

Capítulo 5

Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*)

Alfredo Córdova Lizama, Jorge Ruiz Ruiz, Maira Segura Campos, David Betancur Ancona, Luis Chel Guerrero

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte. Km. 33.5, Tablaje catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yucatán, CP 97203, México.

javinel_14@hotmail.com, jcruiz_ruiz@hotmail.com, maira.segura@uady.mx, bancona@uady.mx, cguerrer@uady.mx

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.35>

Referenciar este capítulo

Córdova Lizama, A., Ruiz Ruiz, J., & Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 123-137). Barcelona: OmniaScience.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo, se calcula que en el 2008 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las defunciones registradas a nivel mundial en dicho año. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos y más del 80% se producen en países en desarrollo. Se calcula que para el 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV y se considera que seguirán siendo la principal causa de muerte (Montero-Granados & Monge-Jiménez, 2010). De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, 5 mil millones de personas padecen caries dental, lo que equivale aproximadamente a un 80% de la población mundial; en América Latina el porcentaje se incrementa al 96% de la población (González-Sánchez, Martínez-Naranjo, Alfonso-Betancourt, Rodríguez Palanco & Morales-Martínez, 2009). Actualmente en México, las enfermedades cardiovasculares (trombosis) y bucales (caries), afectan a un elevado porcentaje de la población. Las enfermedades isquémicas del corazón, incluidas trombosis arterial y venosa, son la primera causa de muerte a nivel nacional (NAAIS, 2005). En lo que respecta a los problemas bucales, el porcentaje de personas con caries en el país es muy elevado. Datos de la Encuesta Nacional de Caries 1997-2001, indican que entre el 85 y 95% de la población infantil y juvenil presenta uno o varios órganos dentarios afectados por los procesos cariosos (Canseco, 2001).

Desde el punto de vista terapéutico, para el tratamiento de la trombosis se emplean durante tiempos prolongados fármacos con efecto anticoagulante y para la caries, tratamientos odontológicos que incluyen la remoción parcial o total del material dental afectado. Los fármacos antitrombóticos presentan una serie de efectos secundarios tales como hemorragias, neutropenia (reducción de granulocitos), trombocitopenia (reducción de plaquetas) y toxicidad hepática (Arzamendi, Freixa, Puig & Heras, 2006). En el caso de los tratamientos odontológicos, estos resultan poco accesibles sobre toda para ciertos estratos socioeconómicos de la población (Canseco, 2001). En este sentido cobra mayor importancia la prevención de dichas patologías, sobre todo desde el punto de vista dieta-salud. En este sentido, en los últimos años, el estudio de las proteínas de los alimentos como componentes beneficiosos, no solo desde un punto de vista funcional o nutricional, está recibiendo una gran atención. En este sentido, se viene investigando la presencia de diferentes péptidos bioactivos en proteínas de diversos tipos de alimentos, los cuales tienen la capacidad de actuar de manera beneficiosa sobre diversos procesos fisiológicos del organismo. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 aminoácidos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento en el organismo del individuo (Vioque, Sánchez-Vioque, Clemente, Pedroche, Yust & Millán, 2000). También, las proteínas de los alimentos pueden digerirse de manera artificial en el laboratorio mediante el uso de reactores de hidrólisis enzimática para liberar los péptidos bioactivos. Estos péptidos, una vez purificados o concentrados, podrían añadirse a otros alimentos para su ingesta, obteniéndose de esta forma alimentos funcionales, los cuales pueden ayudar en el tratamiento o prevención de ciertas patologías crónicas degenerativas (Segura-Campos, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2010). Estudios recientes, como los realizados por Warner, Kanekanian y Andrews (2001), Cai, Shen, Morgan y Reynolds, (2003) y Aimutis (2004), han demostrado que péptidos presentes en la leche y en el suero lácteo, presentan actividad antitrombótica y anticariogénica. La actividad biológica de los péptidos antitrombóticos está relacionada con su similitud estructural con la cadena γ del fibrinógeno humano, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios superficiales, inhibiendo así la agregación que da lugar a la formación de trombos (Baró, Jiménez,

