un cuadro de las vías aéreas superiores; se ha postulado que la rinitis por iECA es una entidad subdiagnosticada (Dykewicz *et al.* 2004). La

intensidad de la tos es variable, por lo habitual leve a moderada, pero puede llegar a ser lo suficientemente grave como para obligar a discontinuar el tratamiento.

El angioedema es un tipo de edema localizado y autolimitado, que no deja fovea, típicamente de desarrollo súbito y corta duración, que puede afectar la piel y las mucosas y suele asociarse con un área eritematosa extensa (Parish & Miller 1992). Puede afectar cualquier parte del cuerpo y en su grado de mayor gravedad compromete la vía aérea, un cuadro que pone en riesgo la vida. Sin embargo, muchos casos leves pasan inadvertidos incluso para los propios pacientes. El mecanismo por el cual los iECA causan angioedema tampoco se conoce por completo, aunque se piensa que es el mismo por el que ocasionan tos. Un dato llamativo y hasta el momento inexplicado es que quienes desarrollan tos debido a estos fármacos tienen una tendencia menor a presentar angioedema y lo inverso también es válido (Dykewicz *et al.* 2004).

2.3 Péptidos bioactivos como alternativas naturales de los iECA

La búsqueda de iECA en fuentes naturales son ahora una alternativa a los fármacos sintéticos y son de gran interés para investigadores en ciencias de la biomedicina y de los alimentos, pues están trabajando juntos en el desarrollo, innovación, pruebas y validación de péptidos nutracéuticos o hidrolizados proteicos con potencial e incremento de beneficios terapéuticos (Mine *et al.* 2010). Los péptidos bioactivos aislados de fuentes de alimentos están empezando a tener un impacto en el tratamiento de diversas enfermedades como: enfermedades del corazón, cáncer, obesidad, diabetes, osteoporosis e hipertensión arterial, debido a las propiedades multifuncionales, además de un menor número de efectos secundarios y su fácil absorción (Udenigwe & Aluko 2012).

Existe una lista grande de trabajo de investigación basándose en ensayos *in vivo* con ratas espontáneamente hipertensas (SHR), donde se ha observado una disminución en la presión arterial de ratas con una actividad similar a la de Captopril, posterior a la ingesta de péptidos inhibidores de ECA de diferentes fuentes alimentarias como: productos lácteos, huevo, fuentes de origen animal y fuentes de origen vegetal (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Tabla 1. Actividad antihipertensiva *in vivo* de péptidos derivados de hidrolizados lácteos.

Fuente de péptidos	Secuencia peptídica	Dosis mg/kg	Disminución de PAS* mmHg
Lácteos	FFVAPFPGVFGK	100	-34
	TTMPLW	100	-13.6
	AVPYPQR	100	-10
	MAIPPKK	10	-28
	RYLGY	5	-25
	AYFYPEL	5	-20
	YQKFPQY	5	-15
	PYVRYL	3	-23.4
	RRWQWR	10	-16.7
	WQ	10	-11.4
	YGLF	0.1	-23.4
	IAK	4	-20.7
	YAKPVA	6	-23.1
	WQVLPNAVPAK	7	-18.4
	HPHPHLSF	10	-15.7
	VYP	8	-21
	VYPPFG	8	-22
	TPVVVPPFLQP	8	-8
	IPA	8	-31
	FP	8	-27
	YKVPQL	2	-13
	AMPKPW	2	-5
	MKPWIQPK	2	-3
	TKVIP	2	-9
	LQSW	2	-2
	KVLPVP	2	-32.2
	KVLPVPQ	2	-31.5
	LQKW	10	-18.1
	LLF	10	-29
	DERF; RYPSYG	300	—
	YPYY	3.4	-15.9
	GVW; GTW	3.3	-22

Fuente de: Martínez-Maqueda *et al.* 2012 *PAS= Presión arterial sistólica.

Tabla 2. Actividad antihipertensiva *in vivo* de péptidos derivados de la fuente proteica del huevo.

Fuente de péptidos	Producto administrado	Dosis mg/kg	Disminución de PAS mmHg
Huevo	YRGGLEPINF	10	-30
	ESIINF	10	-30
	Hidrolizado	100	39.1
	YAEERYPIL	2	-31.6
	RADHPFL	2	-34.1
	IVF	4	-31.7
	RADHPF + yema de huevo	10	-10
	FRADHPFL + yema de huevo	25	-17.6
	LW	60	-22
	Hidrolizado	20	-7

Fuente de: Martínez-Maqueda *et al.* 2012 *PAS= Presión arterial sistólica.

Tabla 3. Actividad antihipertensiva *in vivo* de péptidos derivados de distintas fuentes de origen animal.

Fuente de péptidos	Producto administrado	Dosis mg/kg	Disminución de PAS mmHg	Secuencia con potencial activo
Músculo de pollo	IKW	60	-17	
	LKP	60	-18	
Hidrolizado de troponina porcina	KRQKYDI	10	-9.6	
Hidrolizado de miosina porcina	MNPPK	1	-23	
	ITTNP	1	-21	
	VKKVLGNP	10	-24	
	KRVIQY	10	-23	
Hidrolizado de extracto de hueso de pollo	YYRA	10	-20	
Hidrolizado de colágeno de pierna de pollo	GA; GL; GP	4.5	-18	
Hidrolizado de colágeno de piel porcina	GF; GP	10	-20	
Digestión de proteínas de insectos	AVF	5	-13	
	VF	5	-19	
Hidrolizado de proteínas musculares de rana gigante	GAAELPCSADWW	10	-10	
Hidrolizado de camarón	hidrolizado	100	-18.3	

	LHP	2	-18	
Hidrolizado de proteína de ostra	hidrolizado	100	-30	
	DLTDY	8	-15	
	DY	10	-20	
	hidrolizado	20	-12	VVYPWTQRF
Hidrolizado de pepino de mar	hidrolizado	40	-73	Péptidos (E, D, P, G y A)
	MEGAQEAQGD	3 μM/kg	-19	
Hidrolizado de proteína de marco de solado de rabil	MIFPGAGGPEL	10	-22	
Proteína hidrolizada de proteínas de atún	GDLGKTTTMSNWS P-PKYKDTP	10	-21	
Hidrolizado de músculos oscuros de atún	WPEAAELMMEVD P	10	-20	
Hidrolizado de zumo de cocina de atún	hidrolizado	500	-23	
	hidrolizado + lecitina	500	-34	
	hidrolizado + liposoma	500	-39	
	hidrolizado + goma arábica	500	-36	
Hidrolizado de bonito seco	LKPNM	8	-10	
	LKP	2.25	-5	
	IWHHT	60	-26	
	IVGRPRHQG	60	-14	
	IVGRPR	60	-17	
	IY	60	-19	
	IW	60	-22	
	IWH	60	-30	
	IKP	60	-20	
Hidrolizado de escamas de dorada	hidrolizado	300	-20	GY, VY, GF, VIY
Hidrolizado de proteínas musculares de salmón	hidrolizado	500	-28	WA, VW, WM, MW, IW, LW
Hidrolizado de colágeno de piel de calamar	hidrolizado	200	-40	

Fuente de: Martínez-Maqueda *et al.* 2012 *PAS= Presión arterial sistólica.

Tabla 4. Actividad antihipertensiva *in vivo* de péptidos derivados de distintas fuentes de origen vegetal.

Fuente de péptidos	Producto administrado	Dosis mg/kg	Disminución de PAS mmHg	Secuencia con potencial bioactivo
Proteína de soya	Proteína de soya hidrolizada con proteasa D3	500	-17.1	NWGPLV, PNNKPFQ, EDENNPFLR, GGFIE, IPPGVPYWT
Proteína de soya	Oligopéptidos del hidrolizado de soya con alcalasa	100	-38	
Pasta de frijol soya fermentada	HHL	5	-61	HHL
Leche de soya fermentada	Fracción de suero	—	-19	
Condimento de frijol de soya fermentada	10 % SFF	10 % SFF	-20	VG, GY, SY, AY, AI, VP, AF, GT, AW
Gluten de trigo	Hidrolizado de gluten de trigo	500	-13.9	
Salvado de trigo	Péptidos de salvado de trigo	10 % SFF	-45	LQP, IQP, LRP, VY, IY, TF
Proteína de chícharos	Digestión de chícharos	50	-44.1	
Proteína de arroz	Hidrolizado con alcalasa	600	-25.6	TGVY
	TGVY	30	-40	
Arroz prensado	Arroz prensado hidrolizado	50	-26	
Maiz		450	-20.8	
Huesos de durazno	Hidrolizado con neutrasa y N120P	800	-30.8	
Bebida alcoholica de germinado de frijol mungo	Extracto del germinado crudo	600	-41	
	Hidrolizado del germinado	1000	-32	HY, VY, RF, VW, YW
	Fracción de péptidos del germinado	1000	-21	
	HY	100	-32	
	VY	100	-31	
	RF	100	-24	
	VW	100	-26	
	YW	100	-28	
Proteína de colza	Hidrolizado	500	-15.5	
	VW	7.5	-10.8	
	VWIS	12.5	-12.5	
	RIY	7.5	-11.3	
	IY	7.5	-9.8	
Fibroína del gusano de seda	GVGY	44	-33	GVGY, GY
Fibroína de seda	Hidrolizado	1200	-62.7	GY
Alga wakame (<i>Undaria pinnatifida</i>)	VY	10	-17	VY, IY, FY, IW
	IY	1	-21	
	FY	0.1	-26	
	IW	1	-14	
	YH	50	-50	YH, KY, FY, IY

	KY	—	-45	
	FY	—	-46	
	IY	—	-33	
Alga Nori (<i>Porphyra yezoensis</i>)	Nori oligopéptidos	200	-10	AKYSY
	AKYSY	10	-30	
Alga spirulina	IQP	10	-30	IQP
Hongos (<i>Pleurotus cornucopiae</i>)	Extracto acuoso	600	-50	RLPSEFDLSAFLRA; RLSGQTI EVTSEYLFRH

Fuente de: Martínez-Maqueda *et al.* 2012 *PAS= Presión arterial sistólica.

2.4 Actividad antihipertensiva de hidrolizados proteicos y péptidos aislados de Leguminosas.

Existe un creciente interés por la búsqueda de péptidos aislados a partir de leguminosas, esto debido a que hay un previo conocimiento de la estructura proteica de ellas y distinguiéndose así de otras fuentes proteicas, como leguminosas con alta calidad peptídica en función a las propiedades que generan como nutrientes y ahora nutracéuticos además que son la fuente más barata y accesible de proteínas. Existen algunas fuentes de leguminosas estudiadas, que demuestran tener péptidos con excelente actividad antihipertensiva probada en ensayos *in vitro* (IC₅₀) y ensayos *in vivo* (con SHR) se muestran en la Tabla 5.

La actividad antihipertensiva de péptidos o hidrolizados proteicos obtenidos de la hidrólisis enzimática de diversas fuentes naturales ha sido observada *in vitro* e *in vivo*. La potencia del péptido o hidrolizado en la inhibición de la ECA en ensayos *in vitro*, es usualmente expresada como IC₅₀, el cual es equivalente a la concentración del péptido capaz de inhibir el 50% de la actividad de ECA.

Tabla 5. Actividad antihipertensiva en ensayos *in vitro* (IC₅₀) y ensayos *in vivo* (con ratas) de hidrolizados de distintas fuentes de leguminosas.

Fuente de péptidos en leguminosas	IC ₅₀ (µg/mL) <i>in vitro</i>	Dosis en ensayos <i>in vivo</i> (mg/kg)	Referencias
Garbanzo	0.3	NP	(Medina-Godoy <i>et al.</i> 2012)
Lenteja Roja	440	NP	(Boye <i>et al.</i> 2010)
Chícharo amarillo	412	NP	(Barbana & Boye 2010)
Frijol Mungo	640	600	(Li <i>et al.</i> 2006)
Soya	180	500	(Kodera & Nio 2006)
Chicharos	100	100	(Girgih <i>et al.</i> 2016)

NP= No probado

2.5 Potencial bioactivo del frijol común *Phaseolus vulgaris* L.

Dentro de las propiedades nutritivas que posee el frijol están relacionadas, su alto contenido proteico y en menor medida a su aportación de carbohidratos, vitaminas y minerales. Dependiendo del tipo de frijol, el contenido de proteínas varía del 14 al 33%, siendo rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína. Sin embargo, de acuerdo a evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína del frijol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100%. En relación a la aportación de carbohidratos, 100 g de frijol crudo aportan de 52 a 76 g dependiendo de la variedad, cuya fracción más importante la constituye el almidón. El almidón representa la principal fracción de energía en este tipo de alimentos, la fracción correspondiente a los lípidos es la más pequeña (1.5 a 6.2 g/100 g), constituida por una mezcla de acilglicéridos cuyos ácidos grasos predominantes son los mono y poliinsaturados. El frijol también es buena fuente de fibra cuyo valor varía de 14-19 g/100 g del alimento crudo, del cual hasta la mitad puede ser de la forma soluble. Los principales componentes químicos de la fibra en el frijol son las pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina. Además, este alimento también es una fuente considerable de minerales como calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Fernández *et al.* 2010).

En las últimas décadas, el frijol común ha sido considerado como un alimento nutracéutico debido a algunos de los fitoquímicos actualmente reconocidos en el frijol:

fibra, compuestos fenólicos, ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina y lectinas, además de su composición de péptidos bioactivos (Campos-Vega *et al.* 2013; Luna-Vital *et al.* 2015; Paredes-López *et al.* 2006; Vergara-Castañeda *et al.* 2012).

Luna-Vital *et al.* (2014) mencionan como en la última década, las leguminosas han ganado la atención para producir hidrolizados y péptidos bioactivos, siendo el frijol común un foco de estudio para los investigadores ya que es una excelente fuente de proteínas y se considera un alimento nutracéutico por su potencial de péptidos bioactivos. La búsqueda de péptidos de frijol común con bioactividades no sólo se centra en los beneficios para la salud humana, tales como: potenciales antioxidantes, anticancerígenos y antihipertensivos sino que también explora nuevos horizontes como su potencial como agente de control biológico de patógenos como hongos en plantas y cultivos agrícolas (Figura 3).

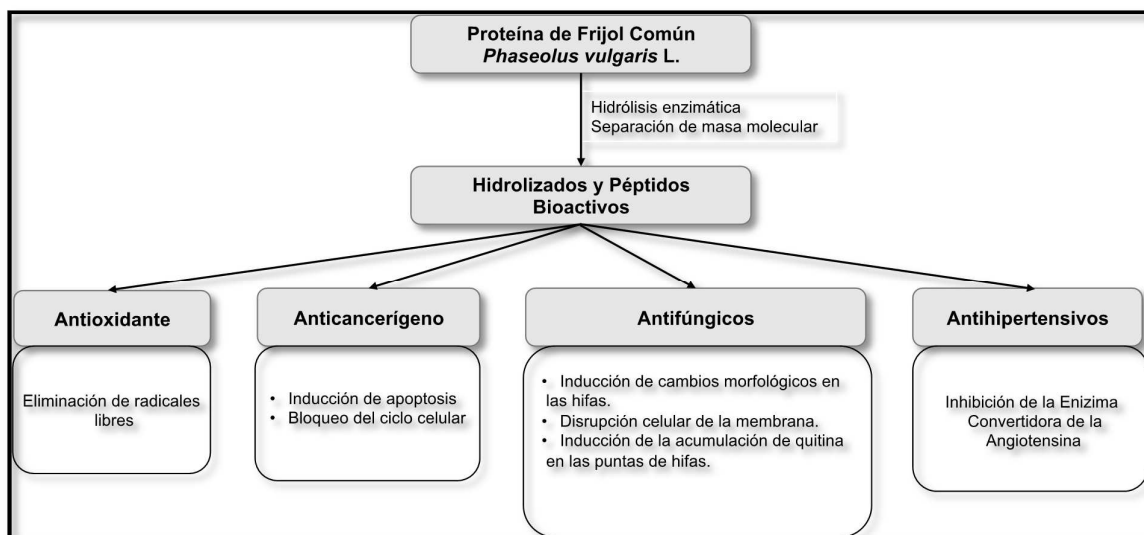


Figura 3. Diagrama general del potencial bioactivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Se reconoce el esfuerzo de estudios de varios investigadores que se centraron en la búsqueda del potencial biológico de los hidrolizados de proteínas y péptidos de frijol común: como las investigaciones de la capacidad antioxidante y propiedades antidiabéticas (Oseguera-Toledo *et al.* 2015); Actividad antimicrobiana (Ariza-Ortega *et al.* 2014); Actividad antiinflamatoria (Oomah *et al.* 2010) y la actividad de inhibición de células tumorales (Luna-Vital *et al.* 2014). Es importante mencionar que existe un mayor número de estudios que se han centrado en la búsqueda de la capacidad iECA de hidrolizados o péptidos de diferentes variedades de frijol común, sin embargo existen

pocos estudios que prueben la capacidad antihipertensiva como en ensayos *in vivo* con ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Tabla 6).

Tabla 6. Investigación realizada en la búsqueda de hidrolizados o péptidos con potencial antihipertensivo *in vitro* e *in vivo* en frijol común *Phaseolus vulgaris* L.

Frijol <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Tratamiento enzimático usado en la hidrólisis	iECA IC ₅₀ (µg/mL)	Dosis en ratas (mg/kg)	Referencias
Negro Jamapa	Alcalasa	61	NP	Torruco-Uco et al. 2009
	Flavoenzimas	127	NP	
Pinto		150	NP	
Navy	Alcalasa/Pepsina	68	NP	Rui et al. 2012
Negro Jamapa		83	NP	
Rojo		78	NP	
Rojo Pequeño	Alcalasa-Papaina-Pepsina-Tripsina-alfa PVNNPQIH	67.2	NP	Rui et al. 2013
		206.7 (µM)	NP	
Negro Plus	Alcalasa/Flavoenzimas	4.34	4 mg/kg vía intraperitoneal	Ariza-Ortega et al. 2014
Azufrado Higuera		4.82		
Negro		220		
Great Northern		200		
Pinto	Pepsina/Pancreatina	250	NP	Mojica et al. 2015
Navy		250		
Rojo		530		

NP= No probado

También, nuestro grupo de trabajo ha realizado una serie de investigaciones en búsqueda del potencial antihipertensivo de hidrolizados de frijol cultivado en el estado de Sinaloa, esto fue reportado por Valdez-Ortiz *et al.*, (2012), quienes iniciaron su búsqueda en tres diferentes variedades regionales de frijol azufrado: variedad Higuera; variedad Noroeste y variedad Regional 87. Las fracciones peptídicas fueron propiciadas mediante la hidrólisis de tres distintos tratamientos de enzimas (alcalasa, termolisina y pancreatina), los tratamientos mostraron un excelente resultado en el grado de hidrólisis para las tres variedades. En la tabla 7 se muestran los resultados iECA reportados en dicho estudio y cabe mencionar que a pesar de que los hidrolizados por los tratamientos enzimáticos alcalasa y termolisina no mostraron diferencia significativa entre ellos y sus variedades evaluadas, se consideró el hidrolizado de frijol azufrado Higuera tratado con la enzima alcalasa como el tratamiento más viable según la disponibilidad, acceso y mejor costo para posteriores estudios ya que la tendencia internacional de investigación en los últimos años, demanda no nada más la búsqueda del potencial iECA de hidrolizados proteicos de fuentes naturales, sino también la búsqueda de la respuesta

que estos tienen en ensayos *in vivo* con ratas espontáneamente hipertensas (SHR), ya sea en tratamientos cortos o prolongados para ver su eficacia en la disminución de la presión arterial. Esto también conlleva a la búsqueda de las secuencias de los péptidos activos presentes en estos hidrolizados, seguido de su aislamiento y purificación para su evaluación de la actividad iECA individual donde dichos resultados puedan avalar la responsabilidad de estos péptidos ante el potencial antihipertensivo.

Tabla 7. Evaluación de la capacidad inhibitoria de ECA *in vitro* de tres distintas variedades de frijol común azufrado sinaloense.

Variedad de Frijol	Enzima tratamiento	IC ₅₀ (µg/mL)	Dosis en ratas
Az Noroeste		0.28827a	
Az Higuera	Alcalasa	0.10852a	NP
Az Regional 87		1.15782a	
Az Noroeste		0.27125a	
Az Higuera	Termolisina	0.17558a	NP
Az Regional 87		2.11647a	
Az Noroeste		83.18403b	
Az Higuera	Pancreatina	93.182447b	NP
Az Regional 87		58.28935c	

NP= No probado. Fuente: Valdez-Ortiz *et al.*, (2012).

2.6 Generalidades de producción y consumo de frijol común *Phaseolus vulgaris* L.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más consumidas en todo el mundo y es un componente básico en la dieta de alrededor de 300 millones de personas, la mayoría de ellas habitantes de países en desarrollo, con un consumo global de aproximadamente 17 millones de ton., entre los países de mayor consumo se encuentran: India (24.7%), Brasil (19.0%), Estados Unidos (5.5%), México (5.3%) y Tanzania (3.3%) (FAO 2014; Panorama agroalimentario 2016).

