

Capítulo 7

Actividad de los hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* en modelos *in vivo* que revierten enfermedades incluidas dentro del síndrome metabólico

Saulo Galicia Martínez¹, Juan Torruco Uco², Elizabeth Negrete León³, Ma. Luisa Cadena Pino³, Juan José Acevedo Fernández³, José Santos Angeles Chimal^{3,4}, Jesús Santa-Olalla Tapia^{3,4}, Vera Lucía Petricevich López³

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, México.

² Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Oaxaca, México.

³ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

⁴ Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo”, Facultad de Medicina/Hospital del Niño Morelense, Calle Gustavo Góme Azcarate #205, Col. Lomas de la Selva, C.P. 62270 Tel.: (777) 1020583.

juan.acevedo@uaem.mx

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.90>

Referenciar este capítulo

Galicia Martínez, S., Torruco Uco, J., Negrete León, E., Cadena Pino, M.L., Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Santa-Olalla Tapia, J., & Petricevich López, V.L. (2013). Actividad de los hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* en modelos *in vivo* que revierten enfermedades incluidas dentro del síndrome metabólico. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 155-173). Barcelona: OmniaScience.

1. Introducción

Una alimentación inadecuada y un estilo de vida sedentario han incrementado la prevalencia y mortalidad de enfermedades incluidas en el síndrome metabólico. De acuerdo a estudios epidemiológicos, para el 2030, a escala mundial, se espera un aumento en la obesidad, hipertensión y diabetes del 36, 28 y 19%, respectivamente. Por otra parte, se ha destacado que existe una estrecha relación entre la corrección hacia una dieta balanceada de las personas y la disminución en la incidencia de enfermedades metabólicas. De esta manera, al incrementar el valor agregado de los alimentos naturales con hidrolizados proteínicos que confieran propiedades farmacológicas contra patologías de alta frecuencia, serán de mayor interés para la industria de los alimentos y la farmacéutica. Los estudios realizados con hidrolizados proteínicos han demostrado diversas actividades farmacológicas, entre las que destacan: efectos antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, inmunomoduladores o antitrombóticos. El procesamiento de algunos alimentos, por proteólisis enzimática o química generan péptidos y residuos de aminoácidos que pueden ser incorporados a la circulación sanguínea tras ser ingeridos y llevar a cabo algún efecto terapéutico al participar en la regulación de diferentes vías fisiológicas. Existen diversos neuropéptidos (CRH, TRH, neuropéptido Y, angiotensina) que regulan el funcionamiento del sistema nervioso, además péptidos-endócrinos que controlan el metabolismo celular y la ingesta de alimento (neuropéptido Y, orexina, leptina, adipocinas). Por otra parte, también existen diversos mecanismos que controlan su concentración (degradación y recaptura), los cuales pueden ser regulados por polipéptidos. De esta manera, las actividades biológicas potenciales de hidrolizados proteínicos sugieren su uso en formulaciones farmacéuticas (nutracéuticos) o en alimentos funcionales para promover el estado de salud, mejorar la calidad de vida, así como reducir las complicaciones de las enfermedades crónico-degenerativas. De las enfermedades del síndrome metabólico, la diabetes, la hipertensión y las dislipidemias (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia LDL, hipocolesterolemia HDL) son los padecimientos metabólicos más importantes. La diabetes se caracteriza por hiperglucemia, la cual favorece un estrés oxidativo que daña órganos vitales y favorece el desarrollo de sus complicaciones, las que causarán incapacidad física, laboral e incluso la muerte. Por su parte, la hipertensión y las dislipidemias representan los factores de riesgo más importantes para sufrir episodios letales como accidentes cerebro-vasculares o infarto agudo al miocardio. Actualmente, estas enfermedades del síndrome metabólico representan un problema de salud pública, siendo tratadas con fármacos que pueden producir efectos secundarios importantes. De esta manera, los hidrolizados proteínicos con actividad hipoglucémica, antihipertensiva, hipolipemiente o antioxidante representan un complemento al tratamiento en curso del síndrome metabólico. En diversos estudios se han evaluado hidrolizados contra padecimientos que conforman el síndrome metabólico. En este trabajo se presentan los efectos de los hidrolizados de *M. pruriens* obtenidos con Alcalasa, Flavourzima y un sistema secuencial, en donde resalta el efecto antihipertensivo en ratas Wistar hipertensas, reduciendo 25 y 23% las presiones sistólica y diastólica, respectivamente.

2. Síndrome metabólico, hidrolizados proteínicos y su evaluación en modelos experimentales

2.1. Causas y epidemiología del síndrome metabólico

El abuso de alimentos hipercalóricos (grasos o dulces), combinado con un estilo de vida sedentario son los factores de riesgo responsables del incremento en la prevalencia y la mortalidad de las enfermedades incluidas en el síndrome metabólico. De acuerdo a estudios epidemiológicos internacionales, para el 2030 se espera un aumento en la obesidad, hipertensión y diabetes del 36, 28 y 19%, respectivamente. De acuerdo a la Federación Internacional de la Diabetes, en el 2010 había 285 millones de diabéticos en el mundo, 317 millones en el 2012 y el pronóstico para el 2030 no es muy alentador, ya que se espera que este número aumente significativamente hasta 439 millones. Sin embargo, es importante resaltar que la distribución de los enfermos no es homogénea, mientras que en algunos países la diabetes y sus complicaciones representan un problema de salud pública importante para otros es prácticamente inexistente. En el continente americano, por ejemplo, la prevalencia de diabetes en países del centro y norte (10.5%) es un poco mayor a la presentada en los países del cono sur (9.2%), pero más del doble que la encontrada en los países del sur de África (4.3%) (Figura 1). En México el problema es mayor, y en el 2012 alcanzó el 6º lugar a nivel mundial con 10.6 millones de pacientes diabéticos (Figura 2). La prevalencia prácticamente se duplicó en tan solo 12 años. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSA 2000) reportó una prevalencia de 5.8, 7.5% en 2006 (ENSANUT 2006) y 9.2% en el 2012 (ENSANUT 2012) en población mayor de 20 años. Este crecimiento acelerado ha despertado un estado de alerta general por la diabetes y sus complicaciones, ya que quienes la padecen ocupan el primer lugar en número de defunciones, superando el número de muertes ocasionadas por enfermedades infecciosas. Considerando que un poco más del 50% de la población adulta y casi un 35% de la población infantil tiene sobrepeso y obesidad, se puede inferir que cerca del 85% de la población presenta factores de riesgo importantes para desarrollar diabetes o síndrome metabólico en los próximos 5 a 10 años.

Ante esta perspectiva de salud, a corto plazo los pronósticos son catastróficos para todos los sectores de la sociedad. Los servicios de salud serán rebasados y no podrán atender los requerimientos asistenciales de la población, así como el colapso financiero de las mismas por el costo de los servicios especializados que se requieren. En el sector productivo e industrial aumentarán las ausencias laborales por asistencia a consulta, revisión y tratamiento médico; sin embargo será más significativo el incremento en las incapacidades físicas y laborales a temprana edad (35-50 años), lo que generará miles de años de vida productivos perdidos. No es de extrañar entonces que todos los actores de la sociedad hayan dado la voz de alerta para establecer los mecanismos de prevención que limite o detenga el avance acelerado de estas enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, el creciente desarrollo de los países, el aumento en el desarrollo de dispositivos tecnológicos que fomentan el sedentarismo y un acelerado y estresante ritmo de vida que lleva a consumir alimentos procesados ricos en grasas o carbohidratos incrementan la tasa de incidencia y mortalidad de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes, dislipidemias e hipertensión.