Martínez-Férez & Bouza, 2001). Algunos péptidos presentan capacidad anticariogénica debido a la carga negativa de los aminoácidos que los constituyen, principalmente los que tienen unidos grupos fosfatos, de esta forma presentan un sitio para quelar minerales; es así como el efecto anticariogénico se presenta a través de la recalcificación del esmalte dental (Aimutis, 2004). Las proteínas son ampliamente utilizadas en la formulación y procesamiento de alimentos como ingredientes, por su importancia nutricional, sensorial y aplicación tecnológica. Debido a lo anterior y a la creciente búsqueda de los consumidores por alimentos e ingredientes funcionales, es necesario proveer productos que satisfagan estas necesidades y que aporten un valor agregado a la salud por medio de compuestos que potencialicen o agreguen diversas propiedades a los nuevos alimentos, ya sean de carácter funcional, nutricional o bioactivo. Como las proteínas animales, tradicionalmente empleadas por su gran valor nutritivo y propiedades funcionales, son difíciles de adquirir debido a su elevado costo de producción, ha sido necesario buscar alternativas de menor costo, de fuentes regionales y con la viabilidad de reducir los riesgos de enfermedades crónicas, siendo las proteínas vegetales la mejor alternativa. En este contexto, destacan las leguminosas, como *Phaseolus lunatus* (Figura 1), la cual se cultiva en el sureste mexicano y es considerada una importante fuente de nutrientes, ya que posee un contenido de proteína de 21 a 26%, carbohidratos de 55 a 64%, grasa de 1 a 2.3% y fibra de 3.2 a 6.5%, además de un alto contenido de minerales como K, Zn, Ca, Fe (Betancur, Gallegos & Chel, 2001). Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad biológica antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus*, obtenidos vía hidrólisis enzimática *in vitro*.



Figura 1. Planta de frijol lima (*Phaseolus lunatus*)

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de la harina de *P. lunatus*

Se emplearon granos de *P. lunatus* provenientes de la cosecha 2012 del estado de Yucatán, México. Los granos se limpiaron y se seleccionaron lo que no presentaron ningún tipo de daño físico para molerlos. La harina obtenida se tamizó a través de mallas tamaño 80 (0.117mm) y 100 (0.149 mm) hasta obtener una harina con partículas menores a 0.149 mm.

2.2. Obtención del concentrado proteínico de *P. lunatus*

Se empleó el método reportado por Betancur et al. (2004). La harina se dispersó en agua destilada en una relación 1:6 p/v y se ajustó el pH a 11 con NaOH 1.0 N. La dispersión se agitó por 1 h a 400 rpm, posteriormente la suspensión se filtró a través de tamices de malla 80 (0.177mm) y 100 (0.149 mm) para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco ocasiones con agua destilada (1:3, p/v), recuperando y mezclando el agua de lavado con el sobrenadante de la suspensión inicial. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 h para precipitar el almidón. El sobrenadante rico en proteína se decantó. El pH del sobrenadante se ajustó con HCl 1.0 N a su punto isoeléctrico (4.5), la solución se centrifugó a 4500 x g por 30 min. El precipitado se secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora.

2.3. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico de *P. lunatus*

Se determinó de acuerdo con los métodos de la AOAC (1997): Humedad (Método 925.09) secado en estufa a 105 °C hasta peso constante. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C hasta la pérdida total de materia orgánica. Grasa cruda (Método 920.39), lípidos libres extraídos con hexano en un sistema Soxhlet. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, por digestión ácida y destilación alcalina, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a digestiones ácida y alcalina. Extracto libre de nitrógeno (ELN), se calculó por diferencia.

2.4. Hidrólisis del concentrado proteínico

Para la hidrólisis se empleó pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, P7000), con una actividad enzimática ≥ 250 unidades/mg de sólido. La reacción se efectuó de acuerdo con la metodología reportada por Vioque, Megías, Yust, Pedroche, Lquari, Girón-Calle et al. (2004). El tiempo de reacción fue de 10 min, la concentración de sustrato del 4%, la relación enzima:sustrato 1:10, la temperatura de 37°C y el pH de 2. La reacción se efectuó en un vaso de precipitado de 2 L colocado en un baño de agua, el volumen de la suspensión fue de 1 L. La agitación se efectuó a 300 rpm, se empleó un termómetro para determinar la temperatura de hidrólisis, así como un electrodo para establecer el pH y poder ajustarlo con NaOH 0.1N o HCl 0.1 N. La hidrólisis se detuvo colocando la muestra en un baño a 80°C durante 20 min, finalmente se centrifugó a 10,000 x g por 20 min, la porción soluble se conservó en congelación (Pedroche, Yust, Girón-Calle, Alaiz, Millán & Vioque, 2002).

2.5. Determinación del grado de hidrólisis

El porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) se determinó empleando la metodología propuesta por Nielsen, Petersen y Dambmann (2001). Inicialmente, se preparó una solución de L-serina en agua destilada (1.004 mg/mL). De dicha solución se tomaron 150 μ L y se añadieron 1500 μ L de agua desionizada para preparar una solución estándar de serina 1:10 (v/v). Se obtuvo una curva de calibración, empleando como testigo diferentes volúmenes de la dilución 1:10 de la solución de L-serina y 1.5 mL del reactivo OPA. Las absorbancias fueron empleadas para hallar los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis. Se utilizó la ecuación de la curva de calibración y se aplicó la siguiente fórmula: $\%GH = (h/h_{tot}) \times 100$. Dónde:

h = concentración de grupos aminos libres expresada como meq/g de proteína.

h_{tot} = número total de enlaces peptídicos presentes en las proteínas de *P. lunatus*. 4.9.