Además la FAO (2014), reportó una producción mundial de 26,529,580 toneladas de frijol en el mundo, México ocupa el quinto lugar entre los países de mayor producción: Myanmar (4,651,094 ton), India (4,110,000 ton), Brasil (3,294,586 ton), Estados Unidos (1,311,340 ton) y México (1,273,957 ton).

En México, el frijol es el tercer cultivo en importancia por la superficie sembrada, superado por maíz y el sorgo; por el valor de la producción primaria que genera, ocupa la décima posición. El cultivo de esta leguminosa se realiza prácticamente en todas las regiones y condiciones climáticas y de suelos en el país. El clima y la disponibilidad de agua son los factores más importantes que determinan la productividad del cultivo, situación que se agrava en las principales regiones productoras del país, que registran bajos niveles y errática distribución de la precipitación pluvial, y donde el cultivo del frijol se lleva a cabo de manera predominante en condiciones de temporal (Panorama Agroalimentario 2016). En el 2016, las 7 principales entidades productoras de frijol a nivel nacional fueron: Zacatecas (386,689.61 ton), Durango (124,573.79 ton), Chihuahua (102,232.54 ton), Sinaloa (92,255.92 ton), Chiapas (62,538.97), Guanajuato (53,514.00 ton) y Nayarit (51,275.54 ton), colocando a el estado de Sinaloa en el cuarto estado de mayor producción en frijol. (SIAP-SAGARPA 2016a).

En el estado Sinaloa, el cultivo de frijol se desarrolla prácticamente en su totalidad en el ciclo Otoño-Invierno, en la que predomina la producción de variedad azufrado Higuera con el 98.7% de su producción en condiciones de riego en los meses enero, febrero y marzo, es la entidad con la mayor superficie cultivada de riego, y reporta los más altos rendimientos en el cultivo del frijol entre los principales estados productores. La producción estatal del 2016 se registró con 90,877.16 toneladas (Panorama Agroalimentario 2016; SIAP-SAGARPA 2016 a).

El consumo de frijol a nivel regional varía de acuerdo con el tipo de grano. Así, por ejemplo, en la región norte de México existe preferencia por los frijoles pintos, en la zona noroeste por los frijoles azufrados, en la región centro por las variedades flor de mayo y flor de junio, mientras que en el sur y sureste se tiene preferencia por el frijol negro. El consumo per cápita de frijol en México reporta una tendencia a la baja durante los últimos treinta años, al pasar de 16 kg por persona por año en la década de 1980 a alrededor de 8.4 kg en la actualidad. Lo anterior debido a diversos factores entre los que destacan la migración, el urbanismo, la reducción en el número de miembros en las familias, cambios en el poder adquisitivo, y la incorporación de la mujer a la actividad laboral. Asimismo, se observa que ha ocurrido sustitución del consumo de frijol en grano por frijol industrializado, debido a su más fácil preparación (Panorama Agroalimentario 2016; SIAP-SAGARPA 2016b).

De acuerdo con estimaciones de la SIAP-SAGARPA (2016a), la recuperación de la cosecha de frijol durante los años agrícolas 2013 y 2014 favoreció la acumulación de inventarios al final de los ciclos comerciales 2013-2014 y 2014-2015 en niveles que superaron las 200 mil toneladas en bodegas. Así, dichos volúmenes representaron cerca del 20 por ciento del consumo nacional. En tanto, como consecuencia de la reducción de la producción de frijol en el año agrícola 2015, los inventarios de frijol al cierre del ciclo 2015-2016 redujeron 36.7% a tasa anual. La reducción en la cosecha de frijol azufrado Higuera en el ciclo Otoño-Invierno 2014-2015 se reflejó en el incremento de los precios de esta desde el inicio del 2015. En octubre de 2015, el precio de esta variedad reportó un promedio nacional de 20,450 pesos por tonelada, lo que significa un incremento anual de 56.7%.

Así mismo es importante resaltar que el frijol variedad azufrado Higuera además de ser el 95% de superficie sembrada en el estado de Sinaloa tiene como ventaja a diferencia de las otras variedades cultivadas en la región norte de Sinaloa, que presenta mejor tolerancia al ataque viral y por lo tanto sus rendimientos en producción son mejores además que se le conoce por tener mejor apariencia visual, así es que por el momento sigue siendo la variedad preferida para los productores y para el mercado consumidor local, nacional e internacional (Reyes 2014). Esto aumenta el interés y la visión por iniciar estudios encaminados a reforzar el valor agregado del frijol azufrado Higuera, donde por un lado se proponga un abanico de nuevas posibilidades de mercado de este y por otro lado proponer otra alternativa de solución al problema global como es la hipertensión hoy en día. Siendo así, y continuando con la investigación iniciada por Valdez-Ortiz *et al.* (2012), este estudio tiene como objetivo: Evaluar el efecto antihipertensivo del hidrolizado proteico de frijol común azufrado Higuera en ensayos *in vivo* con ratas, caracterizar las secuencias de los principales péptidos que lo conforman e identificar el o los péptidos responsables de la actividad antihipertensiva.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la hipertensión es el principal factor de riesgo de muerte en el mundo, en el 2013 la Organización Mundial de la Salud (OMS) con ocasión del Día Mundial de la Salud, hizo un llamado para intensificar los esfuerzos encaminados a prevenir y controlar la hipertensión. El interés en la investigación biomédica crece en la búsqueda de mejores y nuevas alternativas naturales de prevención y tratamiento como son los péptidos inhibidores de ECA, los cuales son ahora ya un foco de atención internacional, principalmente extraídos de leguminosas por ser rica fuente de proteínas y en México, un alimento accesible por su producción y alta demanda.

Aunado a ello, la inestabilidad en la producción y comercio del frijol común en México, ya sea la sobreproducción del frijol y la baja de su precio o la reducción de su producción y por ende el aumento de su precio, han impulsado a los productores a buscar nuevos mercados de comercialización; siendo esto de gran interés para los investigadores en la búsqueda de valor agregado.

El frijol común además de tener importantes propiedades funcionales como ser un potente anticancerígeno, antioxidante y antifúngico puede también ser de gran utilidad en la industria Biofarmacéutica, debido a su capacidad antihipertensiva mostrada en estudios previos en hidrolizado proteico de frijol azufrado en ensayos *in vitro*, donde demostró ser una nueva alternativa para el tratamiento de la hipertensión arterial. Sin embargo, no se conoce el efecto que este hidrolizado pudiera tener en sistemas biológicos como el caso de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) administradas vía oral bajo el tratamiento de un hidrolizado proteico ultrafiltrado, ni tampoco se conocen las secuencias peptídicas que lo conforman y que posiblemente sean responsables del efecto antihipertensivo.

IV. HIPÓTESIS

El hidrolizado ultrafiltrado de la proteína de frijol común azufrado Higuera muestra efecto antihipertensivo en ensayos *in vitro* y en ensayos *in vivo* a corto y largo-plazo en ratas espontáneamente hipertensas y las secuencias de los péptidos posibles responsables de la actividad antihipertensiva son determinadas.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antihipertensivo del hidrolizado ultrafiltrado de la proteína de frijol común azufrado Higuera en ensayos *in vitro* y en ensayos *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas, así como determinar las secuencias de los péptidos posibles responsables de la actividad antihipertensiva.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad inhibitoria de ECA del hidrolizado de la proteína de frijol común azufrado Higuera.
2. Caracterizar la composición proximal y de aminoácidos del hidrolizado de la proteína de frijol común azufrado Higuera.
3. Evaluar el efecto antihipertensivo a corto plazo del hidrolizado de la proteína de frijol común azufrado Higuera en un ensayo con ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
4. Evaluar el efecto antihipertensivo a largo plazo del hidrolizado de la proteína de frijol común azufrado Higuera en un ensayo con ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
5. Caracterizar los péptidos contenidos en el hidrolizado de la proteína de frijol común azufrado Higuera y determinar los péptidos responsables de la propiedad antihipertensiva.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Se utilizaron granos de frijol común de variedad Azufrado Higuera (Reg. N° 045-170205-FRI) donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Valle del Fuerte, México. Los reactivos ECA (de pulmón de conejo), hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) como sustrato de ECA, alcalasa (a partir de *Bacillus licheniformis*), fueron adquiridos de Sigma (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., EE.UU.). El sistema de ultrafiltración (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 Estados Unidos.) y membranas de ultrafiltración (UF) se adquirieron de Millipore (Millipore Corporation, Billerica, MA. USA Cat. No. PLBC07610). Todos los productos químicos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

7.2 Métodos

7.2.1 Preparación de concentrados proteicos de frijol

Los granos de frijol Azufrado Higuera se molieron (Perten Molino de Laboratorio 3100, Alemania) y la harina que resultó de la molienda se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Se obtuvieron concentrados de proteínas como se describe por Valdez-Ortiz *et al.* (2012). Las harinas se mezclaron con agua desionizada (10 g/100 ml), se ajustó a pH 9 con NaOH 2 M y se mezclaron durante 1 h. La solución se centrifugó a 10,000 x g a 4 °C durante 30 min, y el pH del sobrenadante recuperado se ajustó a 4.3 (punto isoeléctrico de la proteína del frijol común) con HCl 2 M, se almacenó a 4 °C durante 1 h y se centrifugó a 10,000 x g a 4 °C durante 10 min. El precipitado se lavó con agua desionizada (DI) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Los sobrenadantes se descartaron, y el precipitado que contiene la proteína aislada se liofilizó y almacenó a -20 °C.

7.2.2 Preparación del hidrolizado proteico

La hidrólisis de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con Valdez-Ortiz *et al.* (2012). Se pesaron 30 g de concentrado de proteína de frijol Azufrado y se mezcló con 300 mL de agua DI, añadiendo enzima alcalasa (4% w/v) a la solución. El concentrado de proteína se hidrolizó durante 2 horas a 50 °C bajo agitación constante (IKA C-MAG HS-

7), manteniendo el pH en 9 con la ayuda de un titulador automático (Mettler Toledo T-50) con un dispensador de NaOH 2 M (pH óptimo para la actividad de la alcalasa). Después de la hidrólisis, las suspensiones se ajustaron a pH 4 con HCl 2 M y se mantuvieron en un baño de agua a 95 °C durante 10 min para inactivar las enzimas, seguido de centrifugación a 10,000 x g a 25 °C durante 30 min. El sobrenadante que contiene los hidrolizados de proteínas se recuperó. De acuerdo con la metodología estándar descrita por Valdez-Ortiz *et al.* (2012) la hidrólisis por alcalasa tiene un grado de hidrólisis (DH) de 73%. Así mismo para corroborar que efectivamente la hidrólisis de la proteína había sido exitosa, se realizó un análisis electroforético del hidrolizado. Los hidrolizados se filtraron en un sistema de ultrafiltración (UF), en la que se fraccionaron a través de membranas de UF con puntos de corte de peso molecular (MWCO) de 3 kDa y el producto ultrafiltrado se liofilizó y se almacenó a -20 °C. El hidrolizado obtenido fueron péptidos de diferentes tamaños moleculares menores a 3 kDa, y esta fracción fue nombrado como péptidos de frijol <3 kDa (BP3).

7.2.3 Análisis electroforético del hidrolizado.

Para observar el éxito de la hidrólisis de la proteína de frijol azufrado Higuera, se tomaron alícuotas de 500 µL en el transcurso del tiempo de incubación con la enzima (Concentrado proteico antes de la hidrólisis, tiempo 0 con alcalasa, 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 100 min y 120 min). A cada muestra inmediatamente se le adicionaron 100 µL de HCl 2M y se pusieron en baño maría a 100 °C durante 10 min cada uno para frenar la hidrólisis. La hidrólisis de la proteína se observó en electroforesis de una dimensión (SDS-PAGE), con un gel de policrilamida al 12%. Las muestras fueron preparadas con un buffer de carga que contiene azul de bromofenol/agua y fueron cargadas al gel, donde se hizo la electroforesis a 90 volts y 80 miliamperes por 3 horas. El gel fue teñido con azul de Coomasie para visualizar las bandas (Laemmli 1970). El resultado fue fotodocumentado en el ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y fue analizado empleando el software Quantity-One (Bio-Rad). Los marcadores de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder Cat. No. 10747-012) se adquirieron con Invitrogen.

7.2.4 Análisis proximal.

Los métodos oficiales de análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, AOAC (2005), se utilizaron para determinar la composición química y nutricional de la harina de frijol, concentrado de proteína de frijol y BP3: nitrógeno (976.05), grasa (920.39), cenizas (942.05), fibra (978.10) y humedad (930.15). El contenido de carbohidratos se estimó como extracto libre de nitrógeno (NFE) y se calcula por diferencia: 100 - la suma de los porcentajes de humedad, grasa, proteína, fibra y cenizas.

7.2.5 Análisis de Aminoácidos.

Las muestras de harina de frijol, concentrado de proteína de frijol y BP3 se analizaron por triplicado para la determinación y cuantificación de aminoácidos. Las muestras se hidrolizaron a 110 °C durante 24 h en HCl 6 N y se prepararon para el ensayo de aminoácidos de acuerdo con el método 994.12 (AOAC 2005). Los ensayos de aminoácidos se llevaron a cabo por HPLC de fase inversa (Wu *et al.* 1997) utilizando un Agilent 1100 HPLC (Agilent Tecnología, Santa Clara, CA. USA.) equipado con un detector de fluorescencia con un filtro de excitación de 350 nm y un filtro de emisión de 455 nm. se utilizó 1 nmol/l de estándar de aminoácidos (BCBJ2713V lot:Sigma-Aldrich) en HCl 0.1M. Para evitar la pérdida parcial del aminoácido Metionina (M), las muestras se oxidaron con ácido per fórmico para cambiarlo a sulfónico metionina antes de la hidrólisis ácida (Baker 1997). La derivatización se realizó utilizando o-ftalaldehído (OPA)/ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC). Los aminoácidos se separaron en una columna ODS Hypersil de 5 micras (200 x 2,1 mm).

7.2.6 Análisis de la actividad inhibidora de ECA.

El potencial antihipertensivo del hidrolizado de proteínas fue determinado por su actividad inhibitoria de la ECA (IECA) de acuerdo con Valdez-Ortiz *et al.* (2012). La enzima ECA hidroliza el sustrato HHL para generar ácido hipúrico y el péptido HL. El método se basa en la reacción desarrollada en una mezcla que contiene el sustrato (HHL), el amortiguador borato de sodio 50 M (0.5 M NaOH pH 8.3), el extracto de enzima y diferentes diluciones del hidrolizado BP3. Las reacciones se incubaron durante 30

minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de HCl 1 M, seguido de la adición de 1 ml de acetato de etilo, para extraer el ácido hipúrico, agitando durante 1 min. La mezcla se centrifugó a 14,000 x g a 25 °C durante 10 min, se recogieron 750 µL de la fase orgánica, se transfirió a un tubo de ensayo y se evaporó. El residuo se disolvió en agua DI 600 µL y se determinó la concentración de ácido hipúrico a 228 nm usando agua DI como blanco. Con el fin de determinar la IC₅₀ de cada hidrolizado de proteína, los datos se ajustaron a un modelo de regresión lineal.

7.2.7 Efecto antihipertensivo a corto-plazo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Todos los experimentos con animales se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington, DC, 1996) y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y uso de Animales en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ (NMM-47-11-12-1). Para este estudio, se incluyeron veinte ratas espontáneamente hipertensas (SHR) macho (10-16 semanas de edad). Las ratas fueron adquiridas de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN, USA.), las cuales fueron recibidas en las instalaciones del bioterio del INCMNSZ para sus cuidados y reproducción. Las ratas fueron alojadas en jaulas de policarbonato reguladas con un ciclo de 12 h de luz y 12 horas de oscuridad.

Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (marca Purina rat chow) y agua purificada *ad libitum*. Para el primer experimento, evaluación del efecto antihipertensivo a corto plazo del hidrolizado BP3, las ratas SHR se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

- Primer grupo, ratas SHR tratadas con agua DI, designado como grupo de control (n = 7).
- Segundo grupo, ratas SHR tratadas con 50 mg de Captopril/kg de peso corporal (BW) (Sigma Akdrich, San Louis, USA), designado como grupo Captopril (n = 5).
- Tercer grupo, ratas SHR tratadas con 500 mg del hidrolizado BP3 (diluido en 800 µL de agua destilada)/kg de peso corporal, designado como grupo BP3 (n = 8). Todos los tratamientos fueron administrados por sonda gástrica.

Las ratas se colocaron sobre una almohadilla de calentamiento para mantener la temperatura corporal a 37 °C controladas con un termómetro rectal. Luego las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg de

peso corporal), aproximadamente cada 2 horas, para mantenerlas anestesiadas durante todo el ensayo. La arteria femoral y la venas yugular fueron cateterizados con tubo de polietileno (PE-50). El plasma isotónico obtenido de una SHR donante se infundió a la rata anestesiada y cateterizada (10 ml / kg de peso corporal) durante 15 minutos para mantener las condiciones eurolémicas lo que indica una buena hidratación durante la cirugía. La presión arterial media (PAM) se monitoreó con un transductor de presión P23Gb (Gould Inc., Cleveland, OH, USA) y se registró en un polígrafo (Grass Instruments, Quincy, MA) durante todo el estudio.

Una sonda de flujo de tránsito/tiempo de ultrasonidos se colocó alrededor de la arteria izquierda y se llenó con gel de acoplamiento ultrasónico (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, Nueva York, USA) para detectar el flujo sanguíneo renal, lo que se tradujo en el mapa por el transductor de presión (Barrera -Chimal *et al.*, 2011), el escenario de este ensayo *in vivo* se puede observar en las Figuras 4 y 5. Con la supervisión de las SHR con anestesia y después de 30 min (tiempo requerido para la infusión de plasma terminado y estabilización de la PAM); los tratamientos de los grupos control (agua), Captopril o BP3 se administraron por alimentación forzada vía intragástrica, se establecieron las mediciones como la PAM basal, control, Captopril y BP3. La PAM se registró cada 10 min durante 5 horas, y se promediaron tres lecturas de 10 min para proporcionar un dato por cada 30 min de monitoreo. Al fin del ensayo las muestras de sangre de las ratas fueron extraídas antes del sacrificio (aproximadamente 12 ml). El cambio en la PAM (Δ PAM) se calculó restando los datos de los diferentes puntos de tiempo (promedio de cada 30 min) a partir de su respectivo valor basal en el tiempo cero.

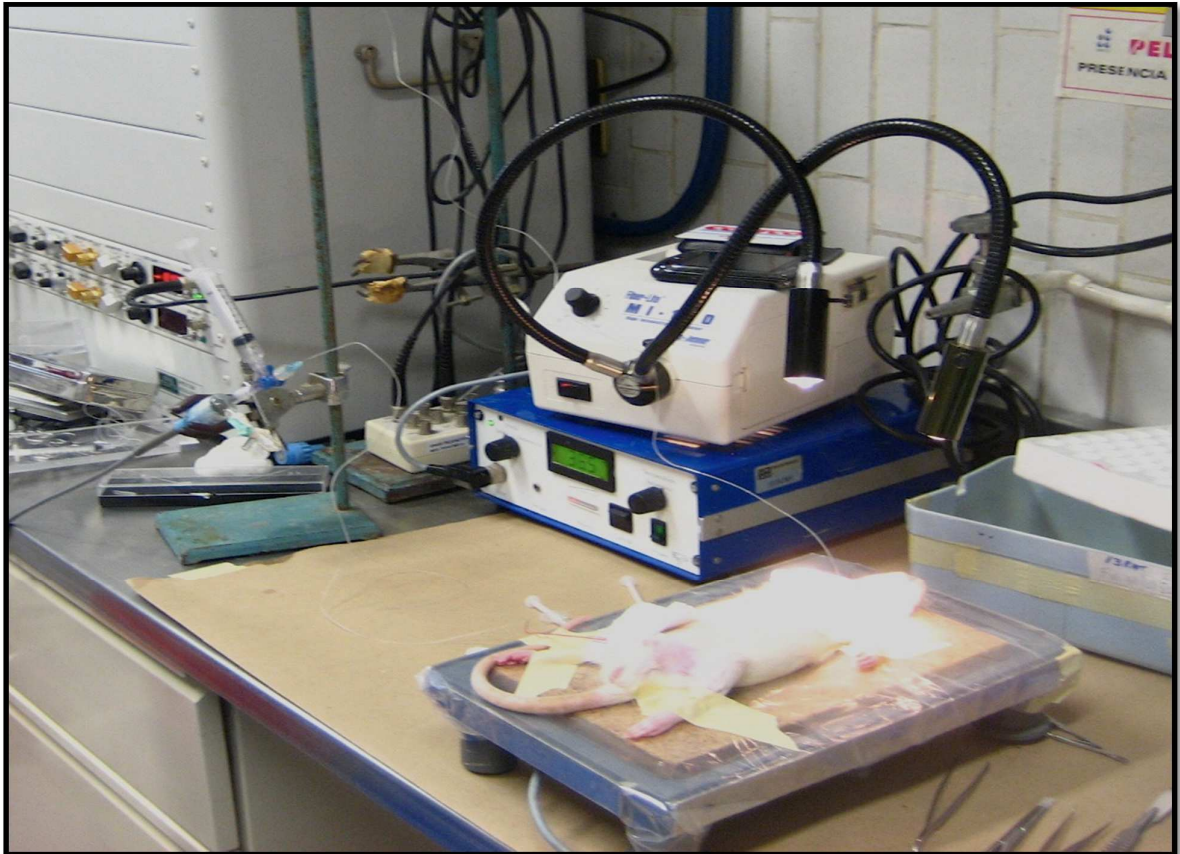


Figura 4. Escenario del ensayo a corto-plazo (invasivo) montado *in vivo* con rata SHR cateterizada y conectada a los dispositivos de monitoreo de presión y temperatura.