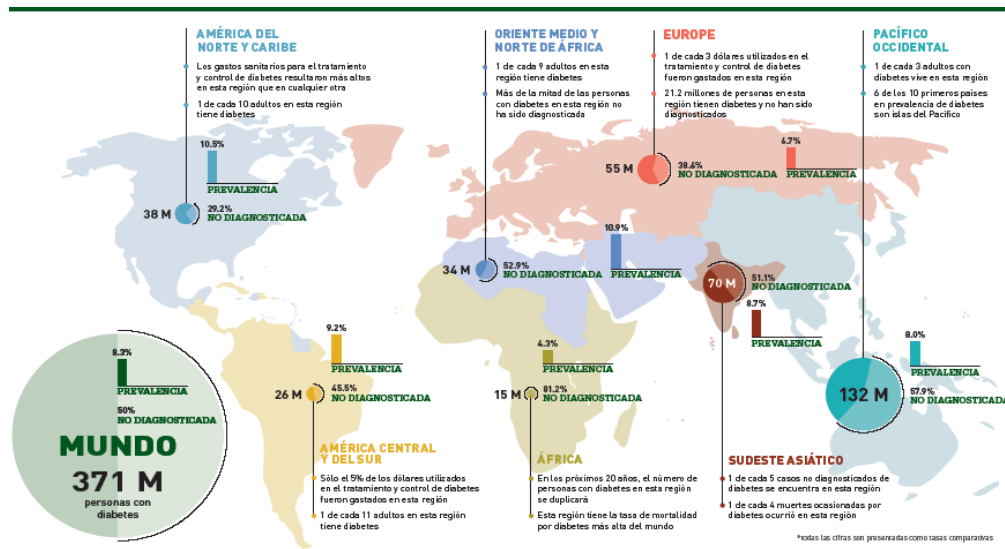


Figura 1. Prevalencia internacional de la diabetes en población de 20 a 79 años (IDF, 2012)

Siendo el síndrome metabólico resultado de un estilo de vida “moderno”, no es de extrañar que a la fecha hayan fallado los diferentes programas y campañas de prevención establecidos por el gobierno federal, los servicios de salud así como las organizaciones no gubernamentales (ONGs). Sobre todo cuando no hay una congruencia entre lo que se promueve y lo que se practica. También puede ser debido a una desarticulación entre los diferentes programas y niveles de intervención: centros educativos, de salud, gobierno, comercios, y medios de comunicación masiva que promueven alimentos y bebidas con alto contenido calórico como un satisfactor de modernidad, estatus o de comodidad.

Así, por un desmedido poder de competencia y libre comercio del mundo globalizado, el triángulo que podría haber ocasionado la pandemia actual del síndrome metabólico está entre la industria farmacéutica, la industria alimentaria y la industria de los medios masivos de comunicación. En conjunto, sin embargo, estos mismos también podrían representar una parte importante de la solución. Al aumentar la producción y distribución de alimentos sanos que aporten el factor nutrimental y que sean funcionales contra las enfermedades asociadas al síndrome metabólico. Todo esto acompañado de campañas masivas a todos los actores de la sociedad (desde el sector educativo en todos sus niveles hasta el político-administrativo y asistencial), que promuevan el ejercicio y el consumo de estos alimentos saludables. Los alimentos funcionales, además de mejorar la calidad y aumentar las expectativas de vida, reducirían de manera importante el gasto en salud de la población.

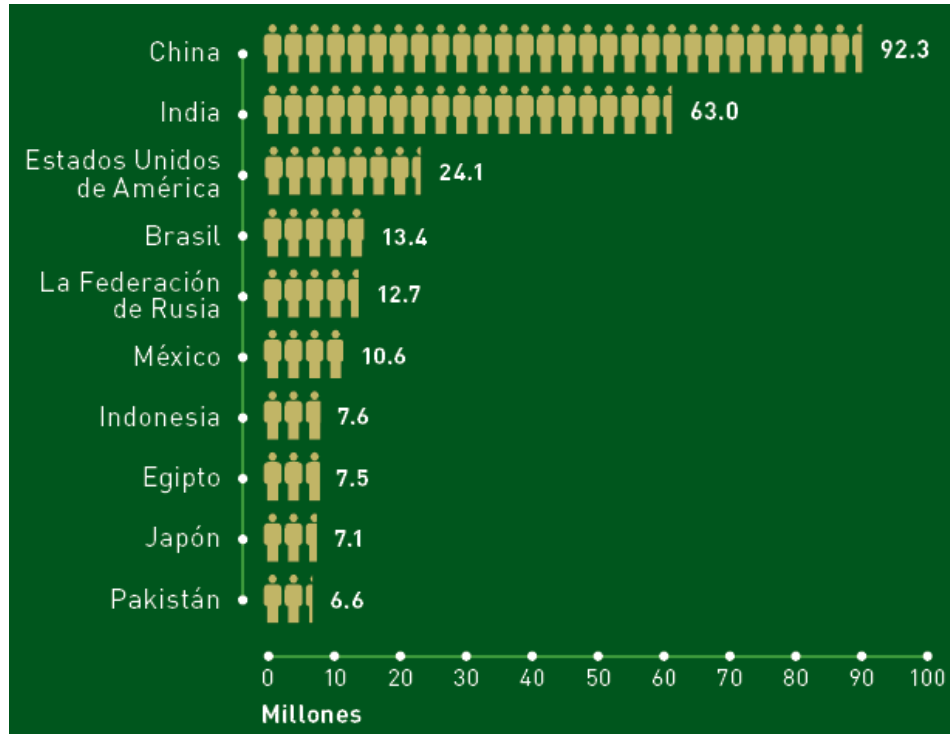


Figura 2. Primeros 10 países/territorios con mayor número de diabéticos de 20 a 79 años (IDF, 2012)

2.2. Alimentos chatarra o alimentos ricos en proteínas

El contenido de proteínas en los alimentos es fundamental para alcanzar un nivel adecuado de nutrición (Morris, Borges, Martínez & Carrillo, 2002). Existen dos factores que determinan el valor nutricional de las proteínas, el contenido proteínico y la calidad de la proteína (Badui, 2006), definida como la capacidad que tienen para cubrir los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos de un individuo, ya que estos aminoácidos de la dieta pueden utilizarse para la síntesis proteínica (Martínez & Martínez, 2006). Debido a que la calidad de los alimentos es un factor de riesgo importante para la aparición de las enfermedades del síndrome metabólico, hay una tendencia creciente en la investigación para el uso de hidrolizados proteínicos de diversas fuentes: leche y sus derivados, tejidos animales, plantas y granos de leguminosas, algunas de las cuales presentan un contenido de proteína importante pero no son aprovechadas de manera significativa para la alimentación humana, tal es el caso de la leguminosa *Mucuna pruriens*. La hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas de diversas leguminosas tropicales como *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, generan fracciones peptídicas con propiedades farmacológicas que se encuentran inactivas en la proteína. Estos péptidos pueden regular eventos fisiopatológicos asociados al síndrome metabólico, como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para reducir la presión arterial, secretagogos de insulina para reducir la hiperglucemia de la diabetes o hipolipemiantes para regular las dislipidemias.