2.6. Determinación de actividades biológicas *in vitro*

Actividad antitrombótica

La agregación plaquetaria se determinó según el método de Miyashita, Akamatsu, Ueno, Nakagawa, Nishumura, Hayashi et al. (1999). Se empleó sangre humana fresca proporcionada por voluntarios. La sangre colectada, se colocó de inmediato en tubos Vacutainer® (4.5 mL) con citrato de sodio para evitar la coagulación. Luego se centrifugaron a 1000 x g durante 15 min dando lugar al plasma rico en plaquetas (PRP) como sobrenadante. La fase residual se centrifugó de nuevo pero a 3500 x g durante otros 15 min, para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente al PRP se le realizó un ajuste de plaquetas a 300.000/ μ L (PA) empleando un citómetro hemático marca, para determinar el número de plaquetas presentes en el PRP y cuál será el volumen requerido para preparar el plasma ajustado (PA).

Se utilizó la fórmula $V1C1 = V2C2$, donde:

V1: volumen de PRP

C1: concentración de plaquetas iniciales (después de centrifugar a 1000 rpm/15 min)

V2: es el volumen final que se requiere del PA a 300.000 plaquetas/ μ L

C2: es la concentración de plaquetas en el plasma ajustado, 300.000 plaquetas/ μ L.

Actividad anticariogénica

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Warner et al. (2001), que consiste en una determinación *in vitro* usando hidroxiapatita (HA) simulando el esmalte dental. Consistió en hacer una suspensión de HA (2 mg/mL) en un buffer 0.1 M de Tris-HCl (pH 7). También se empleó buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH 4.2) para representar los ácidos orgánicos presentes en la boca. Se prepararon suspensiones de las muestras con agua destilada a una concentración de 0.8 mg/mL. El sobrenadante fue utilizado para medir los niveles de calcio y fósforo disueltos en

por acción del buffer de acetato de sodio. Para la determinación de fósforo se siguió la metodología descrita en las normas NMX-AA-029-SCFI-2001 y NMX-Y-100-SCFI-2004; mientras que para el calcio, se utilizó el método 944.03 de la AOAC (1997).

2.7. Modificación química del hidrolizado proteínico

La fosforilación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Sitohy, Labib, El-Saadany y Ramadan (2000), quienes describen condiciones para la fosforilación empleando fosfato monosódico y disódico; y a lo reportado por Hayashi, Can-Peng, Enomoto, Ibrahim, Sugimoto y Aoki (2008), quienes emplean un buffer de pirofosfato. Para la fosforilación con fosfatos, se diluyeron 30 g de fosfato monosódico y 16 g de fosfato disódico en 100 mL de agua destilada a 35°C, ajustando el pH a 6. Posteriormente, 10 g de hidrolizado se disolvieron en 80 mL de la solución de fosfatos agitando por 10 min. La dispersión se filtró, el precipitado obtenido se recolectó y fue secado a 60°C por 1 h. El precipitado se calentó por 3 h a 85°C en un horno de vacío a 800 mbar. El producto se disolvió en 50 mL de metanol al 50%. Esta mezcla se agitó durante 30 min y el producto nuevamente se filtró, lavando el precipitado con 20 ml de etanol absoluto. Se preparó una solución al 10% en agua con el precipitado y se dializó 24 h en agua destilada. El hidrolizado fosforilado se recuperó mediante secado por liofilización a -47°C y 13×10^{-3} mbar. Para la fosforilación del hidrolizado con pirofosfato, se empleó una solución buffer de pirofosfato de sodio 0.1 M a pH 4. Se preparó una solución al 2% del hidrolizado con el buffer, se agitó por 10 min, posteriormente la solución se congeló y secó a -47°C y 13×10^{-3} mbar en una liofilizadora. El residuo seco se activó por calentamiento a 85°C durante 2 días en una estufa de circulación de aire. Una vez activado, se eliminaron los fosfatos libres mediante diálisis. La mezcla dializada, fue nuevamente secada por liofilización.

Determinación de fósforo

La determinación del contenido de fósforo tanto en el hidrolizado de *Phaseolus lunatus* (HPL), el hidrolizado fosforilado con fosfatos (HPL-F) y del hidrolizado fosforilado con pirofosfato (HPL-P), así como en la evaluación de la actividad anticariogénica, se realizó siguiendo la metodología de las normas mexicanas NMX-AA-029-SCFI-2001 y NMX-Y-100-SCFI-2004.