Figura 5. Administración oral del hidrolizado BP3 vía intragástrica en el ensayo a corto-plazo (invasivo) montado *in vivo* con ratas SHR.

7.2.8 Efecto antihipertensivo a largo-plazo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Para este estudio, se incluyeron 17 ratas SHR macho (10-16 semanas de edad). Las ratas fueron reguladas con un ciclo de 12 h de luz y 12 horas de oscuridad y todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar y agua purificada *ad libitum*. Las ratas SHR se dividieron aleatoriamente en tres grupos: un grupo control (SHR+agua, n=6), un grupo tratado con 25 mg/kg de peso corporal/12h de Captopril (SHR + Cap n=6) y un grupo tratado con 500 mg/kg de peso corporal/12h de péptidos BP3 diluido en agua DI administrado vía oral durante 45 días (SHR + BP3, n=5) (Figura 6). La presión arterial sistólica (PAS) se midió por el método de medición de la cola (no invasivo) con un analizador de la presión arterial, CITI modelo 179 (Woodland Hills, CA, EE.UU.) (Chirino *et al.*, 2008), este ensayo es representado en la Figura 7. Las mediciones de la PAS fueron realizadas durante el período de luz en el tiempo cero, 15 días, 30 días y 45 días después del tratamiento. El cambio en la PAS (Δ PAS, mmHg) se calculó restando los datos de los diferentes puntos de tiempo a partir de su respectivo valor basal en el tiempo cero.

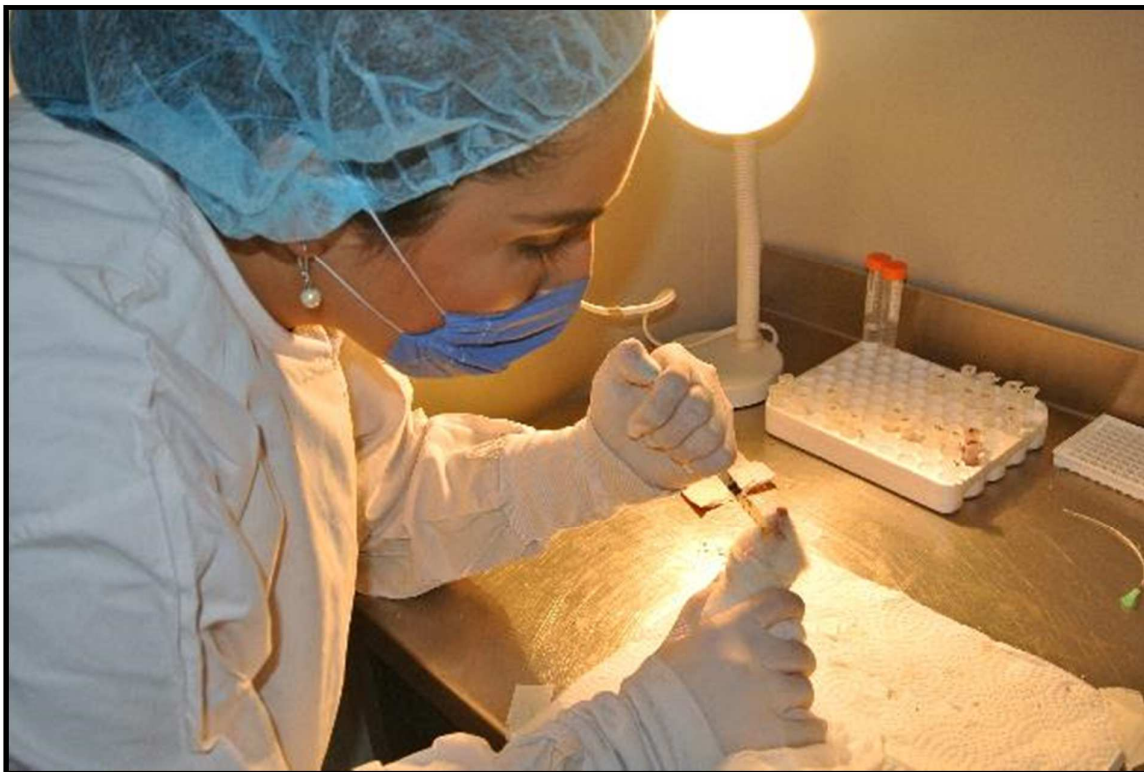


Figura 6. Administración vía oral del hidrolizado BP3 en el ensayo a largo-plazo (no invasivo) montado *in vivo* con ratas SHR.



Figura 7. Escenario durante el ensayo a largo plazo (no invasivo) en ratas SHR. Se observa la cola de la rata en la medición de su presión arterial dentro de una cámara plestimógrafa y conectada al dispositivo traductor de señal, dando como resultado la PAS graficada.

7.2.9 Espectrometría de masas y análisis de datos.

Con el fin de obtener la huella de masa de péptidos del hidrolizado de proteína de frijol (BP3), se utilizó un espectrómetro de masas (MALDI-TOF-TOF) con una matriz/asistida y laser de desorción/ionización tiempo de vuelo/tiempo de vuelo, donde se determinaron las masas moleculares de péptidos y su distribución en el hidrolizado de frijol PB3. Los espectros de masas se obtuvieron en un Bruker Autoflex MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Una muestra de BP3 soluble (1 mg/ml) se disolvió en acetonitrilo/agua (1:1, v/v). Una alícuota (1 μ L) de BP3 soluble se mezcló con 1 μ L de solución de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo/TCA 0.1%). La mezcla de la muestra se colocó sobre la placa de muestras desorción (T_0209520_0022513_49 Bruker, Billerica, MA, EE.UU.). Las condiciones en el MALDI se variaron ampliamente para obtener espectros óptimos mediante el ajuste de la

potencia del láser (30-90%), aumento de la tensión de reflexión (12x-60x), y la extracción de iones de impulsos (140 ns). Los datos brutos obtenidos se analizaron con Novo Secuenciación por BioTools 3.2 (Bruker Daltonics). El potencial de la actividad biológica de los péptidos se predijo mediante el uso de la base de datos BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>).

7.3 Análisis estadístico.

Se realizó la prueba de modelos lineales generalizados (GLM) para comparar los cambios en la presión arterial de la línea de base con tres factores predictivos (grupos de tratamiento, tiempo de tratamiento y sujetos). La prueba de comparación múltiple de la muestra (MSC) se utilizó para encontrar diferencias significativas entre las medias en diferentes momentos. Para discriminar entre los medios la menor diferencia significativa en el método (LSD) de Fisher se realizó la prueba de rango múltiple. Todos estos análisis GLM, MSC y LSD fueron realizados con el programa Statgraphics Centurion XVI (versión 1.17.06) con una significancia establecida de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Obtención de concentrado proteico

En el proceso de obtención del concentrado proteico fue de suma importancia partir de una fuente de frijol de calidad principalmente nuevo y de temporada, así como asegurarse de la limpieza y lavado del grano de tal manera que se obtuvo una harina limpia y fina, ya que fue cribada con el objetivo de eliminar la cascarilla y facilitar el aislado de la proteína. Los resultados mostraron un rendimiento de concentrado proteico de un 13% respecto de la materia prima.

8.1.1 Caracterización proximal del concentrado proteico.

La caracterización proximal de la harina de frijol y el concentrado proteico son mostrados en la Tabla 8. Se observa que el contenido de proteína en el concentrado proteico fue de 83.8%.

Tabla 8. Caracterización proximal de harina de frijol y concentrado proteico.

Composición	Harina de Frijol* (%)	Concentrado Proteico* (%)
Humedad ^a	8.4	2.3
Proteína ^b	27.5	83.8
Grasa	1.5	0.6
Fibra Cruda	3.1	0.07
Cenizas	5.1	3.5
Carbohidratos (por diferencia)	62	11.8

^a Humedad base/seca

^b Factor de conversión Nitrogeno-Proteina = 6.25

* Todos los valores son expresados como porcentajes (%) y los resultados fueron las mediciones de medias por triplicado.

8.2 Hidrolizado de la proteína de frijol.

El concentrado proteico de frijol fue hidrolizado durante 2 h por la enzima alcalasa, durante este tiempo de incubación enzimática se fueron muestreando alícuotas en diferentes tiempos para una evaluación de la calidad de la hidrólisis que fue observada en un análisis electroforético.

8.2.1 Análisis electroforético (SDS-PAGE) del hidrolizado del concentrado proteico.

El resultado del análisis electroforético de la hidrólisis de la proteína de frijol común azufrado Higuera se muestra en la Figura 8. Se pudo observar como el análisis en diferentes tiempos de incubación dio como resultado bandas más tenues incluso la no identificación de bandas según la prolongación del tiempo de hidrólisis.

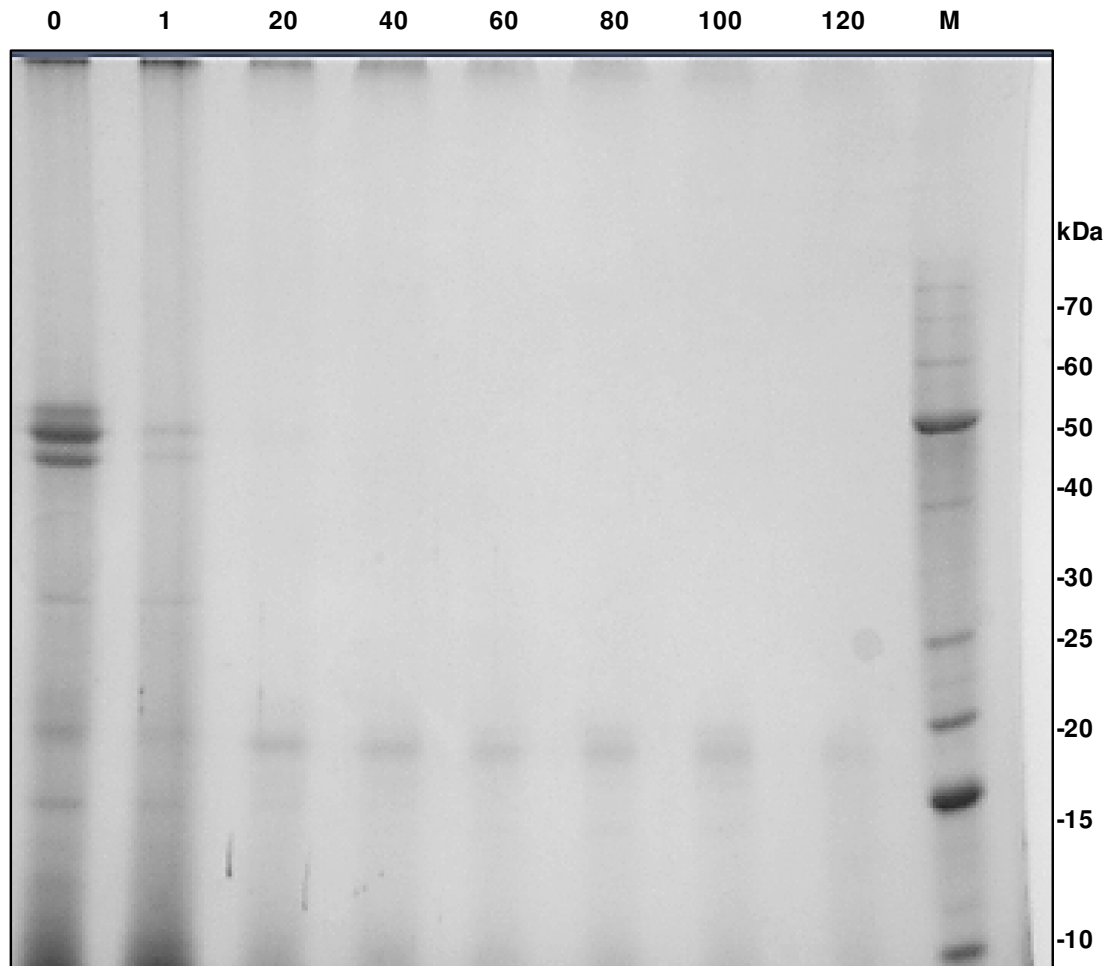


Figura 8. Monitoreo de la hidrólisis de la proteína de frijol Azufrado Higuera en electroforesis de primera dimensión (SDS-PAGE). El carril con número 0 de la parte superior de la foto representa al concentrado proteico (CP) antes de la hidrólisis, el carril 1 es la muestra al minuto inmediato después de añadir alcalasa al CP para su hidrólisis, el carril 20 es la hidrólisis a los 20 minutos, carril 40 representa 40 minutos de hidrólisis, carril 60 representa 60 minutos, carril 80 representa 80 minutos, carril 100 representa 100 minutos, el carril 120 representa 120 minutos y M representa al marcador molecular.

8.2.2 Efecto antihipertensivo del hidrolizado a corto-plazo en SHR

Con el antecedente de Valdez-Ortiz *et al.* (2012) y considerándose así el resultado reportado de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina $IC_{50} = 0.10 \mu\text{g/mL}$ del frijol azufrado Higuera (hidrolizado con alcalasa), se tomó como base este resultado inhibidor para llevar a cabo una evaluación preliminar de cómo sería su efecto reductor de presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en un ensayo a corto-plazo (Tabla 9), para esta prueba se administraron dos dosis (100 mg/kg y 200 mg/kg) a una misma rata con un valor de presión arterial inicial de 154 mmHg, primero fue observada la dosis menor durante 1.5 h y no se vio efecto reductor en ningún tiempo de monitoreo así es que al alcanzar la rata su presión arterial inicial se le administró una dosis mayor (200 mg/kg) donde tampoco se observó disminución de la presión arterial.

Tabla 9. Evaluación preliminar del efector reductor de presión arterial del hidrolizado de frijol común azufrado Higuera en SHR.

Tiempo (h)	100 mg/kg	200 mg/kg
	control de la presión (mmHg)	
0	154	154
0.5	158	155
1	159	154
1.5	154	155

8.3 Obtención del hidrolizado BP3.

Siguiendo la anterior propuesta, se realizó una selección de tamaño molecular de los péptidos que conforman el hidrolizado mediante una ultrafiltración empleando un filtro de peso molecular (3000 MWCO) la cual permitió ultrafiltrar péptidos de peso molecular $<3000 \text{ Da}$. El producto fue nombrado como BP3 por sus siglas en inglés (Bean Peptides 3) dando referencia a la ultrafiltración de 3 kDa. Además, a fin de obtener 30 g de BP3, se hidrolizaron 100 g de concentrado de proteína, lo que representó un rendimiento del 30 %.

8.3.1 Caracterización proximal del hidrolizado BP3

El contenido tanto de Proteína como de Humedad, Grasa, Fibra Cruda, Cenizas y Carbohidratos del hidrolizado BP3 son mencionados en la Tabla 10. Cabe mencionar

que estos resultados se relacionaron con la caracterización proximal previa del concentrado proteico citado en la Tabla 8 y se observó que efectivamente al hidrolizar el concentrado proteico y su ultrafiltración, la composición proximal variaría de manera que la composición proximal del BP3 fue en general menor que la del concentrado proteico, pero mostrando aun su cualidad proteica en la composición de proteína determinada con un valor de 71.4%. Cabe mencionar que incrementó el valor de cenizas en el hidrolizado BP3 comparado con el del concentrado proteico (18.6% vs 3.5%).

Tabla 10. Caracterización proximal del hidrolizado BP3.

Composición	BP3* (%)
Humedad ^a	3.7
Proteína ^b	71.4
Grasa	0.05
Fibra Cruda	0.2
Cenizas	18.6
Carbohidratos (por diferencia)	9.8

^a Humedad base/seca

^b Factor de conversión Nitrógeno-Proteína = 6.25

* Todos los valores son expresados como porcentajes (%) y los resultados fueron las mediciones de medias por triplicado.

8.3.2 Perfil de aminoácidos del hidrolizado BP3.

El perfil de aminoácidos determinado en el concentrado proteico y en el BP3; y su distribución de aminoácidos de acuerdo a las propiedades de su cadena lateral, son mostrados en la Tabla 11, donde se observa que la concentración total de aminoácidos fueron mayores en el concentrado de proteína siendo la única excepción el aminoácido esencial lisina [Lys (K)], que presenta valores de 41.8 y 48.6 mg/g de concentrado de proteína y BP3, respectivamente. Se observó que tanto el concentrado proteico y BP3 tienen elevadas concentraciones de los aminoácidos ácido aspártico [Asp (D)] y ácido glutámico [Glu (E)]. La distribución de los aminoácidos con diferentes características (hidrófilas, hidrófobas, carga negativa y carga positiva) fueron identificados y agrupados, siendo los aminoácidos con propiedades hidrófobas los que se observaron con mayor concentración 329.5 y 267.1 mg/g en el concentrado proteico y BP3, respectivamente.

Tabla 11. Composición de aminoácidos del concentrado proteico y BP3 (mg de aminoácidos por gramo de proteína) y su distribución clasificada de acuerdo a las propiedades de su cadena de aminoácidos lateral.

Distribución de Aminoácidos ^a	Aminoácidos ^b	Concentrado Proteico* mg/g	BP3* mg/g
Hidrofílicos	Ser (S)	45.4	44.2
	Thr (T)	33.2	27.1
	Tyr (Y)	33.3	29.3
		111.9	100.6
Hidrofóbicos	Gly (G)	44.0	34.3
	Ala (A)	68.2	52.7
	Val (V)	Nc	Nc
	Phe (F)	39.1	34.9
	Ile (I)	48.6	42.3
	Leu (L)	71.0	64.2
	Pro (P)	54.8	37.2
	Met (M)	3.8	1.5
	329.5	267.1	
Con carga positiva	His (H)	Nd	Nd
	Arg (R)	41.4	19.7
	Lys (K)	41.8	48.6
	83.2	68.3	
Con carga negativa	Asp (D)	166.3	142.3
	Glu (E)	84.7	77.2
		251.0	219.5

^a La distribución de aminoácidos es clasificada de acuerdo a las propiedades de su cadena lateral y la suma total en mg de aminoácidos distribuidos de acuerdo a su clasificación fueron cuantificados.

^b Estándar de aminoácidos (Sigma-Aldrich lot: BCBJ2713V).

* Todos los valores son en mg de aminoácido por gramo de proteína y las medias son mediciones por triplicado. Nc es cuantificado y Nd es no detectado. Factor de conversión Nitrógeno-proteína = 6.25.

8.3.3 Análisis Electroforético SDS-PAGE del hidrolizado BP3.

La figura 9 muestra el análisis electroforético SDS-PAGE del BP3, para este estudio se utilizó un marcador de peso molecular de 2.5 - 17 KDa (Sigma Aldrich), la muestra fue analizada por triplicado y no se detectó ninguna banda que se observara entre el margen del tamaño molecular del marcador, lo que puede indicar que el previo proceso de ultrafiltrado del hidrolizado BP3 fue exitoso, resultando posiblemente un hidrolizado que contenga péptidos de menor peso molecular que 2.51 KDa indicado en el marcador de

este análisis. Sin embargo, para comprobar lo que se observó en esta figura fue necesario realizar una huella peptídica y así conocer las masas de los péptidos incluidos en el hidrolizado BP3.

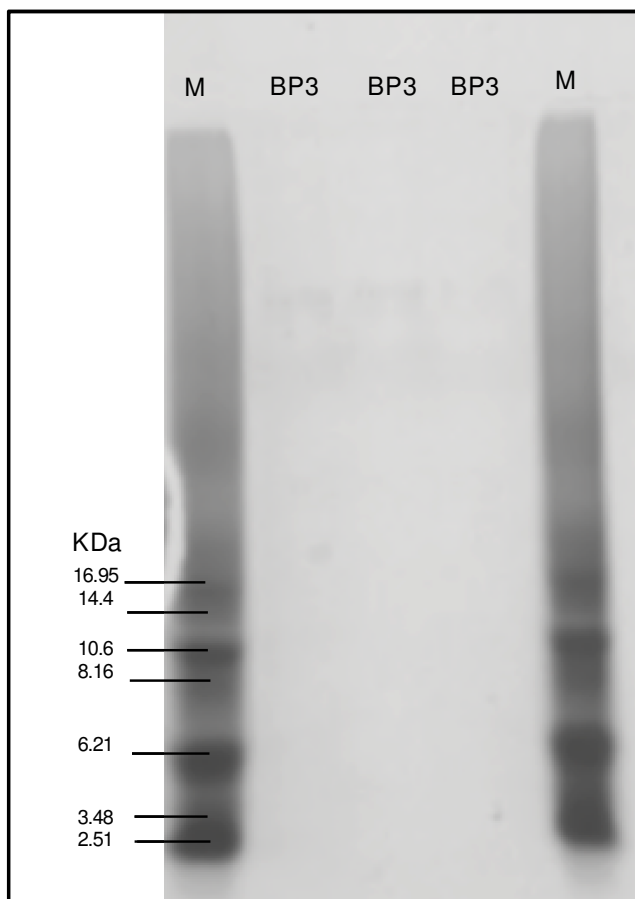


Figura 9. Electroforesis *SDS-PAGE*, con un gel Tris-tricine (10-20%), en cada pozo del gel se depositaron 15 μ L tanto del marcador de peso molecular (M) como del BP3 a (1mg/mL).