A diferencia de otras sustancias orgánicas, las proteínas de la dieta están sujetas a cambios drásticos en su estructura durante el proceso de digestión y absorción, las proteínas ingeridas son hidrolizadas por diversas proteasas para producir oligopéptidos, que a su vez son hidrolizados a pequeños péptidos por las peptidasas presentes en el cepillo de la superficie de las células epiteliales para liberar di- y tri-péptidos e incluso aminoácidos, que pueden atravesar el intestino delgado hacia la circulación sistémica (Shimizu, 2004). Algunos péptidos son también absorbidos en bajas concentraciones y pueden modular la función celular a través de sus propiedades biológicas (Zaloga & Siddiqui, 2004). La biodisponibilidad reducida de los aminoácidos puede ser causada por diversos factores, entre ellos la inaccesibilidad a las proteasas por su conformación, por formar complejos con metales, lípidos o celulosa, así como por el procesamiento al que haya sido previamente sometida la proteína (Badui, 2006).

Las principales fuentes de proteína son de origen animal, como carne, leche y huevos, algunos de estos por lo general de elevado costo, lo que ha dado lugar a un aumento en la investigación de fuentes de proteína vegetal (Chel, Pérez, Betancur & Dávila, 2002). Así pues, es necesario desarrollar procesos de extracción de proteínas vegetales para su utilización en otras aplicaciones (Vioque, Sanchez, Pedroche, Yust & Millán, 2001), como enriquecer los alimentos procesados y productos texturizados para el consumo humano (Chel et al., 2002).

2.3. Obtención de proteínas vegetales

Para obtener la fracción proteínica de las leguminosas se deben eliminar los compuestos solubles no proteicos presentes en la harina, quedando un producto rico en azúcares insolubles y proteínas (Vioque et al., 2001). Para la extracción de las proteínas se pueden aplicar algunos de los siguientes métodos:

- Lavado alcalino y precipitación al punto isoelectrico de las proteínas
- Lavado con agua después de tratamiento térmico
- Tratamiento mediante soluciones hidroalcohólicas.

De estos, la precipitación isoelectrica es la alternativa más favorable ya que permite el uso integral de los granos de leguminosas. Se obtiene un producto rico en proteínas, almidón y fracciones elevadas en fibra (Betancur, Gallegos & Chel, 2004). Mediante estos procesos, de la harina de *Mucuna pruriens* se puede obtener la fracción rica en proteínas < 70% (Adebowale, 2008; Adebowale, Adeyemi, Oshodi & Niranjana, 2007; Corzo, Chel & Betancur, 2000), así como concentrados proteínicos (> 70% de proteína) de *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* (Torruco, 2008). También se pueden obtener aislados proteínicos (90% o más de proteína), en medio alcalino (pH entre 7 y 11) para favorecer la solubilización de las proteínas desnaturalizadas, se precipitan en su punto isoelectrico, y después se separan por centrifugación o filtración (Chel et al., 2002; Betancur et al., 2004). Las fracciones ricas en proteína, así como los concentrados y aislados proteicos se utilizan en la elaboración de alimentos como fuente de nitrógeno (Vioque, Pedroche, Yust, Lqari, Megías, Girón et al., 2006), en la formulación de dietas especiales para la alimentación infantil y/o de adultos mayores (Guadix, Guadix, Paez, Gonzalez & Camacho, 2000). Una vez obtenido el aislado, concentrado o fracción proteínica, y con el fin de mejorar sus propiedades se someten a procesos de hidrólisis enzimática. Esto modifica las

propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las proteínas, favoreciendo su solubilidad, absorción y biodisponibilidad, sin que se vea afectado el valor nutricional (Betancur, Martínez, Corona, Castellanos, Jaramillo & Chel, 2009).

2.4. Hidrolizados proteínicos

Los hidrolizados enzimáticos han sido utilizados para mejorar las propiedades funcionales de los productos alimenticios, en la formulación de productos farmacéuticos y de aplicación clínica específica, así como para hacer a la proteína hipoalergénica y para obtener péptidos bioactivos (Tardioli, Fernández, Guisán & Giordano, 2003). La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la hidrólisis química ácida o alcalina tradicional, entre ellas su selectividad ya que son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, es poco frecuente la aparición de productos de degradación. La hidrólisis ocurre en condiciones moderadas de temperatura y pH (40 a 60 °C y pH entre 4-8), no se añaden sustancias extrañas y, lo más importante, se conserva el valor nutritivo. La hidrólisis alcalina, por el contrario, destruye los aminoácidos Arginina y Cisteína y la hidrólisis ácida disminuye los niveles de triptófano y desamina a la serina y la treonina (Guadix et al., 2000).

El porcentaje de enlaces peptídicos rotos (grado de hidrólisis, GH) puede ser controlado mediante la proporción enzima - sustrato, tiempo de hidrólisis y temperatura.

Los hidrolizados proteínicos se dividen en dos grandes grupos:

- Hidrolizados limitados, con GH menores del 10%, para mejorar sus propiedades funcionales
- Hidrolizados extensivos, con GH mayores del 10%, para su uso en alimentación especializada, por sus propiedades bioactivas (Pedroche, Yust, Giron-Calle, Vioque, Alaiz & Millan, 2003).

Los hidrolizados extensivos (GH > 10%), son utilizados en alimentación especializada, como suplementos nutricionales y dietas médicas que, por su alta solubilidad y óptima absorción intestinal son consumidos por atletas, personas de la tercera edad o consumidores que necesitan requerimientos especiales en sus dietas, así como en el tratamiento de síndromes específicos como fenilcetonuria, tirosinemia y encefalopatías hepáticas (Vioque et al., 2006).

Un factor importante a considerar durante la generación de los hidrolizados es la actividad enzimática específica (Vioque et al., 2001). Diversas enzimas son capaces de producir hidrolizados con propiedades bioactivas (Sosa, 2009; Torruco, 2008; Wenyi & González de Mejía, 2005; Yang, Yang, Chen, Tzeng & Han, 2004). La alcalasa es una de las más utilizadas y es una enzima grado alimentario producida por Novo Nordisk. La enzima presenta amplia especificidad e hidroliza la mayoría de los enlaces peptídicos que contengan residuos de aminoácidos aromáticos así como enlaces donde el extremo carboxílico contenga residuos hidrofóbicos como leucina, tirosina y valina. La alcalasa tiene su pH óptimo de actividad entre 6.5 y 8.5, siendo rápidamente inactivada debajo de pH 5 y por arriba de pH 11 (Tardioli et al., 2003). Otra enzima utilizada es la Flavourzima, proteasa obtenida del *Aspergillus oryzae*, que presenta actividad tanto endoproteasa como exopeptidasa con un pH óptimo entre 7 y 8. Esta enzima ha sido

introducida por Novo Nordisk para disminuir el sabor amargo de los hidrolizados proteínicos con bajos grados de hidrólisis (10 a 20%) y para mejorar el sabor de los productos con alto grado de hidrólisis (50% o más). El sabor amargo desagradable de los hidrolizados puede producirse debido a la formación de péptidos con residuos hidrofóbicos al final de la cadena (Hamada, 2000).