Determinación de calcio

Para la cuantificación de calcio se utilizó el método 944.03 de la AOAC (1997). Basado en la precipitación del calcio a pH 4 como oxalato y su posterior disolución en ácido sulfúrico liberando ácido oxálico el cual se titula con una solución de permanganato de potasio.

2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización proximal de la harina y el concentrado proteínico *P. lunatus*, de la hidrólisis del concentrado proteínico, de la modificación del hidrolizado y de las bioactividades, fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias (LSD) para establecer diferencias entre tratamientos. Se empleó el paquete computacional Statgraphics Plus Versión 5.1 de acuerdo a métodos señalados por Montgomery (2003).

3. Resultados y discusión

3.1. Composición proximal de la harina y concentrado proteínico de *P. lunatus*

La composición proximal de la harina y el concentrado proteínico se presenta en la Tabla 1. En cuanto a la humedad, el concentrado presentó un mayor contenido comparado con la harina, debido a que en la etapa final de la obtención de la harina se calienta a 60°C antes de tamizar, reduciéndose así el contenido de humedad. El contenido de proteína cruda de la harina (19.6%) fue similar al 21.7% para *Phaseolus vulgaris* (Ruiz-Ruiz, Dávila-Ortiz, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2012). El contenido de proteína del concentrado fue de 67.5%, valor semejante al reportado por Tello, Ruiz, Chel y Betancur (2010), de 67.3% para un concentrado de *P. lunatus* y al obtenido por Ruiz-Ruiz et al. (2012), en concentrados de *P. vulgaris* (67.7%).

| Componente (%) | Harina | Concentrado proteínico |
|----------------|--------------------|------------------------|
| Humedad | 4.75 ^a | 5.18 ^a |
| Cenizas | 2.70 ^a | 4.62 ^b |
| Proteína | 19.60 ^a | 67.52 ^b |
| Fibra | 2.38 ^b | 0.57 ^a |
| Grasa | 1.06 ^a | 2.92 ^b |
| ELN | 74.26 ^b | 24.35 ^a |

Tabla 1. Composición proximal de la harina y el concentrado proteínico del frijol lima (% B.S.). Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

El contenido de grasa (2.92%) en el concentrado fue similar (3.12%) al reportado por Tello et al. (2010) y mayor (0.68%) al citado por Betancur et al. (2004). El incremento de grasa cruda en el concentrado proteínico, pudo deberse a que durante la extracción alcalina de la proteína (pH 11) se saponifican las grasas de carácter polar, precipitando con la proteína al modificar el punto isoeléctrico (pH 4.5), tal como lo observaron Chel, Pérez, Betancur y Dávila (2002), en concentrados de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*. Los contenidos de fibra cruda y ELN disminuyeron, en un 75.7% y 67.2%, respectivamente, esto se debió a que el proceso de obtención del concentrado incluye etapas específicas de separación de estos componentes. Lo anterior resulta conveniente ya que de acuerdo con Ruiz-Ruiz et al. (2012), los componentes no proteicos como lípidos, fibra, hidratos de carbono y componentes menores como sustancias minerales afectan la calidad final del concentrado.

3.2. Hidrólisis del concentrado proteínico y grado de hidrólisis

El concentrado proteínico de *P. lunatus*, al ser sometido a un tratamiento hidrolítico con pepsina en una relación E:S de 1:10 a pH 2, 37°C y un tiempo total de hidrólisis de 10 min, presentó un GH de 12.4%, quedando clasificado como hidrolizado extensivo (> 10%). Este tipo de hidrolizados se utilizan en nutrición clínica y son una tendencia prometedora en el campo de los alimentos funcionales, debido a la presencia de péptidos con actividad biológica, los cuales pueden actuar sobre diversos procesos fisiológicos del organismo.

3.3. Actividad antitrombótica

La determinación de la actividad antitrombótica, se basa en inhibir la capacidad que tiene la sangre para formar trombos, principalmente por el agrupamiento de las plaquetas en el plasma sanguíneo. Los resultados expresados como porcentaje de reducción de la agregación plaquetaria (RAP), a diferentes concentraciones de hidrolizado, se presentan en la Figura 2.

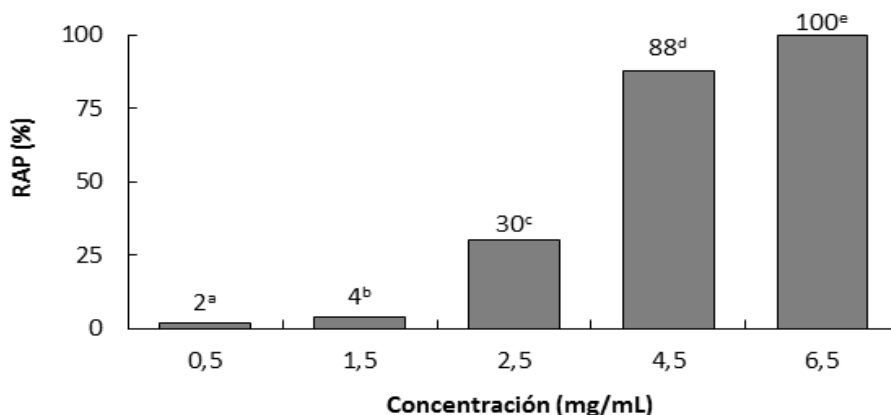


Figura 2. Inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de *Phaseolus lunatus*. Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