8.3.4 Espectrometría de masas y análisis de datos.

Las huellas digitales de las masas de los péptidos del hidrolizado BP3 se determinaron por MALDI-TOF-TOF. Los iones fueron controlados en el campo: 500-2200 m/z donde 21 espectros de masas fueron identificados (Figura 10). Tres espectros de masas fueron detectados como péptidos mayoritarios o abundantes en el hidrolizado y los datos en bruto adquiridos se analizaron con Novo Secuenciación por BioTools software 3.2 (Bruker Daltonics). Las secuencias de los tres péptidos mayoritarios fueron: KFPWVK, GADFRKK y PQSPCKRVNRHS. La actividad biológica potencial de los

péptidos como péptidos bioactivos se predijo mediante el uso de la base de datos BIOPEP y el potencial inhibidor de la ECA se predijo en los tres péptidos (Tabla 12).

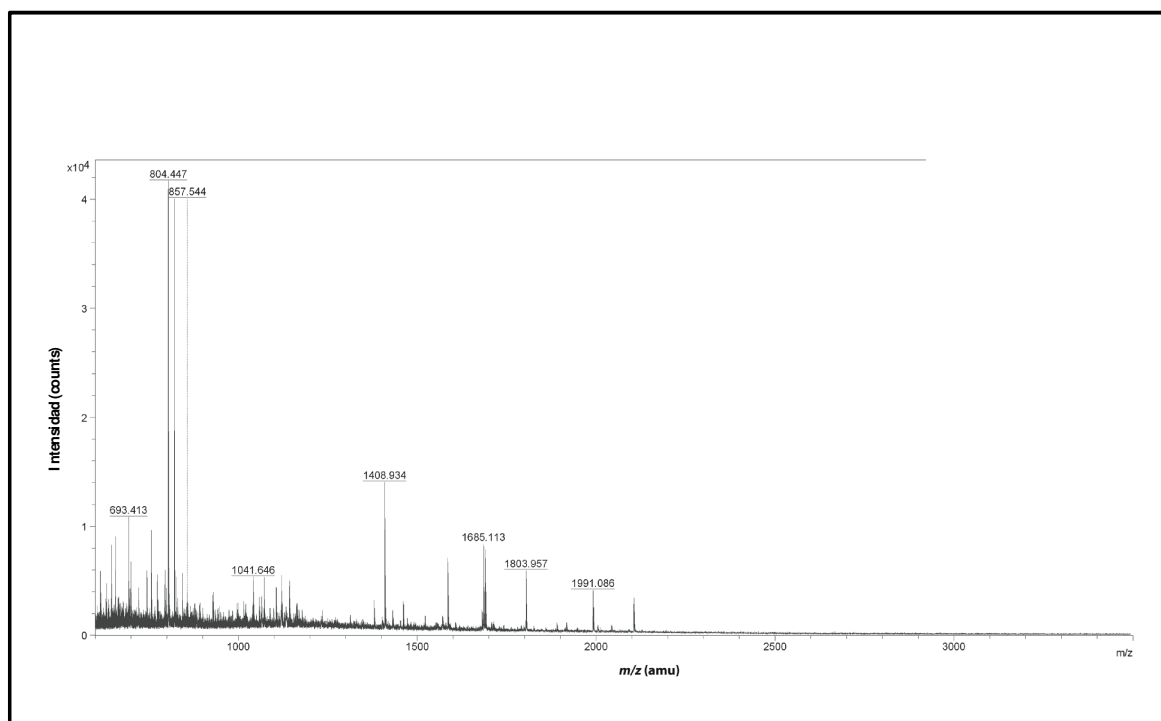


Figura 10. Huella digital de masas de péptidos contenidos en el hidrolizado de frijol común (BP3) por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.

Tabla 12. Masa molecular de los péptidos contenidos en el hidrolizado de frijol común por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF, secuenciación por Novo sequencing y estimación de su bioactividad *in silico*.

Masa. <i>m/z</i>	Secuencia del Péptido	Secuencia Bioactiva ^a	Bioactividad ^a
804.4	KFPWVK	FP, VK, KF	iECA
821.4	GADFRKK	FR, GA	iECA
1408.9	PQSPCKRVNRHS	KR, PQ	iECA

^a La Bioactividad fue obtenida de la base de datos BIOPEP. iECA= Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.

8.3.5 Actividad Inhibitoria de ECA del hidrolizado BP3.

El gráfico de ajuste lineal de la actividad inhibidora de la ECA (iECA) del BP3 se muestra en la Figura 11, donde observamos el porcentaje iECA de BP3 (70%) a una concentración de 1 mg/L. Sin embargo, para determinar el potencial de la actividad antihipertensiva en un compuesto, el valor IC₅₀ fue calculado y se define como la

concentración necesaria para inhibir el 50% la actividad de la ECA, el valor IC_{50} para BP3 fue de $3.68 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$.

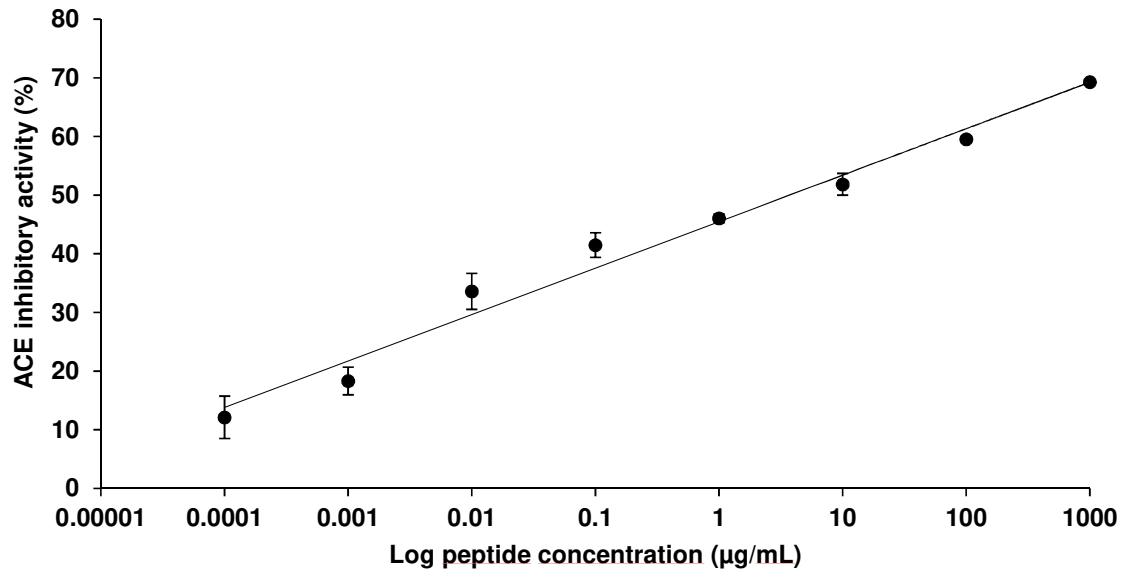


Figura 11. Actividad inhibitoria de ECA en el hidrolizado BP3 tratado con enzima alcalasa. Los valores son medias de mediciones por triplicado.

8.3.6 Efecto antihipertensivo del hidrolizado BP3 a corto-plazo en SHR.

8.3.6.1 Evaluación preliminar del efecto antihipertensivo de diferentes dosis de BP3.

Se realizaron pruebas preliminares con el objetivo de seleccionar la dosis de BP3 (<3 kDa) con mejor efecto antihipertensivo en ratas SHR (Figura 12); Se evaluaron diferentes dosis administradas vía oral: 50, 200 y 500 mg/kg de peso corporal además de agua como control en ratas SHR. En estos experimentos se usó un número pequeño de individuos ($n=3$) por cada grupo de estudio. En el resultado solo se observó efecto antihipertensivo de la dosis de 500 mg/kg de peso corporal de BP3 en los primeros 30 minutos después de la administración del tratamiento hasta el final de su monitoreo a las 5 h, este efecto se mantuvo constante desde el inicio hasta las 2.5 h y pareciera que el efecto fue pasando progresivamente después de las 3 h, no siendo el caso para las dosis de 50 y 200 mg/kg donde incluso sus resultados tuvieron un comportamiento variable.

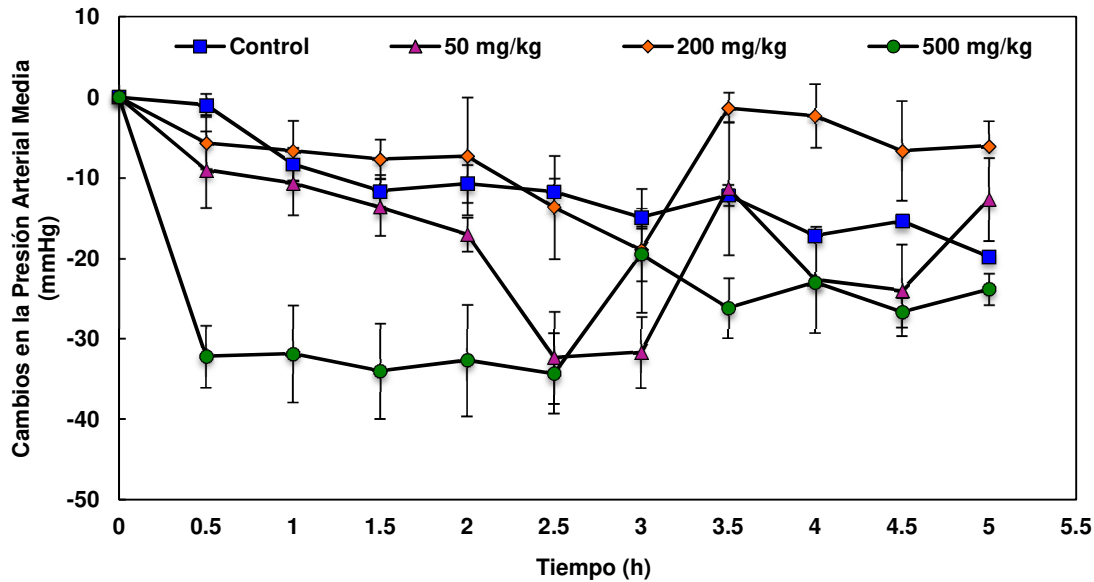


Figura 12. Evaluación preliminar a corto plazo del efecto antihipertensivo de diferentes dosis (50, 200 y 500 mg/kg) de BP3 por el método del transductor de presión durante 5 horas de evaluación en ratas SHR.

8.3.6.2 Evaluación del efecto antihipertensivo de 500 mg/kg de peso corporal de BP3.

Al comienzo del estudio, el valor de PAM basal para el grupo de SHR control fue de 161 ± 7 mmHg (n=7); para el grupo de Captopril 174 ± 5.2 mmHg (n=5) y para el grupo tratado con BP3 fue 164 ± 4.7 mmHg (n=8). Después de la administración oral de los diferentes tratamientos, se observaron los cambios de PAM (Figura 13). Según la prueba de modelos lineales generalizados, hubo efecto estadísticamente significativo en los cambios de presión arterial de los factores predictivos (grupos de tratamiento, el tiempo de tratamiento y sujetos), $p= 0.0000$. Después de dos horas de estudio, se observó una diferencia estadística entre los tratamientos ($p=0.0048$) mediante la prueba de comparación múltiple de muestras. Para discriminar entre las medias se realizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher realizada mediante la prueba de comparación de muestras múltiples. Los resultados del LSD mostraron que los tratamientos Captopril y BP3 fueron estadísticamente similares, pero significativamente ($\alpha = 0.05$) diferente del grupo control. Se obtuvieron resultados similares a las 2.5, 3, 4, y 5 h después de haber sido administradas. Sin embargo a las 3.5 y 4.5 h de estudio, todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($\alpha = 0.05$) entre sí. Se observó el máximo efecto antihipertensivo de BP3 a las 3 h de estudio

con una disminución de PAM de -41 ± 5 mmHg. Por lo contrario y en este punto, el grupo con tratamiento de Captopril presentó una mayor reducción de PAM de -46 ± 8 mmHg.

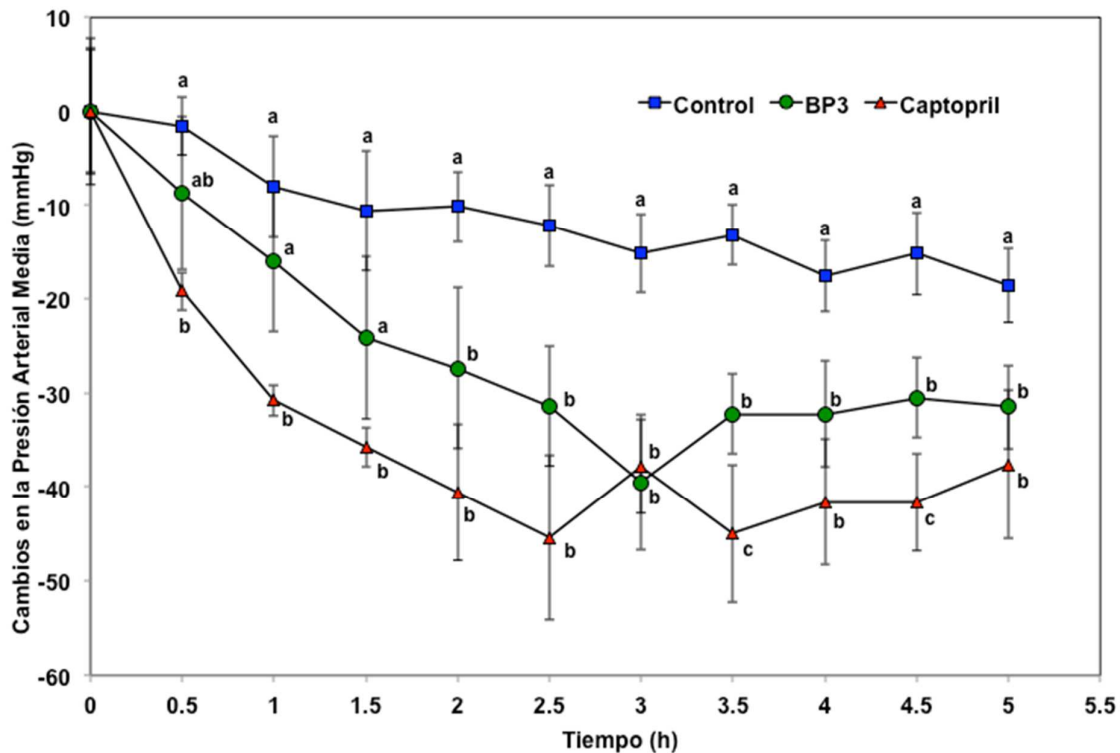


Figura 13. Efecto antihipertensivo a corto plazo del hidrolizado proteico de frijol común (BP3) en SHR, por el método del transductor de la presión durante 5 h de evaluación, las diferentes letras representan la diferencia estadística de acuerdo al método LSD por la prueba de rangos múltiples ($\alpha=0.05$) con un nivel de confianza de 95%.

8.3.7 Efecto antihipertensivo a largo-plazo en SHR.

Al igual que el estudio a corto-plazo en SHR sobre el efecto antihipertensivo de BP3, se midieron los valores de la PAS basal al comienzo del estudio. El valor de la PAS basal para el grupo de SHR control fue de 192 ± 5 mmHg; el del grupo de SHR tratado con Captopril fue 197 ± 6 mmHg; y el del grupo SHR tratado con BP3 fue de 200 ± 9 mmHg. Las diferencias en los valores basales entre los ensayos a corto plazo y largo plazo fueron debido a los tipos de medidas de la presión arterial utilizados para cada ensayo (MAP y PAS). Según la prueba de modelos lineales generalizados, hubo efecto en los cambios de presión arterial estadísticamente significativo de los factores predictivos (grupos de tratamiento, el tiempo de tratamiento y sujetos), ($p= 0.0000$). Además, la Figura 14 muestra que después de la administración oral de 1 mL/12 h de agua destilada (tratamiento control), o 25 mg/kg de peso corporal/12h de Captopril, o

500 mg/kg de peso corporal/12hr de BP3, la reducción de la PAS en SHR no fue significativamente diferente ($\alpha = 0.05$) a los 15 y 30 días de administración de todos los tratamientos. Sin embargo, a los 45 días de administración se observó efecto antihipertensivo para los tratamientos BP3 y Captopril sin diferencia entre ellos, pero significativamente diferentes al grupo control. El análisis de varianza (ANOVA) por la prueba de comparación de muestras múltiples (Tabla 13) confirmó las diferencias estadísticas entre los tratamientos a los 15, 30 y 45 días. Además, el método LSD mostró que la reducción de la PAS en el grupo Captopril (-26 ± 2 mmHg) y BP3 (-24 ± 5 mmHg) fue similar ($\alpha = 0.05$) a los 45 días de tratamiento, pero estos dos tratamientos fueron significativamente diferentes del grupo control (-4 ± 4 mmHg).

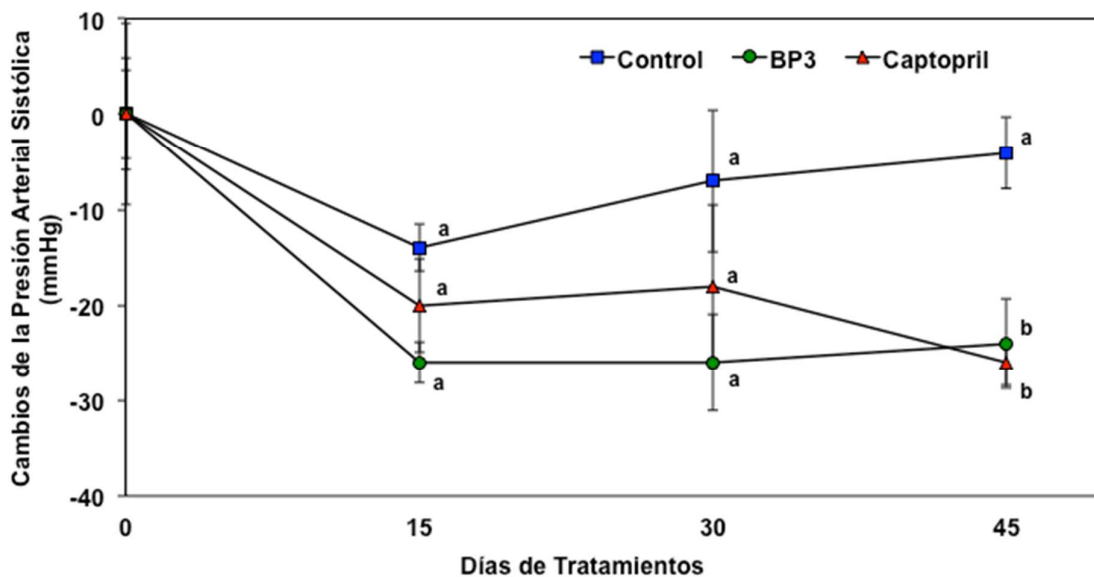


Figura 14. Efecto antihipertensivo a largo plazo del hidrolizado proteico de frijol común (BP3) en SHR, por el método de medición de presión arterial en la cola de la rata con pletismógrafo durante 45 días de evaluación, las diferentes letras representan la diferencia estadística de acuerdo al método LSD por la prueba de rangos múltiples ($\alpha=0.05$) con un nivel de confianza de 95%.

Tabla 13. Análisis estadístico de los resultados del efecto antihipertensivo a largo plazo del hidrolizado proteico BP3 en SHR.

Días de Tratamiento	Gl	Valor F	Valor p
15	(2, 14)	0.98	0.3989
30	(2, 14)	1.04	0.3790
45	(2, 14)	3.90	0.0450

Análisis de varianza (ANOVA) por la prueba de comparación de muestras múltiples.

* Diferencia significativa $p < 0.05$.

IX. DISCUSIÓN

9.1 Obtención de concentrado proteico

El rendimiento de 13% que se obtuvo en el presente trabajo fue similar a lo reportado por Valdez-Ortiz *et al.* (2012), aunque difiere un poco con lo reportado por Corzo-Rios *et al.* (2000) en 12 diferentes tratamientos para la extracción de proteína de frijol terciopelo, sus rendimientos fueron observados alrededor de los valores 8 % y 11 % para los 12 tratamientos, indicando así que el rendimiento de proteína en frijol azufrado según el método empleado en el presente estudio fue mejor. No obstante se necesitan más estudios sobre la eficacia de las técnicas de extracción de proteínas en leguminosas.