2.5. Alimentos funcionales

En los últimos años, el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales ha experimentado un gran incremento, tanto por su evidente valor terapéutico como por su gran interés para la industria alimentaria y farmacéutica, debido a repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos (Martínez & Martínez, 2006). La hidrólisis enzimática puede liberar péptidos biológicamente activos que, además de su valor nutrimental como fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer efectos biológicos específicos.

Para la Organización Mundial de Salud (OMS), la salud no solo es la ausencia de enfermedad, pues incluye también el bienestar físico, mental y psicológico. De manera análoga, el alimento no sólo es necesario para el sustento, desarrollo y crecimiento del cuerpo, sino que desempeña un papel clave en la calidad de la vida (Ashwell, 2004). El término alimento funcional nace en Japón para mejorar la calidad y aumentar las expectativas de vida, reduciendo así el gasto en salud de la población. Los alimentos funcionales son alimentos procesados que contienen ingredientes que regulan funciones específicas del organismo (Monge, Cardozo, Barreiro, Huenchufir, Pinzón, Mora et al., 2008), como valor adicional, por encima de su valor nutrimental y cuyas acciones positivas justifican su carácter funcional (Silveira, Megías & Molina, 2003). La ciencia de los alimentos funcionales se dirige a los componentes alimentarios que afectan positivamente las funciones biológicas del organismo: crecimiento y desarrollo en la primera infancia, regulación de los procesos metabólicos básicos, defensa contra el estrés oxidativo, fisiología cardiovascular, fisiología gastrointestinal, rendimiento cognitivo y mental, incluidos el estado de ánimo y la rapidez de reacción (Ashwell, 2004). La demanda social de estos productos alimenticios aumenta cada día y hoy es posible responder a las exigencias de seguridad y eficacia que reclama la sociedad (Monge et al., 2008).

Existe una amplia gama de productos de los cuales se pueden obtener péptidos con propiedades farmacológicas interesantes (Tabla 1). Hidrolizados de la leche presentan actividades inmunomoduladoras y antihipertensivas (Wenyi & Gonzalez de Mejia, 2005), mientras que los hidrolizados de las leguminosas presentan actividades antioxidantes, antihipertensivas, citotóxicas y antiinflamatorias (Galicia, 2011; Torruco, 2008). Los péptidos bioactivos que constituyen los alimentos funcionales pueden tener acción local (gastrointestinal) y sistémica al atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Martínez & Martínez, 2006). Estos hidrolizados y péptidos se han utilizado en el cuidado y prevención de enfermedades crónico degenerativas, incorporándolos a los alimentos como alternativa para mejorar la salud o prevenir enfermedades mediante una alimentación más saludable (Chel & Betancur, 2009).

Actividad biológica	Efecto benéfico
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores de tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación celular	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

Tabla 1. Péptidos bioactivos y efectos benéficos en el organismo (Vioque et al., 2006)

Cabe mencionar que diversas empresas incluyen en sus productos diversos componentes bioactivos, como Valio Ltd. de Finlandia, quien desarrolló un producto a base de leche fermentada que contiene péptidos bioactivos. Los componentes del Evolus[®] presentan un efecto benéfico sobre la presión sanguínea ya que contiene muy poco sodio y adicionalmente proporciona calcio, potasio y magnesio. En todos los casos la acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por Val-Pro-Pro (VPP) y Ile-Pro-Pro (IPP), los cuales purificados o como componentes de los productos hidrolizados han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto. Hata, Yamamoto, Ohni y Nakajima (1996) de igual forma desarrollaron un producto que contenía los mismos péptidos que el Evolus[®], a este producto lo denominaron Calpis[®] y durante su evaluación clínica redujo la presión sistólica y diastólica ($p < 0.05$). Asimismo se han añadido péptidos extraídos de hidrolizados con caseína de leche con secuencia RYLGY y AYFYPEL, disminuyendo la presión de ratas espontáneamente hipertensas a dosis de 200-800 mg/kg. También se incorporó a un yogurt líquido conservando sus características después de ser sometido a procesos de atomización, homogenización y pasteurización (Contreras, Sevilla, Monroy, Amigo, Molina, Ramos et al., 2011). El panorama actual en el campo de los alimentos funcionales y los avances en la investigación en el uso de hidrolizados en la industria alimentaria da la pauta para la utilización de los productos de hidrólisis de la leguminosa *M. pruriens* como antihipertensivo.

2.6. Bioevaluación de los hidrolizados

La actividad farmacológica de los hidrolizados puede evaluarse mediante ensayos *in vitro* como *in vivo*, con las ventajas y desventajas que presenta cada una de estas modalidades de estudio. El modelo *in vitro* permite determinar actividades concentración - dependiente en poblaciones celulares o tejidos aislados (curvas dosis-respuesta), sin que los hidrolizados y péptidos activos sean afectados por parámetros farmacocinéticos que pudieran limitar la actividad de los mismos, como el metabolismo y la excreción. Sin embargo, son los estudios *in vivo* los que determinan la utilidad y eficacia en el individuo, considerando además la actividad selectiva o específica sobre

los órganos o sistemas fisiológicos. Los estudios *in vitro* realizados con los hidrolizados pueden revisarse en el capítulo 2 de este libro.

Se han descrito distintas metodologías para la evaluación de componentes activos que se incorporan durante la producción de alimentos funcionales, tal como lo reportan Plaami, Dekker y Jongen (2002). Se inicia con pruebas "*in vitro*", después se evalúan en modelos animales y finalmente en seres humanos. Posterior a la evaluación "*in vivo*", los hidrolizados son susceptibles a ser adicionados en alimentos y/o bebidas debido a su alta solubilidad, tal como lo realizó Torruco (2008), quien adicionó fracciones peptídicas bioactivas menores a 1 kDa, extraídos de *P. lunatus* y *P. vulgaris* a una concentración de 10.000 ppm y estos mantuvieron su actividad inhibitoria de la ECA-I observada *in vitro*.

Evaluación del efecto hipotensor y antihipertensivo

Para determinar la actividad hipotensora y antihipertensiva *in vivo* de los hidrolizados obtenidos de las leguminosas *M. pruriens*, *P. vulgaris* y *P. lunatus* se utilizaron ratas Wistar normo e hipertensas. La presión arterial se determinó por métodos no invasivos mediante la colocación de un transductor de presión en la base de la cola. Para cada concentración de los hidrolizados se utilizaron sus respectivos controles positivos y negativos, utilizando de 4 a 6 individuos para cada experimento. El peso corporal de las ratas estuvo en un rango de 240 a 320 g y edad de entre 8 y 10 semanas. Las condiciones ambientales del bioterio fueron a temperatura de 25°C y una humedad relativa de 40 a 70%. Se aplicó un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (07:00 – 19:00) durante toda la etapa del experimento.

