



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico-Biológicas**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Efecto del Bioprocesamiento (Fermentación en Estado Sólido / Hidrólisis Enzimática) de Garbanzo sobre los Perfiles de Péptidos con Actividad Antioxidante y Antihipertensiva**

**TESIS**

que presenta

**Ana Carolina Gastelum Hernández**

Como requisito para  
obtener el grado de

**Maestría en Ciencia**  
**Y**  
**Tecnología de Alimentos**

**Director de Tesis**  
**Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez**  
**Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno**

**Culiacán de Rosales, Sinaloa, México**

**Febrero de 2018**

El presente trabajo de investigación, titulado **“Efecto del Bioprocesamiento (Fermentación en Estado Sólido / Hidrólisis Enzimática) de Garbanzo sobre los Perfiles de Péptidos con Actividad Antioxidante y Antihipertensiva”** se desarrolló en el Laboratorio de Nutraceuticos, Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los Doctores Edith Cuevas Rodríguez, Cuauhtémoc Reyes Moreno y Liliana León López participaron como Asesores Académicos y los primeros dos como Directores de Tesis. La tesista Ana Carolina Gastelum Hernández recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 18 del mes de junio del año 2020, el (la) que suscribe la C. Ana Carolina Gastelum Hernández alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 15664023, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno y la Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto del bioprocesamiento (Fermentación en estado sólido / Hidrólisis enzimática) de garbanzo sobre los perfiles de péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Ana Carolina Gastelum Hernández  
Ana Carolina Gastelum Hernández

Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la UAS, por permitirme llevar a cabo mis estudios de posgrado y contribuir en mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado.

A mis directores de tesis la **Dra. Edith Cuevas Rodríguez** y el **Dr. Cuauhtémoc Reyes moreno** por haber depositado su confianza en mí al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, gracias por compartirme sus conocimientos, por todos sus consejos y en especial la paciencia brindada.

A la **Dra. Liliana León López** por haber sido un pilar de esta investigación, gracias por todo el tiempo, los consejos, la paciencia otorgada, pero sobre todo por la gran disposición que tuvo para este proyecto.

Al **Dr. Jorge Milán Carrillo** por todos los consejos y sus valiosas opiniones otorgadas durante la realización de esta investigación.

A los doctores **Luis Martin Sánchez Magaña** y **Álvaro Montoya Rodríguez** por siempre tener el tiempo para aconsejarme y resolver mis dudas.

A las doctoras **Karen Pineda** y **Perla Reyes** por compartir todos sus conocimientos y asesorías brindadas.

A mis compañeros de generación **MCTA 2015-2017** por todos los buenos momentos compartidos, en especial a Malenny, Fernanda, Melisa, Blanca, Denisse, Agustín y Marquitos, por todos los consejos y palabras de aliento.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad brindada y por sus buenos consejos, **Yuri** (siempre dándome ánimos), **Bris**, (por siempre escucharme y recordarme la cosas), **Eslim** (por tus buenos consejos), **Rosario** (Siempre al pendiente de mis geles), **Astrid**, **Lalo**, **Gaby**, **Oscar** y **Jocelyn**. A **Evelyn** por aguantarme siempre, muchas gracias por todos los consejos, toda la ayuda y por siempre tener tiempo para escucharme y orientarme.

En especial a mis padres **Celina** y **Porfirio** por apoyarme siempre en todo, sin ustedes esto no habría sido posible.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
<b>I. RESUMEN</b> .....	1
ABSTRACT .....	3
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>III. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA</b> .....	8
<b>A ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS</b> .....	8
1 Especies reactivas de oxígeno y daño a biomoléculas .....	8
2 Estrés oxidativo, procesos degenerativos y enfermedad .....	11
3 Enfermedades crónico-degenerativas.....	14
a Epidemiología y etiología .....	14
b Hipertensión arterial sistémica (HTAS).....	16
1) Generalidades .....	16
2) Fisiopatología de la HTAS. ....	16
3) Especies reactivas de oxígeno en la HTAS.....	18
<b>B IMPORTANCIA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN LA SALUD</b> .....	19
1 Relación entre dieta y enfermedad .....	19
2 Alimentos funcionales y propiedades nutraceuticas de los alimentos .....	22
a Compuestos asociados con actividad antioxidante.....	22
b Compuestos asociados con actividad antihipertensiva .....	25
<b>C GARBANZO (<i>Cicer arietinum</i> L.)</b> .....	27
1 Composición química y valor nutricional del garbanzo .....	30
2 El garbanzo como alimento funcional (propiedades nutraceuticas) .....	36
a Fitoquímicos en garbanzo.....	36

1) Compuestos fenólicos .....	36
b Péptidos bioactivos y potencial nutracéutico .....	38
1) Con actividad antioxidante.....	39
2) Con actividad antihipertensiva .....	41
D. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO .....	42
1 Tempe .....	43
a Características .....	43
2 Sustratos utilizados en elaboración de tempe.....	44
a Microorganismos utilizados en la producción de tempe .....	44
1) Hongos filamentosos .....	44
2) <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	45
3 Proceso para la elaboración de tempe.....	47
a Limpieza / remojo / descascarillado .....	47
b Cocción parcial / drenado / enfriado .....	48
c Contenedores de FES / Incubación.....	49
4 Efecto de la FES sobre la composición química de leguminosas.....	50
5 Efecto de la FES sobre el contenido de fitoquímicos y propiedades nutracéuticas en leguminosas .....	56
a Compuestos fenólicos totales .....	56
b Potencial nutracéutico de péptidos bioactivos después del proceso de fermentación en estado sólido .....	57
1) Con actividad antioxidante.....	58
2) Con actividad antihipertensiva .....	60
<b>IV. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>64</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>

<b>A</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	65
<b>B</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	65
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	66
1	Obtención de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB) utilizando como inóculo <i>Rhizopus oligosporus</i> .....	66
a	Pretratamiento de los sustratos .....	66
b	Inóculo .....	66
c	Fermentación en Estado Sólido .....	68
d	Obtención de harinas.....	68
2	Obtención del extracto acuoso proteico de la harina de garbanzo bioprocesado .....	68
a	Desgrasado de harinas de garbanzo bioprocesado .....	69
b	Lavados de harinas de garbanzo bioprocesado .....	69
c	Obtención del extracto acuoso proteico .....	69
3	Evaluación del grado de hidrólisis (GH), proteína soluble (PS) y actividad antioxidante (AAox) del extracto acuoso proteínico (EAP).....	70
a	Grado de hidrólisis .....	70
b	Evaluación de la proteína soluble del EAP .....	70
c	Evaluación de la actividad antioxidante del EAP .....	70
4	Optimización del proceso de FES para obtener valores de grado de hidrólisis, proteína soluble y actividad antioxidante altos en harinas de garbanzo .....	71
a	Diseño experimental .....	71
b	Optimización del proceso de fermentación en estado solido .....	73
5	Simulación gástrica del extracto acuoso proteínico.....	73
6	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteínicos	74
7	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de los hidrolizados proteínicos...	74

8	Electroforesis (SDS-PAGE) .....	74
9	Fraccionamiento por cromatógrafo Flash.....	75
10	Caracterización por TOF LC/MS .....	75
11	Análisis estadístico.....	76
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>77</b>
A.	Condiciones óptimas de fermentación en estado sólido para producir harina de garbanzo bioprocesada. ....	77
1.	Modelos experimentales de predicción.....	77
a	Grado de hidrólisis .....	80
b	Proteína soluble .....	84
c.	Actividad antioxidante .....	87
2.	Optimización del proceso de fermentación en estado solido .....	91
B	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los péptidos generados después de la simulación gastrointestinal.....	93
C	Efecto antihipertensivo (Inhibición de ECA, IC50), por proteína soluble de garbanzo crudo, cocido y fermentada. ....	96
D	Caracterización de proteína de garbanzo mediante electroforesis (SDS-PAGE) .....	98
E	Caracterización de los EAP hidrolizados por TOF LC/MS.....	104
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>111</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>112</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Pág</b>
<b>1</b>	Principales países productores de garbanzo	30
<b>2</b>	Producción nacional de garbanzo	32
<b>3</b>	Hidratos de carbono complejos presentes en el grano de garbanzo	34
<b>4</b>	Contenido de aminoácidos esenciales en la harina de garbanzo y en el tempe	53
<b>5</b>	Efecto de FES de granos de soya sobre la composición de lípidos y ácidos grasos utilizando <i>R. oligosporus</i> y <i>R. oryzae</i> .	54
<b>6</b>	Diseño experimental empleado para obtener diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y resultados experimentales de las variables de respuesta (GH, PS y AAox).	79
<b>7</b>	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción que muestran la relación entre las variables de respuesta (GH, PS y AAox) y variables de proceso (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	80
<b>8</b>	Efecto antihipertensivo (Inhibición de ECA, IC50), por proteína soluble de garbanzo crudo, cocido y fermentada.	88
<b>9</b>	Masas obtenidas por espectrometría de los diferentes tratamientos.	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág</b>
<b>1</b>	Hidrolizados y péptidos bioactivos derivados de proteínas de garbanzo.	41
<b>2</b>	Proceso para la elaboración de tempe de garbanzo.	52
<b>3</b>	Efecto de la FES con <i>R. oligosporus</i> sobre la proteína de garbanzo	60
<b>4</b>	Obtención de harinas de garbanzo bioprocesadas por FES.	68
<b>5</b>	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el GH (%) de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	83
<b>6</b>	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la PS (mg/mL) de los extractos acuosos proteínicos (EAP).	87
<b>7</b>	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la AAox (mmol ET/m g de proteína) de los extractos acuosos proteínicos (EAP).	90
<b>8</b>	Región de la mejor combinación de TF y tF para la producción de HGBO.	93
<b>9</b>	Actividad antioxidante de los EAP hidrolizados FES (A), crudo vs	95

FES (B) con pepsina y pancreatina a diferentes tiempos: 0, 1.5, 2.5, 4.5 y 5.5 h.

<b>10</b>	Perfil electroforético SDS-PAGE de las harinas de garbanzo en condiciones no reductoras y reductoras.	100
<b>11</b>	Perfil electroforético tricina SDS-PAGE de hidrolizados proteínicos a una concentración de 60 µg/mL.	102
<b>12</b>	Perfil electroforético SDS-PAGE del EAP procesado por FES.	104
<b>13</b>	Espectro LC/MS del EAP del tratamiento crudo.	106
<b>14</b>	Espectro LC/MS del EAP del tratamiento procesado por FES.	107
<b>15</b>	Espectro LC/MS del EAP del tratamiento procesado por FES e hidrolizado por 5.5 h.	108

## I. RESUMEN

En la actualidad existen evidencias científicas sobre la relación dieta-prevención de enfermedades crónico degenerativas (diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, otras), por lo que, el consumo de alimentos funcionales con compuestos bioactivos se ha incrementado en la última década. Para la obtención de alimentos funcionales se utilizan metodologías como la fermentación en estado sólido (FES). Durante este proceso se utilizan microorganismos como *R. oligosporus*, los cuales son capaces de liberar enzimas proteolíticas y degradar proteínas de reserva de cereales y leguminosas generando péptidos. El garbanzo es una leguminosa importante debido a la calidad de su proteína, diversos estudios han mostrado el potencial del garbanzo para la obtención de péptidos bioactivos empleando sistemas enzimáticos. Considerando que el garbanzo sin procesar es una fuente de péptidos bioactivos y que debe ser procesado para su consumo, se propuso optimizar el proceso de FES para obtener harinas de garbanzo con valores máximos de grado de hidrólisis (GH), proteína soluble (PS), así como actividad antioxidante (AAox), y evaluar el efecto de la simulación gástrica sobre el perfil de péptidos bioactivos en la fracción de PS generados por la FES en condiciones óptimas. Para ello se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño central compuesto rotatable con dos factores: temperatura y tiempo de fermentación. La mejor combinación de temperatura/tiempo de FES para producir la harina de garbanzo optimizada (HGO) fue de 34.2°C/113 h. El GH incrementó de 22% a 35% por efecto de la FES, mientras que el valor de PS disminuyó significativamente de 8.4 mg/mL a 5.3mg/mL.

Adicionalmente, la FES afectó positivamente la AAox de la PS incrementando de 0.54 mmol a 5.18 ET/ mg proteína, así mismo la fracción PS de HGO sometida a simulación gástrica, mostró un incremento de AAox respecto a la harina HGO (805.04 vs 788.11  $\mu\text{molET/mg}$  de proteína, respectivamente). La FES mostró ser una herramienta útil para obtener péptidos con actividad antioxidante *in vitro*, y que podría sugerirse como un método para el desarrollo de ingredientes bioactivos.

## ABSTRACT

Currently there is scientific evidence on the relationship diet- prevention of chronic degenerative diseases (diabetes mellitus, hypertension, cardiovascular diseases, others), so, the consumption of functional foods with bioactive compounds has increased in the last decade. For the obtaining of functional foods methodologies are used like solid state fermentation (SSF). During this process microorganisms are used, among them, *R. oligosporus*, which are able to release proteolytic enzymes and degrade cereal and legume reserve proteins generating peptides. Chickpea is considered an important legume due to the quality of its protein, several studies of unprocessed chickpea have shown their potential for obtaining bioactive peptides using various enzymatic systems. Considering that raw chickpea is an important source of bioactive peptides with nutraceutical potential and that this must be processed for consumption, it was proposed to optimize the SSF process to obtain chickpea flours with maximum values of hydrolysis degree (HD), soluble protein (SP), as well as antioxidant activity (AoxA) and to evaluate the effect of gastric simulation on the profile of bioactive peptides in the SP fraction generated by SSF under optimal conditions. For this, the response surface methodology (RSM) was used with a rotatable composite central design with two factors: temperature and fermentation time. The best temperature / time combination of SSF to produce optimized chickpea flour (OCF) was 34.2°C/113h. The HD increased from 22% to 35% due to the effect of SSF, while the SP value decreased significantly from 8.4 mg / mL to 5.3mg / mL. Additionally, SSF positively affected the AoxA of the SP, increasing from 0.54 mmol to 5.18 ET / mg of protein. Once the SP fraction of the OCF was obtained, it underwent gastric simulation to evaluate the effect of the enzymes (pepsin and

pancreatin) on the AoxA of the SP, finding that the AoxA of the SP of the raw meal and the OCF increased to undergo gastrointestinal digestion conditions, obtaining values of 805.04 and 788.11  $\mu\text{molET} / \text{mg}$  of protein respectively.

In conclusion, SSF showed to be a useful tool for obtaining peptides with antioxidant activity, *in vitro*, and that could be suggested as a method for the development of bioactive ingredients.

## II. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos necesitan oxígeno ( $O_2$ ) para la producción de energía. Sin embargo, el exceso de  $O_2$  en las células es nocivo debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante su oxidación (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez 2013). A pesar de que las reacciones de óxido-reducción son imprescindibles para la vida, la oxidación también es fuente de enfermedad, es decir, cuando se pierde el equilibrio entre prooxidación y antioxidación a favor de los prooxidantes, nos encontramos entonces con el llamado estrés oxidativo (EO) (Ballester y Honorem 1996). Es por ello que las células cuentan con mecanismos de defensa capaces de remover los productos tóxicos del  $O_2$ , estos son conocidos como sistema antioxidante (AOX), encargado de mantener el equilibrio de las reacciones de óxido reducción y sobrevivencia celular (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez 2013). Las ERO y el establecimiento de EO afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico (Lachance y col 2001). Entre dichas enfermedades se encuentran las enfermedades cardiovasculares, siendo su principal factor de riesgo la elevada presión arterial (OMS 2015), esta enfermedad afecta entre el 20-40% de la población adulta, esto es, alrededor de 250 millones de personas (OMS 2015). Los avances en el estudio de los radicales libres, EO y su participación en el desarrollo de enfermedades, han permitido identificar sus mecanismos de acción; así como el de moléculas con capacidad de inhibir o modular sus efectos en la célula. Por lo anterior, se ha propuesto que la dieta rica en antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, generado por el exceso de EO (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez 2013).

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las personas que consumen una dieta rica en frutas y vegetales tienen menor riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el EO (Chen y Chen 2013). En efecto, los vegetales son una de las principales fuentes naturales de antioxidantes, ya que proveen diferentes compuestos como ascorbato, tocoferol, flavonoides y carotenoides (Halliwell 2009). Además de estos compuestos, los vegetales son ricos en proteínas, las cuales pueden ejercer actividades como antioxidantes y antihipertensivas a través de ciertos aminoácidos (Chen y col 1998). Las leguminosas se caracterizan por su elevado contenido proteico (20-50%), muy superior al de cereales, dependiendo de la especie, genotipo y condiciones medioambientales en las cuales son desarrolladas. En las leguminosas, las proteínas muestran un elevado contenido en lisina y bajo contenido en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Van Der Merwe y SMIT 2016). En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos (Korhonen 2002), ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales. Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química, enzimática o fermentación (Meisel 1998). Por mucho tiempo, la fermentación microbiana ha sido una importante fuente de producción de enzimas (Nakahara y col 2012), un ejemplo de ello es la fermentación en estado sólido (FES). La FES o cultivo en estado sólido es definido como el cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida en la ausencia de agua libre (Lonsane y col 1985), es la

técnica de conversión de sustratos complejos en compuestos simples, el alimento que se genera a partir de este bioproceso es el “tempe” y es considerado un alimento funcional por las características nutricionales que le brinda el microorganismo al sustrato durante la fermentación. Durante la fermentación se lleva a cabo la liberación de péptidos por acción de las enzimas proteolíticas liberadas por el microorganismo. Los péptidos bioactivos son inactivos dentro de la cadena de la proteína nativa y son liberados tras la hidrólisis enzimática durante la fermentación o bien durante la digestión gastrointestinal (Sanjukta y col 2015).

De este modo, la generación de péptidos bioactivos durante la FES, puede mejorar las propiedades nutricionales del sustrato. A pesar de que hay diversos estudios sobre el efecto de la FES en el valor nutricional y nutracéutico de garbanzo (Angulo-Bejarano y col 2008; Sánchez-Magana y col 2014), no hay investigaciones sobre la optimización del proceso de FES para aumentar el grado de hidrólisis (GH), proteína soluble (PS) y actividad antioxidante (AAox) de extractos proteicos acuosos de harina de garbanzo. La metodología de superficie de respuesta (MSR) ha sido considerada un método matemático estadístico efectivo para establecer modelos para evaluar la significancia relativa de variables y determinar condiciones óptimas de respuestas deseables. Por ello, en el presente estudio se planteó el objetivo de encontrar las mejores condiciones de FES de garbanzo, mediante MSR, para maximizar su GH, PS y AAox, para la obtención una harina funcional de garbanzo bioprocesado.

### **III. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA**

#### **A ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS**

En las últimas décadas se ha identificado al estrés oxidativo (EO) como un importante factor de riesgo para padecer enfermedades crónicas. La producción excesiva de las especies reactivas de oxígeno conlleva al daño de diversas macromoléculas las cuales, a su vez dan lugar a la aparición de estas enfermedades. Dentro de estas enfermedades crónicas se encuentra la hipertensión arterial la cual es un factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, todo esto se encuentra ligado al EO. Es por ello la importancia de abordar el tema, en el siguiente bloque se tratarán los aspectos más relevantes del EO y la relación que hay con la aparición de enfermedades.

#### **1 Especies reactivas de oxígeno y daño a biomoléculas**

El estrés oxidativo (EO) se genera cuando la producción de radicales libres (RL) es mayor a la de antioxidantes (Harman 1993). Estos RL son moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente reactivos, las cuales reaccionan con otros compuestos presentes en el organismo, y consecuentemente se produce daño celular (Zorrilla García y col 2004), a su vez, los RL se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco,

etc. (Veiga Alvarez y col 1997). De los radicales libres (RL) inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular  $O^2$ , el radical anión superóxido ( $O^{2-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ), el hidroperóxido orgánico ( $ROOH$ ) y los lípidos peroxidados (Slater 1988; Ballester y Honorem 1996; Veiga-Alvarez y col 1997). En el otro lado de la balanza están los antioxidantes (sustancias con capacidad para oponerse a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo). Hay sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares (la catalasa de los peroxisomas, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa), también hay multitud de antioxidantes no enzimáticos. Los llamados rastrillos de radicales (*radical scavengers*) son especies químicas cuya posibilidad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente a los RL, glutatión, vitamina C o ácido ascórbico y vitamina E o alfa tocoferol son los principales (Wolff y col 1986; Romero-Alvira y col 1990; Scandalios 1992; Ballester y Honorem 1996).

El estrés oxidativo está mediado por dos sistemas generadores de RL: 1) las especies reactivas de oxígeno (ERO) y 2) las especies reactivas de óxidos de nitrógeno (ERON) (Olivares-Corichi y col 2006). El incremento del estrés oxidativo puede resultar de un aumento en: la producción de precursores de radicales libres, de las ERO, un incremento de las catálisis pro-oxidantes, una reducción de los sistemas antioxidantes o de una combinación de todos ellos. Las ERO presentan una alta reactividad, ya que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares, conociéndose como sus blancos fundamentales: los ácidos

grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, las proteínas, y los ácidos nucleicos (Jaruga y Dizdaroglu 1996).

Los RL inician y propagan la peroxidación lipídica, particularmente la de los fosfolípidos que componen la membrana celular ya que tienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico) (Torres 2002). Esta peroxidación conlleva a la destrucción de la porción hidrofóbica o interna de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica puede tener efectos profundos sobre las funciones celulares. El malondialdehído (MDA), uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas (Fedtke y col 1990), es capaz de provocar la alteración estructural en las mismas provocando pérdida de fluidez, aumento de rigidez y mal funcionamiento de dichas membranas, es mutagénico en las células de los mamíferos y carcinogénico en células de ratas (Valko y col 2007).

Debido a la abundancia de proteínas que hay en las células, en el plasma y en la mayoría de los tejidos, estas son un objetivo fundamental del daño oxidativo, ya que tienen una rápida tasa de reacción con radicales libres y otros oxidantes, lo que provoca la pérdida de las funciones específicas de las proteínas dañadas (Varea y col 2015). Dentro de las principales modificaciones que sufren las proteínas ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis (Cabisco y col

2000). Prácticamente todos los aminoácidos pueden servir como blanco del ataque por las especies reactivas, aunque algunos aminoácidos como metionina, triptófano, fenilalanina, tirosina, cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina e histidina son más susceptibles (Vogt 1995). La modificación de las cadenas laterales de éstos, puede generar alteraciones directamente en la estructura y la función de las proteínas (Ortega-Camarillo y Guzmán-Grenfell 1999), a la fragmentación química, o al incremento en la susceptibilidad a proteólisis (Olivares-Corichi y col 2006).

Otra molécula que sufre ataques por radicales libres teniendo como consecuencia la pérdida de la homeostasis celular, es la del ADN, pérdida que puede prolongarse como consecuencia de las funciones del mismo, como reservorio activo de información. En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO, que llegan al interior del núcleo celular, ya sean generadas como consecuencia de un agente externo, o bien, como consecuencia de procesos metabólicos celulares (Shi y col 1996). El estrés oxidativo ha sido señalado como un fenómeno importante en la patogénesis de diversas enfermedades tales como el cáncer, aterosclerosis y diabetes (Beckman y Ames 1998).