El tratamiento enzimático favoreció la bioactividad, ya que los valores incluso alcanzan 100% de RAP con la concentración de 6.5 mg/mL. Sin embargo, este valor pudo deberse a la saturación del PA, evitando así el paso del haz de luz, independientemente de si se forma agregación, dado que se emplea un método óptico (Miyashita et al., 1999). Debido a lo anterior, se tomó como valor de referencia el RAP obtenido con 4.5 mg/mL (88% RAP), valor superior a los reportados por Chim (2011), para hidrolizados de pepino de mar (*Isostichopus badionotus*) empleando los sistemas enzimáticos: Alcalasa-Flavorzima® (79.5% RAP) y pepsina-pancreatina (72% RAP), con una concentración de 50 mg/mL. La elevada bioactividad del HPL pudo deberse a la presencia de péptidos que tengan el segmento ArgGlyAsp en su secuencia ya que se ha demostrado que la Arg participa en la unión entre el fibrinógeno y la GPIIb/IIIa. El grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg (catión) interactúa mediante un enlace iónico con la estructura del grupo carboxilo del Asp presente en el complejo GPIIb/IIIa, impidiendo el enlace del fibrinógeno con sus receptores (Figura 3). En la Figura 3 se esquematizan otros mecanismos que generan efecto antiagregante.

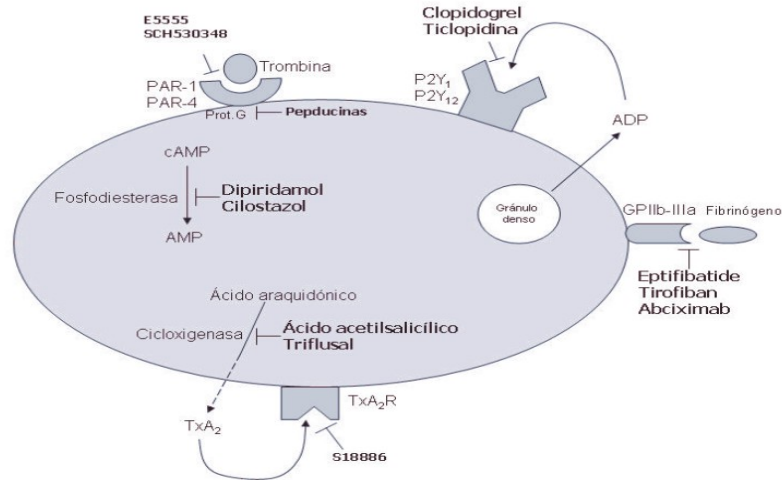


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de acción de los fármacos antiagregantes en uso. Se muestran las enzimas (ciclooxygenasa y fosfodiesterasa) y receptores (P2Y1, P2Y12; GPIIb-IIIa; PAR1, PAR4) inhibidos por los antiagregantes. (Palomo et al., 2009)

El HPL también podría ejercer su acción antiagregante mediante la inhibición de receptores de ADP (PY12 y PY11) y tromboxano (TXA2R), o inclusive inhibiendo la acción de enzimas que promueven la agregación plaquetaria (fosfodiesterasa y ciclooxygenasa). Esto se puede especular debido a que existen medicamentos de naturaleza peptídica como el eptifibatide y las pepducinas, los cuales se emplean para evitar la formación de trombos (Palomo, Torres, Moore-Carrasco & Rodrigo, 2009).

3.4. Hidrolizados proteínicos fosforilados

La fosforilación incrementó el contenido de fósforo en los hidrolizados (Figura 4). En el fosforilado con fosfatos, la cantidad de fósforo se incrementó 2.5 veces, en tanto que en el hidrolizado modificado con pirofosfato el contenido se incrementó 2 veces. De acuerdo con Dávila, Sangronis y Granito (2003), el contenido de fósforo en la mayoría de las leguminosas oscila entre 0.301% y 0.586%. El contenido de fósforo en el hidrolizado fue menor al reportado por dichos autores (0.174%), la disminución de éste pudo deberse tanto al proceso de fraccionamiento húmedo de la harina que incluye una etapa de precipitación de almidón, como a la hidrólisis que incluye etapas de centrifugación y deshecho del precipitado. El contenido de fósforo en los hidrolizados modificados fue superior al reportado por Enomoto, Nagae, Hiyashi, Can-Peng, Ibrahim, Sugimoto y Aoki (2009), quienes fosforilaron clara de huevo con pirofosfato, logrando incrementar el contenido de fósforo de 0.09% hasta un total de 0.60% y al reportado por Hayashi et al. (2008), quienes modificaron ovotransferrina con pirofosfato, logrando un contenido de fósforo de 0.66%.