El efecto hipotensor se determinó de acuerdo al método reportado por Torruco (2008), mediante el registro electrofisiológico de la presión arterial extravascular no invasivo (Flores, Infante, Sánchez, Martínez & Rodríguez, 2002), en ratas anestesiadas con una dosis única (30 mg/kg) de barbital sódico (Sigma B0375) por vía intraperitoneal (I.P.). Los métodos invasivos involucran intervención quirúrgica del animal para el registro intraarterial de la presión en ratas anestesiadas o despiertas mediante el registro telemétrico, previa instalación del dispositivo inalámbrico (Braga & Prabhakar 2009; Silasi, MacLellan & Colbourne, 2009). Los hidrolizados proteínicos elegidos de acuerdo a su actividad *in vitro* sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA), blanco terapéutico de las terapias antihipertensivas (Bader, 2010), se evaluaron en tres dosis: 5, 10 y 15 mg/kg de peso corporal de las ratas, diluidos en 0.3 ml de solución salina fisiológica con la siguiente composición (en mM): NaCl, 130; KCl, 3; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaHCO₃, 1; NaH₂PO₄, 0.5; HEPES 5 (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-ethanesulfónico, Sigma Aldrich H4034), el pH se ajustó a 7.4 con NaOH. Como control testigo positivo se utilizó captopril, un IECA utilizado frecuentemente para el control de la presión arterial, (Captopril®, Sigma Aldrich C4042-5G) a la misma dosis que los hidrolizados (5, 10 y 15 mg/kg de peso corporal). Como control negativo se administró 0.3 ml del vehículo (solución salina fisiológica). Todas las ratas tuvieron libre acceso a un alimento estándar (nu3lab, Research Global Solution) y agua *ad libitum*.

Una vez bajo anestesia, las ratas se pesaron para determinar la cantidad de hidrolizado y captopril que se administrarían vía intraperitoneal (mg/kg). En la base de la cola se conectó el transductor de presión y éste a su vez en línea con un fisiógrafo (Physiograph CPM Narco Bio-System, Inc. Houston, Texas). Las señales de la presión arterial podían ser vistas en un

osciloscopio (OWON PDS 5022S) y adquiridas (a 1Khz) en una computadora mediante el convertidor analógico-digital Mini Digi B (Axon Instruments) y el software AxoScope 10.2. El análisis de los registros de presión arterial se utilizó el Clampfit 10.2 (Axon Instruments). La presión arterial se registró durante al menos 2.5 h por cada rata. De este periodo, los primeros 20-30 minutos representan la presión arterial basal y después se administró vía I.P. el tratamiento a evaluar: control negativo (solución salina fisiológica), control positivo (Captopril®) y los hidrolizados proteínicos.

El porcentaje de efecto hipotensor se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de efecto hipotensor} = 100 \times (\text{PA Exp}) / (\text{PA Ctrl})$$

Donde: PA Exp es la presión arterial observada después de la administración del vehículo, captopril o hidrolizados y PA Ctrl es la presión arterial basal observada durante los primeros 20-30 min. de registro.

La solución salina fisiológica, utilizada como vehículo para disolver los hidrolizados y el captopril® (control negativo) tuvo un efecto hipotensor no significativo ($p > 0.05$), de 0.60 ± 0.14 y $1.194 \pm 0.53\%$ sobre la presión arterial sistólica y diastólica respectivamente. Este efecto reducido fue reportado en la literatura (Chen, Lo, Hu, Wu, Chen & Chang, 2003; Lu, Ren, Xue, Sawuano, Miyakawa & Tanokura, 2010; Zhou, Xue & Wang, 2010). Sin embargo, el efecto con el captopril fue significativo, disminuyendo la presión arterial un 23.54 ± 0.01 a una concentración de 5 mg/kg. Al incrementar la concentración, la disminución de la presión arterial fue mayor, hasta 40.47 ± 4.85 y 76.45 ± 0.02 para 10 mg/kg y 15 mg/kg, respectivamente (Tabla 2), este efecto obtenido fue similar al reportado por Torruco (2008).

Grupo control	Dosis	▼ P. Sistólica (%)	▼ P. Diastólica (%)
Solución salina fisiológica	0.3 ml	0.60 ± 0.14	1.94 ± 0.53
Captopril®	5 mg/kg	23.54 ± 0.01	22.68 ± 0.05
	10 mg/kg	40.47 ± 4.85	30.48 ± 5.71
	15 mg/kg	76.45 ± 0.02	61.00 ± 0.02

Tabla 2. Reducción de la presión (%) sistólica y diastólica en grupos control positivo (captopril) y control negativo (Solución salina fisiológica). (n = 4), media ± DE

Los hidrolizados obtenidos con Alcalasa (90 min de hidrólisis) redujeron la presión arterial un 31.11 ± 18.51 a la dosis de 5 mg/kg del peso corporal de la rata (Figura 3), sin ser estadísticamente diferentes ($p > 0.05$) a las evaluadas a mayor concentración (dosis de 10 y 15 mg/kg). El efecto del hidrolizado de *Mucuna pruriens* fue similar al reportado por Torruco (2008) para hidrolizados proteínicos de *P. lunatus* con Alcalasa a 90 min y concentración de 10 mg/kg. Por otra parte, el efecto del hidrolizado con Alcalasa (120 min) fue estadísticamente semejante en todas las dosis evaluadas (5, 10 y 15 mg/kg, $p < 0.05$), oscilando de 29.37 a 43.47%, pero mayor al observado con captopril a la dosis de 5 mg/kg ($p < 0.05$), semejante a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.05$), pero menor al observado con la dosis de 15 mg/kg. Estos resultados fueron similares a los encontrados con *P. vulgaris* hidrolizado con Alcalasa durante 60 min a concentraciones de 5 y 15 mg/kg reportados por (Torruco, 2008).

Los hidrolizados con Flavourzima de 5 min que presentaron mayor efecto hipotensor a una dosis de 10 mg/kg, tuvieron una reducción de la presión de 22.48 ± 12.37 , aunque fueron menores que los obtenidos con el fármaco Captopril® a la misma dosis. Los hidrolizados con Flavourzima de 120 min de hidrólisis, no presentaron un efecto significativo sobre la presión arterial de la rata, dando valores que oscilaron de 1.09 a 12.64% y -0.58 a 12.85%, siendo estadísticamente iguales (5, 10 y 15 mg/kg). Esto sugiere que al aumentar el tiempo de hidrólisis, el sistema Flavourzima degrada los péptidos activos generados durante los primeros 5 min de hidrólisis.