## **2 Estrés oxidativo, procesos degenerativos y enfermedad**

Las ERO y el establecimiento de EO afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico (Valko y col 2007). Hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de RL, al menos estarían

implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas (Ballester y Honorem 1996).

1. El envejecimiento: es difícil diferenciar entre lo que son procesos propios del envejecimiento o procesos patológicos que se desarrollan preferentemente durante el envejecimiento. El envejecimiento y la muerte pueden ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular (apoptosis). La teoría de los RL del envejecimiento supone que este resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a RL (Wolff y col 1986; Stadtman y Oliver 1991; Bellomo y Mirabelli 1992; McCabe y col 1992; Ame y col 1993; Harman 1993). También se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes (Stadtman y Oliver 1991), una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de RL (Glass y Gershon 1984) y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Rivett 1985).

2. La aterosclerosis: la formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia (Goldstein y col 1979). En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL (Stadtman y Oliver 1991). Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas

de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (Wolff y col 1986; Witztum y Steinberg 1991; Diaz y col 1997). Se ha demostrado una estrecha relación entre RL y LDL y se sabe que su aumento tiene un conocido valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis (Benditt y col 1978; Ray y col 1998). Muchos factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como pueden ser la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre pro-oxidación y anti-oxidación (Benditt y col 1978).

3. Hipertensión arterial (HTA): la HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones (vasculares, parenquimatosas, etc.) producidas por los RL. Probablemente los antioxidantes y rastillos de RL sean una nueva expectativa de tratamiento, implicando en ello acciones terapéuticas que actúen beneficiosamente sobre las manifestaciones presentes en la anatomía patológica (fibrosis, hipertrofia) y en la bioquímica (inhibición de la bomba Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>, inestabilización de membranas, lesiones sobre DNA, etc.) de la HTA, moderando y/o evitando las complicaciones clínicas (síndrome X) y realizando al mismo tiempo cardio-nefroneuro-retino-protección (Romero-Alvira y col 1991). En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante (Kuznetsov y col 1995). La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales (Treasure y col 1995).

Las especies reactivas, generadas en situación de estrés oxidativo, pueden iniciar procesos patológicos graves y favorecer su progresión debido al impacto que

tienen las ERO o ERN en las proteínas. Pueden afectar a proteínas de señalización de gran importancia biológica al inducir un aumento o disminución de su función, o la pérdida de esta (Levine y Stadtman 2001; Halliwell y Whiteman 2004).

Conforme se ha ido profundizando en el conocimiento de los radicales libres, se ha descubierto que están asociados a muchas patologías en el ser humano, como son: procesos reumáticos, patologías de tipo gastroentéricas, renales, neurológicas, endócrinas, broncopulmonares, entre muchas otras. Las más destacadas son las cardiopatías, cáncer y diabetes (Moskovitz y col 2002; Valko y col 2007).

### **3 Enfermedades crónico-degenerativas**

Las enfermedades no transmisibles, también conocidas como enfermedades crónicas, no se transmiten de persona a persona. Son de larga duración y progresión generalmente lenta. Los cuatro tipos principales de enfermedades no transmisibles son las enfermedades cardiovasculares (como los ataques cardíacos y los accidentes cerebrovasculares), los cánceres, las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstruida crónica y el asma) y la diabetes (OMS 2015).

#### **a Epidemiología y etiología**

En diversos estudios se ha demostrado que las enfermedades crónico degenerativas constituyen una de las principales causas de muerte en nuestro país y que estas generalmente se encuentran asociadas a factores como el sobrepeso y la obesidad (UAM 2014). Las enfermedades crónico degenerativas comprenden una serie de enfermedades caracterizadas por una larga latencia y una expresión clínica

muy diversa (OMS 2015). Su incidencia se encuentra asociada a una multitud de factores que se relacionan no solo con el curso clínico sino con la velocidad de aparición del padecimiento, entre esos factores destacan el sobrepeso, la obesidad, altas concentraciones de lípidos en sangre, la hipertensión, la hiperglucemia, el síndrome metabólico, la inactividad física, regímenes alimentarios no saludables, el tabaquismo y el consumo de alcohol (Córdova-Villalobos y col 2008).

Las enfermedades crónicas no transmisibles son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud (Córdova-Villalobos y col 2008). Lo son por varios factores: el gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad general, la conformación en la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento (Bodenheimer y col 2002).

La hipertensión arterial sistémica (HTAS) es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México, además es uno de los factores de riesgo asociados a las principales enfermedades cardiovasculares, tales como la enfermedad cerebro vascular y la enfermedad isquémica del corazón (OMS 2015), en México la prevalencia actual de HTAS es de 25.5%. La proporción de adultos con diagnóstico previo de hipertensión arterial y cifras de tensión arterial controlada (<140/90 mmHg) es de 58.7%. Dentro de la proporción de adultos con diagnóstico previo de hipertensión arterial, el 79.3% reportó tener tratamiento farmacológico para controlar sus valores de tensión arterial. En los hombres la prevalencia de hipertensión arterial es de 24.9%, mientras que en las mujeres, la prevalencia es de 26.1% (Hernández-Ávila, 2016).

## **b Hipertensión arterial sistémica (HTAS)**

### **1) Generalidades**

La hipertensión arterial sistémica (HTAS), principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, afecta entre el 20-40% de la población adulta de la región, esto es, alrededor de 250 millones de personas (OMS 2015). Diversos estudios han identificado como factores que contribuyen a la aparición de HTAS a una alta ingesta de sodio, la edad, dietas elevadas en grasas saturadas, el tabaquismo, estilo de vida sedentario y la presencia de enfermedades crónicas como obesidad, dislipidemias y diabetes entre otros factores (Kearney y col 2004).

La HTAS se define en general como aumento persistente de la presión arterial, la fuerza ejercida por unidad de área sobre las paredes de las arterias. Para considerarla hipertensión, la presión arterial sistólica, o presión de la sangre durante la fase de contracción del ciclo cardiaco, tiene que ser de 140 mm Hg o superior; o la presión arterial diastólica, o presión durante la fase de relajación del ciclo cardiaco, tiene que ser de 90 mm Hg o superior; la lectura se expresa como 140/90 mm Hg. El individuo normotenso tiene una presión sistólica inferior a 120 mm Hg y presión arterial diastólica inferior a 80 mm Hg (120/80 mm Hg) (Escott-Stump 2009).

### **2) Fisiopatología de la HTAS.**

La presión arterial es una función del gasto cardiaco multiplicado por la resistencia periférica (la resistencia que opone los vasos sanguíneos al flujo de la sangre). El diámetro de los vasos sanguíneos afecta mucho al flujo de la sangre. Cuando el diámetro está disminuido (como en la aterosclerosis), aumentan la resistencia y la presión arterial. A la inversa, cuando el diámetro aumenta, la resistencia disminuye y la presión sanguínea desciende (Escott-Stump, 2009).

La inhibición de la ECA es un excelente blanco para el tratamiento clínico de la hipertensión, la ECA a su vez está relacionada en dos sistemas de la presión arterial (PA); 1) el sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), y 2) el sistema kalidina-óxido nítrico (SKON). Se ha pensado que el SRAA es el sistema presor predominante en el control de la PA. En este sistema el N-terminal de la pro-hormona angiotensinógeno (liberado en el hígado) es convertido en un decapeptido angiotensina I (Ang I) por la renina renal. La ECA remueve el C-terminal de la Ang I (HL) para formar angiotensina II (Ang II), un potente vasoconstrictor que actúa directamente sobre las células vasculares del musculo liso. De este modo, la inhibición de la ECA consecuentemente reduce la PA. La Ang II se une a los receptores AT1 y AT2 que están localizados en los tejidos periféricos del cuerpo y en el cerebro. La vasoconstricción producida por la Ang II es mediada por el receptor AT1 (Armstrong y col 2000; Malkowicz y col 2001). En el SKON, la ECA inactiva los péptidos vasodilatadores bradiquinina y kalidina. La kalidina es sintetizada del kininogeno por la kalikreina y posteriormente la kalidina permite la formación de la bradiquinina, entre otros péptidos vasoactivos. La bradiquinina se une a los receptores  $\beta$  originándose un incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular. La unión de la bradiquinina a los receptores  $\beta$  y el incremento de  $Ca^{2+}$  estimula a la óxido nítrico sintasa a convertir la L-arginina a óxido nítrico (ON), un potente vasodilatador. La ECA puede entonces, indirectamente inhibir la producción de ON al hidrolizar la bradiquinina en fragmentos inactivos (Armstrong y col 2000).

### **3) Especies reactivas de oxígeno en la HTAS**

Dentro del sistema cardiovascular, las ERO juegan un papel fisiológico esencial en el mantenimiento de la función cardíaca y vascular y un rol fisiopatológico en la disfunción cardiovascular asociada con la hipertensión, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, entre otras (Landmesser y Harrison 2001). El aumento de los niveles o de la actividad vascular de la NAD(P)H oxidasa ha sido implicado como la fuente primaria de exceso de  $O_2$  en la HTAS esencial (Lassègue y Clempus 2003). La activación del SRAA ha sido propuesto como el principal estimulador de la activación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de ERO en la HTAS (Lassègue y Clempus 2003).

En condiciones patológicas, el aumento de la producción de ERO conduce a disfunción endotelial, aumento de la contractilidad, crecimiento de las células vasculares del músculo liso y apoptosis, migración de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de la deposición de proteínas de la matriz extracelular, procesos principales que contribuyen al daño vascular en la enfermedad cardiovascular (Rao y Berk 1992). Estudios clínicos han demostrado que hay un incremento de ERO en pacientes con HTAS esencial, estos hallazgos se basan en el incremento de los niveles en el plasma de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico y 8-epi-isoprostanos los cuales son biomarcadores de la peroxidación lipídica y del EO (Xu y Touyz 2006), además los pacientes con HTAS tienen disminuidos los niveles de glutatión y la actividad de la superóxido dismutasa esta reducida (Kedziora-Kornatowska y col 2004).

Un incremento en la producción de ERO conlleva a la aparición de diversas enfermedades como la HTA, aterosclerosis, entre algunas otras, lo que resulta en la disminución de la calidad de vida. Es por ello que se deben tomar medidas preventivas para evitar dichas enfermedades, entre las que cabe mencionar la adopción de buenos hábitos alimenticios, además, se ha reportado que una dieta rica en antioxidantes tienen la capacidad de prevenir el daño a diferentes órganos. Dentro de esta dieta se pueden incluir alimentos funcionales los cuales tienen diversos efectos a la salud, tales como antihipertensivos, hipoglucemiantes, antioxidantes, entre otros.

## **B IMPORTANCIA DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN LA SALUD**

En la actualidad se ha recalcado el consumo de alimentos funcionales ya que tienen propiedades que ayudan a mantener una buena salud. Es por ello la importancia de tratar el tema en el siguiente bloque, dando a conocer su definición, así como también la relación que hay entre la alimentación y la aparición de diversas enfermedades.

### **1 Relación entre dieta y enfermedad**

La dieta y la nutrición son muy importantes para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Está bien establecida su función como factores determinantes de enfermedades crónicas, y eso los convierte en componentes fundamentales de las actividades de prevención (OMS 2002). Además se ha relacionado al sobrepeso u obesidad, con la aparición de distintas enfermedades como hipertensión, dislipidemias, diabetes tipo 2, enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea nocturna, problemas respiratorios, y cáncer de endometrio,

glándula mamaria, próstata y colon entre otras (Pi-Sunyer y col 1998). Asimismo, otros elementos de la vida diaria, como por ejemplo la actividad física, el consumo de tabaco y el estrés, también influyen de forma significativa sobre la salud (De Backer y col 2003). Estos cambios en el comportamiento alimentario, asociados a una actividad física baja, se han relacionado con un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas como las antes mencionadas (Eyre y col 2004). Por cuestiones del presente trabajo los siguientes párrafos se enfocaran en la relación que existe llevar una mala alimentación con la aparición de HTA.

La relación entre hipertensión y obesidad se conoce desde hace mucho tiempo. En adultos jóvenes obesos entre 20 y 45 años, la prevalencia de hipertensión arterial es seis veces mayor que en individuos de la misma edad con peso normal (Daza 2002). La distribución de la grasa corporal parece tener un efecto importante sobre el riesgo de hipertensión arterial. Así, la grasa localizada en la mitad superior del cuerpo tiene mayor probabilidad de elevar la presión arterial que la localizada en la parte inferior (Blair y col 1984). La elevación de la tensión arterial parece que se debe al incremento de la resistencia arteriolar periférica. Durante la reducción de peso y después de su estabilización la tensión arterial suele bajar. La obesidad también hace aumentar el trabajo cardíaco, incluso con cifras de tensión arterial normal (Daza 2002).

El tratamiento de la HTA se adecua al paciente, según las cifras de presión arterial que presenta. En algunos casos la dieta, por si sola, puede ser suficiente, sobre todo si se asocia a la reducción del peso corporal, independientemente de su IMC e incrementa la actividad física de manera notable (OMS 2015). Se han identificado a ciertos patrones dietéticos que se asocian con un incremento del riesgo

de enfermedad cardiovascular (Simon y col 1995) y otros, por el contrario, pueden influir en los efectos de la función hemostática (Anderson 1995; Massaro y col 2010) y protegen contra esas enfermedades. Desde el punto de vista de la dietoterapia, existen una serie de nutrientes que han demostrado su relación con los controles de presión arterial, entre ellos tenemos el sodio, potasio, magnesio, lípidos, así como la energía total ingerida. La adopción de una dieta rica en fruta, verdura y lácteos desnatados, la disminución de la ingesta de sal y alcohol, la pérdida de peso en pacientes con sobrepeso u obesidad y la actividad física regular pueden prevenir y retrasar el desarrollo de hipertensión (Zanuy 2013). También, se ha descubierto a través de estudios epidemiológicos que la vitamina E, la vitamina C y los carotenos protegen contra la aparición de ésta enfermedad (Mahan y col 2013). La vitamina E (tocoferol) es el antioxidante liposoluble más importante (Pita-Rodríguez 1997), localizado en el medio hidrofóbico de las membranas biológicas, cuya principal función es actuar como antioxidante natural ya que reacciona con los radicales libres que se generan en la fase lipídica, protegiendo a los lípidos de las membranas; además de desempeñar una función fisicoquímica en el ordenamiento de las membranas lipídicas, estabilizando las estructuras de membrana (Vega y col 2005); con respecto a los carotenoides, diversos estudios sugieren que desempeñan un papel posterior y no anterior en el proceso aterosclerótico, al prevenir la formación de la placa arterial (Zamora 2007).

Por otro lado, dietas como la dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) brindan una serie de recomendaciones que promueven la reducción de presión arterial, las cuales son factibles y fáciles de alcanzar, y conjuntamente con la modificación en estilos de vida (actividad física, regulación de la ingesta de

alcohol, etc.) logra mejoría en la condición del paciente hipertenso (Esquivel-Solís y Jiménez-Fernández 2010). Un tratamiento interdisciplinario de la hipertensión arterial involucra tanto la prescripción de terapia farmacológica como también de dietas modificadas.

## **2 Alimentos funcionales y propiedades nutraceuticas de los alimentos**

Los alimentos funcionales se definen como los productos alimenticios de origen animal o vegetal, consumidos en la dieta diaria, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos. Estos compuestos ejercen efectos farmacológicos que modulan funciones terapéuticas en el cuerpo que resultan benéficas para la salud (Roberfroid 1999). La parte interesante de los alimentos funcionales ha sido a que su toxicidad es menor que los medicamentos (Aluko 2016). Un nutraceutico, por otro lado, es un suplemento dietético concentrado, hecho a partir de una sustancia natural bioactiva presente en los alimentos y que proporciona un efecto favorable sobre la salud, superior al que tendría el alimento normal (Cruzado y Cedrón 2013).

### **a Compuestos asociados con actividad antioxidante**

Los alimentos de origen vegetal son productos de gran interés, ya que, además de aportar macronutrientes y micronutrientes contienen una serie de sustancias que, aunque no tienen una función nutricional clásicamente definida, o no se consideran esenciales para la salud humana, pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad y ser indispensables a largo plazo para nuestra salud. (Economos y Clay 1999; Mellish 1999; Häkkinen y Törrönen, 2000; Kalt 2001; Gorinstein y col 2002; Hannum 2004). Estas sustancias bioactivas o

metabolitos secundarios de origen vegetal se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes (King y Young 1999; Belnstein 2001) y entre la diversidad de capacidades que estos poseen, lo más estudiado son sus propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante (Rivas y García, 2002).

La exposición a los radicales libres permite desarrollar una serie de mecanismos de defensa (Cadenas 1997), los cuales incluyen a las vitaminas (E y C), algunas enzimas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.) y otros captadores de radicales no vitamínicos de la dieta, entre los que destacan los polifenoles (Espín y Tomás-Barberán 2005). Por lo tanto, la eficacia de estos antioxidantes depende de cuestiones genéticas (enzimas) y de la nutrición (captadores de radicales vitamínicos y no vitamínicos). En este sentido, teniendo en cuenta que entre los antioxidantes naturales se encuentran muchas vitaminas y colorantes naturales con actividad polifenólica, se evidencia el beneficio de incluir frutas, legumbres, verduras y hortalizas en nuestra dieta (Martínez-Navarrete y col 2008).

De forma general, los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por estos radicales se clasifican en tres categorías: 1) Antioxidantes, que previenen la formación de radicales libres; 2) Antioxidantes captadores de radicales libres, que inhiben la iniciación del proceso oxidativo o bien interfieren en el proceso de propagación; y 3) Antioxidantes que actúan revirtiendo el proceso de oxidación (Rivas y García 2002). La ingestión dietética de flavonoides junto con otros antioxidantes naturales de eficacia comprobada, como las vitaminas C y E y carotenoides, coadyuvan en esos procesos de defensa. Los flavonoides se encontrarían dentro de las dos primeras categorías, es decir, son capaces de

prevenir la formación de radicales libres o bien actúan como captadores de estos radicales una vez formados (Packer y col 1999; Santos-Buelga y Scalbert 2000).

Otros compuestos relacionados con la capacidad antioxidante son los péptidos, estos se pueden obtener a partir de la digestión de proteínas de origen animal o vegetal, ya sea empleando enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana, procesamiento y durante la digestión gastrointestinal (Samaranayaka y Li-Chan 2011). En general, los 20 aminoácidos presentes en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres si la energía de éstos es alta (por ejemplo radicales hidroxilo). Los más reactivos incluyen los azufrados (Met y Cys), los aromáticos (Trp, Tyr y Phe) y los que contienen anillo imidazol como la His (Tintoré y col 2013). Ghribi y col. (2015) purificaron péptidos antioxidantes a partir de la proteína aislada de garbanzo a través de un proceso de hidrólisis con alcalasa, encontrando que después de dicho proceso la proteína poseía mayor capacidad captadora de radicales libres, esto se demostró a través del análisis *in vitro* DPPH, lo cual sugiere que los péptidos pueden ser un ingrediente funcional de los alimentos (Ghribi y col 2015).

Zhuang y col (2013) identificaron tres péptidos con actividad antioxidante de hidrolizados de gluten de maíz, encontrando que todos en su estructura tenían aminoácidos aromáticos (Leu-Pro-Phe, Leu-Leu-Pro-Phe y Phe-Leu-Pro-Phe). Estos péptidos mostraron tener actividad de captación de radicales libres, por lo cual ellos sugirieron que los hidrolizados de gluten de maíz pueden ser usados como fuentes naturales de antioxidantes (Zhuang y col 2013). Por otro lado, Chi y col (2015) encontraron tres péptidos (WEGPK, GPP, GVPLT) con propiedades antioxidantes,

concluyendo que dicha actividad era conferida por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en la secuencia del péptido (Chi y col 2015).

### **b Compuestos asociados con actividad antihipertensiva**

La ingesta de compuestos fitoquímicos se asocia a un descenso proporcional en el riesgo relativo de presentar enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares (Ross y Kasum 2002) y parece que intervienen ejerciendo un efecto vasodilatador (Vennat y col 1988; Waladkhani y Clemens 1998; Morton y col 2000) y reductor de la presión sanguínea (Klein y Kurilich 2000; Kaur y Kapoor 2001). La regulación de la presión arterial esta relacionada con la enzima convertidora de angiotensina (ECA, EC 3.4.15.1) por la modulación del SRAA (Wang y col 2005). Ha sido demostrado que los inhibidores de la ECA tienen una actividad antihipertensiva en animales (Murthy y col 1977) y en pacientes hipertensos (Case y col 1978). Muchos estudios se han enfocado en los péptidos inhibidores de la ECA derivados de alimentos, tales como: la caseína de la leche (Maruyama y col 1987; Nakamura y col 1995), de pescado (Kohama y col 1988), de huevo (Yoshii y col 2001), y de proteínas de las plantas (Shin y col 2001).

Ferreira fue el primero en aislar pequeños péptidos del veneno de la cobra brasileña (*Bothrops jararaca*) que exhibían una fuerte actividad inhibitoria de la ECA y que fueron denominados como factores potenciadores de bradicininas (Ferreira 1965). Cheung y col. estudiaron la inhibición de la ECA de esos péptidos, y concluyeron que la inhibición observada es de tipo competitivo y que los inhibidores se ligan a la enzima de la misma manera que ésta se liga al sustrato (Cheung y Cushman 1973). Más tarde, el mismo grupo demostró que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en su grupo C-terminal (HL,

FR y AP) también determina el efecto sobre la inhibición de la ECA. Puesto que la ECA libera específicamente dipéptidos, se podría esperar que sea bastante selectiva con respecto a los dos residuos de aminoácidos que componen este grupo saliente (Cheung y col 1980).

Yang y col. aislaron cuatro péptidos a partir de la hidrólisis de las proteínas de espinaca con actividad antihipertensiva probados en ratas hipertensas espontáneamente, encontrando nuevas secuencias de aminoácidos que presentaron efecto inhibitorio sobre la ECA, con secuencias MRWRD (Met-Arg-Trp-Arg-Asp), MRW (Met-Arg-Trp), LRIPVA (Leu-Arg-Ile-Pro-Val-Ala) y IAYKPAG (Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly). Los péptidos con mayor actividad fueron el MRW disminuyendo la presión arterial a las 2 h después de la administración, seguida por el péptido MRWRD con 4 h después de la dosis (Yang y col 2003). Barbana y Boye estudiaron la actividad inhibitoria de la ECA de proteína asilada de garbanzo y de chícharo sometidos a un proceso de hidrólisis, encontrando que conforme aumentaba el tiempo de hidrólisis había mayor porcentaje de inhibición de la enzima (Barbana y Boye 2010). Ramírez-Torres y col. (2017) evaluaron la proteína de amaranto hidrolizada con alcalasa sobre el efecto de inhibición de la ECA in vitro, quienes detectaron la inhibición de la enzima después de 5 minutos de la administración intragástrica del hidrolizado, resaltando que estos compuestos bioactivos son resistentes a la digestión gastrointestinal y son biodisponibles por lo que pueden ser utilizados como suplementos o ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales (Ramírez-Torres y col 2017). Por otro lado, Fritz y col, demuestran que los péptidos de amaranto obtenidos por hidrólisis con alcalasa tienen mayor porcentaje de inhibir a la ECA, que aquellos que son obtenidos con otras enzimas

como tripsina, quimotripsina, papaína, entre otras. La especificidad de la enzima para romper el enlace peptídico es importante para la generación de péptidos antihipertensivos de amaranto (Fritz y col 2011). Por ejemplo, la tripsina tiene preferencia por los residuos de lisina y arginina, mientras que la alcalasa tiene una amplia especificidad por los enlaces peptídicos (Ottesen y Svendsen 1970). Esto puede incrementar la diversidad de péptidos de amaranto generados después de la hidrólisis con alcalasa y puede ser un factor clave en la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva (Ramírez-Torres y col 2017).