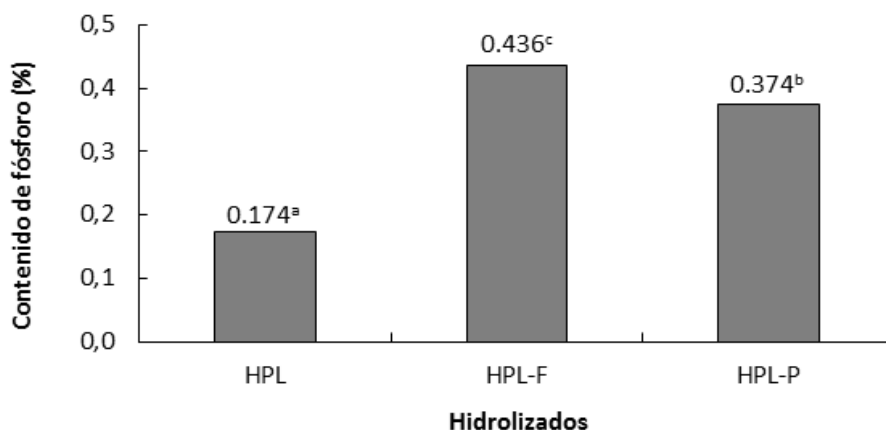


Figura 4. Contenido de fósforo (%) del hidrolizado de *Phaseolus vulgaris* (HPL) y de los hidrolizados modificados con fosfatos (HPL-F) y con pirofosfato (HPL-P). Letras diferentes en la misma serie indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

3.5. Actividad anticariogénica

La capacidad anticariogénica del HPL, HPL-F y del HPL-P, se muestran en la Figura 5. Se puede observar que el HPL presentó una reducción de la desmineralización de la hidroxiapatita del 50% para el calcio y de 55.8% para el fósforo. Warner et al. (2001), reporta reducción de la desmineralización para calcio de 80.2%, 44.0% y 48.5% para caseinofosfopéptidos, suero lácteo de la elaboración de queso cottage y de suero lácteo ácido, respectivamente. Por otro lado, también presenta inhibición de la pérdida de fósforo de 81.8%, 18.2% y 39.4% para las mismas especies. Lo anterior revela un elevado potencial de los hidrolizados fosforilados para minimizar la desmineralización del esmalte dental por acción de los ácidos, pues el HPL-F alcanzó valores de inhibición para calcio y fósforo del 68.2% y 71.9%, respectivamente, mientras que el HPL-P redujo la disociación del calcio en un 77.3% y del fósforo en 76.9%. Estos valores son similares a los reportados por Warner et al. (2001) para caseinofosfopéptidos, los cuales han sido incorporados a productos como gomas de mascar y pastas dentales, como auxiliares en control y prevención de caries (Aimutis, 2004; Reynolds, Cai, Shen y Walker, 2003; Reynolds et al., 1997). Aún cuando el HPL-P presentó una menor cantidad de fósforo (0.374%) que el HPL-F (0.436%), logró tener el mejor porcentaje de protección (Figura 4).