9.1.1 Caracterización proximal del concentrado proteico.

Valores similares a 83.8 % de contenido de proteína en el concentrado proteico fueron reportados por Evangelho *et al.* (2016) para el concentrado de proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) donde encontraron un 81.6% de contenido de proteína. Así también se reportó 83.3% de proteína en el análisis proximal del concentrado proteico del frijol variedad Jamapa (Hernández-Álvarez *et al.* 2013).

9.2 Análisis electroforético (SDS-PAGE) del hidrolizado del concentrado proteico.

La desaparición de las bandas en el gel dependiendo del tiempo de hidrólisis se debe según Makri & Doxastakis (2006) a que las bandas de peso molecular mayores a 57 kDa corresponden a la fracción 11S de proteínas de almacenamiento de frijol. Así, la desaparición de la banda entre 45-66 kDa, después del hidrolizado con alcalasa, indica que la fracción 11S se dividió en fracciones de peso molecular de menor tamaño. Este resultado fue también reportado por varios autores que emplearon la enzima alcalasa para la hidrólisis de concentrados de frijol (Fuentes-Gutiérrez 2010; Hernández-Álvarez *et al.* 2013; Evangelho *et al.* 2016).

9.2.1 Efecto antihipertensivo del hidrolizado a corto-plazo en SHR

Cabe mencionar que teníamos la noción de que se observaría este resultado,

debido a la administración del hidrolizado total de la proteína sin previa ultrafiltración, por lo que el hidrolizado estaría constituido por péptidos grandes de alto peso molecular. Estudios sobre la absorción y la bioactividad de los hidrolizados proteicos, reportan que los pequeños péptidos de bajo peso molecular (<3000 Da y <1000 Da) se absorben mejor en el tracto digestivo y por lo tanto tienen un mejor efecto antihipertensivo que los péptidos de alto peso molecular. En particular, el potencial bioactivo de pequeños péptidos es más alto debido a que pueden ser absorbidos en el intestino sin ser descompuesto por las enzimas digestivas y de este modo llegan a los sitios diana para potenciar su actividad (Meisel *et al.*, 2006). Debido a lo anteriormente mencionado, se propuso mejorar la calidad de obtención del hidrolizado proteico del frijol común azufrado Higuera para que este pudiera ser un buen potencial reductor de la presión arterial.

9.3 Obtención del hidrolizado BP3.

Un estudio de optimización del proceso de hidrólisis de la proteína de soya con flavoenzimas, reportó que a medida de que los parámetros de tiempo y temperatura del proceso del hidrolizado incrementaban, el rendimiento del hidrolizado sin ultrafiltrar resultaba mayor: 40 % de rendimiento (120 min/45 °C); 50 % (180 min/55 °C) y 60% (150^o min/50 °C) (Rostammiry *et al.* 2017). Argumentando nuestro rendimiento de 30 % de hidrolizado BP3, remarcaremos que las condiciones de proceso para la hidrólisis fueron 120 min/50 °C con la enzima alcalasa además nuestro rendimiento fue del hidrolizado ultrafiltrado (<3000 Da), lo que indica que todo lo que fue mayor a 3000 Da no pasó por el filtro y ese producto no fue colectado para el propósito del estudio ni tampoco fue cuantificado, se podría estimar que ese rendimiento desechado sería de alrededor de 10-20 %, sin embargo se necesitaría determinar con detalle los porcentajes de rendimientos tanto para el producto ultrafiltrado como el sub-producto de la ultrafiltración del hidrolizado BP3. Es importante mencionar que no existen estudios reportados que se concentren en estimar rendimientos del proceso de hidrólisis de proteínas vegetales, la mayoría de ellos hacen estudios de optimización de la hidrólisis midiendo diferentes parámetros y solo determinan su eficacia según su grado de hidrólisis pero no en rendimientos, aunado a esto tampoco se encuentran reportes del rendimiento de hidrolizados ultrafiltrados.

9.3.1 Caracterización proximal del hidrolizado BP3

Cabe mencionar que el alto valor de cenizas encontrado en el BP3 comparado con el del concentrado proteico (18.6% vs 3.5%), fue debido al uso de altas concentraciones de NaOH 2M y de HCl 2M en el proceso de la hidrólisis con la enzima alcalasa, por lo que el uso excesivo de agentes alcalinizantes y acidificantes se vio reflejado en la cantidad de cenizas determinadas en la caracterización proximal.

9.3.2 Perfil de aminoácidos del hidrolizado BP3.

La menor concentración de aminoácidos observada en BP3 se atribuye a la pérdida de aminoácidos debido a los procesos de hidrólisis y ultrafiltración. Tanto el concentrado proteico y BP3 contienen elevadas concentraciones de los aminoácidos ácido aspártico [Asp (D)] y ácido glutámico [Glu (E)], los cuales son responsables de la característica ácida de las proteínas. Así mismo, se ha indicado anteriormente, que la propiedad hidrófoba de aminoácidos es una característica muy importante de los péptidos con capacidad inhibidora de la ECA (Pihlanto 2000).

9.3.3 Espectrometría de masas y análisis de datos.

Estas tres secuencias que muestran tener actividad inhibidora de ECA *in silico* pueden ser también responsables de la actividad antihipertensiva en los ensayos *in vivo*. Sin embargo, se recomienda para estudios posteriores, el aislamiento y purificación de los tres péptidos mayoritarios de BP3, así como sus evaluaciones en la actividad inhibidora de ECA *in vitro* y su efecto antihipertensivo en ensayos *in vivo* con ratas SHR, de manera que los resultados puedan ser correlacionados.

En el caso de péptidos inhibidores de la ECA, los inhibidores peptídicos más potentes y específicos con estructuras similares y actividad de la ECA fueron fuertemente influenciados por la secuencia del tripéptido C-terminal de los péptidos. Los tripéptidos con W, Y, F, P y un aminoácido hidrófobo en el extremo C-terminal mostraron ser eficaces en la actividad inhibidora de la ECA debido a la interacción entre tres subsitios en el sitio activo de la ECA (Pihlanto 2000).

Los péptidos del hidrolizado BP3 contienen aminoácidos hidrófobos pero no P en la secuencia del tripéptido C-terminal. Li *et al.* (2006), aislaron péptidos de frijol mungo con

la característica de ser inhibidores de ECA (LNYRL, VTPALR y KLPAGTLF). También un octapéptido (PVNNPQIH) aislado del hidrolizado del pequeño frijol rojo mostró ser un inhibidor de la ECA (Rui *et al.* 2013). En una investigación de hidrolizado de proteína de chícharos, Jakubczyk y Baraniak (2014) reportaron cinco péptidos aislados con fuerte capacidad inhibidora de ECA (GGSGNY, DLKLP, GSSDNR, MRDLK y HNTDSR) donde sólo un péptido contiene P en la secuencia del tripéptido C-terminal, sin embargo los autores indicaron que la aparición de ciertos aminoácidos en el extremo C-terminal o en un péptido no necesariamente indicará un fuerte efecto hipotensor.

Los datos de la actividad de la estructura también sugieren que la carga positiva en guanidina o el grupo ϵ -amino en la C-terminal de las cadenas laterales de la arginina (R) y de lisina (K), contribuyen sustancialmente al potencial inhibidor de la ECA de varios péptidos (Maisel 1993). Mojica *et al.* (2015) aislaron péptidos de diferentes variedades de frijol común (Negro, Pinto, rojas, la Armada y la Gran N) con actividad inhibidora de la ECA como bioactividad potencial *in silico* (RKRAAQ, RNEQMGAGRLGRLRK, RRQRRRRMRKDK, QQRLLRRK y YAGGS). En el presente estudio, todas las secuencias de los péptidos del hidrolizado BP3, mostraron R o K en C-terminal, lo que indica que estos péptidos podrían ser inhibidores potenciales de la ECA.

9.3.4 Actividad Inhibitoria de ECA del hidrolizado BP3.

El valor IC_{50} del hidrolizado BP3 de $3.68 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, fue mayor en comparación con el valor IC_{50} de Captopril de $0.0015 \mu\text{g/mL}$ reportados por Tsai *et al.* (2008). Ariza-Ortega *et al.* (2014) reportó para un hidrolizado de proteína de frijol Azufrado Higuera con alcalasa-flavoenzima un $IC_{50} = 4.82 \pm 1.59 \mu\text{g/mL}$ siendo este valor mayor que el resultado obtenido en el presente estudio, es decir se requieren mayores concentraciones de hidrolizado para inhibir el 50% de ECA y a medida que aumente el valor de IC_{50} menor será su capacidad inhibitoria. Varios estudios en hidrolizados de frijol reportan valores mayores de IC_{50} que el del presente estudio, por ejemplo Li *et al.* (2006) reportan un $IC_{50} = 640 \mu\text{g/mL}$ de un hidrolizado de frijol mungo, donde se trató también de un hidrolizado con enzima alcalasa durante 2 h y ultrafiltrado con una membrana de filtración ($<3000 \text{ Da}$). Otros valores no tan elevados como el anterior mencionado fueron reportados por Rui *et al.* (2012) en distintas variedades de frijol hidrolizado sin ultrafiltrar

como Pinto, Navy, Negro Jamapa y Rojo (150, 68, 83 y 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). También Girgih *et al.* (2016) publicaron en estudios de chícharos un IC_{50} = 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Meisel *et al.* (2006) indicaron que el valor de IC_{50} no es siempre directamente relacionado con la reducción de la presión arterial. Por ejemplo, el tetrapéptido YGGY tiene un IC_{50} de 16.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ y después de la administración oral de 100 mg kg^{-1} en las ratas no se observó ningún cambio en la PAS (Saito *et al.* 1994). Por el contrario, el péptido KVLVPVE (β -caseína [f169-175]) resultó tener un IC_{50} de 1,000 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pero en la administración oral de 1 mg kg^{-1} en ratas, estas disminuyeron su PAS -31.5 mmHg (Maeno *et al.* 1996). Por lo tanto, para determinar el efecto antihipertensivo de BP3, es importante considerar realizar ensayos *in vivo* con ratas SHR.

9.3.5 Efecto antihipertensivo del hidrolizado BP3 a corto-plazo en SHR.

9.3.5.1 Evaluación preliminar del efecto antihipertensivo de diferentes dosis de BP3.

La alta variabilidad del resultado del presente ensayo, se explica principalmente a la cantidad pequeña de individuos ($n= 3$) usados para este estudio y al efecto que repercute en los resultados debido a las altas concentraciones de anestesia administradas en las ratas durante todo el ensayo para mantener a las ratas bajo la observación de su presión arterial media (PAM) y que al paso de su anestesia no sean alteradas por dolor a causa de la cirugía. Sin embargo, este ensayo resulta ser muy difícil de mantener estable ya que el paso impredecible de la anestesia, es muy notable en el monitoreo de la presión ya que se registran valores más elevados e inestables de presión PAM. Además, es importante mencionar que el número de individuos utilizados en el ensayo fue muy pequeño, lo que conlleva a un resultado con mayor error de precisión y menor seguridad estadística, ya que incrementa la variabilidad de los resultados y su error. Sin embargo, fue posible identificar exitosamente la dosis con mejor efecto antihipertensivo, observándose la dosis de 500 mg/kg de peso corporal de BP3 como la más efectiva.

Rojo (2014), mencionó que la estimación del número de sujetos requeridos para responder a una pregunta experimental es un paso importante en la planificación de un estudio, aunque también puntualizando en que una muestra de tamaño excesivo o simplemente un ensayo mal planificado, puede incluso también resultar en pérdidas de

vidas animales y otros recursos, incluyendo tiempo y dinero, ya que un resultado válido se puede obtener con un número reducido de animales.

Un estudio con un número pequeño de individuos ($n=3$) es el de Ariza-Ortega *et al.* (2014), ellos reportaron el efecto antihipertensivo de 4 mg/kg de peso corporal de hidrolizado de frijol Azufrado (3-10 kDa) administrado por vía intraperitoneal en ratas SHR, los resultados observados fueron una disminución máxima de PAS de -27.13 ± 11.17 mmHg a las 2 h después de su administración. Sin embargo, se considera que para efecto de publicar la capacidad antihipertensiva de este hidrolizado (3-10 kDa) debieron haber estudiado un mayor número de individuos para aumentar la confianza estadística, además que la administración intraperitoneal del hidrolizado de proteínas no es usual en estudios *in vivo* en ratas SHR. Considerando lo planteado y para el siguiente ensayo a corto-plazo de la evaluación del efecto antihipertensivo de la dosis de 500 mg/kg de peso corporal de BP3 (<3 kDa) administrada en ratas SHR vía oral, se realizará con un número considerado no menor de 5 ratas ni mayor a 10 ratas.

9.3.5.2 Evaluación del efecto antihipertensivo de 500 mg/kg de peso corporal de BP3.

Existen limitados estudios sobre el efecto antihipertensivo de péptidos de fuentes de legumbres en SHR. Uno de pocos estudios llevados a cabo en hidrolizados de leguminosas en frijol mungo (<3kDa) por Li *et al.* (2006), reportaron una disminución significativa de PAS seguido de la administración oral de 600 mg/kg de peso corporal, lográndose la mayor reducción después de 6 h (-30.8 mmHg). Con base a este estudio, el efecto antihipertensivo de BP3 representó una forma más eficaz de reducir la PAS a una dosis más baja y en un corto periodo de tiempo en comparación al hidrolizado de frijol mungo. En un estudio del hidrolizado de proteína de chícharo (<3kDa), Li *et al.* (2011) reportaron una reducción máxima en PAS de -19 mmHg en SHR en 4 h de estudio, después de haber sido administrado vía oral 200 mg/kg de peso corporal del hidrolizado. Esto corresponde a un 46.34% del efecto hipotensor de BP3 (-41 mmHg) en las ratas SHR, lo que podría indicar el efecto beneficioso de BP3 sobre SHR. Sin embargo, ya que el hidrolizado de proteína de chícharo se administró a una dosis más baja, resulta difícil comparar la eficacia real de BP3 sobre la inducida por hidrolizado de proteína de chícharo por la diferencia de las dosis evaluadas.

Haciendo énfasis en las limitaciones del ensayo a corto-plazo evaluado en el presente

estudio, aclararemos que se trató de un método de tipo invasivo, clasificado así debido a que las ratas de estudio están en cirugía durante el estudio, este ensayo es molesto y doloroso para las ratas ya que se les administran altas dosis de anestesia, la cual las hace susceptibles a asfixias y es necesario estar pendientes para intervenir y evitarlo limpiando su tráquea constantemente y además tienen que ser sacrificadas al fin del ensayo. Sin embargo, es un ensayo que en ocasiones es necesario para estudios *in vivo*, principalmente porque permite observar el efecto del tratamiento en las ratas en tiempo real minuto a minuto durante todo el ensayo y este es el punto atractivo de llevarlo a cabo.

Sin embargo, resulta ser muy complicado y nada práctico ya que las ratas deben ser observadas y monitoreadas en presencia física del analista sin descuido alguno y no quitarles la atención durante las horas del ensayo, mas el tiempo que fue necesario previo y después a la cirugía. Cabe mencionar que todos los reportes anteriormente mencionados para el estudio del efecto antihipertensivo en ratas, fueron estudios del tipo no invasivo, donde utilizaron un pletismógrafo (instrumento para la medición de la presión arterial en la cola de las ratas), lo que lo hace un ensayo práctico y menos molesto para las ratas, no permite la observación minuto a minuto, pero como se pudo observar en los estudios previamente citados, si es posible monitorear el valor de la presión arterial cada hora o cada dos horas así como también es el método mas usado para los ensayos a largo-plazo, ya que las ratas no son agredidas y pueden ser usadas como objeto de estudio por tiempos prolongados.

9.3.6 Efecto antihipertensivo a largo-plazo en SHR.

Hasta el momento existe sólo un estudio de la capacidad antihipertensiva a largo plazo de hidrolizados proteicos en fuentes de legumbres. Li *et al.* (2011) reportaron el efecto antihipertensivo de un alimento para ratas a base de caseína suplementado con un hidrolizado de proteína de chícharo en ratas Han: SPRD-CY (un modelo de ratas con enfermedad renal crónica), los autores indicaron que la disminución de la PAS máxima se observó a los 45 días de estudio (-35 mmHg). En el presente estudio, se observó una disminución máxima similar en la PAS de -24 ± 5 mmHg registrada también a los 45 días del estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos por Li *et al.* (2011) no se pueden comparar con los del presente estudio, debido a que el modelo de rata usado fue diferente en ambas investigaciones. Además, ellos evaluaron un alimento suplementado

con hidrolizado de chícharo y caseína, mientras que en el presente estudio se utilizó un hidrolizado de proteína pura (BP3) de frijol común azufrado Higuera. Esa diferencia en los valores de PAS observadas entre los estudios se atribuye a las diferencias indicadas por los modelos de las ratas y la fuente de hidrolizado de proteínas usadas.

Cabe mencionar, que se observaron datos con mucha variabilidad en las gráficas de ambos ensayos *in vivo* evaluados en el presente estudio, sin embargo esta gran incertidumbre en la medición reportada también es muy común, debido a múltiples factores que afectan el valor verdadero. Por lo general, los experimentos con modelos animales siempre dan muy alta variabilidad y es mas normal en un método invasivo debido a la exposición de estrés inducida como la anestesia y la cirugía, por lo que es importante aumentar el número de individuos cuando se trabaja en modelos animales o bien optar por ensayos no invasivos. Sin embargo, la viabilidad de estos dos métodos ha sido defendida en muchos trabajos ya reportados. El objetivo del presente estudio no fue evaluar la eficacia entre estos dos métodos. Sin embargo, cada uno de los ensayos con ratas SHR a corto y largo-plazo fueron empleados con éxito.

Cabe resaltar que los resultados de la evaluación del efecto antihipertensivo del hidrolizado BP3 en ambos ensayos *in vivo*, sugieren varias alternativas de administración para el tratamiento de la hipertensión arterial; ya que se observó en diferentes puntos del estudio *in vivo* que no existe diferencia significativa para la disminución de la presión arterial en el tratamiento con BP3 como en el tratamiento con Captopril, lo cual sugiere que Captopril podría ser sustituido para el control de dicha enfermedad, pero sin duda para muchos pacientes sería una decisión muy aventurada, pues es evidente que es necesario realizar más estudios para aumentar su confiabilidad, como la farmacocinética, farmacodinámica, estudios toxicológicos etc. Por otro lado, se visualiza otra vía alternativa en el tratamiento para la hipertensión y esta podría ser el uso del hidrolizado BP3 combinado con Captopril, además se puede sugerir una disminución en la dosis del Captopril, así el paciente podría disminuir progresivamente la dosis del fármaco Captopril hasta incluso quedar en la mínima dosis necesaria o eliminarla en su totalidad, también es posible que el efecto de la combinación de los dos tratamientos pudieran desencadenar mayor potencia en la disminución de la presión arterial que la administración individual de estos tratamientos, sin embargo es necesario hacer otros

estudios en ratas SHR para observar el efecto de la combinación de los dos tratamientos, así como el estudio de la disminución progresiva de Captopril.

Aclaremos también que los péptidos al ser ingeridos vía oral son rápidamente degradados por una gran variedad de proteasas, teniendo una vida media *in vivo* reducida. Según Lien y Lowman (2003), reportaron que existen factores que influyen en esta estabilidad, como el tamaño, la estructura y la composición. Péptidos pequeños lineales sin modificaciones estructurales (como por ejemplo, amida C-terminal, D aminoácidos o aminoácidos no naturales) se degradan en un tiempo de vida medio de 2 a 5 min, mientras que péptidos mayores y péptidos que incorporen puentes disulfuro o motivos no proteinogénicos pueden alargar este tiempo considerablemente. Un segundo factor de eliminación que sufren los péptidos está condicionado por su pequeño tamaño, que permite que sean filtrados por el riñón; Aunque algunas compañías estudian la síntesis de análogos más estables, y la conjugación de péptidos con moléculas de mayor tamaño para evitar su filtración (Rafferty *et al.* 2016).

Las dosis de péptidos de origen natural utilizadas tanto en estudios con animales como en humanos, siempre han sido altas en comparación con las dosis de los fármacos, con el fin de obtener la mínima concentración de péptido para realizar su bioactividad *in vivo*. La forma de administración de cualquier fármaco es crucial, siendo importante que se puedan administrar de la manera menos traumática, por eso la administración vía oral sigue siendo la preferida y la idónea, sin embargo los péptidos al degradarse rápidamente en el estómago debido a su naturaleza proteica, son muy difíciles de administrar por vía oral, es por ello que muchas compañías están desarrollando tecnologías que permitan una administración oral protegiendo la concentración de los péptidos de las proteasas que puedan degradarlo (Fosgerau and Hoffmann, 2015).

X. CONCLUSIONES

El hidrolizado de la proteína de frijol común Azufrado Higuera (BP3) obtenido después de la hidrólisis con alcalasa y un proceso de ultrafiltración (3000 MWCO) tuvo un rendimiento del 30 %. No existen reportes acerca del rendimiento de hidrolizados proteicos ultrafiltrados de vegetales que sirvan de referencia para comparar el rendimiento obtenido de 30 %. Sin embargo, se sugiere optimizar los procesos para incrementar su rendimiento y calidad.