Estos estudios demuestran que para obtener la actividad inhibidora de la ECA es necesario tener péptidos con peso molecular pequeño, es por ello la importancia de llevar a cabo un proceso de hidrólisis previo, además es importante recalcar que estos péptidos deben de escapar de la digestión gastrointestinal para poder tener su efecto.

La incidencia de las enfermedades crónico degenerativas está estrechamente relacionado con una mala alimentación, es por ello que se deben adoptar buenos hábitos alimenticios para la prevención o bien, en algunos casos, como tratamiento de dichas enfermedades. Se ha recomendado la implementación de alimentos funcionales a la dieta para prevenir algunas enfermedades, estos alimentos son ricos en compuestos que tienen múltiples beneficios a la salud. Dentro de estos alimentos funcionales se encuentran las leguminosas, las cuales poseen una gran cantidad de proteína, fibra, vitaminas y minerales capaces de prevenir este tipo de patologías.

### **C GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)**

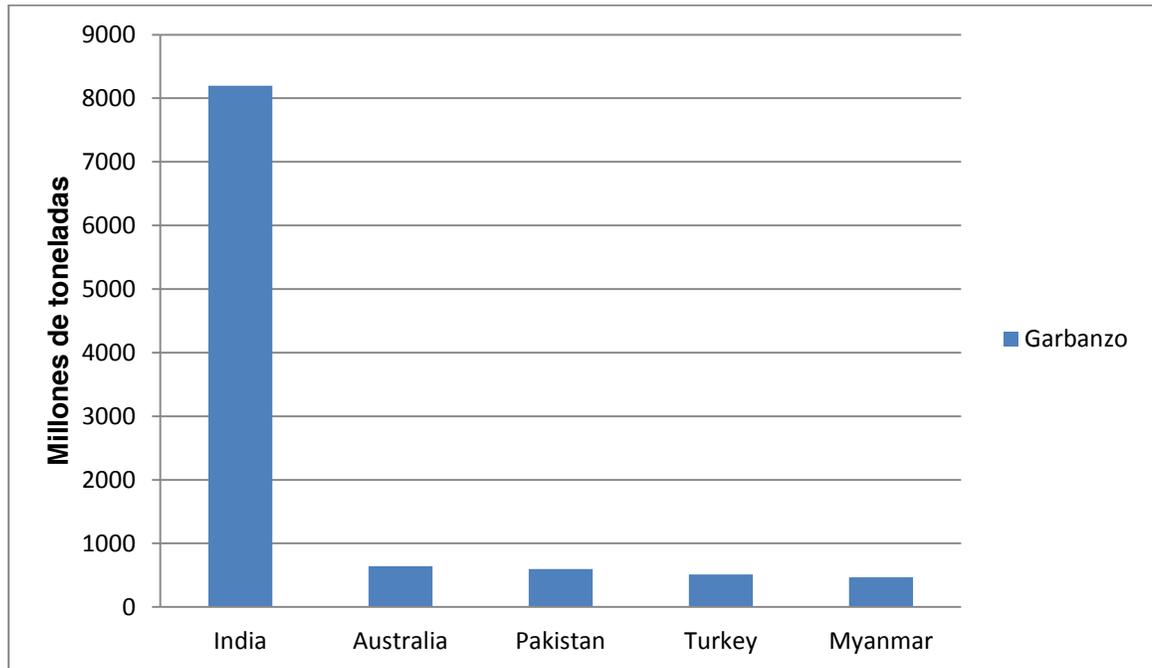
El garbanzo se clasifica en la familia Fabacea, género *cicer*, especie *Cicer arietinum* L, nombre científico *Cicer arietinum*. El origen del cultivo del garbanzo se

localiza en el Suroeste de Turquía. Se ha comprobado la existencia de 40 especies de garbanzos extendiéndose desde Oriente Medio, Turquía, Israel y Asia Central. Existen dos tipos de granos del garbanzo: Desi o Kabuli. Los Desi son cultivados principalmente en Oriente, y la característica principal es que son granos más pequeños, coloreados, con flores colores rosados a púrpuras, mientras que las variedades del tipo Kabuli, son de granos color crema a blanco, con tamaño de semilla grande y flores de color blanco cremoso (Prieto 2012).

Los tipos de garbanzo que se producen en México provienen inicialmente de la región mediterránea (Francia, España e Italia) y asiática (India y Afganistán); las primeras se destinan al consumo humano (kabuli) y las segundas al forrajero (desi). Debe destacarse que estos tipos han sido adaptadas y mejoradas genéticamente, generando otras diversas variedades con altos rendimientos, semilla de calidad para el mercado de exportación y resistencia a distintas enfermedades. Algunas variedades que se han liberado y se cultivan en gran parte de México, son Surutato 77, Sonora 80, Santo Domingo 82, Tubatama-88, y Blanco-Sinaloa 92 y recientemente liberadas Costa 2004 y Blanco noroeste (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz 2013).

Datos de la FAOSTAT del 2014 rebelaron que el principal productor de garbanzo fue la India que participo con el 68.5 % del total mundial, muy lejos le sigue en importancia Australia que pasó al segundo lugar con el 5.51 %, dejando en el tercer lugar a Pakistán (**Cuadro 1**), otros países que revisten importancia en la producción mundial son Turquía, Myanmar, y en el continente americano se destacan México y Canadá (FAOSTAT 2014).

**Cuadro 1.** Principales países productores de garbanzo



Producción de garbanzo a nivel mundial durante el periodo 2013-2014, destacando como los principales: India, Australia y Pakistán. En ese periodo México ocupó el octavo lugar (FAOSTAT 2014).

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa de importancia comercial en el noroeste de México; Sinaloa, Sonora y Guanajuato son los principales estados productores (**Cuadro 2**). De 2007 a 2009, México produjo 389 mil toneladas de grano, con lo que consiguió el tercer peldaño a nivel mundial en este rubro, sólo debajo de India y Turquía. De una un total de ocho países evaluados en producción de garbanzo durante 2007-2009, México ocupó el tercer lugar, con 389 mil toneladas de grano; en primer sitio se encontró la India, con un millón 100 mil toneladas; y en segundo lugar Turquía, con 675 mil toneladas. Sinaloa es el líder de la producción de garbanzo (SAGARPA-SIAP 2017), según estadísticas de los últimos 12 años (**Cuadro 2**).

Cómo se ha descrito hasta ahora, el garbanzo se encuentra dentro de las leguminosas más importantes a nivel mundial, nacional y estatal. Además, el garbanzo es una importante fuente de proteínas y carbohidratos lo que convierte en un alimento con alto valor nutricional. En los siguientes apartados se describirá la relevancia de esta leguminosa debido a su valor nutricional y potencial nutracéutico.

### **1 Composición química y valor nutricional del garbanzo**

El garbanzo es considerado una buena fuente de proteínas gracias a su buen balance en composición de aminoácidos, una alta biodisponibilidad y relativamente bajos niveles de factores antinutricionales (Singh y col 1991; Friedman 1996; Cardoso y col 2001). El contenido de proteína en el garbanzo varía significativamente cuando se considera la masa total del grano seco (17-22%) y cuando es descascarillado incrementa (25.3-28.9%) (Hulse 1989; Badshah y col 2003). Las proteínas del garbanzo usualmente se clasifican en dos fracciones, las

**Cuadro 2.** Producción nacional de Garbanzo

<b>Ubicación</b>	<b>Superficie Sembrada (Ha)</b>	<b>Superficie Cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>
Sinaloa	30,948	30,948	52,891
Sonora	16,243	16,012	35,348
Guanajuato	4,988	3,822	5,828
Michoacán	10,316	9,825	17,771
Baja California Sur	2,649	2,649	4,041
Jalisco	1,293	1,293	2,135
Guerrero	553	549	425
Oaxaca	269	269	240
Hidalgo	18	18	12
Querétaro	7	7	4
<b>Total</b>	<b>67,329</b>	<b>65,437</b>	<b>118,649</b>

Estados productores de garbanzo en México. Año agrícola 2016, situación al 31 de marzo de 2017 (SAGARPA-SIAP).

globulinas y las albuminas (Clemente y col 2000). Las globulinas son las proteínas mayoritarias de las semillas las cuales representan alrededor del 60-80%. La fracción de albuminas, la menos abundante, representa el 15-25% del total de las proteínas. Las albuminas juegan un papel esencial en la semilla porque incluye a las proteínas con función enzimática y metabólica, además, las albuminas tienen un alto valor nutricional por su gran contenido de lisina y aminoácidos azufrados (Bhatty 1982).

Las proteínas de reserva del garbanzo son relativamente bajas en aminoácidos que contienen azufre, tales como metionina, cisteína y triptófano. Sin embargo, el contenido de lisina y arginina es alto en comparación con los cereales. Por esta razón, la combinación de leguminosas y cereales proporcionan los aminoácidos esenciales necesarios para una adecuada nutrición (Duranti 2006).

Además de tener una gran concentración de proteínas es una importante fuente de carbohidratos representando más del 50% del peso seco total del grano (Wood y Grusak 2007) (**Cuadro 3**). La concentración de monosacáridos en el garbanzo son: galactosa (0.05%), ribosa (0.1%), fructosa (0.25%) y glucosa (0.7%). Los disacáridos libres más abundantes son: la maltosa (80.6%) y la sacarosa (1-2%) (Wood y Grusak 2007). El garbanzo es una de las leguminosas con mayor concentración de oligosacáridos (Campos-Vega y col 2009). Posee un gran contenido de fibra, superando al frijol, habas y chícharos. La fibra dietética incluye carbohidratos no digeribles y lignina (constituyente principal de las paredes celulares en plantas) (AACC 2001). El contenido total de la fibra dietaria del garbanzo crudo es de 18-22 g /100 g y su contenido es mayor al de otras leguminosas (Tosh y Yada 2010). Por lo general, no se encuentran diferencias significativas en el contenido de fibra soluble entre los granos Kabuli y Desi, debido a la proporción similar de

**Cuadro 3.** Carbohidratos complejos presentes en el grano de garbanzo

<b>Componente</b>	<b>Concentración (%)</b>
Almidón	50.4
Amilosa	20-46.5
Almidón resistente	3.4-16.4
Celulosa	1.1-13.7
Hemicelulosa	0.6-16.0
Lignina	Trazas a 7.1
Fibra dietética total	8.2-24.0
Fibra dietética soluble	3.7
Fibra dietética insoluble	7.9
NSP polisacáridos no almidón	5.5-35.4

Composición de carbohidratos complejos presentes en el grano de garbanzo tipo kabuli (%/100 g de grano seco) (Wood y Grusak 2007).

hemicelulosa que constituye gran proporción (aproximadamente 55%) del total de fibra dietaria del grano (Wood y Grusak 2007; Jukanti y col 2012).

El contenido de polisacáridos en el garbanzo varía entre 37.5 a 50.8%, siendo mayor en el garbanzo tipo kabuli que en el tipo desi (Frimpong 2010). El almidón del garbanzo contiene amilosa que varía entre 30 y 40%, esto se ha asociado con la digestibilidad del almidón *in vitro*, debido a que contiene almidón de menor digestibilidad (almidón resistente) en comparación con el almidón de los cereales (Jukanti y col 2012).

El garbanzo también contiene polisacáridos que no forman parte del almidón, se dividen en dos tipos: solubles e insolubles. La parte soluble está integrada por hemicelulosa (3.5-9%) y sustancias pépticas (1.5-4%), éstos se digieren lentamente debido a su naturaleza higroscópica y pegajosa (Wood y Grusak 2007). Los componentes insolubles son la celulosa y algunas hemicelulosas siendo éstos los que forman parte de la pared celular y que generalmente se hace referencia a la fibra cruda. El garbanzo tipo desi contiene entre 4 a 13% de celulosa, mientras que el tipo kabuli contiene menos del 5%, esto se debe a la diferencia en el grosor de la testa (Jukanti y col 2012). El garbanzo presenta mayor contenido de grasa que otras leguminosas. La concentración total de lípidos de los tipos desi y kabuli oscila entre 2.9-7.4 % y 3.4-8.8%, respectivamente.

El contenido total de lípidos en el garbanzo comprende principalmente ácidos grasos poliinsaturados (62-67%), ácidos grasos mono-insaturados (19-26%) y grasas saturadas (12-14%) (Wood y Grusak 2007). El principal ácido graso presente en las fracciones lipídicas es el ácido palmítico (Ravi 2005). El ácido linoleico se encuentra en el tipo desi (46-62%) y kabuli (16-56%) (Asif y col 2013).

El garbanzo puede complementar los requerimientos de las vitaminas de las personas cuando se consume con otros alimentos, es buena fuente de ácido fólico y de tocoferol (Çiftçi y col 2010), además posee grandes cantidades de ácido pantoténico (B5) y piridoxina (B6), teniendo valores similares o mayores a otras leguminosas (Lebiedzińska y Szefer 2006), mientras que la concentración de niacina es menor comparado con otras leguminosas (Singh y Diwakar 1993).

El garbanzo también es rico en vitaminas liposolubles con propiedades antioxidantes. Abbo y col. señalan que el garbanzo contiene alta concentración de carotenoides, hasta 49 mg/100 g de  $\beta$ -caroteno, precursor de la vitamina A, además contiene carotenoides que no tienen actividad de vitamina A, tales como la luteína y la zeaxantina (Abbo y col., 2005). Por otra parte, el garbanzo contiene 13.7 mg/100 g de vitamina E (Jukanti y col., 2012).

Los minerales principales en el garbanzo son: calcio (40-267 mg/100 g), potasio (220-333 mg/100 g), fósforo (159-930 mg/100 g) y azufre (160-200 mg/100 g) (Wood y Grusak 2007). La variación de la cantidad de los minerales depende directamente de las condiciones del cultivo (Asif y col 2013).

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y otras leguminosas son alimentos básicos en muchos países y desempeñan un papel importante en la dieta de vegetarianos alrededor del mundo. Cuando se combinan con cereales, proporciona una composición de aminoácidos nutricionalmente equilibrada con una relación que acerca a la ideal para el ser humano (Wood y Grusak 2007). Las proteínas de garbanzo son deficientes principalmente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano pero poseen un alto nivel de lisina, la cual es relativamente deficiente en cereales. Los aminoácidos azufrados, son los primeros aminoácidos limitantes; siguiendo en

importancia treonina, valina y triptófano (Williams y Singh 1987; Singh y col 1991). Las leguminosas deben ser sujetas a cocción antes de ser utilizadas en la dieta humana. Esto mejora la calidad de la proteína por la destrucción térmica de factores antinutricionales termolábiles (Alajaji y El-Adawy 2006).

## **2 El garbanzo como alimento funcional (propiedades nutraceuticas)**

Se han identificado diversos compuestos en el garbanzo lo cual lo convierten en un alimento funcional. Diversos autores han reportado la obtención de fitoquímicos, como compuestos fenólicos, péptidos entre algunos otros, que poseen capacidades antioxidantes, antihipertensivas, antiinflamatorias, hipocolesterolemicas etc., por ello durante el siguiente bloque se abarcara la importancia del consumo de esta leguminosa.

### **a Fitoquímicos en garbanzo**

El garbanzo contiene diferentes componentes con actividad biológica, también llamados fitoquímicos. Entre dichos fitoquímicos se encuentran los polifenoles o fenólicos. Recientemente se ha identificado al garbanzo como una buena fuente de polifenoles y flavonoides (Segev y col 2010). Estos compuestos poseen características químicas que les permiten eliminar los radicales libres, atrapar metales, activar las enzimas, e inhibir oxidasas. Lo anterior se traduce en propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, y antimicrobianas que protegen a los tejidos del cuerpo contra los radicales libres.

#### **1) Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes actividades y estructura química, englobando más de 8.000 compuestos

distintos. Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Andary y Mondolot-Cosson 1997).

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Tsimidou 1998). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos.

La capacidad antioxidante descrita para distintos polifenoles se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados como son la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial (Hertog y col 1995; Wang y col 1996). El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también puede promover reacciones de oxidación *in vitro*. Los compuestos fenólicos actúan como pro-

oxidantes quelando metales, bien de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker 1997).

El garbanzo contiene isoflavonas como la biocanina en forma libre (biocanina A y B) y ligadas a otros compuestos (biocanina glucosidala); el contenido de isoflavonas en el garbanzo representa el mayor porcentaje de fenólicos identificados (Campos-Vega y col 2010; Aguilera y col 2011). Muchas actividades biológicas han sido asociadas con las isoflavonas, incluyendo la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, prevención de cáncer y para el tratamiento de síntomas de menopausia (Ricketts y col 2005; Messina y col 2006; Trock y col 2006). También se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante de estos compuestos en el garbanzo, tal es el caso de Guardado-Félix y col (2017) quienes identificaron y cuantificaron las principales isoflavonas de esta leguminosa después del proceso de germinación del grano con estrés inducido con selenito de sodio, reportando que los brotes de garbanzo enriquecidos con selenio presentaron mayor capacidad antioxidante que el tratamiento control, atribuyendo este efecto al incremento en la concentración de isoflavonas después del proceso (Guardado-Félix y col 2017).

### **b Péptidos bioactivos y potencial nutracéutico**

Los péptidos bioactivos se definen como regiones específicas de las proteínas con secuencias de aminoácidos que tienen actividad biológica, incluyendo antioxidante, antihipertensivo, antitrombótico, antiadipogénica, antimicrobiano, antiinflamatorio y efectos inmunomoduladores. Estos péptidos tienen 2-20 aminoácidos y masas moleculares de menos de 6.000 Da. Su bioactividad se

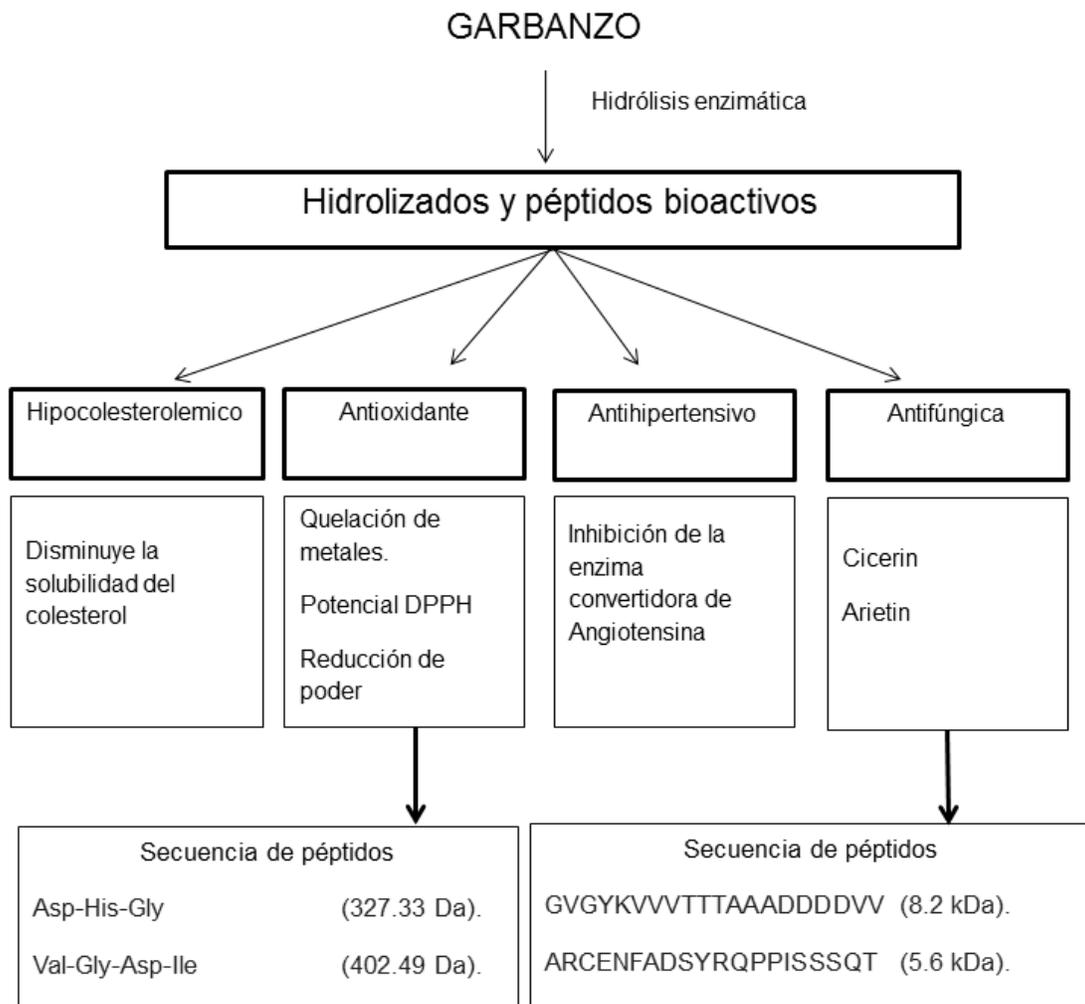
determina principalmente por su secuencia de aminoácido y su composición. Se han identificado por varios autores a los péptidos y proteínas como posibles sustitutos de los medicamentos (de Castro y Sato 2015). En el garbanzo se han encontrado péptidos con diferente actividad biológica (**Figura 1**) en las que cabe recalcar su actividad antioxidante y antihipertensiva (Pedroche y col 2002; Xue y col 2015).

### **1) Con actividad antioxidante**

Se han encontrado diversos péptidos con capacidad antioxidante, su actividad biológica ha sido estudiada desde el primer reporte obtenido acerca de ellos por Marcuse (Marcuse 1960). Los péptidos antioxidantes poseen de 5 a 16 residuos de aminoácidos y son considerados compuestos seguros y sanos con un bajo peso molecular, bajo costo, alta actividad y fácil absorción. El mecanismo exacto de la actividad antioxidante de estos péptidos no ha sido completamente entendida, sin embargo varios estudios muestran su actividad como inhibidores de la peroxidación lipídica, captadores de radicales libres, y quelantes de metales de transición (De Castro y Sato 2015).

Los péptidos con actividad quelante pueden prevenir la pro oxidación al acomplejar los iones metálicos, que catalizan muchas reacciones de oxidación. Además, el péptido quelante puede mejorar la biodisponibilidad de minerales como calcio, cobre, hierro y zinc cuando están en forma quelada (Megías y col 2008).

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están relacionadas a su composición, estructura e hidrofobicidad. Tyr, Trp, Met, Lys, Cys e His son ejemplos de aminoácidos que causan la actividad antioxidante. Aminoácidos con residuos



**Figura 1.** Hidrolizados y péptidos bioactivos derivados de proteínas de garbanzo. Bioactividades de péptidos reportados en diferentes estudios obtenidos a través de hidrólisis enzimáticas y secuencias de péptidos. Tomado de: (Ye y col 2002; Barbana y Boye 2010; Yust Mdel y col 2012; Xue y col 2015).

aromáticos pueden donar protones a los radicales lo que le brinda la propiedad de captadores de radicales (Sarmadi y Ismail 2010). La actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de garbanzo no pueden ser atribuidas a un solo mecanismo, por lo tanto se han hecho diferentes ensayos para estudiar las propiedades antioxidantes de estos péptidos.