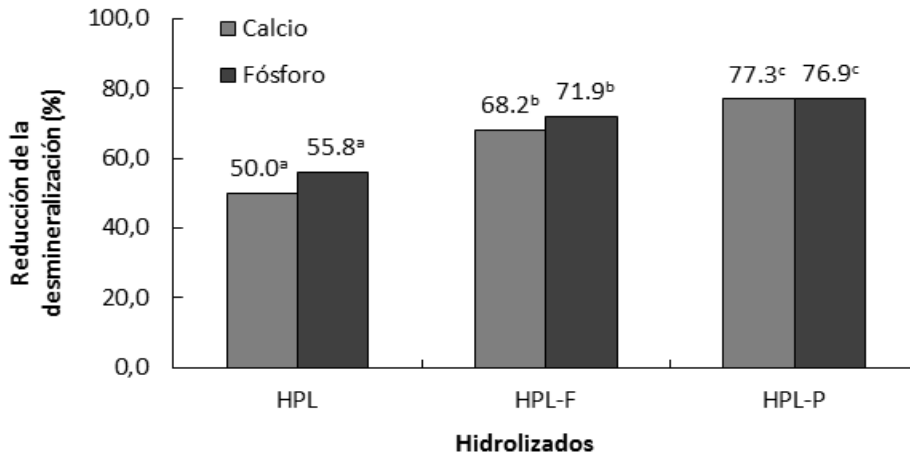


Figura 5. Reducción de la desmineralización de calcio y fósforo de la matriz de hidroxiapatita, en presencia del hidrolizado de *Phaseolus lunatus* (HPL) y los hidrolizados modificados con fosfatos (HPL-F) y pirofosfato (HPL-P). Letras diferentes en la misma serie indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Esta mayor capacidad para neutralizar los ácidos posiblemente se debió a la estructura que presenta el pirofosfato, pues dicho compuesto cuando se enlaza mediante enlaces mono éster, a los aminoácidos serina, tirosina y/o treonina, expone más grupos (-ONa) susceptibles a neutralizar los grupos ácidos, que la mezcla de fosfatos (Figura 6).

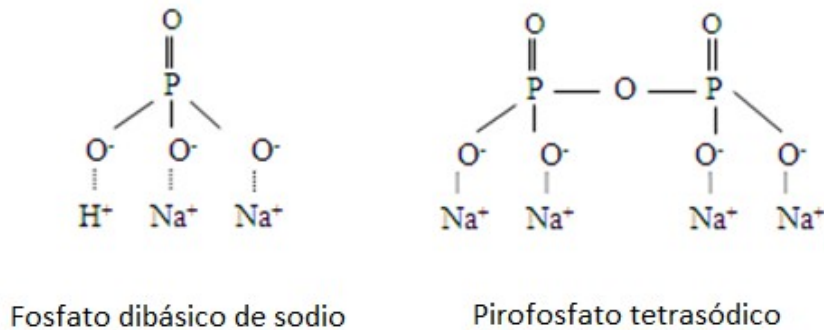


Figura 6. Estructura de las especies químicas utilizadas en la fosforilación de los hidrolizados

También es de considerar la capacidad anticariogénica que pudiera tener los hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* debido a sus contenidos, no solo de fósforo, sino de aminoácidos como prolina e histidina, ya que se ha reportado que péptidos excretados por las glándulas salivales (parótida, submaxilar y sublingual) ricos en estos minerales, ejercen un efecto eficaz contra bacterias responsables de la caries como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp* y

Porphyromonas gingivalis (Ayad, Van, Minaguchi, Raubertas, Bedi, Billings et al., 2000; Geetha, Venkatesh, Bingle, Bingle & Gorr, 2005; Groenink, Ruissen, Lowies, Hof, Veerman & Nieuw, 2003).

4. Conclusión

La hidrólisis enzimática del concentrado proteínico del frijol lima con pepsina, generó un grado de hidrólisis de 12.4%, esto permite clasificarlo como hidrolizado de tipo extensivo. Para la actividad antitrombótica del hidrolizado, se obtuvieron valores de disminución de la agregación plaquetaria de 2, 4, 30, 88 y 100% con concentraciones de muestra de 0.53, 1.29, 2.45, 4.46 y 6.15 mg/mL, respectivamente. La fosforilación con fosfatos de sodio incrementó 2.5 veces el contenido de fósforo y con pirofosfato de sodio 2 veces, en comparación con el hidrolizado proteínico sin modificar. Se evaluó el potencial de los hidrolizados para disminuir la desmineralización del calcio y fósforo presentes en la hidroxiapatita. La mayor reducción de la desmineralización se logró con el hidrolizado modificado con pirofosfato, reduciendo la disociación de calcio en un 77.3% y de fósforo en 76.9%. La modificación enzimática del concentrado proteínico de *Phaseolus lunatus*, generó secuencias peptídicas con actividad antitrombótica y anticariogénica. La fosforilación del hidrolizado incrementó la actividad anticariogénica. Los resultados obtenidos permiten plantear el potencial uso de los hidrolizados de *Phaseolus lunatus* como ingredientes nutracéuticos para el desarrollo de alimentos funcionales o como productos con aplicación farmacéutica.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo al proyecto de ciencia básica titulado "Actividad biológica de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis enzimática de proteínas de frijoles lima (*Phaseolus lunatus*) y caupí (*Vigna unguiculata*)". Con número de convenio 153012, del cual forma parte este trabajo.

Referencias

Aimutis, W.R. (2004). *Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis*. Food technical development center. American Society for Nutritional Sciences.

Aimutis, W.R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition*, 134, 989-995.

AOAC (1997). *Official Methods of analysis. Association of official analytical chemists*. 15th ed., William Horwitz Editor, Washington, D.C., USA.

Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., & Heras, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardiol*, 6, 2H-10H.