La caracterización proximal del hidrolizado BP3 presentó un alto valor de proteína (71.4 %), lo cual es una característica distintiva de un hidrolizado proteico, aunque también se observó un alto porcentaje de cenizas (18.6 %), debido a las altas concentraciones de NaOH usadas en la hidrólisis. Esto pudo haberse evitado si el hidrolizado una vez ultrafiltrado se hubiera dializado para separar las sales del contenido proteico.

Los aminoácidos con diferentes características (hidrófilas, hidrófobas, carga negativa y carga positiva) fueron identificados y agrupados, siendo los aminoácidos con propiedades hidrófobas los que se observaron con mayor concentración (267.1 mg/g) en el hidrolizado BP3, una característica muy importante que potencia a los péptidos inhibidores de la ECA.

Las huellas digitales de las masas de los péptidos del hidrolizado BP3 fueron determinadas, tres espectros fueron detectados como péptidos más abundantes en el hidrolizado y el análisis de sus datos en bruto por Novo Secuenciación determinó las secuencias de éstos péptidos (KFPWVK, GADFRKK y PQSPCKRVNRHS), el potencial inhibidor de la ECA se predijo *in silico* en los tres péptidos mediante el uso de la base de datos BIOPEP, este dato da referencia a que éstas secuencias podrían tener potencial antihipertensivo *in vivo*. Sin embargo, sería interesante para estudios posteriores, el aislamiento y purificación de los tres péptidos mayoritarios de BP3, así como sus evaluaciones en la actividad inhibidora de ECA *in vitro* y su efecto antihipertensivo en ensayos *in vivo* con ratas SHR, de manera que los resultados puedan ser correlacionados. Sin embargo, el presente estudio ha logrado dar ya un paso grande en el camino de la búsqueda de péptidos bioactivos, porque es importante resaltar que las secuencias son presentadas por primera vez en frijol común azufrado Higuera y pertenecerá al conjunto de péptidos con bioactividad en las bases de datos de péptidos.

La capacidad inhibitoria de ECA del hidrolizado BP3 fue analizada *in vitro*, el valor de su $IC_{50} = 3.68 \mu\text{g/ml}$ fue alto según reportes anteriormente citados. Sin embargo, cabe mencionar que el valor IC_{50} no es siempre directamente relacionado con la reducción de la presión arterial por lo que siempre es importante considerar la correlación de los valores *in vitro* con los resultados *in vivo*.

El efecto de BP3 sobre la reducción de la presión arterial fue mostrado en ensayos *in vivo* con ratas SHR. En un ensayo a corto plazo, se observó en las ratas una disminución de presión arterial media (PAM) después de una sola administración vía oral de 500 mg/kg de BP3 donde la caída máxima de PAM (-41 mmHg) fue registrada a las 3 h de estudio. Por otro lado Captopril mostró a las 2.5 h su caída máxima de PAM (-46 mmHg) en general ambos tratamientos mostraron tener similar efecto antihipertensivo sin diferencia estadística a las 2, 2.5, 3, 4 y 5 h; lo que nos indica que el hidrolizado BP3 podría ser usado para el tratamiento y control de la hipertensión arterial como se utiliza captopril. Se cree probable que su efecto antihipertensivo *in vivo* se potencializaría, una vez optimizado el proceso de obtención de los hidrolizados por diálisis con membrana para la separación de las sales de los péptidos, además de su recubrimiento como encapsulado o micro encapsulado para protegerlos de las proteasas. El método empleado para este ensayo a corto-plazo fue complicado y también doloroso para las ratas en estudio, sin embargo resultó ser útil para la observación en tiempo real del tratamiento con el hidrolizado BP3, aunque se sugiere optar por métodos no invasivos y más prácticos.

En el ensayo *in vivo* a largo plazo del tratamiento con el hidrolizado BP3, se observó una disminución significativa de la presión arterial sistólica ($-24 \pm 5 \text{ mmHg}$) en las ratas SHR, siendo esta la mayor reducción de presión registrada después de 45 días de administración de los tratamientos, los datos analizados no mostraron diferencia estadística entre los tratamientos con Captopril y el tratamiento con BP3 (500 mg/kg/12 h vía oral). La correlación del valor IC_{50} del hidrolizado BP3 con los resultados del efecto antihipertensivo del tratamiento con BP3 en ambos ensayos *in vivo con ratas SHR*, justifica y respalda el efecto antihipertensivo observado en el hidrolizado BP3. Ambos ensayos *in vivo* mostraron ser efectivos y exitosos en el análisis del efecto antihipertensivo de los tratamientos, sin embargo el ensayo a largo-plazo del tipo no invasivo mostró ser práctico y nada agresivo para los animales, lo cual da pauta a

concluir que se pudo haber logrado el estudio a corto y largo-plazo con únicamente el uso del método no invasivo con el pletismógrafo.

Este es el primer estudio que muestra la capacidad antihipertensiva del hidrolizado de frijol común azufrado Higuera (*Phaseolus vulgaris* L.) administrado vía oral probado en un ensayo a corto y largo-plazo en ratas SHR y que además propone tres secuencias de los péptidos más abundantes en el hidrolizado como los péptidos responsables de dicha capacidad antihipertensiva.

Con base en los resultados de este estudio, se ha aportado un valor agregado al frijol común azufrado Higuera. Y se concluye que estos péptidos representan una valiosa información a la ciencia de los alimentos y a la búsqueda de alternativas naturales de inhibidores de ECA, debido a que pueden tener gran potencial significativo en la salud humana para evitar y controlar la presión arterial alta. El hidrolizado de frijol común Azufrado Higuera BP3, podría ser administrado en cápsulas o comprimidos recubiertos de una película de celulosa o polímeros y podría ser usado como un tratamiento alternativo del Captopril, también podría ser explorada la idea de probar el efecto de los dos tratamientos a la vez en el paciente y eventualmente disminuir las dosis del Captopril.

XI. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentadas en esta tesis doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se pueden orientar en tres direcciones:

- *Producto nutracéutico para el control y tratamiento de la hipertensión presentado como hidrolizado proteico BP3.*

En un primer plano y con el fin de concretar un producto nutracéutico en forma de un hidrolizado proteico para el control de la presión arterial, es necesario completar aspectos de caracterización y optimización del proceso. Primeramente se recomendaría eliminar las sales del hidrolizado mediante diálisis con membranas, ya que estas sales son resultado del proceso de la hidrólisis pero llegan a alterar tanto la composición nutricional del hidrolizado como también sus propiedades fisicoquímicas. También sería conveniente optimizar el proceso para aumentar su producción y rendimiento.

Se propone realizar estudios enfocados a la rectificación del potencial antihipertensivo observado en los resultados del presente trabajo de tesis, por un lado se sugiere aislar y purificar los 3 péptidos mayoritarios del hidrolizado BP3 (KFPWVK, GADFRKK y PQSPCKRVNRHS) y llevar a cabo estudios más concretos como la capacidad inhibidora de ECA *in vitro* para cada péptido, así como también estudios *in vivo* con ratas SHR para evaluar el potencial antihipertensivo de cada uno de estos tres péptidos. Para los estudios con ratas SHR, se recomendaría hacer solo ensayos del tipo no invasivo con 10 individuos para cada grupo a estudiar a corto-plazo por 12 h de estudio (se sugiere que se les administre los péptidos cada 6 h y se haga la lectura de la presión arterial cada 2 h) y una vez corroborado su efecto antihipertensivo, será necesario estudiar el hidrolizado BP3 en función a su farmacocinética y farmacodinámica, así como estudios toxicológicos.

También será interesante valorar el encapsulado o el comprimido del hidrolizado con recubrimiento de polímeros para la protección a las proteasas y su mejor aprovechamiento. Evidentemente la última evaluación y la más importante sería en pacientes con problemas de hipertensión arterial. Sería interesante evaluar su efecto antihipertensivo administrado como único tratamiento o administrado junto con la mitad de la dosis del fármaco prescrito por su médico. Este primer plano es tan solo un camino

de muchos a seguir, pero sin duda llevaría a una posible patente del hidrolizado de proteína de frijol azufrado (BP3) para el control de la hipertensión arterial.

- *Exploración de otras funcionalidades bioactivas del hidrolizado protéico BP3.*

En un segundo plano sería interesante evaluar la funcionalidad de otras bioactividades del hidrolizado BP3 tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Podría ser conveniente concretar los estudios de la capacidad antioxidante o continuar con la exploración de la capacidad anticancerígena, antimicrobiana, inmunológica, antitrombótica y opioide por mencionar algunas bioactividades para la salud humana; pero también pudiera ser posible abrir otras líneas de investigación en la búsqueda del control y mejoramiento de las prácticas agropecuarias.

- *Búsqueda de valor agregado de los subproductos del proceso del hidrolizado BP3.*

En un tercer plano se sugiere una exploración en búsqueda del valor agregado de los subproductos del proceso del hidrolizado BP3 (fibra dietaria, pasta producto de la extracción alcalina de las proteínas e hidrolizado parcial), sería interesante concretar los estudios y avances realizados por nuestro equipo de investigación, enfocados en la caracterización nutricional, fisicoquímica, estructural y de tipo funcional, los resultados de dichos estudios sugeridos podrían revelar a un producto nutracéutico dirigido para la industria alimentaria y agropecuaria.

- *Síntesis del péptido bioactivo del hidrolizado BP3 con mejor efecto antihipertensivo.*

Un cuarto plano sería la síntesis del péptido bioactivo que no nada más es uno de los tres mayoritarios en el hidrolizado de BP3, sino también ya aislado y purificado fue el que presentó mejor efecto antihipertensivo *in vitro* e *in vivo*. Se sugiere la síntesis química para este péptido aunque otra opción podría ser la síntesis con bacterias recombinantes. Cualquiera de estas dos opciones llevaría a este péptido a la industria farmacéutica, pues las síntesis de los péptidos va creciendo en los últimos años y ya existen varios péptidos sintetizados e industrializados. Sin duda es la mejor opción de producir el compuesto activo de cualquier fórmula peptídica a escala industrial.

Se sugiere realizar las pruebas anteriormente mencionadas para la caracterización del hidrolizado BP3, principalmente estudios de la farmacodinámica y farmacocinética del péptido activo, estudios toxicológicos y realizar nuevas evaluaciones de la capacidad inhibidora de ECA *in vitro*, así como otros ensayos *in vivo* del tipo no invasivo con ratas SHR. Se propone realizar ensayos a corto-plazo (5 horas de estudio) para evaluar la dosis idónea del péptido activo en tiempo real y un segundo ensayo a largo-plazo (45 días de estudio) de la dosis idónea del péptido para evaluar su efecto prolongado bajo el tratamiento. Es evidente que una alta producción del péptido bioactivo extraído del hidrolizado BP3 a escala piloto en laboratorios, podría ser muy complicado por el gasto de producción, tiempo y esfuerzo que se necesitarían para lograr aislar y purificar grandes cantidades del péptido para administrarlo en las ratas vía oral. Para solucionar este problema, la síntesis de los péptidos sería lo más conveniente, luego de su encapsulado o microencapsulado para la protección de ellos en el tracto intestinal.

Logrado esto y bajo resultados positivos de las pruebas antes mencionadas, el péptido podría ya también ser probado en pacientes con problemas de hipertensión clínica, se propone estudiar grupos de personas bajo el tratamiento único del péptido sintetizado y otro grupo bajo el tratamiento de la mezcla del péptido sintetizado y la mitad de su fármaco prescrito por el médico. Y finalmente se podría estar muy cerca de lograr una patente del péptido bioactivo para el tratamiento y control de la hipertensión arterial.

XII. REFERENCIAS

Alderman, C. P. 1996. Adverse effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Ann Pharmacother.* 30:55-61.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists, 18th Ed. Methods 930.15 Moisture, 942.05 Ash, 976.05 Nitrogen, 920.39 Fat, 978.10 Crude Fiber, 994.12 Amino acids. W. Horwitz, ed. The Association: Gaithersburg, MD. USA.

Aoki, Y., Yoon, S. S., Chong, Y., & Carrol, M. D. 2014. Hypertension, abnormal cholesterol, and high body mass index among non-Hispanic Asian adults: United States, 2011–2012. NCHS Data Brief, No. 140. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.

Ariza-Ortega, T. J., Zenón-Briones, E.Y., Castrejón-Flores, J. L., Yáñez-Fernández, J., Gómez-Gómez, Y. M., and Oliver-Salvador, M. C. 2014. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Eur Food Res Technol.* 239:785–794.

Barbana, C., & Boye, J. I. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Res Int.* 43:1642–9.

Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Cortés-González, C., Ojeda-Cervantes, M. Gamba, G., Morales-Buenrostro, L. E., and Bobadilla, N. A. 2011. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med* 3:5-20.

Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M., & Chel-Guerrero, L. 2014. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *Int J Food Sci Technol.* 49: 2–8.

Botey. 2006. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Su utilidad clínica. *Endocrinol Nut.* 53:270-278.

Boye. J. I., Roufik, S., Pesta, N., & Barbana, C. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT-Food Sci Technol* 43(6):987–91.

Brown, N. & Vaughan, D. 1998. Cardiovascular drugs: angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation.* 97:1411-1420.

Campos-Vega, R., Oomah, D., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. A. 2013.

Common beans and their non-digestible fraction: Cancer inhibitory activity — An overview. *Foods*. 2:374–392.

Chirino, Y. I., Trujillo, J., Sánchez-González, D. J., Martínez-Martínez, C. M., Cruz, C., Bobadilla, N. A., and Pedraza-Chaverri, J. 2008. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett*. 176:48-57.

Corzo-Rios, L., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. 2000. Extracción de las fracciones de almidón y proteínas del grano de la leguminosa *Mucona Pruriens*. *Tecnol. Ciencia*. 15:37-41.

Dykewicz, M. S. 2004. Cough and angioedema from angiotensin-converting enzyme inhibitors: new insights into mechanisms and management. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 4:267-70.

ENSANUT/ Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de medio camino. 2016. Informe final de resultados. Hipertensión arterial. Instituto Nacional de Salud Pública. http://http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf. (Consultada el 09 de mayo 2017).

Evangelho, J. A., Berrios, J. J., Pinto, V. Z., Antunes, M. D., Vanier, N. L. & Zavareze, E. R. 2016. Antioxidant activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates. *Food Sci Technol Campinas*. 36: 23-27.

FAO. 2014. The statistics division of the FAO. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Consultada el 16 de Mayo 2017).

Fernández, A. C., Nishida, W., & Da Costa Proenca, R. P. 2010. Influence of soaking on the nutrition quality of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cooked with or without the soaking water: a review. *International J Food Sci and Technol* 45:2209-2218.

Fosgerau, K., & Hoffman, T. 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 20: 122-128.

Fuentes-Gutiérrez, C. I. 2010. Evaluación del potencial antioxidante y antihipertensivo de variedades de frijol cultivados en el estado de Sinaloa. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Maestría de Ciencias y Tecnología de Alimentos.

García-Tejedor, A., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Salom, J.B., & Manzanares, P. 2015. Dairy *Debaryomyces hansenii* strains produce the antihypertensive casein-derived peptides LHLPLP and HLPLP. *LWT-Food Sci. Technol*. 61: 550–556.

Georgios-Spyroulias, S., Athanassios-Galanis, S., George-Pairas, Manessi-Zoupa, &

- Paul-Cordopatis. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. *Curr Top Med Chem.* 4: 403-429.
- Girgih, A. T., Nwachukwu, I. D., Onuh, J. O., Malomo, S., & Aluko, R. E. 2016. Antihypertensive properties of a pea protein hydrolysate during short- and long-term oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J Food Sci.* 81:1281-1287.
- Huang, J., Liu, Q., Xue, B., Chen, L., Wang, Y., Ou, S., & Peng, X. 2016. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities and in vivo antihypertensive effects of Sardine protein hydrolysate. *J. Food Sci.* 81: H2831–H2840.
- Hernández-Álvarez, A.J., Carrasco-Castilla, J. Dávila-Ortiz, G., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque-Peña, J., Jacinto-Hernández, C. & Jiménez-Martínez C. 2013. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity in protein hydrolysates from normal and anthracnose disease-damaged *Phaseolus vulgaris* seeds. *J Sci Food Agric.* 93:961–966.
- Jakubczyk, A., & Baraniak, B. 2014. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after in vitro hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) Globulins. *J Biomed Biotechnol Res Int.* 1-9.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Whelton, P. K., & He, J. 2004. Worldwide prevalence of hypertension: A systematic review. *J Hypertens.* 22:11–19.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li, G.-H., Shi, Y.-H., Liu, H., & Le, G.-W. 2006. Antihypertensive effect of Alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Eur. Food Res. Technol.* 222:733-736.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., Jones, P. J. H., & Aluko, R. E. 2011. Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* 59:9854-9860.
- Lien, S., & Lowman, H. B. 2003 Therapeutic peptides, *TRENDS in Biotech.* 21: 556-562.
- López-Sendón, J., Swedberg, K., McMurray, J., Tamargo, J., Maggioni, A. P., & Dargie, H. 2004. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart.* 25:1454-70.
- Luna Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. 2014. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chem.* 157:347–355.

- Luna Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. 2015. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Review. *Food Res Int.* 76:39-50.
- Maeno, M., Yamamoto, Y., & Takano, T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 79:1316-1321.
- Makri, E. A., & Doxastakis, G. I. 2006. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. *Food Chem.* 98: 558-568.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. 2012. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct.* 4:350-361.
- MediciABC. 2013. Introducción al Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. <http://www.medicinabc.com/2013/10/sistema-renina-angiotensina-aldosterona.html>. Consultada en Octubre del 2016.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *J Sci Food Agric.* 92:1974-1981.
- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B., & FitzGerald, R. J. 2006. ACE inhibitory peptides, (chapter 13). Page 269-315 in: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, 4th ed. Y. Mine and F. Shahidi, eds. Academic Press: Taylor and Francis group. Boca Raton, FL. USA.
- Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B. 2010. Biologically active food proteins and peptides in health: an overview. In: Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B., editors. *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell. 5–11.
- Mojica, L., Chen, K., & González de Mejía, E. 2015. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *J Food Sci.* 80:188-198.
- Molina, D. R., García, M. L., Martín, R. E. & Mayoral SE. 2006. Manual de hipertensión arterial en la práctica clínica de atención primaria. Grupo de Hipertensión Arterial. Sociedad Andaluza de Medicina de Familia. [www.femeba.org.ar/fundacion/manual hipertensión arterial](http://www.femeba.org.ar/fundacion/manual-hipertension-arterial). (Consultada el 05 de Agosto del 2012).
- OMS. 2014. Hypertension. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (Consultada el 20 de Mayo del 2017).

Ondetti, M. A., & Cushman D.W. 1984. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological activities. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16: 381-411.

Oomah, B. D., Corbé, A. & Balasubramanian, P. 2010. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. *J Agri Food Chem.* 14: 8225–8230.

Oseguera-Toledo, M. E., González de Mejía, E., & Amaya-Llano, S. L. 2015. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *76:839-851.*

Panorama Agroalimentario. 2016. www.gob.mx/Panorama_Agroalimentario_frijol_2016. (Consultada el 16 de Mayo 2017).

Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. A. 2006. Los alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas. Mexico: Fondo de Cultura Económica (Chapter 3).

Parish, R. C., & Miller, L. J. 1992. Adverse effects of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Drug Saf.* 7:14-31.

Rafferty, J., Nagaraj, H., McCloskey, A. P., Huwaitat, R., Porter, S., Albadr, A., & Lavery, G. 2016. Peptide Therapeutics and the Pharmaceutical Industry: Barriers Encountered Translating from the Laboratory to Patients. *Curr Med Chem.* 37: 4231-4259.

Reyes, C. R. 2014. 50 preguntas claves del frijol. *Panorama Agroalimentario. La revista mensual del campo.* 04:2014.

Ridker, P. M., Libby, P., & Buring, J. E. 2015. Risk markers and the primary prevention of cardiovascular disease. In: Mann, D. L, Zipes, D. P., Libby ,P., Bonow, R. O, & Braunwald, E., eds. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.* 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. Chap 42.

Rojo, A. 2014. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. *Valoración de las incidencias. Técnicas.* 62:31-33.

Rostammiry, L., Reza S. M., Reza S, & Javadian, R. 2017. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolate by Alcalase and Trypsin. *Biosci., Biotech. Res. Asia.* 14:193-200.

Rui, X., Boye, J. I., Barbana, C., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. 2012. Electrophoretic profiles and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of nine varieties of *Phaseolus vulgaris* protein hydrolysates. *Journal of Nutrition and Food Sciences.* 2:1-6.

- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. 2013. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean. *J funct foods*. 5:1116-1124.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., & Imayasu, S. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci Biotech Biochem*. 58:1767-1771.
- Sebastian, J. L., McKinney, W. P., Kaufman, J., Young, M. J. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cough. Prevalence in an outpatient medical clinic population. *Chest*. 99:36-9.
- SIAP-SAGARPA. 2016^a. Avances de la Producción Agrícola. http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (Consultada el 20 de Mayo 2017).
- SIAP-SAGARPA. 2016^b. Atlas Agroalimentario 2016. <http://www.gob.mx/siap/articulos/atlas-agroalimentario-2016-siap-presenta-los-exitos-del-campo-mexicano>. (Consultada el 20 de Mayo 2017).
- Sowers, J. R., Epstein, M., & Frohlich, E. D. 2001. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease, an update. *Hypertens*. 37:1053–1059.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT – Food Sci Technol*. 42:1597–1604.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing and potential health benefits. *J Food Sci*. 77:11-24.
- Unger & Gohlke. 1994. Converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential. *Cardiovasc Res*. 2:146-58.
- 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. *J Food Sci Tech*. 46: 91-96.
- Vallabha, S. V., & Tikku, P. K. 2014. Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation. *Int J Pept Res Ther*. 20:161-168.
- VandenBurg, M. J., Sharman, V. L., Morton, J. J., Williams, G. H. & Marsh, F. P. 1981. Hormonal and blood pressure changes during converting enzyme inhibition by teprotide.

J Postgrad Med. 57:283-288.

Vergara-Castañeda, H. A., Guevara-González, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. F. 2012. Non-digestible fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates signaling pathway genes at an early stage of colon cancer in Sprague–Dawley rats. *Br J Nut.* 108:S145–S154.

Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S., & Wei, J. 2017. A novel antioxidant and ace inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT-Food Sci. Technol.* 75: 93–99.

Wu, G., Davis, P. K., Flynn, N. E., Knabe, D. A., & Davidson, J. T. 1997. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *J Nutr.* 127:2342-2349.

XIII. ANEXO

11.1 Artículo publicado en Journal of Cereal Chemistry. “Antihypertensive Effect of Protein Hydrolysate from Azufrado Beans in Spontaneously Hypertensive Rats”

Antihypertensive Effect of Protein Hydrolysate from Azufrado Beans in Spontaneously Hypertensive Rats

Paola Valenzuela-García,¹ Norma A. Bobadilla,^{2,3} Victoria Ramírez-González,^{2,3} Andrés León-Villanueva,¹ Ismael A. Lares-Asseff,⁴ Angel Valdez-Ortiz,⁵ and Sergio Medina-Godoy^{1,†}

ABSTRACT

Cereal Chem. 0(0):1–7

The objective of this study was to evaluate the antihypertensive potential of common bean protein hydrolysate. Protein concentrates were obtained, followed by Alcalase enzymatic hydrolysis, and then ultrafiltered (3,000 molecular weight cutoff); the lyophilized product was named BP3. The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity was determined as IC₅₀ (3.68 ± 0.07 µg/mL). The antihypertensive effect was evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR) by two assays; Captopril ACE inhibitor was used as a reference compound and water as a control. A short-term assay showed a maximum decrease in mean arterial pressure of -41 ± 5 mmHg in

SHR, 3 h after oral administration of 500 mg of BP3/kg of body weight (bw). In a long-term assay, a significant decrease in systolic blood pressure of -24 ± 5 mmHg was observed in SHR, after 45 days of oral administration of 500 mg of BP3/kg of bw/12 h. In both assays, BP3 treatment showed antihypertensive effect over SHR, similar to Captopril treatment. The sequences of the most abundant peptides present in BP3, determined by mass spectrometry, were identified as KFPWVK, GADFRKK, and PQSPCKRVNRHS. These peptides are reported for the first time in Azufrado Higuera common beans, and they are most likely responsible for the antihypertensive effect of BP3.

Systemic hypertension is one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases, stroke, and chronic kidney diseases. High blood pressure affects 15–20% of the adult population in Western countries (Jung et al. 2006). Angiotensin converting enzyme (ACE), a zinc metallopeptidase, plays an important role in regulating blood pressure. ACE catalyzes the conversion of angiotensin from an inactive decapeptide called angiotensin I to a potent vasoconstrictor octapeptide called angiotensin II, and it inactivates antihypertensive vasodilator bradykinin (Ondetti 1977). Thus, many laboratories have attempted to synthesize new and better ACE inhibitors, as an alternative to Captopril, Enalapril, Alacepril, and Lisinopril ACE inhibitors, which are currently used in the treatment of essential hypertension and heart failure in humans (Patchett et al. 1980).

The search for natural ACE inhibitors as an alternative to synthetic drugs is of great interest among researchers, and many natural ACE inhibitors have been isolated from functional foods and bio-resources. The isolated bioactive peptides from food sources are beginning to have an impact in the treatment of hypertension owing to multifunctional properties such as fewer side effects, good antihypertensive properties, and their easy absorption (Udenigwe and Aluko 2012).

Different studies have identified several ACE inhibitor peptides obtained from enzymatic hydrolysis of various natural sources such as dairy products (Yamamoto et al. 1994), marine products (Jung et al. 2006), vegetable products such as soybeans (Wu and Ding 2001), and rice (Li et al. 2007).

Pulses are inexpensive and affordable source of proteins. Currently, major research efforts have been focused on isolating ACE

inhibiting peptides from legumes such as peas (Li et al. 2011; Jakubczyk and Baraniak 2014), lentils (Boye et al. 2010), chickpeas (Medina-Godoy et al. 2012), mung bean (Li et al. 2006), and common beans (Valdez-Ortiz et al. 2012; Rui et al. 2013; Mojica et al. 2015).

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a pulse cultivated worldwide, and it is considered a nutraceutical food and a good source of protein. In the last decade, pulses have gained attention to produce bioactive hydrolysates and peptides (Luna-Vital et al. 2015). The authors recognize the efforts of several researchers for studies focused on the search for other potential biological uses of protein hydrolysates and peptides from common bean: antioxidant capacity and antidiabetic properties (Oseguera-Toledo et al. 2015), antimicrobial activity (Ariza-Ortega et al. 2014), and tumor cell inhibition activity (Luna Vital et al. 2014). It is important to mention that there are a greater number of reports focused on in vitro assays and few studies focused on in vivo assays, such as the antihypertensive effect evaluated in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Azufrado Higuera bean (*P. vulgaris* L.) is a sulfur yellow common bean variety from the northwestern part of Mexico that is considered an important source of protein. Previously, Valdez-Ortiz et al. (2012) demonstrated that three varieties of Azufrado Higuera bean hydrolysates exhibited ACE-inhibitor activity. The aim of this study was to evaluate the antihypertensive effect of Azufrado Higuera bean protein hydrolysate administered orally in SHRs.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Azufrado Higuera beans (registration number FRI-045-170205) were donated by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Valle del Fuerte, Mexico. ACE (from rabbit lung), hippuryl-L-histidyl-L-leucine as a substrate for ACE, and Alcalase enzyme (from *Bacillus licheniformis*) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, U.S.A.). An ultrafiltration system and ultrafiltration membranes (catalog number PLBC07610) were purchased from Millipore (Billerica, MA, U.S.A.). All chemicals used in this study were of analytical grade.

Preparation of Bean Protein Concentrates. Azufrado Higuera beans were milled (3100 laboratory mill, Perten, Hamburg, Germany), and the resultant flours were kept at -20°C until use. Protein concentrates were obtained as described by Valdez-Ortiz et al. (2012). The supernatants were discarded, and the pellets, which contained the protein concentrate, were lyophilized and stored at -20°C.

*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates that one supplementary figure is published online.

† Corresponding author. Phone: +52 687 87 2 96 26. E-mail: smedinam@ipn.mx

¹ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola, Guasave, Sinaloa, Mexico.

² Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

³ Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., Mexico.

⁴ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Durango, Departamento de Farmacogenómica y Biomedicina Molecular, Durango, Durango, Mexico.

⁵ Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa 80000, Mexico.

Preparation of Protein Hydrolysate. Protein hydrolysis by Alcalase enzyme was carried out according to the method of Valdez-Ortiz et al. (2012). Hydrolysates were filtered in an ultrafiltration system, in which they were fractionated through ultrafiltration membranes with a 3,000 molecular weight cutoff (MWCO), and the ultrafiltered product was lyophilized and stored at -20°C . The hydrolysate obtained contained peptides of different molecular sizes smaller than 3,000, and this fraction was named as bean peptides <3,000 (BP3).

Proximate Analyses. Standard methods (AOAC 2005) were used to determine nitrogen (976.05), fat (920.39), ash (942.05), fiber (978.10), and moisture (930.15) contents of the bean flour, bean protein concentrate, and BP3. Carbohydrate content was estimated as nitrogen-free extract and calculated as the difference between 100 and the sum of percentages of moisture, fat, protein, fiber, and ash.

Amino Acid Analyses. Triplicate samples of protein concentrate and BP3 were analyzed for amino acids. Samples were hydrolyzed at 110°C for 24 h in 6N HCl and prepared for amino acid assay according to method 994.12 (AOAC 2005). Amino acid assays were performed by reversed-phase HPLC (Wu et al. 1997) with an Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) equipped with a fluorescence detector with a 350 nm excitation filter and a 455 nm emission filter. Amino acid standard (1 mmol/ μL in 0.1M HCl) (Sigma-Aldrich, lot BCBJ2713V) was used. To avoid partial loss of methionine, samples were oxidized with performic acid to obtain methionine sulfone prior to acid hydrolysis (Baker 1997). Derivatization was performed with *o*-phthalaldehyde/3-mercaptopyropionic acid and 9-fluorenylmethylchloroformate. Amino acids were separated on a Hypersil ODS $5\ \mu\text{m}$ ($200 \times 2.1\ \text{mm}$) column, preceded with a Hypersil ODS ($20 \times 2.1\ \text{mm}$) guard column.

Measurement of ACE-Inhibitory Activity. Antihypertensive potential in vitro of the protein hydrolysate was determined by the ACE-inhibitory activity according to the method of Valdez-Ortiz et al. (2012). ACE-inhibitory activity of BP3 was evaluated at different concentrations (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, and 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data were adjusted to a linear regression model. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was calculated as the concentration of BP3 required to inhibit 50% of the ACE activity.

Short-Term Antihypertensive Effect in SHR. All experiments involving animals were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council 1996) and were approved by the Animal Care and Use Committee at Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (NMM-47-11-12-1). For this study, 20 male SHRs (10–16 weeks old) were included. Rats were purchased from Harlan Laboratories (Indianapolis, IN, U.S.A.) and reproduced in the animal facility. The rats were housed in polycarbonate cages regulated with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness. All rats were fed a standard chow diet and tap water ad libitum. The SHRs were randomly divided into three groups: the first group was treated with deionized water, SHR+water ($n = 7$), and was designated as the control group; the second group was treated with 50 mg of Captopril ACE inhibitor/kg of body weight (bw) (Sigma-Aldrich), SHR+Cap ($n = 5$); and the third group was treated with 500 mg of BP3/kg of bw (diluted in 800 μL), SHR+BP3 ($n = 8$). A single dose of each treatment was orally administered by gastric gavage. Rats were placed on a heating pad to maintain core body at 37°C and monitored with a rectal thermometer. Then, the rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg of bw), approximately every 2 h, to remain anesthetized throughout the experiment. The femoral arteries and jugular veins were catheterized with polyethylene tubing (PE-50). Isotonic SHR plasma obtained from a donor SHR was infused (10 mL/kg of bw) for 15 min to maintain euvolemic conditions. The mean arterial pressure (MAP) was monitored with a P23Gb pressure transducer (Gould, Cleveland, OH, U.S.A.) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA, U.S.A.) throughout the study. An ultrasound transit-time flow probe was placed around the left artery and

filled with ultrasonic coupling gel (HR lubricating jelly, Carter-Wallace, New York, NY, U.S.A.) to detect renal blood flow, which was translated into MAP by the pressure transducer (Barrera-Chimal et al. 2011). With the supervision of SHR under anesthesia and after 30 min (time required for the finished plasma infusion and stabilization of MAP), MAP was recorded and set as the basal MAP, and control (water) or Captopril ACE inhibitor or BP3 were administered by gavage. MAP was recorded every 10 min for 5 h, and three readings at each point were averaged to provide one recording for every 30 min. Blood samples were taken (approximately 12 mL) at the end of the study. The change in MAP (ΔMAP) was calculated by subtracting the data for the different time points from their respective basal values at time zero.

Long-Term Antihypertensive Effect in SHR. For this study, 17 male SHRs (10–16 weeks old) were included. Rats were regulated with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness, and all animals were fed a standard chow diet and tap water ad libitum. The SHRs were randomly divided into three groups: a control group with water, SHR+water ($n = 6$); a group treated with 25 mg/kg of bw/12 h of Captopril ACE inhibitor, SHR+Cap ($n = 6$); and a group treated with 500 mg/kg of bw/12 h of bean peptides, SHR+BP3 ($n = 5$), diluted in deionized water. A dose of each treatment was orally administered every 12 h by gastric gavage for 45 days. The systolic blood pressure (SBP) was measured by the tail-cuff method (non-invasive) with a blood pressure analyzer (model 179, IITC, Woodland Hills, CA, U.S.A.) (Chirino et al. 2008). SBP measurements were made during the light period at time zero, 15 days, 30 days, and 45 days after treatment. The change in SBP (ΔSBP , mmHg) was calculated by subtracting the data for the different time points from their respective basal values at time zero.

Mass Spectrometry and Data Analysis. To get the peptide mass fingerprint of the bean protein hydrolysate (BP3), matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used; molecular mass and molecular mass distributions were determined. Mass spectra were obtained on a Bruker Autoflex MALDI-TOF-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Soluble sample of BP3 (1 mg/mL) was dissolved in acetonitrile/water (1:1, v/v). Soluble BP3 (1 μL) was mixed with 1 μL of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile/trichloroacetic acid 0.1%). The sample mixture was placed on the sample desorption plate (T_0209520_0022513_49, Bruker, Billerica, MA, U.S.A.). MALDI conditions were varied widely to obtain optimal spectra by adjusting laser power (30–90%), reflection voltage gain ($12\times$ – $60\times$), and pulsed ion extraction (140 ns). Acquired raw data were analyzed with Novo Sequencing by BioTools 3.2 software (Bruker Daltonics). The potential biological activity of the peptides was predicted by using the BIOPEP database (www.uwm.edu.pl/biochemia).

Statistical Analysis. Generalized linear models were applied to compare changes in blood pressure from the baseline with three predictive factors (treatment groups, time of treatment, and subjects). The multiple sample comparison test was used to find significant differences between means at different times. To discriminate among the means, the least significant difference (LSD) method of Fisher was performed by the multiple range test. Generalized linear models, multiple sample comparison tests, and LSD analyses were conducted with Statgraphics Centurion XVII software (version 17.1.06) with significance set at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein Hydrolysate. The composition of moisture, protein, fat, crude fiber, ash, and carbohydrates in different Azufrado bean products was characterized. Table I shows that the greatest protein content was determined in the protein concentrate (83.8%) and BP3 (71.4%), as might be expected. In the process of obtaining the bean protein concentrate it was observed that protein yield was 13%, similar as that reported by Valdez-Ortiz et al. (2012). Also, in order

to obtain 30 g of BP3, 100 g of protein concentrate was hydrolyzed, which represented a 30% yield.

Amino Acid Composition. The amino acid profiles determined in the protein concentrate and BP3 and their distribution classified according to the properties of amino acid side chains are shown in Table II, for which almost all concentrations of amino acids in the protein concentrate were shown to be higher compared with those determined for BP3; the only exception was observed for the essential amino acid Lys (K), which presented values of 41.8 and 48.6 mg/g for protein concentrate and BP3, respectively. BP3 was obtained after several larger peptide fractions with molecular weight >3,000 were discarded through ultrafiltration of hydrolyzed protein concentrate. Therefore, the observed lower concentration of amino acids in BP3 was attributed to the loss of amino acids, through the indicated analytical processes of hydrolysis and ultrafiltration. Both the protein concentrate and BP3 were found to be rich in the amino acids Asp (D) and Glu (E), which impart acidic characteristic to the proteins. The distribution of amino acids with different characteristics (hydrophilic, hydrophobic, basic charged, and acidic charged) was also observed, and amino acids with hydrophobic properties were present at the highest concentrations of 329.5 and 267.1 mg/g in protein concentrate and BP3, respectively; it has been previously indicated that the hydrophobic property of amino acids is a very important characteristic of ACE-inhibitory peptides (Pihlanto-Leppälä 2000).

ACE-Inhibitory Activity of BP3. The ACE-inhibitory activity of Azufrado Higuera protein hydrolysate (BP3) was determined. Data were fitted to a lineal equation: ACE-inhibitory activity (%) = $7.92(\log BP3) + 45.51$. The IC_{50} value of BP3 was $3.68 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, which was much higher in comparison with the IC_{50} value of Captopril ACE inhibitor of $0.0015 \mu\text{g/mL}$ reported by Tsai et al. (2008). However, Ariza-Ortega et al. (2014) reported an ACE-inhibitory activity of $IC_{50} = 4.82 \pm 1.59 \mu\text{g/mL}$ in an Alcalase-Flavorzyme hydrolysate of Azufrado Higuera bean protein, which is higher than the value obtained in the present study.

Meisel et al. (2006) indicated that the IC_{50} value is not always directly related to blood pressure reduction. For example, the tetrapeptide Tyr-Gly-Gly-Tyr having an IC_{50} of $16.2 \mu\text{mol/L}$ did not yield any change in SBP following oral administration at 100 mg/kg (Saito et al. 1994). Conversely, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln (β -casein [f169–175]) having an IC_{50} of $1,000 \mu\text{mol/L}$ on oral administration at 1 mg/kg gave a maximal decrease in SBP of -31.5 mmHg (Maeno et al. 1996). Therefore, it was important to evaluate the antihypertensive effect of BP3 in an in vivo assay with SHR rats.

Short-Term Antihypertensive Effect on SHR. At the beginning of the study, the values of basal MAP were $161 \pm 7 \text{ mmHg}$ for the SHR in the control group, $174 \pm 5.2 \text{ mmHg}$ for the SHR in the Captopril group, and $164 \pm 4.7 \text{ mmHg}$ for the SHR in the BP3-treated group. After oral administration of the different treatments, changes in MAP were observed (Fig. 1). According to the generalized linear models, there was a statistically significant effect of the predictive factors (treatments groups, time of treatment, and sub-

jects) on changes in blood pressure, $F(49,170) = 13.37$, $P = 0.0000$. After 2 h of study, a statistical difference between treatments was observed, $F(2,17) = 7.43$, $P = 0.0048$. To discriminate among the means, Fisher's LSD method was performed by the multiple range test. LSD results showed that Captopril and BP3 treatments were statistically similar but were significantly ($\alpha = 0.05$) different from the control group. Similar results were obtained at 2.5, 3, 4, and 5 h of study. However, at 3.5 and 4.5 h of study, all treatments were statistically different ($\alpha = 0.05$) from each other. The maximum antihypertensive effect of BP3 was observed at 3 h of study with a MAP of $-41 \pm 5 \text{ mmHg}$. Conversely, at this point the Captopril treatment presented its lowest antihypertensive effect with a MAP of $-46 \pm 8 \text{ mmHg}$. This may be owing to an adaptation period of SHR under the Captopril and BP3 treatments, because after 3 h of study both treatments were statistically different ($\alpha = 0.05$).

There are only limited reports on the antihypertensive effect of legume sources in SHR. One of the few studies was carried out on mung bean hydrolysate (<3,000) by Li et al. (2006); they reported a significant decrease in SBP after oral administration of 600 mg/kg of bw, with the highest reduction observed after 6 h (-30.8 mmHg). Based on this study, the effect of BP3 from Azufrado Higuera bean protein represents a more effective way to reduce SBP, at a lower dose and in a shorter period of time, than hydrolysate from mung beans. Li et al. (2011) reported a maximum reduction on SBP of -19 mmHg in SHR at 4 h of study, after oral administration of 200 mg/kg of bw of pea protein hydrolysate (<3,000); this corresponded to 46.34% of the hypotensive effect of BP3 (-41 mmHg) in SHR, which could indicate the beneficial effect of BP3 over SHR. However, because the pea protein hydrolysate was fed at a lower dose, it is difficult to compare the actual effectiveness of BP3 over that induced by pea protein hydrolysate.

Ariza-Ortega et al. (2014) reported the antihypertensive effect of Azufrado bean protein hydrolysate (3,000–10,000) at a dose of 4 mg/kg of bw in SHR ($n = 3$) administered intraperitoneally. The

TABLE II
Amino Acid Composition of Protein Concentrates and Common Bean Protein Hydrolysate (BP3) (mg of Amino Acid per Gram of Protein) and Their Distribution Classified According to the Properties of Amino Acid Side Chains^a

Amino Acid Distribution	Amino Acid ^b	Protein Concentrate (mg/g)	BP3 (mg/g)
Hydrophilic	Ser (S)	45.4	44.2
	Thr (T)	33.2	27.1
	Tyr (Y)	33.3	29.3
	Total	111.9	100.6
	Hydrophobic	Gly (G)	44.0
Ala (A)		68.2	52.7
Val (V)		NC	NC
Phe (F)		39.1	34.9
Ile (I)		48.6	42.3
Leu (L)		71.0	64.2
Pro (P)		54.8	37.2
Met (M)		3.8	1.5
Total		329.5	267.1
Basic charged		His (H)	ND
	Arg (R)	41.4	19.7
	Lys (K)	41.8	48.6
	Total	83.2	68.3
Acidic charged	Asp (D)	166.3	142.3
	Glu (E)	84.7	77.2
	Total	251.0	219.5

^a All values are in milligrams of amino acid per gram of protein and are means of triplicate measurements. The amino acid distribution was classified according to the properties of the side chain, and the total amount in milligrams of amino acids distributed according to classification was quantified. NC = not quantified, and ND = not detected. Nitrogen-protein conversion factor = 6.25.