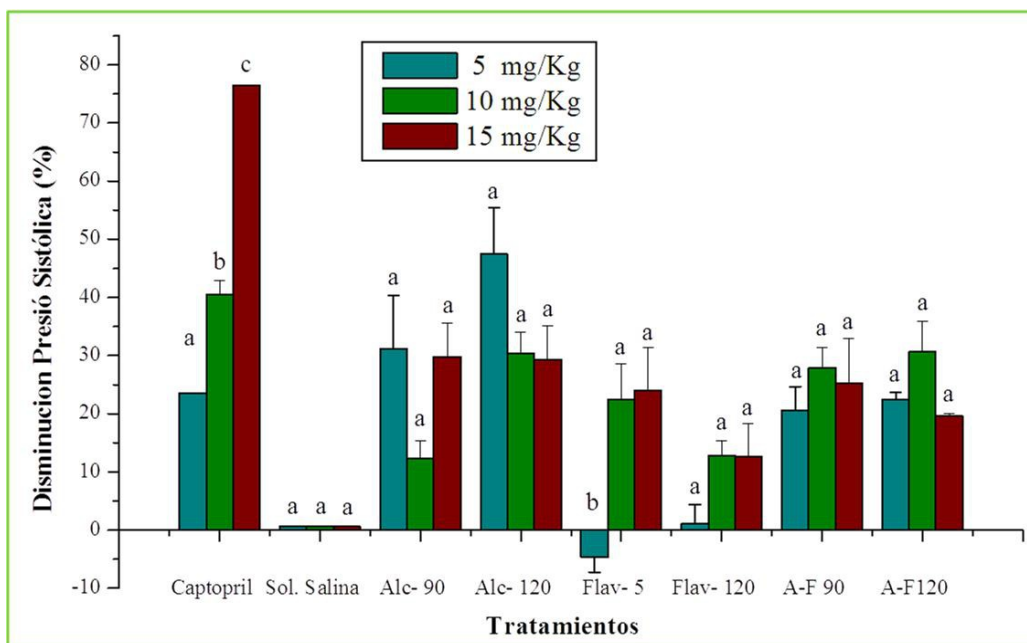


Figura 3. Disminución de la presión sistólica (%) del control positivo, negativo e hidrolizados proteínicos de *Mucuna pruriens* (n = 4), media \pm EEM. a-c Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística por tratamiento ($p < 0.05$)

El efecto hipotensor del sistema secuencial Alc-Flav (90 min de hidrólisis) a dosis de 5 mg/kg, fue de 20.58 ± 8.12 (Figura 3), semejante al observado con 120 min de hidrólisis (22.40 ± 2.53) a la misma concentración. Este efecto fue estadísticamente similar ($p > 0.05$) al observado con captopril, sin embargo al aumentar la dosis del hidrolizado no se observó un mayor efecto hipotensor, lo cual si se observó con el captopril.

Para determinar el efecto antihipertensivo se utilizan diversos modelos de inducción de hipertensión (Badyal, Lata & Dadhich, 2003). En este experimento se indujo hipertensión arterial en las ratas con la metodología reportada por Kuru, Sentürk, Koçer, Özdem, Baskurt, Çetin et al. (2009). La administración oral crónica del inductor L-NAME en su agua de uso, a una dosis de 25 mg/kg del peso corporal de la rata durante un periodo de 5 a 6 semanas. Este inhibidor de la óxido nítrico sintetasa induce un incremento de la presión arterial después de su administración crónica (Kuru et al., 2009). Como control negativo (sin fármaco) se utilizaron 5 ratas. La inhibición

de la óxido nítrico sintetasa se comprobó farmacológicamente mediante la administración aguda (vía I.P.) del inhibidor L-NAME, comparando su efecto sobre la presión arterial con el grupo control. El captopril se utilizó como control positivo, a la misma concentración que los hidrolizados. Durante el tratamiento del L-NAME se determinó el peso corporal de las ratas cada semana, así como un análisis de la química urinaria con tiras reactivas multiparamétricas (Uricheck 10: nitritos, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubinas, sangre, gravedad específica, pH y leucocitos), lo que permitía conocer la funcionalidad renal de los modelos experimentales.

Después de las 6 semanas de tratamiento con L-NAME (a dosis de 25 mg/kg/día), las ratas Wistar tratadas, se consideraron en estado hipertenso (HTA) según lo reportado por Kuru et al. (2009) donde presentaron una elevación de la presión arterial mayor a 140 mmHg después de la quinta semana de tratamiento. La evaluación farmacológica de la inactivación de la enzima óxido nítrico sintetasa (ON) mediante la administración vía I.P. del inhibidor L-NAME, se muestra en la Figura 4.

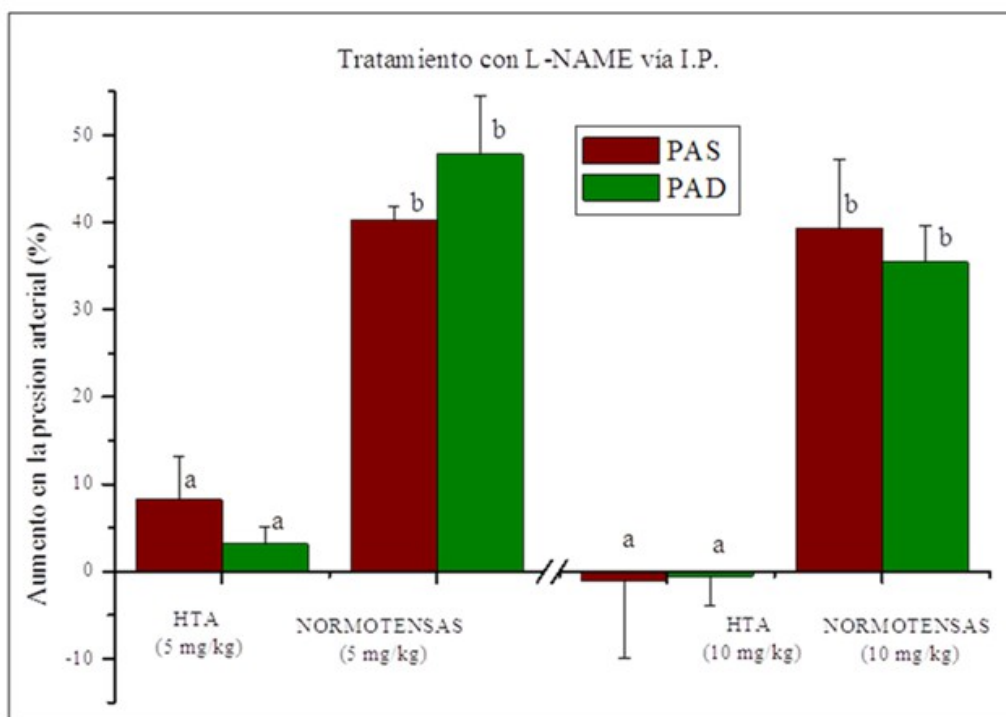


Figura 4. Efecto hipertensor de L-NAME (vía I.P.) en ratas con hipertensión arterial inducida (HTA) y ratas normotensas Wistar, (n = 4), media \pm DE. a-b Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística por dosis ($p < 0.05$)

El efecto hipertensor de las ratas con HTA inducida fue de 8.20 ± 4.93 y $-0.54 \pm 3.37\%$ para la dosis de 5 y 10 mg/kg, respectivamente. Sin embargo, en las ratas control, sin inhibición de la óxido nítrico sintetasa por L-NAME, el efecto hipertensor fue mayor: 40.18 ± 1.56 y 39.31 ± 7.85 a las dosis de 5 y 10 mg/kg, respectivamente. Este efecto hipertensor es similar a lo reportado

por Ladecola, Xu, Zhang y Hu (1994). La inhibición de esta enzima disminuye los niveles de ON, y se ve reflejado en un aumento en la presión arterial (Chao-Yu, Fu-Ming & Ding-Feng, 2001). Los modelos experimentales tratados y no tratados con L-NAME, no presentaron diferencias significativas en el peso ($p > 0.05$) y los parámetros evaluados en la orina estuvieron dentro de los límites normales (Laso, 2002).