La proteína hidrolizada de garbanzo presenta una alta actividad antioxidante comparada con las proteínas intactas. Los resultados obtenidos en diferentes estudios muestran el potencial del uso de hidrolizados de garbanzo en el desarrollo de alimentos funcionales para el tratamiento de patologías cardiovasculares y neurológicas. Además las proteínas hidrolizadas de garbanzo pueden servir como ingredientes para reducir la necesidad de agregar antioxidantes sintéticos a los alimentos y posteriormente evitar su rancidez (Yust Mdel y col 2012), así como también su uso sería conveniente en la industria farmacéutica.

## **2) Con actividad antihipertensiva**

Pedroche y col. en su estudio reportaron la actividad de los péptidos generados por la hidrólisis de proteínas con alcalasa y flavorizima encontrando la inhibición de la ECA al principio de la hidrólisis por la generación de los péptidos, esta inhibición fue incrementando conforme el grado de hidrólisis aumentaba (Pedroche y col 2002). También Medina-Godoy y col. realizaron un estudio similar con diferentes enzimas en la hidrólisis (alcalasa, papaína y pancreatina) encontrando el efecto antihipertensivo del hidrolizado de proteína de garbanzo incluso con valores mayores reportados por Pedroche y col. (2002) (Medina-Godoy y col 2012). El potencial del garbanzo hace que su grano sea considerado para obtener alimentos

funcionales con péptidos bioactivos con un posible rol para el tratamiento de la alta presión (Medina-Godoy y col 2012).

Esta leguminosa tiene un importante valor nutricional gracias a su composición química, por lo que cuenta con múltiples beneficios a la salud. Además se ha demostrado que al ser procesada puede mejorar esas propiedades, por lo tanto se deben buscar distintas tecnologías que tengan la capacidad de procesarla e incrementar su valor biológico.

#### **D. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO**

Se han empleado diversos procesos que son capaces de incrementar el valor biológico de las leguminosas como son la germinación, nixtamalización, extrusión y fermentación en estado sólido; La germinación es un tratamiento sencillo y económico, que da como resultado un producto natural, permite eliminar o inactivar ciertos factores antinutricionales y aumenta la digestibilidad de proteínas y almidones en leguminosas. De esta manera, la germinación de leguminosas puede mejorar sus propiedades de alimentos funcionales (Davila y col 2003). La extrusión es un proceso continuo de temperatura alta y tiempo corto que combina corte mecánico y calor para la gelatinización parcial del almidón y la desnaturalización parcial de proteínas obteniéndose un producto plastificado y reestructurado con nuevas formas y texturas (Asp y Björck 1989). La nixtamalización es un proceso muy antiguo desarrollado por las culturas Mesoamericanas y aún es utilizado para la producción de tortillas lo que a su vez produce cambios que mejoran la calidad nutricional del maíz (Paredes López y col 2009). Por otro lado la fermentación en estado sólido (FES) representa una alternativa tecnológica para procesar una gran variedad de

legumbres y cereales e incrementar su calidad nutricional y obtener productos comestibles con buenas características sensoriales (Reyes-Moreno y col 2004).

La FES o cultivo en estado sólido es definido como el cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida en la ausencia de agua libre (Lonsane y col 1985), es la técnica de conversión de sustratos complejos en compuestos simples. La FES ha sido ampliamente usada desde la antigüedad para la producción de alimentos fermentados como salsa de soya (Barrios-González 2012), el alimento que se genera a partir de este bioproceso es el tempe y es considerado un alimento funcional por las características nutricionales que le brinda el microorganismo al sustrato durante la fermentación.

## **1 Tempe**

El tempe (kedele tempe) es un alimento de soja fermentada tradicional de Indonesia. Se produce por diferentes estratos de *Rhizopus sp.*, (*R. oligosporus*, *R. arrhizus*, y *R. stolonifer*). Un tempe bien hecho es un pastel compacto blanco, completamente cubierto de hongos. El hongo crece derecho a través de los granos y forma una masa compacta (Hesseltine 1965). Prinsen Geerligts fue el primero en describir un método para la producción de tempe. En E.U.A. (Prinsen Geerligts 1895). Steinkraus y col. reportaron un estudio de la preparación y composición química del tempe haciendo un aislamiento e identificando los microorganismos involucrados en la fermentación (Steinkraus y col 1983).

### **a Características**

El tempe es una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Durante la fermentación de la soja algunas características como la composición de ácidos grasos y de vitaminas son mejoradas. Una de las más importantes características del

tempe es el alto contenido de proteínas el cual alcanza niveles mayores a los del producto sin fermentar. Murata y col (2017), reportaron que el contenido de proteína durante la fermentación fue constante, mientras que el contenido de aminoácidos libres aumento hasta un 85% comparado con soya sin fermentar. El tempe posee un amplio rango de propiedades benéficas como hipolipídicas, antimicrobianas, antiaterogénicas, entre otras (Karyadi y Lukito 2000).

## **2 Sustratos utilizados en elaboración de tempe**

El tempe es un alimento fermentado oriental producido por la FES de la soya, sin embargo, existen diversos sustratos que se pueden usar para preparar tempe como el maíz, garbanzo, soya, arroz, frijol entre otros (Paredes-Lopez y Harry 1989; Hachmeister y Fung 1993; Sharma y Khetarpaul 1997; Cuevas-Rodríguez y col 2004; Angulo-Bejarano y col 2008).

### **a Microorganismos utilizados en la producción de tempe**

Generalmente la FES se puede llevar acabo con hongos de la especie *Rhizopus*; una importante función del hongo durante la fermentación es la síntesis de enzimas las cuales hidrolizan algunos sustratos y contribuyen al desarrollo de la textura, sabor y aroma agradable del producto. La hidrólisis enzimática puede disminuir o eliminar factores antinutricionales ya que durante el proceso se liberan metabolitos secundarios que van desde antibióticos a péptidos, enzimas y factores de crecimiento por consiguiente, la calidad nutricional del alimento fermentado puede mejorarse (Hachmeister y Fung 1993).

#### **1) Hongos filamentosos**

Muchos grupos de microorganismos pueden crecer en sustratos sólidos, sin embargo, los hongos filamentosos tienen la mejor capacidad de crecer en ausencia

de agua libre. El cultivo de hongos filamentosos en sustratos sólidos ha sido ampliamente usado para diferentes propósitos por ejemplo para la fermentación. Los hongos comúnmente más usados son: a) *Phycomycetes* (*Mucor* y *Rhizopus*), y b) *Ascomycetes* (*Aspergillus* y *Penicillium*) (Pandey y col 2000). Sin embargo, con *Rhizopus oligosporus* se obtiene un producto con mejor calidad que aquellos que se hacen con otras especies, además las proteasas generadas por este hongo tienen la capacidad de romper más del 50% de las proteínas de la soya (Lim y col 1987).

## **2) *Rhizopus oligosporus***

Algunas características morfológicas, como largo del rhizoide y esporangiospora, diámetro del esporangio, forma de la columela, tamaño, forma y textura de la superficie de la esporangiospora, ayudan en la diferenciación entre dichas especies. Las hifas pueden ser o no septadas (6-15  $\mu\text{m}$  en diámetro), las esporangiosporas son de color café y no presentan ramificación, encontrándose solas o formando racimos. Los rhizoides se localizan en el punto de unión entre estolón y esporangiospora. El esporangio (40-350  $\mu\text{m}$  en diámetro) se localiza en la punta de la esporangiospora, su forma es redonda con bases aplanadas. Presentan esporangiospora unicelular, de forma redonda a ovalada, la textura es de suave a estriada (Larone 1993).

El crecimiento en hifas proporciona al hongo la capacidad de penetrar en la mayoría de los sustratos sólidos hasta 1 mm ó 25% del cotiledón, manteniéndolos unidos (Hutkins, 2008), secretando en la punta de la hifa las enzimas hidrolíticas que penetran directamente en el sustrato. Este proceso es muy eficiente a diferencia de la fermentación de cultivos sumergidos donde las enzimas hidrolíticas son diluidas en el medio y su acción se ve reducida considerablemente (Raimbault 1998). Estos

hongos tienen la capacidad de crecer muy rápido a temperaturas relativamente altas (37-45°C) y condiciones de humedad alta (60-80%). El hongo utiliza el oxígeno disponible y produce CO<sub>2</sub>, el cual inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente contaminantes. La combinación de un pH relativamente bajo, agua no libre y temperatura alta en la masa del sustrato permite a *Rhizopus oligosporus* desarrollarse rápidamente; éste penetra y une el sustrato dando forma de pastel, originando una cohesión de los granos enteros o fragmentados (Miszkievicz y col., 2003). *Rhizopus oligosporus* se considera un microorganismo seguro (“GRAS” *generally recognized as safe*) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por su siglas en inglés) de los Estados Unidos de América (FDA 2001).

Miszkievicz y col. estudiaron la biosíntesis de las enzimas que degradan polisacáridos, lípidos y proteínas de *R. oligosporus*, encontrando que en la primera fase de crecimiento el hongo sintetiza lipasas cuyo rendimiento alcanza su punto máximo a las 12 horas. La actividad máxima de la Alfa-amilasa se encontró después de 36 h y enzimas como xilanasas, endoglucanasa y beta-glucosidasa son sintetizadas después de 48 h, reportando que la máxima liberación de glucosa está correlacionada con la actividad de estas enzimas (excepto la xilanasas). En la última fase del proceso, ellos encontraron un incremento de dos proteasas ácidas (pH de 3.0 y 5.5), lo cual se correlacionó con el incremento de proteína soluble observada durante su investigación. Así como también concluyeron que la secreción de proteasas ácidas es crucial para la producción de un tempe con alta calidad (Miszkievicz y col 2003).

### **3 Proceso para la elaboración de tempe**

Para la elaboración del tempe son necesarios algunos tratamientos previos con la finalidad de que el proceso sea lo más puro posible, es decir que el microorganismo este en un ambiente deseable para su crecimiento óptimo. Este proceso consiste en 4 pasos: a) Limpieza, remojo y descascarillado, b) Cocción parcial, drenado y enfriado, c) Inoculación e d) Incubación. A continuación cada uno de estos pasos será descrito con detalle.

#### **a Limpieza / remojo / descascarillado**

La limpieza consiste en remover aquellas impurezas que presente el grano, así como también eliminar aquellos granos quebrados o dañados y eliminar materia ajena a los granos. Durante el remojo los granos se introducen en un exceso de agua por 12 o 15 h a temperatura ambiente para facilitar la penetración del micelio. Durante la fermentación ácida bacteriana, el pH de los granos disminuye en un rango de 5.3 a 4.5. Este no afecta el crecimiento de *Rhizopus*, pero previene el desarrollo de bacterias indeseables que puede deteriorar el tempe. Se ha documentado que el crecimiento del hongo se mantiene estable en un pH superior de 3.5 y un poco más lento cuando el sustrato es acidificado mayor a ese valor de pH (Babu y col 2009).

Debido a que el hongo no puede crecer en grano entero, el descascarillado es esencial en la producción de tempe. De esta manera el hongo es capaz de alcanzar los nutrimentos de los cotiledones. El descascarillado puede ser manual separando la testa de los cotiledones facilitado por la hidratación anterior o por abrasión mecánica.

## **b Cocción parcial / drenado / enfriado**

La cocción parcial es necesaria para destruir la contaminación de bacterias que puedan interferir con la fermentación, destruir factores antinutricionales y liberar algunos de los nutrientes requeridos para el crecimiento del hongo (Steinkraus y col., 1965). Durante el cocimiento las proteínas presentes experimentan un proceso de desnaturalización seguido por agregación. El calentamiento provoca el desdoblamiento de la estructura secundaria y al mismo tiempo fenómenos de disociación y agregación a nivel de la estructura cuaternaria de las proteínas (Avanza y Añón 2006). En general, la desnaturalización de proteínas va acompañada de un descenso de la solubilidad, debido a la exposición de los grupos hidrófobos hacia la fase acuosa y a la agregación de las moléculas proteicas desplegadas mediante interacciones hidrofóbicas (Cheftel y col 1993). Los tiempos de cocción tradicional varían de 10 min hasta 3 h a temperatura de ebullición (Steinkraus y col 1965).

Tradicionalmente, el agua de cocción es drenada y los cotiledones son extendidos en bandejas de bambú, mallas de alambre o cestos perforados. El exceso de agua favorece el crecimiento bacteriano y deterioro del tempe; así que, un inapropiado drenado de los granos disminuye la vida de anaquel del producto (Winarno 1986; Steinkraus 1995).

## **c Inoculación**

La fuente del inóculo puede ser obtenida a través de: (1) Lote previo de tempe (2) Cepas puras de *Rhizopus* liofilizadas o suspendidas en agua. Para una fermentación óptima, (Wang y col 1975) reportaron que  $1 \times 10^6$  esporas/100 g de sustrato cocido, produce resultados satisfactorios. La principal especie de hongo para elaborar tempe es *Rhizopus oligosporus* porque presenta una fuerte actividad

de proteasas y lipasas (Shurtleff y Aoyagi 2001). Sin embargo, otras especies, como *R. oryzae*, *R. chinensi* y *R. stolonifer* también han sido utilizadas en la producción de tempe a partir de diferentes sustratos (Steinkraus 1995).

### **c Contenedores de FES / Incubación**

Tradicionalmente, los granos son empacados en hojas marchitas de plátano perforadas que permitan un suministro limitado de aire a los granos. Un contenedor es apropiado mientras permita acceder suficiente oxígeno para el crecimiento del hongo, pero no demasiado que promueva la esporulación y obscurecimiento del micelio; la temperatura puede ser controlada, el sustrato retiene la humedad durante la fermentación, no existe agua libre en contacto con el grano y la fermentación del tempe ocurre en condiciones higiénicas (Steinkraus 1995). Hoy en día, las bolsas de plástico, tubos flexibles (tripas) o cajas de plástico duro con orificios de perforación adecuado se encuentran en uso para permitir el crecimiento aeróbico del hongo (Roubos-van den Hil y col 2010).

Temperatura, tiempo de fermentación y humedad relativa son tres factores esenciales que inciden en el resultado de la fermentación para la obtención del tempe. La fermentación del tempe puede ser llevada a cabo a temperaturas en un rango de 25-37°C; sin embargo, el tiempo requerido para llevar a cabo la fermentación disminuye cuando la temperatura se incrementa (Steinkraus 1995). Usmani y Noorani (1986) reportaron una humedad relativa óptima de 60-65%. Se ha observado que a una humedad relativa >75% se da una esporulación indeseable del hongo.

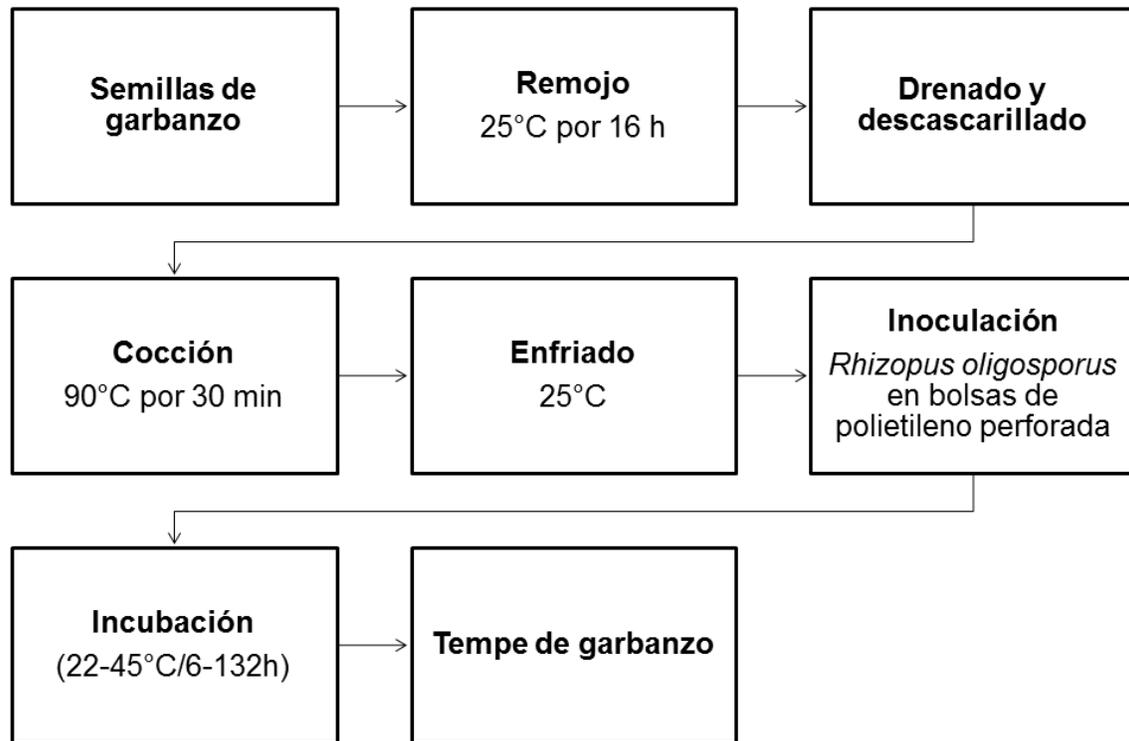
En conclusión, las condiciones para la producción de tempe de alta calidad son variables. La temperatura, humedad relativa, extensión de la fermentación,

disponibilidad de oxígeno y otras condiciones controladas apropiadamente, pueden garantizar que los requerimientos de crecimiento del hongo sean satisfactorios (**Figura 2**).

#### **4 Efecto de la FES sobre la composición química de leguminosas**

Estudios reportados por (Baumann y Bisping 1995) utilizando *R. oligosporus*, *R. oryzae* y *R. stolonifer* durante la fermentación de granos de soya observaron que la concentración de aminoácidos incremento después de 30 h con *R. oligosporus*, en cambio la cepa de *R. stolonifer* demostró baja actividad después de 30 h de fermentación. La capacidad proteolítica de *R. oryzae* y *R. oligosporus* depende de la cepa y no de la especie usada. Estos hongos tienen una alta capacidad proteolítica es por eso su importancia para la fermentación del tempe. En el **Cuadro 4** se muestra la comparación de aminoácidos presentes en la soya y en el tempe de soya (Gibbs y col 2004).

En cuanto a los lípidos, un estudio realizado por (De Reu y col 1994) de fermentación de soya con *R. oligosporus* encontraron que hubo una reducción del 39% después de 69 h de fermentación a 37°C, la temperatura optima de crecimiento de *R. oligosporus* es de 35-37°C y la de *R. oryzae* es aproximadamente a 30°C. En el experimento hecho con *R. oryzae* a 25 y 37 °C obtuvieron un decremento menos pronunciado que a 30°C, esto quiere decir que el decremento de lípidos presentes está relacionado con la fase de crecimiento del hongo (**Cuadro 5**). Los carbohidratos que contienen la mayoría de las leguminosas son polisacáridos de la pared celular, pequeños azúcares como fructosa, rafinosa y estaquiosa. Estos azúcares pequeños se eliminan durante el remojo, cocción y fermentación (Mulyowidarso y Buckle 1991; Egounlety y Aworh 2003).



**Figura 2.** Proceso para la elaboración de tempe de garbanzo. Como primer paso se lleva a cabo una limpieza del grano, posteriormente se deja en remojo con ácido acético por 16 h para luego ser descascarillados. Después se lleva a cabo la cocción con ácido acético por 30 min, se enfría y se inocula con el hongo, por último se lleva a cabo la incubación a diferentes temperaturas y tiempos para obtener el tempe de garbanzo. (Reyes-Moreno y col 2004).

**Cuadro 4.** Contenido de aminoácidos esenciales en la harina de soya y en el tempe.

Aminoácidos esenciales	Harina de soya		Aminoácidos esenciales	Harina de soya	
	<i>Sin fermentar</i>	<i>Tempe</i>		<i>Sin fermentar</i>	<i>Tempe</i>
Gly	3.3	4.1	His	3.1	1.6
Ala	4.4	3.2	Phe	5.1	4.3
Val	3.0	3.0	Tyr	5.4	4.2
Ile	5.2	5.6	Pro	8.0	8.8
Leu	8.6	7.9	Try	1.0	1.0
Asx	11.0	10.1	Met	1.4	1.4
Glx	18.0	16.3	Cys	0.9	1.1
Lys	6.8	7.6	Ser	5.0	10.1
Arg	5.6	5.8	Thr	4.5	7.2

Composición de aminoácidos (mol%) en el tempe de soya tras 12 h de proceso (Gibbs y col., 2004)

**Cuadro 5.** Efecto de FES de granos de soya sobre la composición de lípidos y ácidos grasos utilizando *R. oligosporus* y *R. oryzae*.

<i>R. oligosporus</i>			<i>R. oryzae</i>		
Tiempo de incubación (h)	G	AGL	Tiempo de incubación (h)	G	AGL
0	22.2	0.3	0	24.4	0.3
16	19.8	0.8	18	24.4	0.4
19	17.2	1.0	21	19.6	4.0
22	19.7	1.5	24	18.8	5.1
28	21.3	3.8	28	20.3	4.4
40	15.5	4.8	40	18.2	4.4
46	16.9	4.0	46	11.0	5.3
69	14.7	5.9	64	10.7	5.2
			70	15.8	4.0

Estudio sobre el cambio en la composición de los lípidos y ácidos grasos durante la fermentación en granos de soya. Expresado como % de masa seca.  
G: glicéridos, AGL: ácidos grasos libres. (De Reu y col., 1994)

Los polisacáridos insolubles de la pared celular, tales como pectina, celulosa y hemicelulosa son parcialmente degradados por las enzimas del hongo; esto conduce a su mayor solubilidad en agua durante la fermentación (Kiers y col 2007). Las carbohidrasas principales de *R. oligosporus* en tempe se incluyen poligalacturonasas, celulasas, xilanasas y arabinanasas (Sarrette y col 1992).

Egounlety y Aworh (2003) evaluaron el efecto de los pretratamientos (remojo, descascarillado, cocción y fermentación con *Rhizopus oligosporus*) sobre la concentración de oligosacáridos en la elaboración de tempes de soya. Ellos reportaron pérdidas considerables de sucrosa, rafinosa, y estaquiosa durante estos pretratamientos. Sin embargo, los contenidos de galactosa, glucosa, fructosa y maltosa incrementaron durante las primeras horas de fermentación (30 y 36 h); concluyendo que dichos pretratamientos son eficientes para reducir compuestos indeseables causantes de flatulencia (oligosacáridos de la familia de la rafinosa). Reyes-Moreno y col (2004) reportaron que durante la fermentación en estado sólido el contenido de carbohidratos se reduce como consecuencia de la eliminación de la testa y de la lixiviación durante las etapas de remojo y cocción. Guzmán-Uriarte y col. analizaron la composición química de frijol común bioprocesado por FES, reportando un incremento en fibra soluble, insoluble y fibra total, 4.74% a 13.32%, de 11.30% a 22.51% y de 28.92% a 39.17%, respectivamente (Guzmán-Uriarte y col 2013). La presencia de fibra dietaria brinda importantes efectos a la salud debido a que han sido considerados ingredientes funcionales por reducir el riesgo de cáncer de colon.