Ayad, M., Van, B.C., Minaguchi, K., Raubertas, R., Bedi, G., Billings, R., Bowen, W., & Tabak, L. (2000). The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with

- caries experience. *J. Dent. Res.*, 79 (4), 976-982. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345000790041401>
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., & Bouza, J.J. (2001). Bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica*, 42(3-4), 135-145.
- Betancur, D., Gallegos, S., & Chel, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1193-1201. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Cai, F., Shen, P., Morgan, M.V., & Reynolds, E.C. (2003). Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal*, 48 (4), 240-243. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1834-7819.2003.tb00037.x>
- Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México: Federico Gómez*, 58, México, DF.
- Chel, L., Pérez, V., Betancur, D., & Dávila, G. (2002). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50 (3), 584-591. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010778j>
- Chim, Y. (2011). Obtención de hidrolizados enzimáticos de pepino de mar (*Isostichopus badionotus*) y evaluación de su bioactividad. Facultad de Ingeniería Química, UADY. Tesis de maestría.
- Dávila, M.A., Sangronis, E., & Granito, M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(4), 348-354.
- Enomoto, H., Nagae, S., Hiyashi, Y., Can-Peng, L., Ibrahim, H., Sugimoto, Y., & Aoki, T. (2009). Improvement of functional properties of egg white protein through glycation and phosphorylation by dry-heating. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 22(4), 591-597.
- Geetha, C., Venkatesh, L., Bingle, L., Bingle, C., & Gorr, S. (2005). Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *J. Dent. Res.*, 84(2), 149-153. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508400208>
- González-Sánchez, A., Martínez-Naranjo, T., Alfonzo-Betancourt, N., Rodríguez Palanco, J.A., & Morales-Martínez, A. (2009). Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes. *Rev Cubana Estomatol*, 46(3), 30-37.
- Groenink, J., Ruissen, A., Lowies, D., Hof, W., Veerman, E., & Nieuw, A. (2003). Degradation of antimicrobial histatin-variant peptides in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 82(9), 753-757. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910308200918>

Hayashi, Y., Can-Peng, L., Enomoto, H., Ibrahim, H., Sugimoto, Y., & Aoki, T. (2008). Improvement of functional properties of ovotransferrin by phosphorylation through dry-heating in the presence of pyrophosphate. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 21(4), 596-602.

Miyashita, M., Akamatsu, M., Ueno, H., Nakagawa, Y., Nishumura, K., Hayashi, Y., Sato, Y., & Ueno T. (1999). Structure activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 63, 1684-1690. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.63.1684>

Montero-Granados, C., & Monge-Jiménez, T. (2010). Patología de la Trombosis. *Rev Med Costa Rica Centroamérica*, 591, 73-75.

Montgomery, D. (2003). *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D.F., 14-27.

NAAIS. Núcleo de Acopio y Análisis de Información en Salud (2005). *Distribución geográfica y la salud de los mexicanos 2000 y 2005*.

Nielsen, M.P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>

NMX-AA-029-SCFI-2001. (2001). *Análisis de aguas. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Metodología de prueba*.

NMX-Y-100-SCFI-2004. (2004). *Determinación de fósforo en alimentos terminados e ingredientes para animales*.

Palomo, I., Torres, C., Moore-Carrasco, R., & Rodrigo, M. (2008). Mecanismos de acción de los principales antiagregantes plaquetarios. *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas*, 2(3), 1-6.

Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, & F., Vioque, J. (2002). Utilization of chickpea protein isolates for the production of peptides with angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Science and Food Agriculture*, 82, 960-965. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1126>

Reynolds, E., Cai, F., Shen, P., & Walker, G. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptides-stabilized calcium phosphate solutions. *J. Dent. Res.*, 76(9), 1587-1595. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345970760091101>

Reynolds, E., Cai, F., Shen, P., & Walker, G. (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J. Dent. Res.*, 82(3), 206-211. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910308200311>

Ruiz-Ruiz, J.C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L.A., & Betancur-Ancona, D.A. (2012). Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. *Food Bioprocess and Technology*, 5, 1531-1540. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-010-0451-0>

Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr*, 37(3), 386-391. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000300014>

Sitohy, M., Labib, S., El-Saadany, S., & Ramadan, Z. (2000). Optimizing the conditions for starch dry phosphorylation with sodium mono- and dihydrogen orthophosphate under heat and vacuum. *Starch*, 52(4), 95-100. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X\(200006\)52:4<095::AID-STAR95>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X(200006)52:4<095::AID-STAR95>3.0.CO;2-X)

Tello, R., Ruiz, J., Chel, L., & Betancur, D. (2010). Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En: *Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos*. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México, 233-238.

Vioque, J., Megías, C., Yust, M.M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2004). Purification of an ACE Inhibitory Peptide alters Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1928-1932. <http://dx.doi.org/10.1021/jf034707r>

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51, 361-365.

Warner, E.A., Kanekanian, A.D., & Andrews, A.T. (2001). *Bioactivity of milk proteins: anticariogenicity of whey proteins*. Food Science and Technology Group.