En la Figura 5 se presenta el efecto antihipertensivo de los hidrolizados que presentaron mayor efecto hipotensor en las ratas Wistar normotensas. La respuesta antihipertensiva del hidrolizado con Alcalasa (90 min), a una dosis de 5 mg/kg fue de $25.53 \pm 5.46\%$, similar a los obtenidos en las ratas normotensas. El hidrolizado con Alcalasa, 120 min de hidrólisis redujo la presión arterial $29.37 \pm 13.03\%$ a la dosis de 5 mg/kg y fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) al de 90 min y ambos al captopril (reducción de $28.56 \pm 5.23\%$). Los resultados obtenidos con el sistema Alcalasa fueron mayores a los que reportan Lourenço, da Rocha y Netto (2007) para los hidrolizados de proteína de suero con Alcalasa (hasta GH de 10%) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), donde probaron una dosis más alta (500 mg/kg) y solamente redujo un 15% la presión arterial.

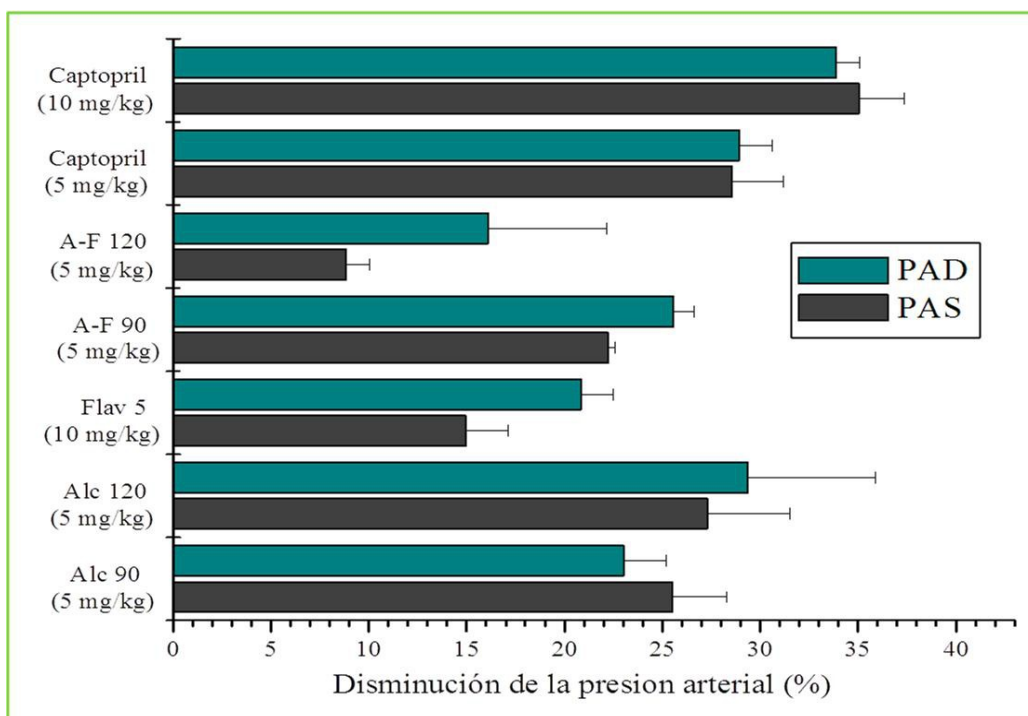


Figura 5. Efecto antihipertensivo de hidrolizados proteínicos de *M. pruriens* y captopril (vía I.P.) en ratas con hipertensión arterial inducida (HTA). ($n = 4$), media \pm EEM. PAD, presión arterial diastólica; PAS, presión arterial sistólica

Los hidrolizados con Flavourzima de 5 min tuvieron un efecto antihipertensivo de $14.96 \pm 4.32\%$ a dosis de 10 mg/kg, menor que el obtenido con los de Alcalasa (90 min, 5 mg/kg) y captopril a la misma dosis, el cual redujo la presión un $35.05 \pm 4.58\%$. Existe poca evidencia científica donde se hayan evaluado hidrolizados con Flavourzima vía I.P., sin embargo se han encontrado péptidos

con actividad antihipertensiva a partir de hidrolizados con Flavourzima como los citados por Tonouchi, Suzuki, Uchida & Oda (2008) a partir del hidrolizado de queso danés obtenido mediante una mezcla de Proteasa N, Umamizima y Flavourzima, produciendo un péptido de secuencia Met-Ala-Pro que al ser administrado oralmente a ratas SHR mostró una reducción de la presión arterial sistólica aproximadamente un 10%. También Tsai, Chen, Pan, Gong & Chung (2008) utilizaron Flavourzima como acelerador en la producción de péptidos bioactivos, sucesivo a fermentación con bacterias ácido lácticas, capaces de inhibir a la ECA y tener efecto en la reducción de la presión arterial.

Para los hidrolizados obtenidos con el sistema secuencial de 90 y 120 min (5 mg/kg), el efecto antihipertensivo fue de $22.22 \pm 0.75\%$ y $16.10 \pm 12.12\%$, respectivamente (Figura 5). El efecto observado a 90 min de hidrólisis fue estadísticamente similar ($p > 0.05$) al observado con captopril a la misma dosis. Nuevamente, al aumentar el tiempo de hidrólisis con flavourzima disminuye el efecto antihipertensivo. Diversos autores han extraído péptidos con actividad antihipertensiva (Chen, Xuan, Fu, He, Wang, Zhang et al., 2007; Jauhiainen, Pilvi, Jian, Kautiainen, Muller, Vapaatalo et al., 2010; Megías, Pedroche, Yust, Alainz, Giron, Millán et al., 2009), asimismo, Motoi y Kodama (2003) a partir de hidrolizado de proteína de soya con Proteasa M, secuenciaron el péptido Ile-Ala-Pro, y después de ser disuelto en solución salina se inyectó por vía I.P. a ratas SHR, a dosis muy elevada de 50 mg/kg que redujo la presión arterial sistólica en aproximadamente un 25%, y al aumentar la dosis a 150 mg/kg la presión arterial se redujo cerca de un 40%.

3. Conclusión

Los hidrolizados generados de *Mucuna pruriens* fueron farmacológicamente activos, capaces de disminuir la presión arterial. Estos resultados permiten sugerir su incorporación en los alimentos como alternativa antihipertensiva para mejorar la salud o prevenir las complicaciones de la enfermedad mediante una alimentación más saludable.

La actividad farmacológica de los hidrolizados proteínicos obtenidos con los sistemas enzimáticos permite desarrollar alimentos funcionales o nutraceuticos que pueden ser utilizados para prevenir o reducir la aparición de las enfermedades crónico-degenerativas del síndrome metabólico y sus complicaciones.

El proceso de hidrólisis genera péptidos con actividad biológica, proceso que debe ser estandarizado para mejorar el rendimiento de los mismos ya que un mayor tiempo de hidrólisis podría llevar a su degradación, como ocurre con el sistema de la Flavourzima.