Los cambios observados en la fibra pueden ser debidos a la lixiviación de algunos compuestos durante las etapas previas de la fermentación (cocción), además el crecimiento del hongo el cual consumirá como fuente principal ácidos

grasos y posteriormente carbohidratos y grasas como fuentes de energías desarrollando micelios ricos en fibra.

Sánchez-Magaña y col. analizaron el efecto de la FES en frijol sobre contenido de almidón resistente, reportaron un incremento de almidón resistente después de la fermentación (Sánchez-Magana y col 2014). De igual forma, Angulo-Bejarano y col. evaluaron el efecto de la FES en garbanzo encontrando un comportamiento similar ya que incremento el contenido de almidón resistente de 19 a 76 g/kg en garbanzo crudo y fermentado respectivamente (Angulo-Bejarano y col 2008). El efecto de las etapas previas al proceso como remojo, cocción y el efecto de la temperatura permiten la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas moleculares dentro del granulo de almidón.

Bisping y col. estudiaron el efecto de diferentes microorganismos (*R. oligosporus*, *R. arrhizus* y *R. stolonifer*) sobre la fermentación en estado sólido para la formación de vitaminas como la rivo flavina, vitamina B<sub>6</sub>, ácido nicotínico, encontrando que la mejor cepa para la formación de vitaminas fue *R. oligosporus* (Bisping y col 1993).

Denter y col. realizaron un estudio sobre la soya sometida a fermentación utilizando diferentes microorganismos, encontrando que la actividad metabólica de *Rhizopus spp.* durante la fermentación del tempe, cambia considerablemente el contenido de vitaminas liposolubles (Denter y col 1998). El hervido y descascarado de los granos de soya, resulta en una pérdida pequeña de vitaminas liposolubles de alrededor de 15%. En contraste más del 50% de vitaminas hidrosolubles fueron destruidas o diluidas durante el proceso de preparación de la fermentación del tempe (Keuth y Bisping 1993; Denter y Bisping 1994).

## **5 Efecto de la FES sobre el contenido de fitoquímicos y propiedades nutraceuticas en leguminosas**

Durante la FES, los compuestos orgánicos presentes en los granos son convertidos en pequeñas moléculas por acción del microorganismo, las cuales, exhiben funciones fisiológicas. La FES de la soya con diferentes microorganismos mejora las propiedades funcionales al incrementar el contenido de compuesto fitoquímicos y de péptidos (Cho y col 2003; Zhang y col 2006; Sanjukta y col 2015).

### **a Compuestos fenólicos totales**

En los últimos años, la FES se ha empleado para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en algunos productos alimenticios, mejorando así su actividad antioxidante. En un estudio reciente en el procesamiento biológico de estos granos para preparar koji utilizando FES con diferentes hongos filamentosos de calidad alimentaria (en particular *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*), una mejora de las propiedades antioxidantes de la habas se observó, que podrían estar relacionados con el aumento de fenólicos y el contenido de antocianina (Lee y col 2008). Sin embargo, el aumento de la actividad antioxidante del frijol negro Koji vario para cada microorganismo utilizado. La fermentación mejora la actividad antioxidante mediante el aumento de la liberación de flavonoides de alimentos de origen vegetal, por lo tanto, este proceso es un método útil para aumentar el suministro de antioxidantes naturales. (Hubert y col 2008) reportaron los efectos que tiene la fermentación sobre la soya reportando los beneficios de esta, siendo atribuidos a la actividad antioxidante de compuestos que son modificados estructuralmente o liberados después de la hidrólisis bacteriana.

Dey y col. (2014) en su estudio sobre la extracción de compuestos fenólicos de trigo por FES con *R. oryzae* concluyeron que la FES es un proceso biológico complejo donde varias enzimas son producidas por el hongo, tales como,  $\alpha$ -amilasa, xilanasa,  $\beta$ -glucosidasa, esterasas entre otras, las cuales están asociadas en la liberación de compuestos fenólicos (Dey y Kuhad 2014). Se han identificado diversos mecanismos por los cuales se genera un incremento de compuestos fenólicos durante la FES, uno de ellos es el que reportan Cheng y col. (2013) en donde la enzima  $\beta$ -glucosidasa del hongo cataliza la liberación de agliconas del frijol y consecuentemente hay un incremento de compuestos fenólicos e isoflavonas (Cheng y col 2013). Por su parte Huynh y col. (2014) reportan diferentes investigaciones en donde la concentración de ácidos fenólicos y agliconas flavonoides incrementan por el proceso de fermentación por efecto del hongo, así como también fue reportado que las esterasas producidas por el hongo a través de FES en granos causa un incremento en el contenido de ácidos fenólicos como ferulico, cafeico y p-cumarico (Huynh y col 2014).

#### **b      Potencial nutracéutico de péptidos bioactivos después del proceso de fermentación en estado sólido**

Los péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína, sin embargo, estos pueden ser liberados por hidrólisis enzimática durante la fermentación o la digestión gastrointestinal. En los productos fermentados los péptidos generados van a depender del microorganismo involucrado y del sustrato presente en la fermentación. Los péptidos bioactivos obtenidos por FES que se han reportado son los antioxidantes, antihipertensivos, hipocolesterolemico, entre otros.

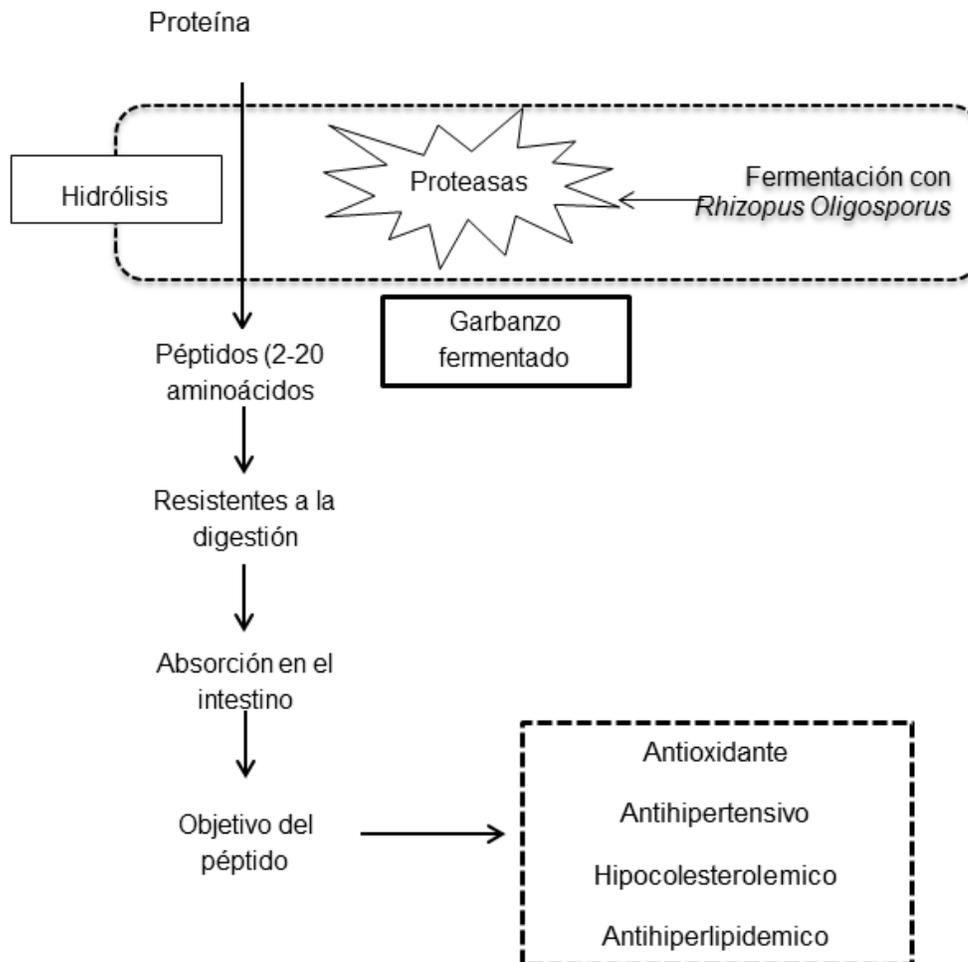
## 1) Con actividad antioxidante

Recientes estudios han demostrado que los aminoácidos libres y los péptidos presentes en la soya fermentada son responsables de la actividad antioxidante (Watanabe y col 2007; Sanjukta y col 2015). Aminoácidos como triptofano, histidina, fenilalanina, alanina, tirosina, metionina, glicina, leucina y valina han sido reportados de ser componentes de los péptidos antioxidantes (Guo y col 2009; Ajibola y col 2011; Sanjukta y col 2015). La captación de radicales de los péptidos es contribuida a los residuos de aminoácidos presentes en la cadena (Nam y col 2008; Guo y col 2009).

Watanabe y col. sugirieron que la actividad antioxidante en la fracción soluble en agua del tempe fermentado con *Rhizopus* podría deberse a los aminoácidos y péptidos formados durante la fermentación. Durante la fermentación aeróbica con *Rhizopus*, los aminoácidos libres y el contenido de péptidos fue incrementando, el cual resulta en una alta actividad antioxidante en dicha fracción. Fue sugerido que los residuos de aminoácidos aromáticos y de His contribuyen a la actividad captadora de radicales por su capacidad de donar protones fácilmente a los radicales deficientes de electrones y poder mantener su estabilidad (Watanabe y col 2007).

Gibbs y col. (2004) obtuvieron péptidos antioxidantes durante la fermentación de soya utilizando como inóculo *Rhizopus oligosporus* (**Figura 3**). El organismo usado durante la fermentación tendrá gran influencia sobre las propiedades antioxidantes que se obtengan del sustrato, también se ha demostrado que la mezcla de microorganismos proteolíticos (*Bacillus* y *fungus*) durante la fermentación de la soya incrementa la actividad antioxidante (Wongputtisin y col 2007).

## Garbanzo



**Figura 3.** Efecto de la FES con *R. oligosporus* sobre la proteína de garbanzo.

Péptidos reportados que se han generado por FES que tienen la habilidad de llegar a la circulación sanguínea y ejercer su efecto dentro del organismo. Adaptado de: (Ye y col 2002; Barbana y Boye 2010; Yust Mdel y col 2012; Sanjukta y col 2015; Xue y col 2015).

## 2) Con actividad antihipertensiva

Los alimentos ricos en proteínas fermentados son fuentes naturales de péptidos inhibidores de la ECA ya que durante la fermentación son liberados estos péptidos por acción del microorganismo (Müntz y col 2001). La presencia de aminoácidos hidrofóbicos (Try, Phe, Trp, Ala, Ile, Val y Met) o con carga positiva (Arg y Lys), como también la Pro en la posición C- terminal de los péptidos inhibidores de la ECA, demuestran mayor afinidad a la ECA (Haque y Chand 2008; He y col 2011; Rai y col 2015).

Torino y col. la actividad inhibitoria *in vitro* de la ECA de lentejas fermentadas con *B. subtilis* mostrando que esta actividad fue en incremento de un 67.5% a un 90% de inhibición después de 48 y 96 h respectivamente. La menor actividad de inhibición observada se le puede atribuir a los tipos de péptidos liberados los cuales a su vez dependerán de la especificidad de la enzima así como también las condiciones del proceso tendrán gran influencia sobre la liberación de péptidos inhibidores de la ECA (Torino y col 2013). En conclusión la fermentación en estado sólido es una alternativa tecnológica segura para mejorar la calidad nutricional de las leguminosas, esto gracias al efecto que produce el hongo dentro del sustrato ya que tiene la capacidad de incrementar el potencial nutracéutico del grano. Es por ello que la FES representa una buena opción para generar un alimento funcional con gran capacidad de preservar la salud.

En los últimos años, estudios epidemiológicos han demostrado que las personas que tienen una dieta rica en frutas y hortalizas tienen menor riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Las plantas son una

de las principales fuentes naturales de antioxidantes, ya que poseen diferentes compuestos como flavonoides, tocoferol, carotenoides, entre otros. Además de estos componentes, las plantas son ricas en proteínas que pueden ejercer actividad antioxidante a través de la capacidad de ciertos aminoácidos para actuar como agentes quelantes de metales y donantes de hidrogeno. De este modo muchas proteínas y péptidos de diferentes fuentes, como soya, frijol, garbanzo han demostrado tener propiedades antioxidantes.

Cabe mencionar que es necesario aplicar procesos tecnológicos para hacer biodisponibles los compuestos causantes de las actividades biológicas (antioxidante, antihipertensivo), entre los que se encuentra la fermentación en estado sólido. Ha sido reportado que la FES es un proceso eficiente para la producción de péptidos bioactivos, sin embargo se deben de buscar sustratos adecuados para obtener mejores resultados, es decir, sustratos ricos en proteínas. El garbanzo por ser una leguminosa rica en proteínas se considera una buena opción para ser procesado mediante FES.

Dentro del siguiente trabajo existen algunas lagunas en cuanto si el proceso es el adecuado, si el hongo es el mejor para la generación de péptidos bioactivos, aunque hay reportes sobre la obtención de péptidos por FES, no hay estudios que demuestren el efecto que tiene la fermentación sobre las proteínas del garbanzo para generar péptidos. Para llevar a cabo este proceso y obtener la mayor producción de péptidos bioactivos es necesario implementar un proceso de optimización. En este proceso se buscan diversos valores de factores que pueden afectar nuestro objetivo, en este caso se busca obtener el mayor grado de hidrólisis para asegurar que las

proteínas presentes se conviertan en pequeñas cadenas que nos pueden generar la actividad. Por otro lado, existen diferentes tipos de proteínas que se pueden clasificar por su solubilidad, en este proyecto se estudia la proteína soluble en agua (albuminas), lo cual puede generar duda porque solo se evalúan esas y no las demás, o porque no, hacer una extracción de toda la proteína presente. Sin embargo se decidió estudiar estas porque juegan un papel esencial en las semillas ya que incluyen a las proteínas enzimáticas y metabólicas, además poseen un alto valor nutricional por su alto contenido en lisina y aminoácidos azufrados.

Se espera encontrar péptidos con capacidad antioxidante y antihipertensiva los cuales se ha reportado que tienen masas moleculares muy pequeñas, es por ello que se utilizan dos procesos de hidrólisis, para asegurar obtener péptidos pequeños que nos puedan conferir estas actividades. Además, no solamente se espera encontrar péptidos con estas actividades, si no también, se pueden identificar otros compuestos con diferentes actividades y esto se podría analizar a través de la caracterización de nuestra proteína por sus pesos moleculares.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidativo es un factor de riesgo para la aparición enfermedades crónico-degenerativas como la HTA. Por ello, es importante el estudio de compuestos que ayuden a regular la presión arterial, o bien, evitar una producción excesiva de ERO. Para esto se puede implementar el consumo de péptidos con actividad antioxidante obtenidos de fuentes naturales como las leguminosas. El garbanzo es una buena fuente de proteínas y se ha reportado la obtención de péptidos bioactivos a través de hidrólisis enzimática. Sin embargo, existen otros procesos que se pueden emplear para la liberación de péptidos y a la vez obtener un alimento funcional, un ejemplo de ellos es la FES. Se ha reportado que durante la FES de leguminosas se generan una diversidad de compuestos fenólicos con AAox, pero no existen reportes sobre la obtención de péptidos con AAox del garbanzo. Por ello existe la necesidad de estudiar el efecto de la FES sobre la producción de péptidos bioactivos en garbanzo. Además, hasta el momento no existe un proceso estandarizado para la FES en garbanzo, por lo que, es necesaria la optimización de dicho proceso con la finalidad de encontrar las mejores condiciones que permitan la máxima producción de estos péptidos.

## V. HIPÓTESIS

Un proceso optimizado de fermentación en estado sólido incrementa el potencial antioxidante de la fracción proteica soluble del garbanzo (*Cicer arietinum* L).

## VI. OBJETIVOS

### A OBJETIVO GENERAL

Obtener péptidos con propiedades antioxidantes y antihipertensivas mediante un proceso optimizado de fermentación en estado sólido y evaluar el efecto de la simulación gástrica.

### B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el proceso de fermentación en estado sólido (FES) de garbanzo para encontrar la mejor combinación de temperatura y tiempo de fermentación con valores altos de grado de hidrólisis, proteína soluble y actividad antioxidante.
2. Obtener una harina de garbanzo con las mejores condiciones del proceso de FES y validar el proceso de optimización.
3. Obtener la fracción soluble (FS) proteínica de la harina de garbanzo fermentada optimizada (HGFO).
4. Evaluar el efecto de la simulación gástrica *in vitro* de la FS de la HGFO sobre su capacidad antioxidante y antihipertensivo.
5. Caracterizar los péptidos de garbanzo generados mediante FES / simulación gástrica, por cromatografía en gel y espectrometría de masas.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### 1 Obtención de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB) utilizando como inóculo *Rhizopus oligosporus*

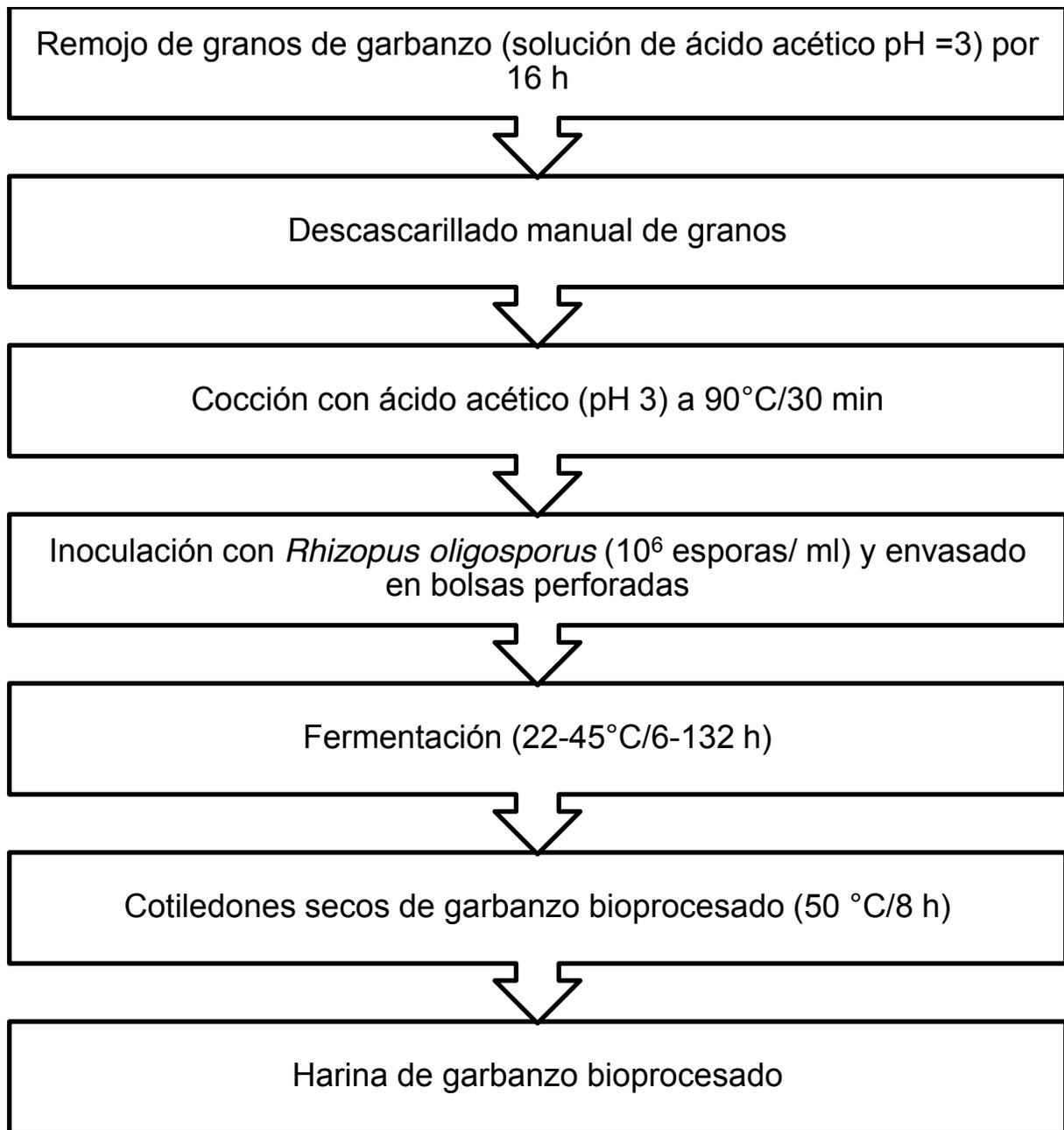
Los métodos utilizados para la obtención de HGB fueron los reportados por Sánchez-Magaña y col. (2014) con algunas modificaciones (**Figura 4**).

#### a Pretratamiento de los sustratos

Se utilizaron varios lotes de 200 g de garbanzo. Los granos se remojaron en disolución acuosa de ácido acético glacial (pH = 3.0) en una relación 1:3 (p/v) durante 16 h. Después del remojo la testa de garbanzo se eliminó manualmente, los cotiledones de garbanzo se cocieron en la disolución acuosa de ácido acético a 90 °C por 30 min. Los sustratos se drenaron y se enfriaron a temperatura ambiente.

#### b Inóculo

Como inóculo se utilizó el microorganismo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 (American Type Culture Collection, Manassas, USA). La cepa se propagó en tubos de ensayo los cuales contenían agar papa dextrosa, a 35 °C durante 2-3 días hasta que se obtuvo la adecuada esporulación. Los cultivos que se produjeron se guardaron en refrigeración a 4 °C y se sembraron cada mes para su conservación. Para la obtención de la concentración de esporas requeridas (1 X 10<sup>6</sup> esporas/mL) se utilizó el método nefelométrico de McFarland (Leptospira Laboratory 1997) el cual se basa en la preparación de una suspensión para posteriormente medir la



**Figura 4.** Procedimiento para la obtención de harinas de garbanzo bioprocesado por FES. (Sánchez-Magana y col 2014)

absorbancia y determinar el número de células o esporas que se encuentran suspendidas por mililitro de suspensión, de ése modo se obtiene la solución de esporas (Paredes-Lopez y col 1989).

### **c Fermentación en Estado Sólido**

Para llevar a cabo la fermentación, se adicionaron 3 mL de suspensión de esporas por cada 100 g de sustrato, se mezcló con una espátula de acero inoxidable para lograr una distribución homogénea. Se hicieron lotes pequeños de 200 g de la mezcla sustrato-inóculo y se colocaron en bolsas de polietileno de 15 X 25 cm con pequeñas perforaciones realizadas con una aguja de coser (4 cm de distancia). Los lotes se colocaron en una incubadora (Riossa, mod EC-33, México) para llevar a cabo la fermentación.

### **d Obtención de harinas**

Una vez que se llevó a cabo el proceso de fermentación, las muestras se secaron en estufa (50 °C/12 h), enfriaron (25 °C) y molturaron (Molino Tecator, mod 1083, Suecia) hasta obtener harinas que atravesaran malla 80 (0.180 mm). Se almacenaron (4 °C) en recipientes con cierre hermético hasta su utilización.