^b Amino acid standard (Sigma-Aldrich, lot BCBJ2713V).

TABLE I
Proximate Composition of Different Bean Products (Bean Flour, Protein Concentrate, and Common Bean Protein Hydrolysate [BP3])^a

Composition	Bean Flour (%)	Protein Concentrate (%)	BP3 (%)
Moisture ^b	8.4	2.3	3.7
Protein ^c	27.5	83.8	71.4
Fat	1.5	0.6	0.05
Crude fiber	3.1	0.07	0.2
Ash	5.1	3.5	18.6
Carbohydrate	62	11.8	9.8

^a All values are expressed as percentage (%) and are means of triplicate measurements. Carbohydrate is calculated by difference.

^b Dry basis moisture.

^c Nitrogen-protein conversion factor = 6.25.

maximum decline of SBP of -27.13 ± 11.17 mmHg was observed at 2 h of study. However, the authors emphasized that this study was only a preliminary test, in which a small number of rats ($n = 3$) were analyzed. In addition, intraperitoneal administration of protein hydrolysate was not common in similar *in vivo* studies. In our preliminary assays, a single oral administration of different doses (0, 50, 200, and 500 mg/kg of bw) of BP3 was evaluated for 5 h in SHR; we did not observe any antihypertensive effect, except in SHR fed 500 mg/kg of bw (Supplementary Fig. 1). Because of this reason, we fed SHR with BP3 (<3,000) at 500 mg/kg of bw in the present study.

Girgih et al. (2016) conducted a comprehensive study of the antihypertensive effect of a 5,000 membrane pea protein hydrolysate permeate (PPH-5) during short- and long-term assays in SHR. In the short-term assay, they reported that after 2 h of a single oral administration (100 mg/kg of bw) of PPH-5, the maximum effect of

lowering SBP was -36 mmHg. In the long-term evaluation, authors tested the pea hydrolysate PPH-5 incorporated in casein substitute as 0.5 or 1% (w/w) in the SHR diet; they reported maximum SBP reductions of -22 and -26 mmHg, respectively, after 3 weeks. These data are not comparable with our results, because in our study we only evaluated the bean protein hydrolysate (3,000) orally without incorporating any diet in SHR.

Studies on absorption and bioactivity of the hydrolysates reported that low-molecular-weight peptides (<3,000 and <1,000) were better absorbed in the digestive tract and thus have better antihypertensive effect than high-molecular-weight peptides. In particular, the bioactive potential of small peptides was highest because they can be absorbed in the intestine without being broken down by digestive enzymes and thus reach the target sites in the body (Meisel et al. 2006).

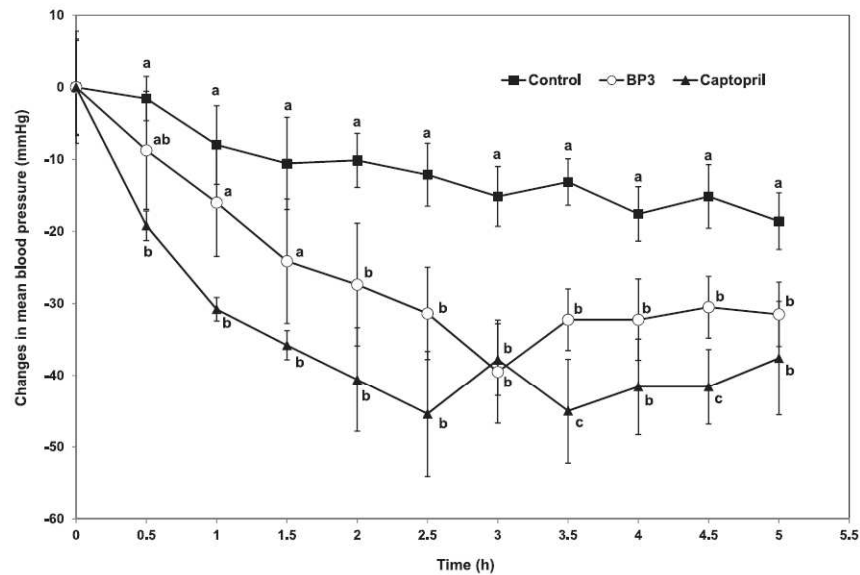


Fig. 1. Short-term antihypertensive effect of common bean protein hydrolysate (BP3) in spontaneously hypertensive rats, by a pressure transducer method for 5 h of evaluation. Different letters represent statistical difference according to the LSD method by multiple range test ($\alpha = 0.05$) with a confidence level of 95%.

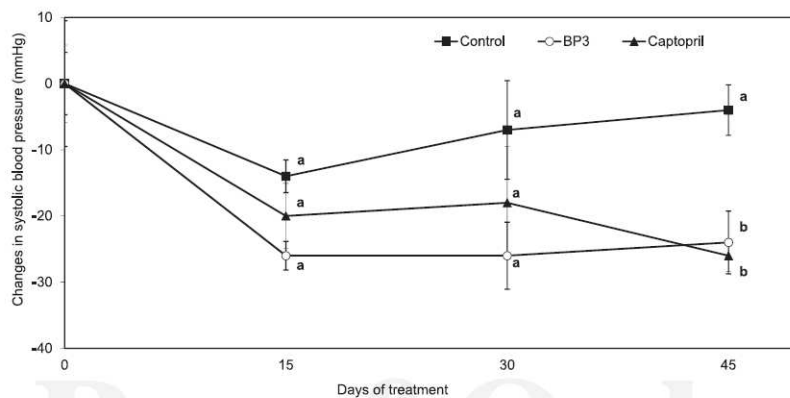


Fig. 2. Long-term antihypertensive effect of common bean protein hydrolysate (BP3) in spontaneously hypertensive rats, by a plethysmograph in the tail of the rat method for 45 days of evaluation. Different letters represent statistical difference according to the LSD method by multiple range test ($\alpha = 0.05$) with a confidence level of 95%.

Long-Term Antihypertensive Effect on SHR. Similar to the short-term antihypertensive effect on SHR study, the values of basal SBP were measured at the beginning of the study. The value of basal SBP was 192 ± 5 mmHg for the SHR in the control group, 197 ± 6 mmHg for the SHR in the Captopril group, and 200 ± 9 mmHg for the SHR in the BP3-treated group. Differences in baseline values between short-term and long-term assays were owing to the measures of blood pressure used for each assay (MAP and SBP). According to generalized linear models, there was a statistically significant effect of predictive factors (treatment groups, time of treatment, and subjects) on changes in blood pressure, $F(25, 42) = 4.25$, $P = 0.0000$. Also, Figure 2 showed that after 15 and 30 days of oral administration of 1 mL/12 h of distilled water (in the control treatment), or 25 mg/kg of bw/12 h of Captopril ACE inhibitor, or 500 mg/kg of bw/12 h of BP3, the SBP reduction on SHR under all indicated treatments was not significantly different ($\alpha = 0.05$). However, at 45 days of study, the BP3 and Captopril treatments were similar but different than the control. The analysis of variance by multiple sample comparison test at 15, 30, and 45 days confirmed the statistical differences of the treatments: $F(2, 14) = 0.98$, $P = 0.3989$; $F(2, 14) = 1.04$, $P = 0.3790$; and $F(2, 14) = 3.90$, $P = 0.0450$, respectively. Additionally, the LSD method showed that the SBP reduction on SHR under the Captopril (-26 ± 2 mmHg) and BP3 (-24 ± 5 mmHg) treatments at 45 days was similar ($\alpha = 0.05$), but both these treatments were significantly different from the control treatment (-4 ± 4 mmHg).

Only one study about long-term antihypertensive evaluation of legume hydrolysate sources was reported. Li et al. (2011) reported the antihypertensive effect of casein supplemented with pea protein

hydrolysate on Han:SPRD-cy rats (a model of chronic kidney disease). They indicated that the maximum decrease in SBP of -35 mmHg was observed at 45 days of study. In the present study, a similar maximum decrease in SBP of -24 ± 5 mmHg was observed also at 45 days of study. However, the results obtained by Li et al. (2011) cannot be compared with those of the present research, because the rat model used was different in both studies. Additionally, they used an impure source of protein hydrolysate in the form of a mixture of the pea protein hydrolysate with casein, whereas in the present study a pure protein hydrolysate (BP3) from Azufrado bean was used. That difference in SBP values observed between the studies is attributed to the indicated differences in rat models and the source of protein hydrolysate used.

It is important to mention that there were two methods for measuring blood pressure in the SHR in vivo assays. The first method used in this study was the pressure transducer method (an invasive short-term assay), and the second one was by a plethysmograph in the tail of the rat method (noninvasive long-term assay). A large degree of error in the graphs of both assays was clearly observed; however, high uncertainty in a reported measurement of in vivo assays is also common, owing to multiple factors that affect the true value. Usually experiments with animal models give high variability, and it is normal to see greater variability with an invasive method owing to exposure of rats to stress, anesthesia, and surgery, which is why it is important to increase the number of individuals to analyze. However, data were analyzed with the generalized linear model followed by multiple sample comparison test, and both statistical tests were very effective for data analysis. The viability of these two methods was advocated in many literature reports. The

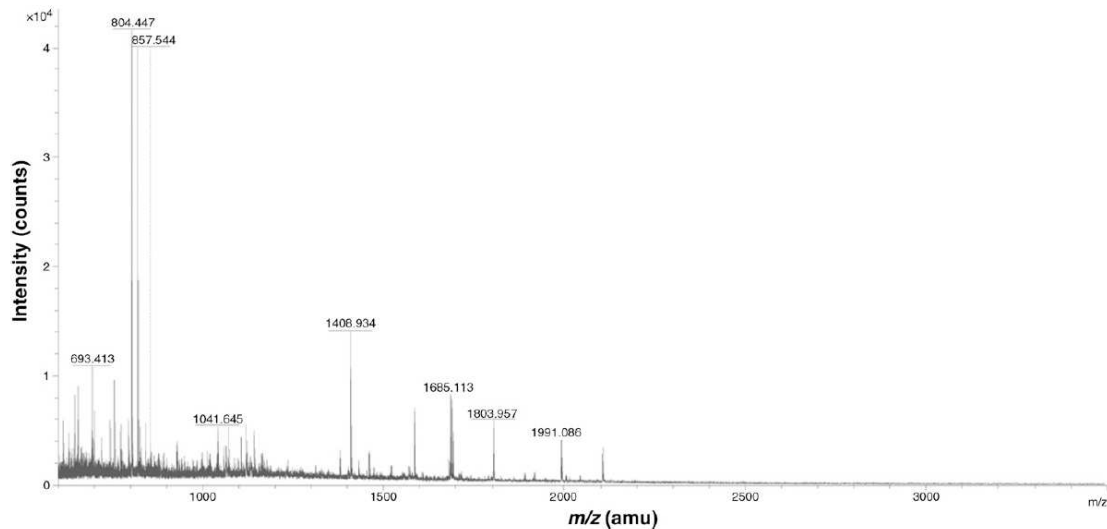


Fig. 3. Peptide fingerprint of common bean protein hydrolysate by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry.

TABLE III
Molecular Mass by MALDI-TOF-TOF Mass Spectrometry and Amino Acid Sequences by Novo Sequencing of Common Bean Peptides (BP3)^a

Measured <i>m/z</i>	Peptide Sequence	Bioactive Sequence	Potential Bioactivity
804.40	KFPWVK	FP, VK, KF	ACE-I, hypotensive
821.40	GADFRKK	FR, GA	ACE-I
1,408.90	PQSPCKRVNRHS	KR, PQ	ACE-I

^a Potential bioactivities were obtained from the BIOPEP database (www.uwm.edu.pl/biochemia). MALDI-TOF-TOF = matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight; and ACE-I = angiotensin converting enzyme inhibition.

aim of the present study was not to evaluate the effectiveness between these two methods. However, these two methods were employed successfully on each of our in vivo short- and long-term assays.

Mass Spectrometry and Data Analysis. The peptide mass fingerprint of BP3 was determined by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. Ions were monitored in the field 500–2,200 *m/z*, and 21 mass spectra were obtained (Fig. 3). Three mass spectra were detected as the most abundant peptides in the hydrolysate, and acquired raw data were analyzed with Novo Sequencing by BioTools 3.2 software (Bruker Daltonics). The sequences of the three major peptides were KFPWVK, GADFRKK, and PQSPCKRVNRHS. The potential biological activity of the peptides as bioactive peptides was predicted by using the BIOPEP database; the potential ACE-inhibitory effect was predicted in the three peptides (Table III). These sequences with ACE-inhibitory activity may be responsible for the antihypertensive activity in the in vivo assays. However further studies are needed to isolate and purify these peptides to test their ACE-inhibitory activity in vitro, and the effect in vivo assays could be correlated with the ACE-inhibitory activity.

In the case of ACE-inhibitory peptides, the most potent and specific peptide inhibitors with similar structures and ACE activity were strongly influenced by the C-terminal tripeptide sequence of those peptides. The tripeptides with W, Y, F, P, and a hydrophobic amino acid at the C-terminus were effective for ACE-inhibitory activity because of the interaction between three subsites at the active site of ACE (Pihlanto-Leppälä 2000).

Peptides from BP3 contained hydrophobic amino acids but not P at the C-terminal tripeptide sequence. Guan Hong et al. (2006) isolated ACE-inhibitory peptides from mung bean (LNYRL, VTPALR, and KLPAGTLF). Also, an octapeptide (PVNNPQIH) isolated from small red bean hydrolysate showed to be an ACE inhibitor (Rui et al. 2013). In research on pea protein hydrolysate, Jakubczyk and Baraniak (2014) reported five peptides isolated with strong ACE-inhibitory capacity (GGSGNY, DLKLP, GSSDNR, MRDLK, and HNTDSR), of which only one peptide contained P at the C-terminal tripeptide sequence; however, the same authors indicated that the occurrence of certain amino acids at the C-terminus or in a peptide does not necessarily mean that the relationship had a strong hypotensive effect.

Structure-activity data also suggest that the positive charge on the guanidine or ϵ -amino group of C-terminal arginine (R) and lysine (K) side chains contribute substantially to the ACE-inhibitory potency of several peptides (Meisel 1993). Mojica et al. (2015) isolated peptides of different varieties of common beans (black, pinto, red, navy, and great northern) with ACE-inhibitory activity as potential bioactivity in silico (RKRAAQ, RNEQMGAGRLGRLRK, RRQRRRRMRKDK, QQRLLRRK, and YAGGS). In the present study, all peptide sequences of BP3 hydrolysate showed R or K at the C-terminus, indicating that these peptides could be potential inhibitors of ACE.

CONCLUSIONS

The Azufrado Higuera common bean protein hydrolysate (BP3) obtained after Alcalase hydrolysis and an ultrafiltration process (3,000 molecular weight cutoff) presented antihypertensive property. In vivo assays with SHR showed the effect of BP3 on blood pressure reduction. In a short-term assay, a decline in MAP was observed after a single oral administration of 500 mg/kg of bw of BP3, and the maximum decrease was at 3 h of study. In a long-term assay, a significant decrease on SBP was observed at 45 days of study, on SHR under the BP3 treatment. This is the first study showing the antihypertensive capacity of the oral administration of Azufrado Higuera common bean (*P. vulgaris* L.) protein hydrolysate in a short- and long-term assay with SHR. The sequences of the most abundant peptides of BP3 were detected and identified. It is important to highlight that those sequences are reported for the first time in Azufrado Higuera common beans and that they are most likely responsible for the antihypertensive effect of BP3. Based on

the results of this study, it is concluded that these peptides represent valuable information to food scientists and may have a potentially significant impact on human health to prevent or control high blood pressure. Azufrado Higuera common beans could be used in the nutraceutical industry as a value-added ingredient in the form of protein hydrolysate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Fundación Produce Sinaloa for funding support. Also, thanks to Octavio Sanchez Villanueva, Rosalva Pérez Villalba, and Cristino Cruz Rivera for support in the in vivo assays with SHR. Thanks to Jose De J. Berrios and Emma P. Báez Valdez for support in the production of the manuscript draft. P. Valenzuela-García thanks to CONACYT-México, PIFI-IPN, and Colegio de Sinaloa for the scholarship support. The authors also thank CNMN-IPN for mass spectrometry analysis.

LITERATURE CITED

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists, 18th Ed. Methods 930.15 Moisture, 942.05 Ash, 976.05 Nitrogen, 920.39 Fat, 978.10 Crude fiber, and 994.12 Amino acids. W. Horwitz, ed. AOAC: Gaithersburg, MD.
- Ariza-Ortega, T. J., Zenón-Briones, E. Y., Castrejón-Flores, J. L., Yáñez-Fernández, J., Gómez-Gómez, Y. M., and Oliver-Salvador, M. C. 2014. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Eur. Food Res. Technol.* 239:785-794.
- Baker, D. H. 1997. Ideal amino acid profiles for swine and poultry and their applications in feed formulation. FERMEX report no. 9. Nutri-Quest: Chesterfield, MO.
- Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Cortés-González, C., Ojeda-Cervantes, M., Gamba, G., Morales-Buenrostro, L. E., and Bobadilla, N. A. 2011. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol. Med.* 3:5-20.
- Boye, J. I., Roufik, S., Pesta, N., and Barbana, C. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43:987-991.
- Chirino, Y. I., Trujillo, J., Sánchez-González, D. J., Martínez-Martínez, C. M., Cruz, C., Bobadilla, N. A., and Pedraza-Chaverri, J. 2008. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol. Lett.* 176:48-57.
- Girgih, A. T., Nwachukwu, I. D., Onuh, J. O., Malomo, S., and Aluko, R. E. 2016. Antihypertensive properties of a pea protein hydrolysate during short- and long-term oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.* 81:H1281-H1287.
- Jakubczyk, A., and Baraniak, B. 2014. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides obtained after in vitro hydrolysis of pea (*Pisum sativum* var. Bajka) globulins. *J. Biomed. Biotechnol. Res. Int.* 2014: 438459.
- Jung, W. K., Mendis, E., Je, J. Y., Park, P. J., Son, B. W., and Kim, H. C. 2006. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 94:26-32.
- Li, G.-H., Qu, M.-R., Wan, J.-Z., and You, J.-M. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16:275-280.
- Li, G.-H., Shi, Y.-H., Liu, H., and Le, G.-W. 2006. Antihypertensive effect of Alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Eur. Food Res. Technol.* 222:733-736.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., Jones, P. J. H., and Aluko, R. E. 2011. Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* 59:9854-9860.
- Luna Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., and Loarca-Piña, G. 2014. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chem.* 157:347-355.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., and Loarca-Piña, G. 2015. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Res. Int.* 76:39-50.

- Maeno, M., Yamamoto, Y., and Takano, T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79:1316-1321.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Pérez, L., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., and Valdez-Ortiz, A. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *J. Sci. Food Agric.* 92:1974-1981.
- Meisel, H. 1993. Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein. Pages 67-75 in: *Food Protein—Structure and Functionality*. K. D. Schwenke and R. Mothes, eds. Academic Press: New York, NY.
- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B., and FitzGerald, R. J. 2006. ACE inhibitory peptides. Pages 269-315 in: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, 4th Ed. Y. Mine and F. Shahidi, eds. Academic Press: Boca Raton, FL.
- Mojica, L., Chen, K., and González de Mejía, E. 2015. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *J. Food Sci.* 80:H188-H198.
- National Research Council. 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press: Washington, DC.
- Ondetti, M. A. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196:441-444.
- Oseguera-Toledo, M. E., González de Mejía, E., and Amaya-Llano, S. L. 2015. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by Alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. 76:839-851.
- Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., and Taub, D. 1980. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* 288:280-283.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 347-356.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., and Prasher, S. O. 2013. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean. *J. Funct. Foods* 5:1116-1124.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., and Imayasu, S. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1767-1771.
- Tsai, J. S., Chen, J. L., and Pan, B. S. 2008. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochem.* 43:743-747.
- Udenigwe, C. C., and Aluko, R. E. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing and potential health benefits. *J. Food Sci.* 77:R11-R24.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., and Medina-Godoy, S. 2012. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *J. Food Sci. Technol.* 46:91-96.
- Wu, G., Davis, P. K., Flynn, N. E., Knabe, D. A., and Davidson, J. T. 1997. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *J. Nutr.* 127:2342-2349.
- Wu, J., and Ding, X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 49: 501-506.
- Yamamoto, N., Akino, A., and Takano, T. 1994. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertension rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:776-778.

[Received April 14, 2016. Accepted September 27, 2016.]

Proof Only