Agradecimientos

Agradecimiento especial a las siguientes personalidades: Dr. Luis Chel Guerrero, Dr. David Betancur Ancona, de la Facultad de ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, por su participación activa en la producción de los hidrolizados; MVZ Gerardo Arrellin Rosas, responsable del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos; Dra. Elizabeth Mata Moreno y Técnico Sergio González Trujillo, responsables del

Bioterio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo en la crianza y el cuidado de los modelos experimentales. Asimismo, a las entidades que brindaron el apoyo económico para realización del proyecto: RUBIO-PHARMA, PROMEP, FARMED-CONACYT.

Referencias

Adebowale, Y., Adeyemi, I., Oshodi, A., & Niranjana, K. (2007). Isolation, fractionation and characterisation of proteins from Mucuna bean. *Food Chemistry*, 104, 287-299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.050>

Adebowale, Y.A. (2008). A study of the control variables during the preparation of protein isolate from Mucuna bean (*Mucuna pruriens*). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(9), 3223-3238.

Ashwell, M. (2004). *Conceptos sobre alimentos funcionales*. ILSI Europe, 1-40.

Bader, M. (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 439-465. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610>

Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México.

Badyal, D., Lata, H., & Dadhich, A. (2003). Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology*, 35, 349-362.

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>

Betancur, D., Martínez, R., Corona, A., Castellanos, A., Jaramillo, E., & Chel, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from Phaseolus lunatus seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 128-137. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01690.x>

Braga, V. & Prabhakar, N. (2009). Refinement of telemetry for measuring blood pressure in conscious rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(3), 268-271.

Chao-Yu, M., Fu-Ming, S., & Ding-Feng, S. (2001). Blood pressure variability is increased in genetic hypertension and L-NAME induced hypertension. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(2), 137-140.

Chel, L. & Betancur, D. (2009). Biopéptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. *Mundo Alimentario*, Nov./Dic., 7-12.

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 Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010778j>

- Chen, Q., Xuan, G., Fu, M., He, G., Wang, W., Zhang, H., & Ruan, H. (2007). Effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from rice dregs protein on antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(Suppl 1), 281-285.
- Chen, T., Lo, Y., Hu, W., Wu, M., Chen, S., & Chang, H. (2003). Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1671-1675. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020900u>
- Contreras, M., Sevilla, M., Monroy, J., Amigo, L., Molina, E., Ramos, M., & Recio, I. (2011). Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal*, 21, 470-476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.004>
- Corzo, L., Chel, L., & Betancur, D. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología Ciencia y Educación*, 15, 35-41.
- Federación Internacional de Diabetes, 2012.
- Flores, P., Infante, O., Sánchez, G., Martínez, R., & Rodríguez, G. (2002). Detección de signos vitales en ratas mediante métodos no invasivos. *Veterinaria Mexicana*, 33(2), 179-187.
- Galicia, S. (2011). *Evaluación de la actividad antihipertensiva in vivo de hidrolizados proteínicos de la leguminosa Mucuna pruriens*. Instituto Politécnico Nacional.
- Guadix, A., Guadix, E., Paez, M., Gonzalez, P., & Camacho, P. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- Hamada, J. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science*, 65(2), 305-310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15998.x>
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., & Nakajima, K. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 767-771.
- Jauhiainen, T., Pilvi, T., Jian, Z., Kautiainen, H., Muller, D., Vapaatalo, H., Korpela, R., & Mervaala, E. (2010). Milk products containing bioactive tripeptides have an antihypertensive effect in double transgenic rats (dTGR) harbouring human renin and human angiotensinogen genes. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1-6.
- Kuru, O., Sentürk, U., Koçer, G., Özdem, S., Baskurt, O., Çetin, A., Yesilkaya, A., & Gündüz, F. (2009). Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *Journal of Applied Physiology*, 107, 896-902. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.91180.2008>
- Ladecola, C., Xu, X., Zhang, F., & Hu, J. (1994). Prolonged inhibition of brain nitric oxide synthase by short-term systemic administration of nitro-L-arginine methyl ester. *Journal of neurochemistry research*, 19(4), 501-505.

Laso, M. (2002). Interpretación del análisis de orina. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 100(2), 179-183.

Lourenço, E., da Rocha, J., & Netto, F. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17, 632-640. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.003>

Lu, J., Ren, D., Xue, Y., Sawuano, Y., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7166-7171. <http://dx.doi.org/10.1021/jf100193f>

Martínez, O. & Martínez, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2), 1-14.

Megías, C., Pedroche, J., Yust, M., Alainz, M., Giron, C., Millán, F., & Vioque, J. (2009). Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *Food Science and Technology*, 42, 228-232.

Monge, A., Cardozo, T., Barreiro, E., Huenchufir, P., Pinzón, R., Mora, G., Núñez, A., & Chiriboga, X. (2008). Functional foods. Reflexions of a scientist regarding a market in expansion. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 39(2), 81-85.

Morris, H., Borges, L., Martínez, C., & Carrillo, O. (2002). Aspectos bioquímicos de la recuperación de ratones Balb/C malnutridos con un hidrolizado proteico de *Cholrella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentacion y Nutrición*, 16(1), 5-12.

Motoi, H. & Kodama, T. (2003). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung/Food*, 47, 354-358.

Pedroche, J., Yust, M., Giron-Calle, J., Vioque, J., Alaiz, M., & Millan, F. (2003). Plant protein hydrolysates and tailor-made foods. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2, 233-235.

Plaami, S., Dekker, M., & Jongen, W. (2002). Functional food: a conceptual model for assessing their safety and effectiveness. *Innovation Network Rural Areas and Agricultural Systems*, 1-54.

Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, 21, 43-47. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.552210109>

Silasi, G., MacLellan, C., & Colbourne, F. (2009). Use of telemetry blood pressure transmitters to measure intracranial pressure (ICP) in freely moving rats. *Current Neurovascular Research*, 6(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.2174/156720209787466046>

Silveira, M., Megías, S., & Molina, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*, 77(317), 331.

- Sosa, T. (2009). *Evaluación de la funcionalidad fisiológica y tecnológica de hidrolizados proteínicos de frijol endurecido*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Tardioli, P., Fernández, R., Guisán, J., & Giordano, R. (2003). Desing of new immobilized-stabilized carboxypeptidase a derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, 19(2), 565-574. <http://dx.doi.org/10.1021/bp0256364>
- Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M., & Oda, M. (2008). Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, 75, 284-290. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029908003452>
- Torruco, J. (2008). *Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (Phaseolus lunatus) y frijol jamapa (Phaseolus vulgaris)*. Instituto Politécnico Nacional.
- Tsai, J., Chen, T., Pan, B., Gong, S., & Chung, M. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, 106, 552-558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.039>
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megías, C., Girón, J., Alaiz, M., & Millán, F. (2006). Bioactive peptides in storage plant proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 99-102.
- Vioque, J., Sanchez, R., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 127-131.
- Wenyi, W. & Gonzalez de Mejia, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Journal of Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63-78. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x>
- Yang, H., Yang, S., Chen, J., Tzeng, Y., & Han, B. (2004). Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 92, 507-512. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20041218>
- Zaloga, G. & Siddiqui, R. (2004). Biologically active dietary peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(8), 815-818. <http://dx.doi.org/10.2174/1389557043403477>
- Zhou, F., Xue, Z., & Wang, J. (2010). Antihypertensive effects of silk fibroin hydrolysate by alcalase and purification of an ACE inhibitory dipeptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6735-6740. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101101r>