## **2 Obtención del extracto acuoso proteico de la harina de garbanzo bioprocesado**

Para fines del trabajo se utilizó la proteína soluble en agua para llevar a cabo los análisis de proteína soluble y la actividad antioxidante. Para esto se realizaron

desgrasados de las harinas y estas fueron lavadas con etanol y acetona para retirar los compuestos que pudieran intervenir con los resultados de los análisis.

#### **a Desgrasado de harinas de garbanzo bioprocesado**

Para llevar a cabo el proceso se utilizaron 5 g de HGB empleando hexano como solvente en una relación 1:3 (p/v), se agitaron por 10 min y fueron centrifugados a 3000 rpm/10 min, se retiró el sobrenadante, el proceso se repitió 3 veces para asegurar la eliminación de ácidos grasos, la harina se dejó evaporando hasta sequedad.

#### **b Lavados de harinas de garbanzo bioprocesado**

Se utilizó la metodología descrita por (Girón-Calle y col 2004), la harina desgrasada fue lavada con etanol una primera vez y dos veces con acetona. Los lavados consistieron en la resuspensión con el solvente al 5 % y fueron centrifugados a 500 g /10 min para recuperar el material insoluble, posteriormente la harina se dejó evaporando hasta lograr sequedad.

#### **c Obtención del extracto acuoso proteico**

Para la obtención de un extracto acuoso concentrado en proteínas se utilizó la metodología descrita por (Sanjukta y col 2015), en donde a la harina previamente lavada se le agregó agua destilada en una relación 1:10, se agitó por 4 horas, posteriormente fue centrifugada a 8000 g /20 min, se recuperó el sobrenadante y fue almacenado a - 20 °C para su posterior análisis.

### **3 Evaluación del grado de hidrólisis (GH), proteína soluble (PS) y actividad antioxidante (AAox) del extracto acuoso proteínico (EAP).**

#### **a Grado de hidrólisis**

Se determinó el grado de hidrólisis midiendo el contenido total de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10 % con referencia al contenido total de nitrógeno. Se tomó una alícuota de 10 mL conteniendo 1% p/v de cada hidrolizado, se mezcló con 10 mL de TCA al 20% y después se centrifugo a 10000 rpm durante 20 min. Se determinó el N soluble en el sobrenadante y el N total por el método de Kjeldahl (Hoyle y col 1994). El grado de hidrólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ GH} = \text{N soluble en TCA} / \text{N total} * 100$$

#### **b Evaluación de la proteína soluble del EAP**

Se utilizó el kit DC *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteína, la reacción es similar al ensayo de Lowry. Se utilizó como estándar albumina de suero bovino. Los resultados se expresaron como mg/mL.

#### **c Evaluación de la actividad antioxidante del EAP**

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres de los extractos acuosos proteicos mediante el método de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], el cual es un potente radical libre. El ensayo se realizó según la metodología reportada por (Re y col 1999) con algunas modificaciones.

Este método se basa en la generación de un cromóforo del radical ABTS\* (color verde) y la capacidad del antioxidante para decolorar este radical. Se preparó una solución de ABTS mezclado con persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) a una concentración de 2.45 mM en etanol, la solución resultante se almacenó en oscuridad por 16 h para permitir el desarrollo del radical. Posteriormente se diluyó la solución en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.700 nm. Se tomaron 20  $\mu$ l de cada una de las muestras, y se mezclaron con 1980  $\mu$ l de la solución de ABTS\*, se homogenizaron suavemente y se leyó su absorbancia después de 5 min a 735 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La capacidad antioxidante de los extractos se expresó en mmol Equiv Trolox/ g de proteína.

#### **4 Optimización del proceso de FES para obtener valores de grado de hidrólisis, proteína soluble y actividad antioxidante altos en harinas de garbanzo**

##### **a Diseño experimental**

Para determinar las condiciones óptimas para la producción de harina de tempe de garbanzo a través del proceso de FES, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) y un diseño central compuesto rotatable (DCCR). Datos de la literatura y ensayos preliminares se tomaron en cuenta para seleccionar el número y los niveles de variación de las variables de proceso en el diseño experimental, se utilizaron temperaturas de 22-45°C y tiempos de 6 a 132 h (Reyes-Moreno y col 2004; Guzmán-Uriarte y col 2013; Sánchez-Magana y col 2014; Rochín-Medina y col 2015). Se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR), con dos factores [temperatura de fermentación (TF, 22 – 45°C), tiempo de

fermentación (tF, 6 – 132 h)] y cinco niveles de variación. Los experimentos individuales fueron llevados a cabo en orden aleatorio. Se asumió un modelo de regresión cuadrático para predecir las variables de respuesta (Y). Se desarrollaron modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta.

$$Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii}X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=1+1}^2 \beta_{kij}X_iX_j + \varepsilon$$

Donde  $\hat{Y}_i$  es el valor predicho de la variable de respuesta considerada (GH, PS y AAox), X1 y X2 son los valores de TF y tF, respectivamente,  $\beta_{k0}$  es el valor del intercepto,  $\beta_{ki}$  es un coeficiente lineal,  $\beta_{kij}$  es un coeficiente de interacción y  $\beta_{kii}$  es un coeficiente cuadrático. Aplicando un análisis de regresión, los términos no significativos ( $p > 0.1$ ) fueron eliminados del polinomio de segundo orden y un nuevo polinomio fue recalculado, obteniendo un modelo de predicción para cada variable de respuesta (GH, PS, AAox). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando *Design Expert Software*(Version7.0.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

## **b Optimización del proceso de fermentación en estado solido**

Se aplicó el método convencional grafico como técnica de optimización, para obtener los valores máximos de grado de hidrolisis, proteína soluble y actividad antioxidante, fueron utilizados los modelos de predicción para representar gráficamente dichas respuestas. Las gráficas de contorno de las variables de proceso fueron usadas para la aplicación de la metodología de superposición de superficies, para obtener una gráfica de contorno; para la observación y selección de la mejor combinación (región óptima) de las variables de proceso Temperatura de fermentación (TF) y tiempo de fermentación (tF). Se utilizó el software *Design Expert*.

## **5 Simulación gástrica del extracto acuoso proteínico**

Se realizó una simulación gástrica de los extractos acuosos proteínicos (EAP) de la HGB optimizada, con la finalidad de conocer la supervivencia de los péptidos tras la hidrólisis enzimática de las enzimas gastrointestinales (pepsina y pancreatina) siguiendo la metodología de (You y col 2010) con algunas modificaciones. Se tomaron 20 mL del EAP, se ajustó el pH a 2.0 con 1 M HCL. Posteriormente se agregó pepsina (4% del porcentaje de proteína en la muestra) a 37°C en agitación durante 90 min, al transcurrir este tiempo se ajustó el pH a 7.5 usando 1 M NaOH, se agregó pancreatina (4% de la proteína de la muestra), y se mantuvo en agitación durante 4 horas a 37°C. La actividad enzimática fue detenida suspendiendo la muestra en agua a 100°C por 15 min. La muestra hidrolizada fue centrifugada a 10000 g por 20 min (Thermo Scientific, E.U.A.). El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

## **6 Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteínicos**

La actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de garbanzo bioprocesado se evaluó según lo descrito en el apartado VII.3.c.

## **7 Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de los hidrolizados proteínicos**

La actividad inhibitoria de la ECA se determinó por medio del ACE KitWST kit assay (Shimamura y col 2007). El cual consistió en: añadir 20µL de la muestra en una microplaca y 20 µL de blanco 1 y blanco 2, posteriormente se añadirá 20 µL de tampón de sustrato a cada pocillo, 20 µL de agua desionizada al blanco 2, añadir 20 µL de la solución de la enzima a cada pocillo que contenga muestra y al blanco 1(utilizar pipeta multicanal de preferencia), se incubará 1 hora a 37°C , añadir 200 µL del indicador a cada pocillo, incubar a temperatura ambiente durante 10 min, leer la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. La actividad inhibitoria de la ECA se calculara mediante la siguiente ecuación:

La actividad inhibidora de la ECA (tasa de inhibición%) = [(A Blanco 1 - Una muestra) / (A Blanco 1 - 2 en blanco)] X 100

## **8 Electroforesis (SDS-PAGE)**

Los péptidos obtenidos tras la hidrólisis del extracto acuoso proteínico fueron caracterizados por electroforesis Tricina SDS-PAGE utilizando la metodología descrita por (Haider y col 2012). Se utilizaron geles Mini-Protean Tris-Tricine Precast Gels (Bio-Rad, Hércules CA, USA) con un rango de 10-20%. Se inyectaron 60 µL de

proteína soluble en cada pozo, tomando una concentración 1:1 con el buffer de muestra Tricine SDS (Novex, Invitrogen, USA). Para el buffer de corrida se utilizaron los siguientes reactivos: 25 mM Tris (3.03 g), 25 mM tricina (4.5 g), 0.05% (w/v) SDS (0.5 g) en un litro de agua desionizada. Se utilizó un estándar de bajo peso molecular (Spectra multicolor low range protein ladder, Thermo Scientific, USA) con un rango de 2 kDa a 40 kDa. La corrida se desarrolló durante 120 min con un voltaje constante de 110 V. Posteriormente los geles se retiraron y se les agregó Simple Blue SafeStain (azul de Coomassie) toda la noche para colorear las bandas y poder tomar una mejor imagen. Después del reposo toda la noche, se lavaron 3 veces con agua cada 5 minutos y se tomó la fotografía utilizando el programa Gel Logic Carestream 4000 Pro (Eastman Kodak Co., New Haven, CT).

## **9 Fraccionamiento por cromatógrafo Flash**

Para la separación de los compuestos del EAP, los extractos se sometieron a cromatografía flash en columna C18, empleando como fase A agua destilada, 5% metanol, 0.2% ácido fórmico y como fase B metanol con incrementos de polaridad. Las fracciones recolectadas por el cromatógrafo flash que mostraron diferente espectro fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC). Los péptidos fueron eluidos con la fase A (acetonitrilo) y fase B (H<sub>2</sub>O). Se inyectaron 50 µL de muestra. Se corrió a una temperatura de 30 °C con un rango de flujo de 1 mL/min. La absorbancia se llevó a cabo entre 190 a 600 nm.

## **10 Caracterización por TOF LC/MS**

Las muestras hidrolizadas fueron inyectadas (5 µL) en un espectrómetro de masas Infinitely better (Agilent Technologies, USA). Se utilizó un gradiente de 99.9 %

H<sub>2</sub>O y 0.1% ácido fórmico (solvente A) y 99.9% de acetonitrilo y 0.1% ácido fórmico (solvente B) con un flujo de 50% A y 50% B. La elución de los péptidos se analizó por un detector TOF 6230 (Agilent Technologies, USA) a una longitud de onda de 280 nm. La ionización por electrospray fue operada en modo positivo. La presión del nebulizador fue de 30 PSI, con un flujo de gas de 4 L/min a una temperatura de 200°C. El fragmentador tuvo un voltaje de 170 V y el potencial de skimmer fue 50 V. Los datos fueron recogidos en un rango de m/z 100 a 3200.

## **11 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos para HGBO se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y las medias de los resultados se compararon con la prueba LSD de Fisher, con un nivel de significancia de  $\leq 0.05$  (Statgraphics-Plus 6.0).

## VIII. RESULTADOS

### A. Condiciones óptimas de fermentación en estado sólido para producir harina de garbanzo bioprocesada.

En el **Cuadro 6** se muestran las diferentes combinaciones de variables del proceso de fermentación en estado sólido [temperatura de fermentación (TF) y tiempo de fermentación (tF)] utilizadas para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y los valores experimentales de las variables de respuesta [grado de hidrólisis (GH) proteína soluble (PS), Actividad antioxidante (AAox)] evaluadas a las HGB.

#### 1. Modelos experimentales de predicción

A partir de los datos experimentales de GH, PS y AAox de las HGB mostrados en el **Cuadro 6** se obtuvieron modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio:  $\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$ , que relaciona las variables de respuesta (GH, PS y AAox) evaluadas a las HGB, con las variables del proceso de FES (TF y tF). A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA) (**Cuadro 7**). Un buen modelo de predicción debe tener una  $R^2$  ajustada (coeficiente de determinación)  $\leq 0.80$ , un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , un coeficiente de varianza (CV)  $\leq 10\%$ , y prueba de falta de ajuste  $> 0.1$  (Meyers y Montgomery, 2002). Todos estos parámetros fueron usados para decidir el nivel de satisfacción del modelo.

**Cuadro 6.** Diseño experimental<sup>1</sup> empleado para obtener diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y resultados experimentales de las variables de respuesta (GH, PS y AAox).

Tratamiento <sup>2</sup>	Variables del proceso		Variables de respuesta		
	TF(°C)	tF (h)	Grado de hidrólisis (%)	Proteína soluble (mg/mL)	AAox (μmol ET/ mg de proteína)
1	33.5	69.05	27.26	4.20	421.76
2	33.5	69.05	26.99	4.31	483.30
3	25.4	24.5	14.25	1.20	251.60
4	33.5	69.05	26.24	4.56	506.72
5	33.5	69.05	24.77	3.98	539.43
6	33.5	6.04	16.23	0.80	346.90
7	25.4	113.6	33.33	5.60	216.08
8	41.6	113.6	35.65	4.77	374.30
9	33.5	69.05	25.91	4.56	465.62
10	41.6	24.5	19.68	2.15	258.39
11	22.04	69.05	19.89	3.70	53.63
12	44.95	69.05	26.43	3.105	184.74
13	33.5	132.05	39.26	5.91	445.56

<sup>1</sup> Diseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 tratamientos.

<sup>2</sup> No corresponde al orden de procesamiento.

<sup>3</sup>GH = Grado de hidrólisis; PS = Proteína soluble; AAox = Actividad antioxidante

**Cuadro 7.** Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción que muestran la relación entre las variables de respuesta (GH, PS y AAOx) y variables de proceso (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

Coeficientes	Grado de hidrólisis		Proteína soluble		AAOx	
	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
Intercepto	+26.24	-18.80259	4.33	-9.69485	483.37	-2632.2274
Lineal						
$\beta_1$	+2.12****	+1.76298****	-0.092 NS	+0.53082 NS	43.80**	179.67284**
$\beta_2$	+8.45****	+0.13239****	+1.78****	+0.11406****	27.49*	-0.16825*
Cuadrático						
$\beta_{11}$	-1.47****	-0.022400****	-0.45****	-6.82061E-003****	-177.74****	-2.70909****
$\beta_{22}$	+0.82*	+4.15072E-004*	-0.47****	-2.37021E-004****	-39.22**	-0.019763**
Interacción	NS	NS				
$\beta_{12}$			-0.45****	-1.23357E-003****	37.86*	0.10491*
P modelo		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001
P falta de ajuste		0.5269		0.6024		0.9002
CV %		3.74		6.10		10.1
R <sup>2</sup>		0.9882		0.9874		0.9655
R <sup>2</sup> ajustada		0.9824		0.9784		0.9408
R <sup>2</sup> predicha		0.9717		0.9563		0.9225

\* Nivel de significancia a  $p \leq 0.10$ , \*\* Nivel de significancia a  $p \leq 0.05$  \*\*\* Nivel de significancia a  $p \leq 0.01$   
 NS= No significativo

### **a. Grado de hidrólisis**

Las HGB presentaron valores de GH entre 14.2% y 39.2% (**Cuadro 6**). En todos los tratamientos de fermentación, el GH del garbanzo aumentó como consecuencia de la acción enzimática del microorganismo. En el **Cuadro 7** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para GH de las HGB, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ( $p < 0.0001$ ) para GH. Este análisis también mostró que el GH de las HGB fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF), y los términos cuadráticos de temperatura de fermentación (TF<sup>2</sup>) y tiempo de fermentación (tF<sup>2</sup>). Por otro lado, el término de interacción (TF\*tF) no fue significativo. El modelo de predicción para el GH de las HGB usando variables codificadas fue:

$$\text{GH} = 26.24 + 2.12 \text{ TF} + 8.45 \text{ tF} - 1.47 \text{ TF}^2 + 0.82 \text{ tF}^2$$

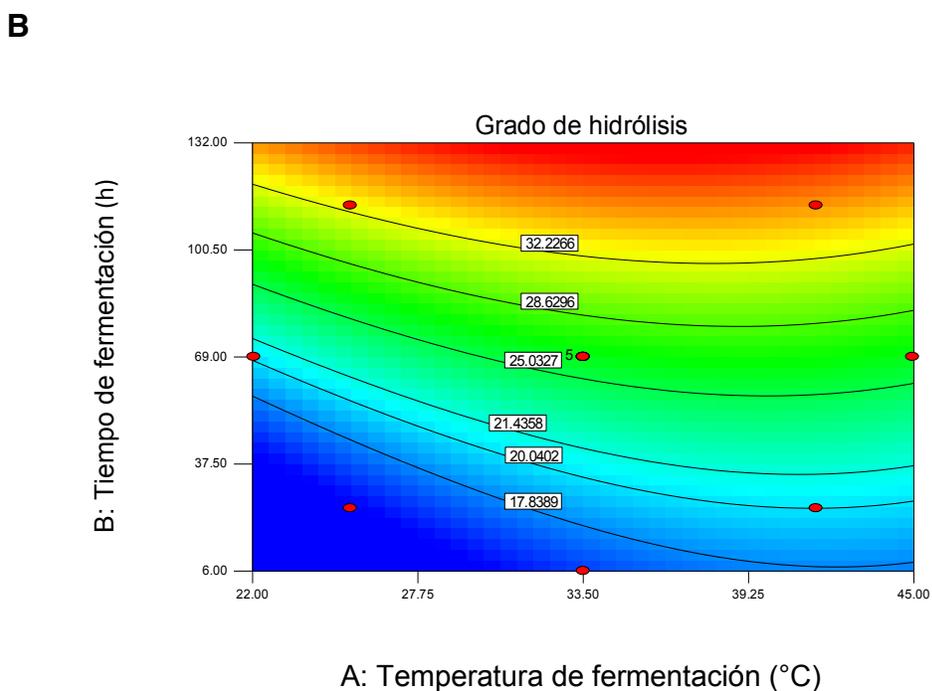
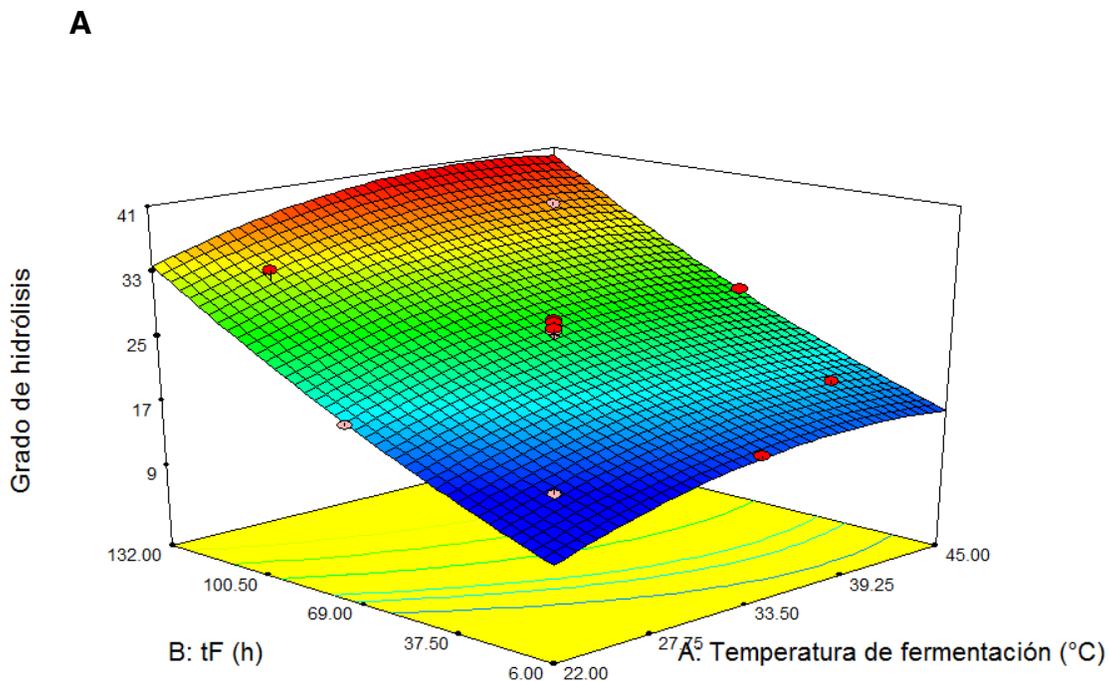
El modelo de predicción para el GH de las HGB usando variables no codificadas fue:

$$\text{GH} = -18.80259 + 1.76298 \text{ TF} + 0.13239 \text{ tF} - 0.022400 \text{ TF}^2 + 4.15072\text{E-}00 \text{ tF}^2$$

Este modelo de predicción explicó el 98.8% de la variabilidad total ( $< 0.0001$ ) de los valores de GH de las HGB. El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> ajustada del modelo fue 0.98 y la falta de ajuste no fue significativa (P=0.53). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos

con el modelo (CV) fue de 3.74%. Estos valores indican que el modelo experimental para el GH de las HGB fue adecuado y reproducible.

A partir de los modelos matemáticos de predicción, se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 5**) en ellos se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre el GH de las HGB. Ambas variables de proceso (TF, tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento del GH, tanto en sus términos lineales, como en los términos cuadráticos TF y tF. El valor más bajo de GH (14.2%) se localizó a una TF de 25.4°C y un tF de 24.5 h. En las gráficas se observa que el máximo valor de GH se tiene a TF de medias a altas (33° - 45°C) y a mayores tiempos (132 h) de fermentación. Para la medición del grado de hidrólisis, se utiliza una metodología la cual permite medir la cantidad de nitrógeno libre que existe en una muestra. Para el caso de nuestras muestras fermentadas, el grado de hidrólisis representa la cantidad de nitrógeno proteico libre que interacciona con el reactivo ácido tricloroacético (TCA), a su vez el TCA precipita las proteínas grandes permitiendo cuantificar las que quedan suspendidas y considerarlas como aquellas que fueron hidrolizadas por el hongo, como se puede observar en la **Figura 5**, el grado de hidrólisis fue aumentando durante todo el proceso. Este comportamiento, ocurre por la síntesis enzimática que lleva a cabo *Rhizopus oligosporus* y a su vez, éstas enzimas actúan sobre el sustrato (proteína de garbanzo) como parte de su metabolismo. Se ha reportado que *Rhizopus oligosporus* es un hongo mesófilo, el cual se desarrolla mejor a temperaturas de 35 a 37°C (Jin y col., 1999), por lo tanto bajo estas condiciones la capacidad proteolítica del hongo incrementa, dando como resultado un mayor GH. Además se observó que,



**Figura 5.** Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el GH (%) de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

al aumentar el tF, hay un incremento en el GH de la HGB. Este mismo comportamiento ha sido reportado por diversos investigadores, como (De Reu y col 1994), quienes evaluaron el GH de soya durante la FES a diferentes temperaturas (25, 30 y 37°C) por 70 h de proceso, encontrando que a temperaturas de 30 y 37°C el GH fue superior que a 25°C, concluyendo que este efecto se debe a que el hongo se desarrolla mejor bajo a temperaturas de 30 y 37°C y la producción de proteasas es mayor lo que ocasiona el incremento de la hidrólisis de proteínas.

Al aumentar el tF, hay un incremento en el GH de la HGB. Este mismo comportamiento ha sido reportado por diversos investigadores, como (De Reu y col 1994), quienes evaluaron el GH de la soya durante la FES a diferentes temperaturas (25, 30 y 37°C) por 70 h de proceso, encontrando que a temperaturas de 30 y 37°C el GH fue superior que a 25°C, reportando que este efecto se pudo deber que bajo a temperaturas de 30 y 37°C el hongo crece en mejores condiciones y la producción de proteasas es mayor lo que ocasiona el incremento de la hidrólisis.

Por su parte, Jia y col. (2013), evaluaron el grado de hidrólisis de la soya mediante FES utilizando como inóculo *Bacillus subtilis* (BS-GA15) a una temperatura de 30°C, durante 48 y 60 h, encontrando un GH de 12.91% y 13.14%, respectivamente. Estos resultados permitieron concluir una relación directa entre GH y el tiempo de proceso, conforme aumenta el tiempo de fermentación también aumenta el GH. Por otro lado, Sanjukta y col. (2015) observaron esta respuesta en soya fermentada con *Bacillus subtilis* (MTCC 5480 y MTCC 1747) encontrando un máximo GH de 44.89% a una temperatura de 42°C por 24 horas. Tanto Jia y col (2013) como Sanjukta y col. (2015) concluyeron que el GH depende del

microorganismo involucrado en el proceso, el cual necesita de condiciones adecuadas para su crecimiento y de este modo incrementar su capacidad proteolítica, entre las que destacan temperatura, humedad y pH del sustrato.

#### **b. Proteína soluble**

Los EAP presentaron valores de PS entre 0.80 y 5.91 mg/mL (**Cuadro 6**). Esta respuesta fue en aumento conforme aumentaba el tiempo de proceso ya que el tratamiento con mayor tiempo (33°C/132h) presento una cantidad de PS de 5.91 mg/mL, mientras que el menor tiempo de fermentación (33°C/6h) tuvo un valor de 0.80 mg/mL. En el **Cuadro 7** se muestra la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para la PS de los EAP, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ( $p < 0.0001$ ) para PS. Este análisis también mostró que el contenido de PS de los EAP fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF), el término de interacción (TF\*tF) y los términos cuadráticos Temperatura de fermentación (TF<sup>2</sup>) y tiempo de fermentación (tF<sup>2</sup>). El modelo de predicción para el contenido de PS de los EAP usando variables codificadas fue:

$$\text{PS} = 4.33 - 0.092 \text{ TF} + 1.78 \text{ tF} - 0.45 \text{ TF} \cdot \text{tF} - 0.45 \text{ TF}^2 - 0.47 \text{ tF}^2$$

El modelo de predicción para el contenido de PS de los EAP usando variables no codificadas fue:

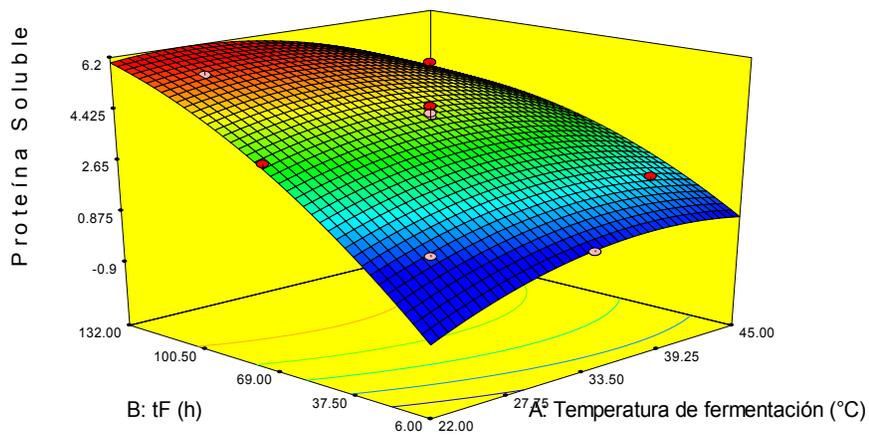
$$\text{PS} = - 9.69485 + 0.53082 \text{ TF} + 0.11406 \text{ tF} - 1.23357\text{E-}003 \text{ TF} \cdot \text{tF} - 6.82061\text{E-}003 \text{ TF}^2 - 2.37021\text{E-}004 \text{ tF}^2$$

Este modelo de predicción explicó el 98.7 % de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de PS de los EAP. El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustada del modelo fue 0.978 y la falta de ajuste fue no significativa (0.60). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 6.10%. Estos valores indican que el modelo experimental para el contenido de PS de las EAP fue adecuado y reproducible.

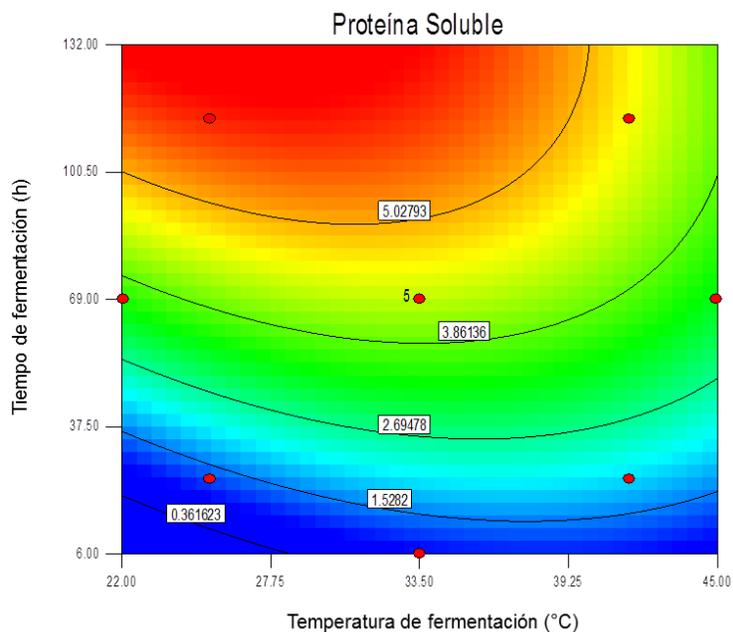
A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 6**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre el contenido de PS de los EAP. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (TF y tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de PS.

El valor de PS más bajo (0.80 mg/mL) se localizó a una TF de 33°C y un tF de 6 h en cambio la mayor concentración de PS fue a la misma temperatura pero a mayores tiempos de fermentación (132 h= 5.91mg/mL), esto demuestra que la cantidad de PS podría depender del tiempo pero a temperaturas medias a altas, ya que bajo estas condiciones el hongo crece rápidamente, mostrando altas capacidades proteolíticas (Steinkraus y col 1983). Ikasari y col. reportaron que la producción de proteasas del microorganismo depende del tipo de sustrato, ya que ellos evaluaron la producción de proteasas de *Rhizopus oligosporus* en el arroz y en trigo, encontrando que en el arroz la mayor producción se obtenía a las 72 h mientras

**A**



**B**



**Figura 6.** Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la PS (mg/mL) en los extractos acuosos proteínicos (EAP).

que en el trigo se observó a las 58 h a una temperatura de 37°C (Ikasari y Mitchell 1994).

Silva Canedo y col. (2016) observaron que tras fermentar cebada con *Rhizopus* se incrementó el valor de PS de 10 al 16%. En todos los tratamientos de fermentación realizados en el presente trabajo el contenido de PS incrementó con respecto al grano de garbanzo sometido a cocción, el cual es equivalente a un tiempo de fermentación igual a 0 h y cuyo contenido de PS es igual a 0.93 mg/mL. La disminución en PS por efecto de la cocción podría deberse al aglomeramiento de las proteínas y con ello la disminución drástica de su solubilidad (Elkhalifa y col 2006). Este comportamiento también fue reportado por Tahir (2015) quien evaluó la calidad nutricional de harina de sorgo fermentada y harina de soya, encontrando que, tras el proceso de cocción, la fracción proteica soluble en agua disminuye su valor hasta en un 74% (Tahir 2015). Aunque la FES fue un método efectivo para incrementar el contenido de PS en granos de garbanzo sometido a la etapa previa de cocción, ninguno de los tratamientos empleados logró alcanzar la solubilidad de proteína que presenta el grano crudo (8.39 mg/mL).

### **c. Actividad antioxidante**

Los EAP presentaron valores de AAox entre 53.63 y 539.43 mmol ET/ mg de proteína (**Cuadro 6**). En el **Cuadro 7** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para la AAox de los EAP, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). El análisis de varianza mostró un modelo

cuadrático significativo ( $p < 0.0001$ ) para AAox. Este análisis también mostró que el GH de los EAP fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF), el término de interacción (TF\*tF) y los términos cuadráticos de temperatura de fermentación (TF<sup>2</sup>) y tiempo de fermentación (tF<sup>2</sup>). El modelo de predicción para la AAox de los EAP usando variables codificadas fue:

$$\mathbf{AAox = 483.37 + 43.80 TF + 27.49 tF + 37.86 TF*tF - 177.74 TF^2 - 39.22 tF^2}$$

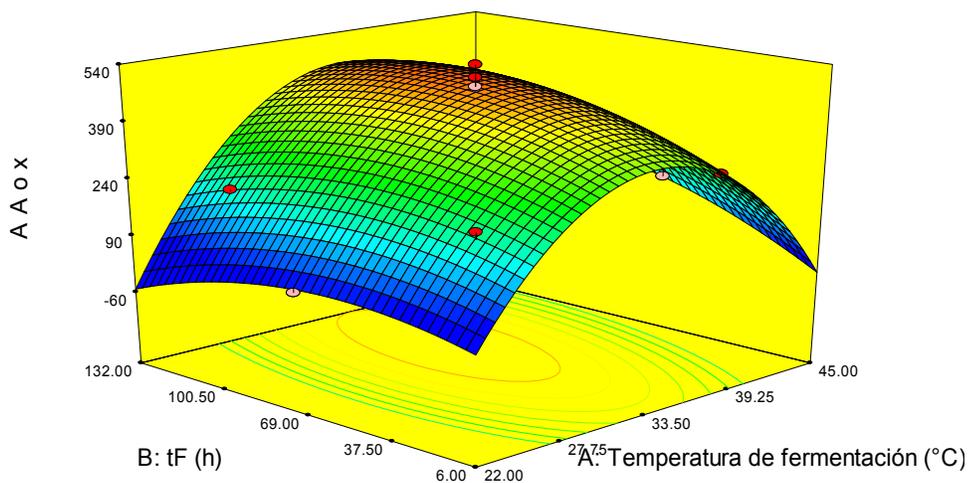
El modelo de predicción para la AAox de los EAP usando variables no codificadas fue:

$$\mathbf{AAox = - 2632.22740 + 179.67284 TF - 0.16825 tF + 0.10491 TF*tF - 2.70909 TF^2 - 0.019763 tF^2}$$

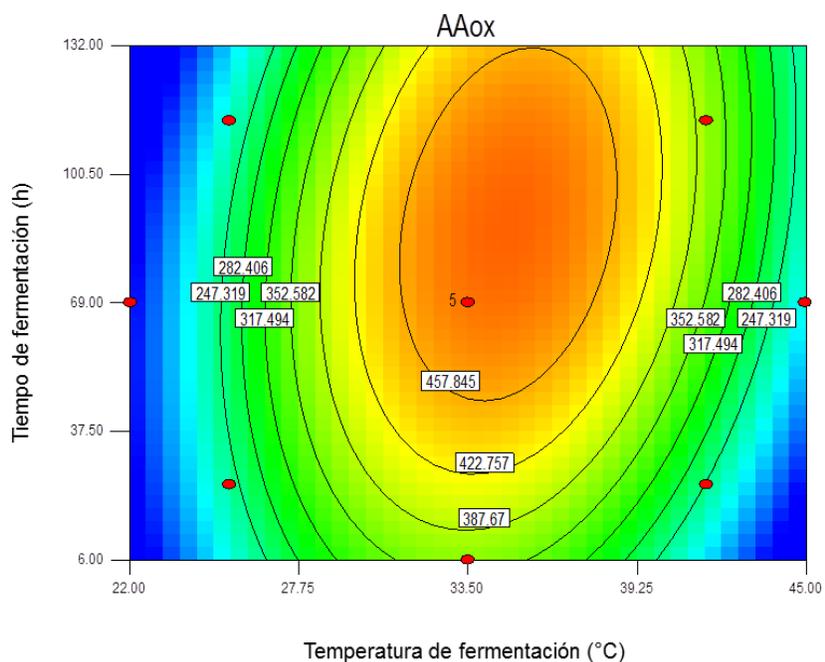
Este modelo de predicción explicó el 96.55% de la variabilidad total ( $p < 0.0001$ ) de los valores de la AAox de los EAP. El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> ajustada del modelo fue 0.94 y la falta de ajuste fue no significativa (0.90). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 10%. Estos valores indican que el modelo experimental para el contenido de AAox de los EAP fue adecuado y reproducible.

A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 7**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre la AAox de los EAP. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (TF y tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de AAox. El valor de AAox más bajo (53.63  $\mu\text{mol}$

**A**



**B**



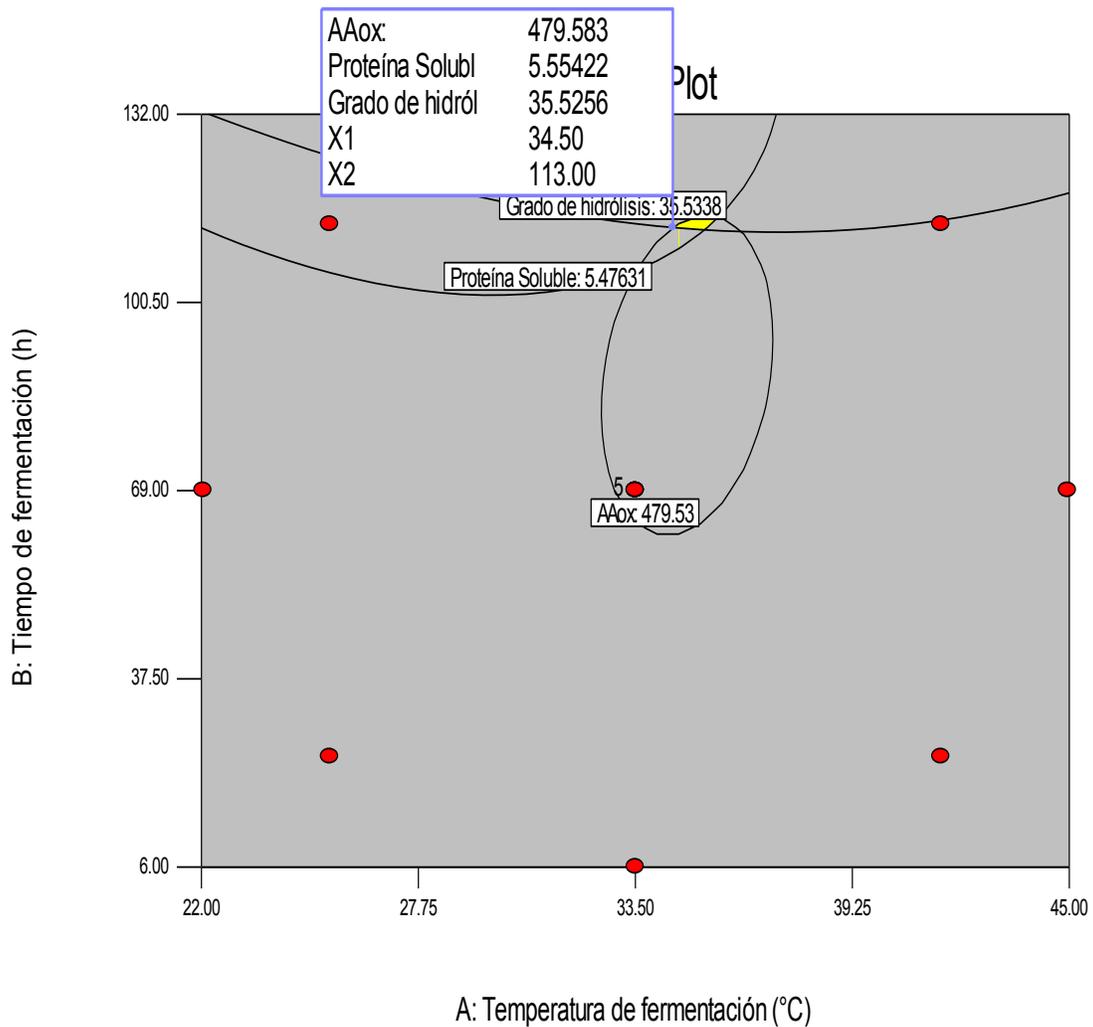
**Figura 7.** Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la AAox ( $\mu\text{mol ET/m g}$  de proteína) de los extractos acuosos proteínicos (EAP).

ET/mg de proteína) se localizó a una TF de 22°C y un tF de 69 h. Se observa una mayor AAox a TF de 33°C y un tF de 69 h, este comportamiento podría deberse a que a estas condiciones, tanto de temperatura como de tiempo, se producen péptidos con dicha actividad debido a la actividad proteolítica del hongo y, al transcurrir el tiempo hasta 132 h, los péptidos previamente generados podrían ser hidrolizados y perder la actividad. Watanabe y col (2007) sugirieron que la AAox en la fracción soluble en agua de tempe fermentada con *Rhizopus* puede ser atribuida a los aminoácidos y péptidos generados durante la fermentación. Un comportamiento similar ha sido reportado por Zhu y col. quienes evaluaron la AAox de un subproducto de la soya (okara) fermentado con *Bacillus subtilis* (B2), encontrando que tras 48 horas de fermentación se presentó un incremento de la AAox, atribuyendo esta actividad a los péptidos y aminoácidos libres que pudieron haber sido producidos tras la hidrólisis de proteínas de la soya por las proteasas generadas por el hongo (Zhu y col 2008).

La AAox incremento en comparación con el tratamiento crudo (172.3  $\mu\text{mol}$  ET/mg de proteína) esto se pudo deber a los péptidos generados durante el proceso con dicha actividad, en general, los 20 aminoácidos presentes en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres si la energía de éstos es alta (por ejemplo radicales hidroxilo). Los más reactivos incluyen los azufrados (Met y Cis), los aromáticos (Trp, Tir y Fen) y los que contienen anillo imidazol como la His (Sarmadi y Ismail 2010; Samaranayaka y Li-Chan 2011).

## 2. Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

La sobreposición de las gráficas de contorno permitió construir la **Figura 8**, la cual se utilizó para la observación y selección de la mejor combinación de las variables de proceso de fermentación en estado sólido para la producción de harina de garbanzo bioprocesada con un alto GH, valores máximos de PS soluble y actividad antioxidante. Los puntos centrales de la región de optimización en la **Figura 8** muestran la combinación óptima de las variables de proceso, Temperatura y tiempo de fermentación,  $TF=34.5^{\circ}C$ ,  $tF=113$  h, para las cuales se predice un grado de hidrólisis de 35.52%, proteína soluble igual a 5.55 mg/mL y una actividad antioxidante de 479.58  $\mu\text{mol ET/ mg}$  de proteína.



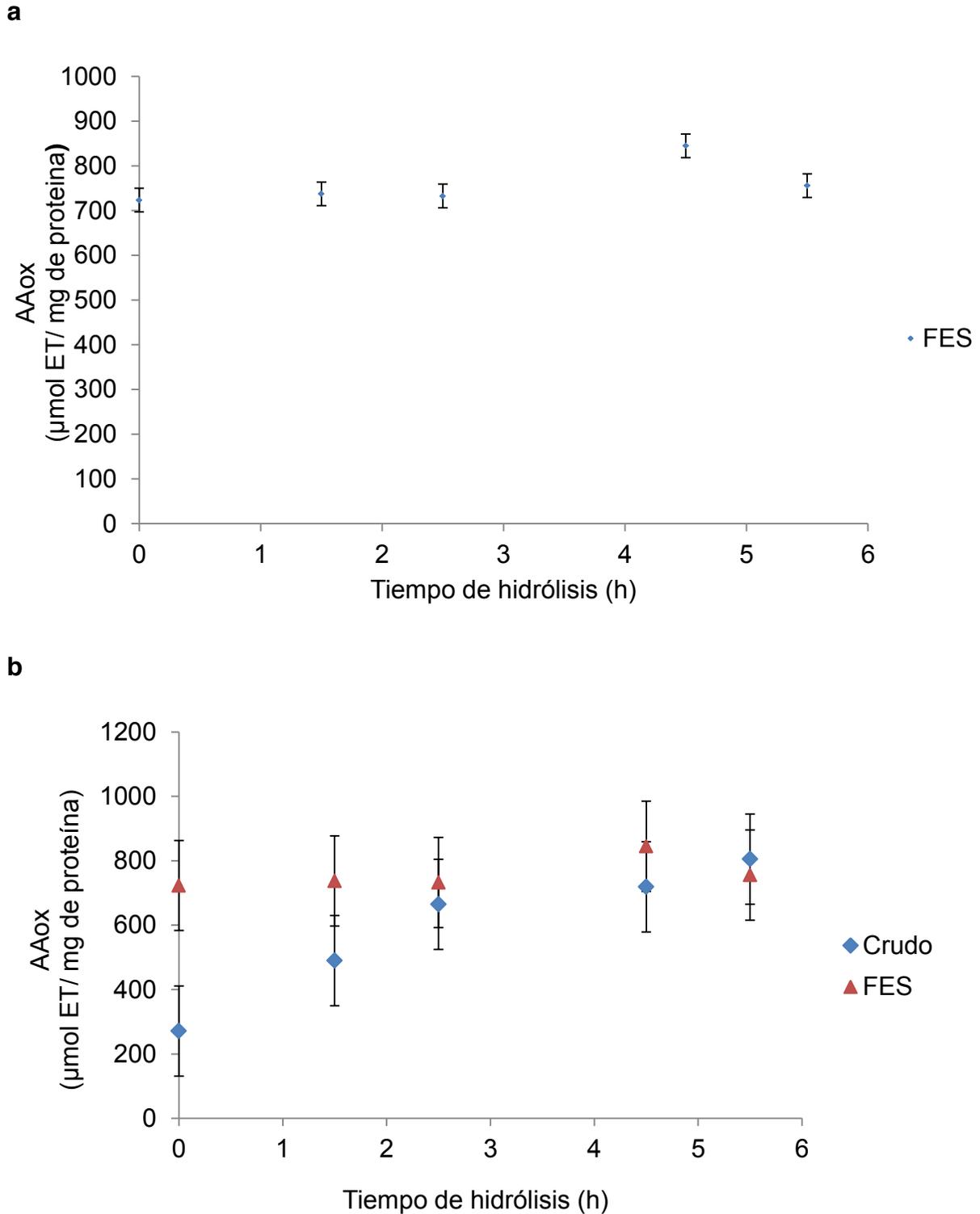
**Figura 8.** Combinación óptima de TF y tF para la producción de HGBO. Efecto de las variables del proceso Temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF) sobre el grado de hidrólisis, contenido de proteína soluble y actividad antioxidante de las harinas de garbanzo procesadas por fermentación en estado sólido.

## **B Actividad antioxidante *in vitro* de los péptidos generados después de la simulación gastrointestinal**

La digestión de las proteínas en humanos se puede dividir en dos procesos, uno dentro del estómago y otro en el intestino delgado. Dentro del estómago se debe a la acción de la pepsina y los ácidos que se encuentran en él, los que rompen los péptidos y las proteínas en cadenas de aminoácidos (Rivas 2014), posteriormente la digestión duodenal empieza en el intestino delgado, donde las proteínas son degradadas por enzimas proteolíticas y pancreatina (Cárdenas Hidalgo 2016). Los péptidos generados usando estas proteasas (pepsina y pancreatina) pueden parecerse a los generados durante la digestión de proteínas de garbanzo o tempe de garbanzo en el organismo. Estos péptidos podrían ser absorbidos intactos y favorecer la actividad antioxidante.

En la **Figura 9.a** se puede observar el efecto de la digestión gastrointestinal con pepsina y pancreatina sobre la actividad antioxidante en el extracto acuoso proteínico (EAP) procesado por FES teniendo un valor inicial de 723.17  $\mu\text{molET}/\text{mg}$  de proteína. Durante la hidrólisis con pepsina (1.5 h) se obtuvo 737.32  $\mu\text{molET}/\text{mg}$  de proteína, no se observaron diferencias significativas con el tiempo inicial, mientras que al finalizar la hidrólisis (pancreatina 5.5 h) el resultado fue de 755.67 generando un incremento del 4.4% sobre el tiempo inicial (723.17  $\mu\text{molET}/\text{mg}$  de proteína) lo que indica al someter el EAP procesado por FES a condiciones de digestión gastrointestinal podría generarse nuevos péptidos con mayor actividad antioxidante.

Por otro lado en la **Figura 9.b** se puede comparar el efecto de la hidrólisis sobre los EAP de los tratamientos crudo y fermentado. Se observó que al someter al EAP



**Figura 9.** Actividad antioxidante de los EAP hidrolizados FES (A), crudo vs FES (B) con pepsina y pancreatina a diferentes tiempos: 0, 1.5, 2.5, 4.5 y 5.5 h.

del grano crudo a condiciones de digestión gastrointestinal la actividad antioxidante fue en incremento conforme transcurría el tiempo de hidrólisis, teniendo como valor inicial 271.22  $\mu\text{molET/mg}$  de proteína (tiempo 0) y 805.04  $\mu\text{molET/mg}$  de proteína al finalizar el proceso con pancreatina (5.5 h). Este incremento, 297% con respecto al valor inicial, puede ser atribuido a la generación de péptidos y/o liberación de aminoácidos libres durante la simulación gastrointestinal. Por su parte, el EAP del tratamiento fermentado bajo condiciones óptimas solo mostró diferencia significativa con respecto al EAP del grano crudo al tiempo 0 de hidrólisis. Al comparar el comportamiento de ambos tratamientos durante la simulación gastrointestinal se observa que mientras la AAox del EAP del grano crudo aumenta durante este proceso, la AAox del EAP del tratamiento fermentado se mantiene, solo se observa un aumento de la AAox a las cinco horas de la hidrólisis, sin embargo a las cinco horas y media (tiempo final de hidrólisis) hay una disminución de dicha actividad, posiblemente se generaron péptidos con mayor actividad y al finalizar el proceso estos desaparecieron.

Al finalizar la simulación gástrica con ambos tratamientos crudo y procesado, se tiene que su AAox tiene valores de 805.04 y 788.11  $\mu\text{molET/mg}$  de proteína respectivamente, dentro de los cuales no se observa diferencia significativa, sin embargo, a pesar que la actividad antioxidante no tuvo diferencias significativas, esto no indica que el resultado de ambos sea el mismo, es decir, posiblemente los péptidos obtenidos en cada uno de los tratamientos sean diferentes, es por ello que a cada tratamiento se le realizó un análisis de masas para determinar los posibles compuestos presentes.

### **C Efecto antihipertensivo (Inhibición de ECA, IC<sub>50</sub>), por proteína soluble de garbanzo crudo, cocido y fermentada.**

El efecto antihipertensivo a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se muestra en el **Cuadro 8**. Donde podemos encontrar que la harina de garbanzo crudo mostró una inhibición máxima de ECA del 94.61% con un IC<sub>50</sub> de 0.683 mg proteína/mL, mientras que el grano de garbanzo una vez que fue sometido al proceso de cocción mostró una actividad máxima de ECA de 85.75% con un IC<sub>50</sub> de 0.15 mg proteína/mL y una vez que fue sometido al proceso de fermentación en estado sólido con *R oligosporus*, la proteína soluble de garbanzo mostró una inhibición máxima de ECA de 96.1% con un IC<sub>50</sub> de 0.096 mg proteína/mL. El IC<sub>50</sub> es medición de la concentración inhibitoria máxima media de la efectividad de una sustancia o compuesto químico que permite inhibir una función biológica o bioquímica específica. Boschín y col (2014) reportaron una actividad inhibitoria máxima de ECA a partir de hidrolizados de garbanzo de 86% con un IC<sub>50</sub> de 0.63 mg proteína/mL. Además, concluyeron que comparar los resultados con los publicados en otras investigaciones es difícil, ya que cada grupo de investigación utiliza diferentes protocolos experimentales (Boschín y col 2014).

Además, podemos observar que la proteína soluble de garbanzo una vez que fue sometida al proceso de hidrólisis con pepsina y pancreatina mostró una inhibición máxima de ECA del 94.50% con un IC<sub>50</sub> de 0.379 mg proteína/mL, mientras que el grano de garbanzo una vez que fue sometido al proceso de cocción-hidrólisis mostró una actividad máxima de ECA de 89.28% con un IC<sub>50</sub> de 0.059 mg proteína/mL y una vez que fue sometido al proceso de fermentación en estado

**Cuadro 8.** Efecto antihipertensivo (Inhibición de ECA, IC<sub>50</sub>), por proteína soluble de garbanzo crudo, cocido y fermentada.

<b>Muestra</b>	<b>Sin hidrolizar</b> (mg proteína/mL)	<b>MAX</b> <b>inhibición de</b> <b>ECA (%)</b>	<b>Hidrolizado*</b> (mg proteína/mL)	<b>MAX</b> <b>inhibición de</b> <b>ECA (%)</b>
Garbanzo crudo	0.683 ±	94.61	0.379 ±	94.50
Garbanzo cocido	0.150 ±	85.75	0.059 ±	89.28
GFO	0.096 ±	96.1	0.066 ±	90.56

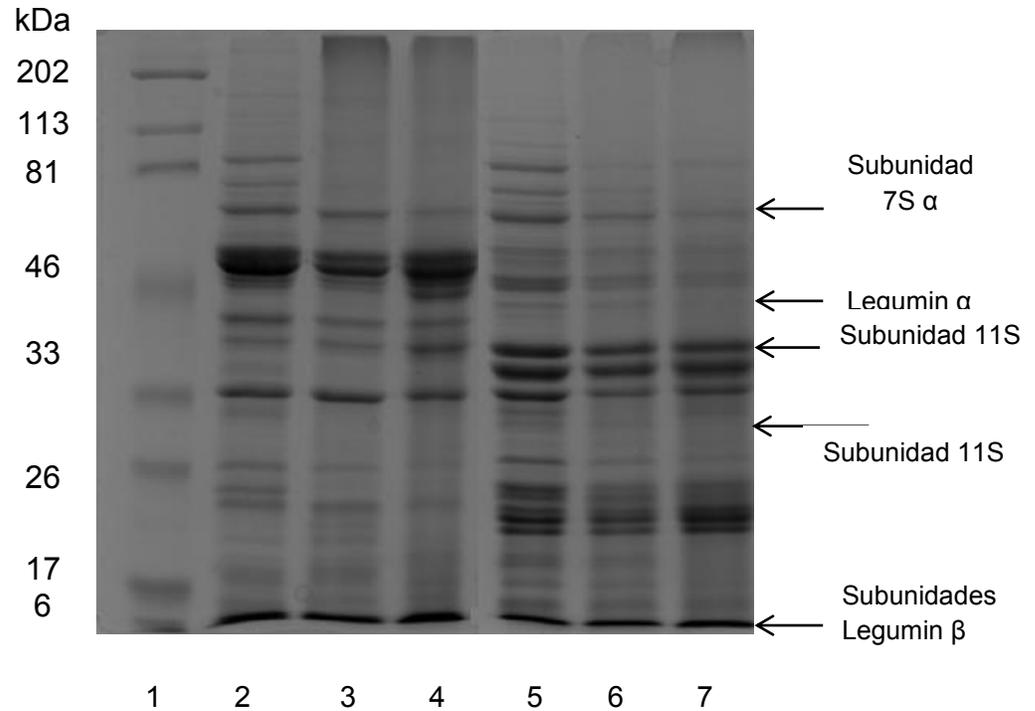
- **Hidrolizado durante 4 horas**

sólido- con *R. oligosporus* e hidrólisis enzimática, la proteína soluble de garbanzo mostró una inhibición máxima de ECA de 90.56% con un IC<sub>50</sub> de 0.066 mg proteína/mL. Comparar nuestros resultados con otras investigaciones es difícil, ya que la mayoría de los péptidos estudiados en leguminosas se llevan a cabo en granos sin procesar, sin embargo podemos destacar que el proceso de fermentación en estado sólido (incluyendo la cocción) permite modificar el perfil de péptidos y estos permitieron obtener valores de IC<sub>50</sub> menores que los granos crudos y sin hidrolizar.

Así mismo, estas diferencias pueden explicarse por los diferentes protocolos que se utilizan dentro de los grupos de investigación y dentro de estos factores están involucrados factores como tipo de muestra y procedimiento de extracción de la proteína, diferencias en la composición de mezcla de péptidos, cambios relacionados con el proceso de digestión (enzima, pH, tiempo, temperatura, proporción enzima sustrato o los métodos analíticos utilizados para la determinación inhibitoria de ECA (Barbana y Boye 2010; Boschín y col 2014)

#### **D Caracterización de proteína de garbanzo mediante electroforesis (SDS-PAGE)**

La distribución del peso molecular de las proteínas del garbanzo crudo y procesado por FES fue examinado por SDS-PAGE. En la **Figura 10** se puede apreciar el perfil electroforético de las proteínas de garbanzo crudo y las de garbanzo procesado por FES, en condiciones no reductoras (líneas 2-4) y reductoras (líneas 5-7), bajo estas condiciones se utilizó beta-mercaptoetanol el cual contribuye a



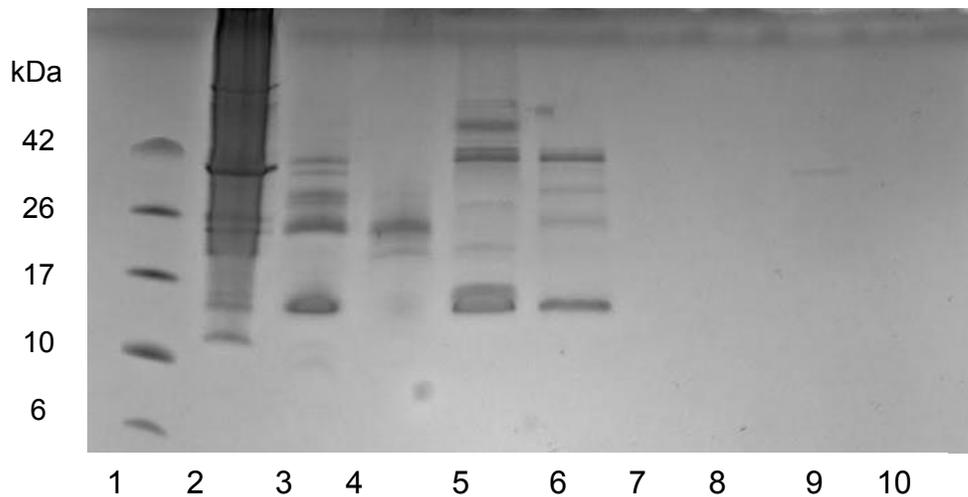
**Figura 10.** Perfil electroforético SDS-PAGE de las harinas de garbanzo en condiciones no reductoras (2-4) y reductoras (5-7). Línea 1: Marcador de peso molecular; Línea 2: Harina de garbanzo crudo; Línea 3: Harina de garbanzo procesado por FES por 6 h; Línea 4: Harina de garbanzo procesado optimizado (34°C/113h). Línea 5: Harina de garbanzo crudo; Línea 6: Harina de garbanzo procesado por FES por 6 h; Línea 7: Harina de garbanzo procesado optimizado (34°C/113h).

desnaturalizar las proteínas reduciendo los enlaces disulfuro, desplegando así algunas formas de plegamiento terciario y rompiendo la estructura cuaternaria.

Las globulinas 7S son proteínas cuyo peso molecular varía entre 150 a 190 kDa y están constituidas por subunidades de 40- 70 kDa que pueden ser iguales o diferentes (Casey y col 1993). Mientras que las globulinas 11S son oligómeros hexaméricos cuyas subunidades interaccionan por enlaces no covalentes con un peso molecular de 50-60 kDa (Plietz y col 1986).

En la **Figura 10** se puede observar que las proteínas de mayor peso molecular (81 kDa) desaparecen con la fermentación, las subunidades 11S (46 kDa) disminuyen, al igual sucede con las subunidades de Legumin  $\beta$  (26 kDa), sin embargo, estas proteínas se encuentran en la totalidad de ambas harinas (crudo y procesado) por lo que se realizó un análisis posterior para evaluar las proteínas o péptidos que se encontraban en el extracto acuoso proteico (EAP).

En la **Figura 11** se encuentra el perfil electroforético de los EAP crudo, cocido y procesado, con sus respectivos tiempos de hidrólisis de simulación gástrica. Se puede observar que las proteínas solubles en agua del tratamiento crudo son las que se observan en mayor cantidad con respecto a los otros dos tratamientos (cocido y procesado), en cuanto al tratamiento cocido se aprecia la disminución de las proteínas en comparación con el tratamiento crudo, debido a la aglomeración de las mismas que conlleva el proceso térmico impidiendo así su solubilidad.

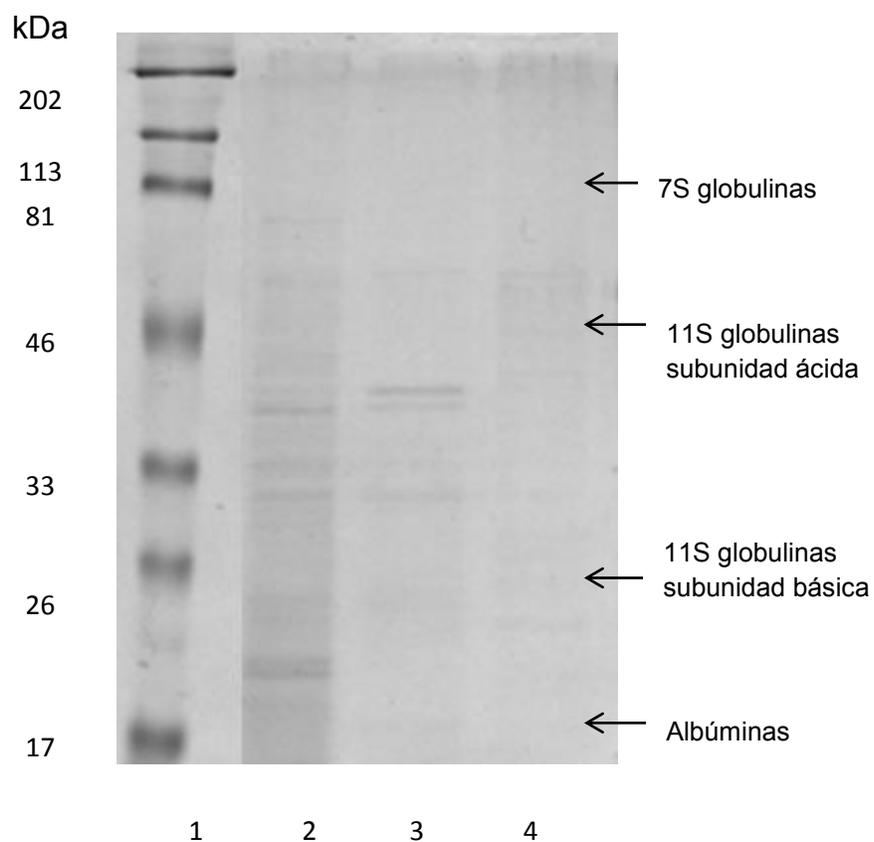


**Figura 11.** Perfil electroforético tricina SDS-PAGE de hidrolizados proteínicos a una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$ . Línea 1: marcador de peso molecular; Línea 2: EAP del tratamiento control; Línea 3: EAP del tratamiento control hidrolizado con pepsina (90 min); Línea 4: EAP del tratamiento control hidrolizado con pepsina y pancreatina (330 min); Línea 5: EAP del tratamiento cocido; Línea 6: EAP del tratamiento cocido hidrolizado con pepsina (90 min); Línea 7: EAP del tratamiento cocido hidrolizado con pepsina y pancreatina (330 min); Línea 8: EAP del tratamiento procesado por FES; Línea 9: EAP por FES hidrolizado con pepsina (90 min); Línea 10; EAP por FES hidrolizado con pepsina y pancreatina (330 min).

La simulación gastrointestinal se llevó a cabo en dos fases. Una gástrica a pH 2.0, ya que simula el pH del estómago de un adulto sano, durante esta primera fase se utilizó pepsina la cual hidroliza los enlaces en los que intervienen aminoácidos aromáticos, aunque también lo hace donde hay metionina y leucina. El producto de la catálisis de esta enzima son péptidos de tamaño variable y algunos aminoácidos libres. En la segunda fase se llevó a cabo la simulación de la digestión duodenal donde las proteínas son degradadas por enzimas proteolíticas y pancreatina a pH de 7.5. La pancreatina es una mezcla de enzimas, que incluye la quimotripsina y tripsina, la primera hidroliza enlaces peptídicos que contiene grupos carbonilo de aminoácidos aromáticos, mientras que la segunda hidroliza enlaces en los que intervienen arginina y lisina.

En el gel de la **Figura 11** se puede observar la disminución de las proteínas conforme transcurre la simulación gástrica para ambos tratamientos, esperando que al finalizar el proceso de hidrólisis el resultado sea la obtención de péptidos. Los últimos carriles pertenecen al tratamiento procesado por FES, se aprecia que aún sin ser sometido a la simulación gástrica no hay ninguna banda por lo que se espera solo tener péptidos de muy bajo peso molecular, o bien, aminoácidos libres.

Las proteínas de reserva presentes en el garbanzo se pueden dividir en globulinas (56%), albuminas (12%), Prolaminas (2.8%) y glutelinas (18.1%) (Salunkhe y Kadam, 1989), sin embargo por ser un extracto soluble en agua se espera que la mayoría de las proteínas presentes sean albuminas y parte de globulinas, ya que algunas de estas últimas pueden ser extraídas con agua. Esto se puede comprobar en el gel de la **Figura 12** donde se encuentran bandas de pesos



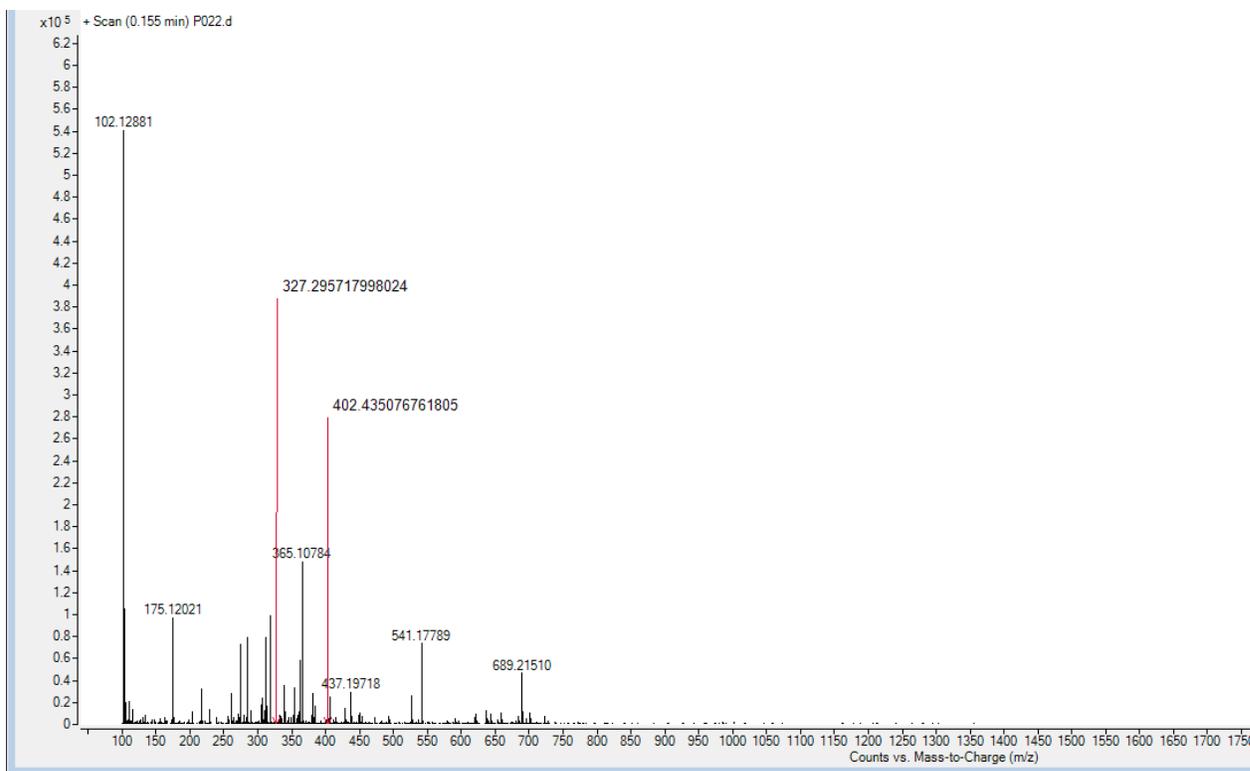
**Figura 12.** Perfil electroforético SDS-PAGE del EAP procesado por FES. Línea 1: marcador de peso molecular; Línea 2: EAP de FES; Línea 3: EAP de FES hidrolizado con pepsina (90 min); Línea 4: EAP de FES hidrolizado con pepsina y pancreatina (330 min).

moleculares comprendidas entre 14 y 66 kDa. Las albuminas se presentan como una banda de bajo peso molecular <14,4 kDa, mientras que las proteínas con peso molecular entre 33-36 kDa corresponden a la subunidad ácida de las 11S globulinas. Por otro lado, las proteínas con peso molecular entre 20-22 de kDa corresponden a la unidad básica de las 11S globulinas, mientras que las proteínas con 60 kDa correspondiente a la globulina 7S (Abugoch y col 2008).

La línea 2 del mismo gel (**Figura 12**) corresponde al EAP sometido a simulación gástrica con pepsina, en donde se observa una disminución de las proteínas, sin embargo, se observa una nueva banda con un peso aproximado de 45 kDa la cual puede corresponder a la pepsina restante de la hidrólisis. Por último, en la línea 3 se tiene el EAP hidrolizado con pepsina y pancreatina, en la cual se observa una disminución considerable de proteínas, esto se debe a la acción de las enzimas las cuales degradaron las proteínas presentes en el extracto en péptidos pequeños o aminoácidos libres.

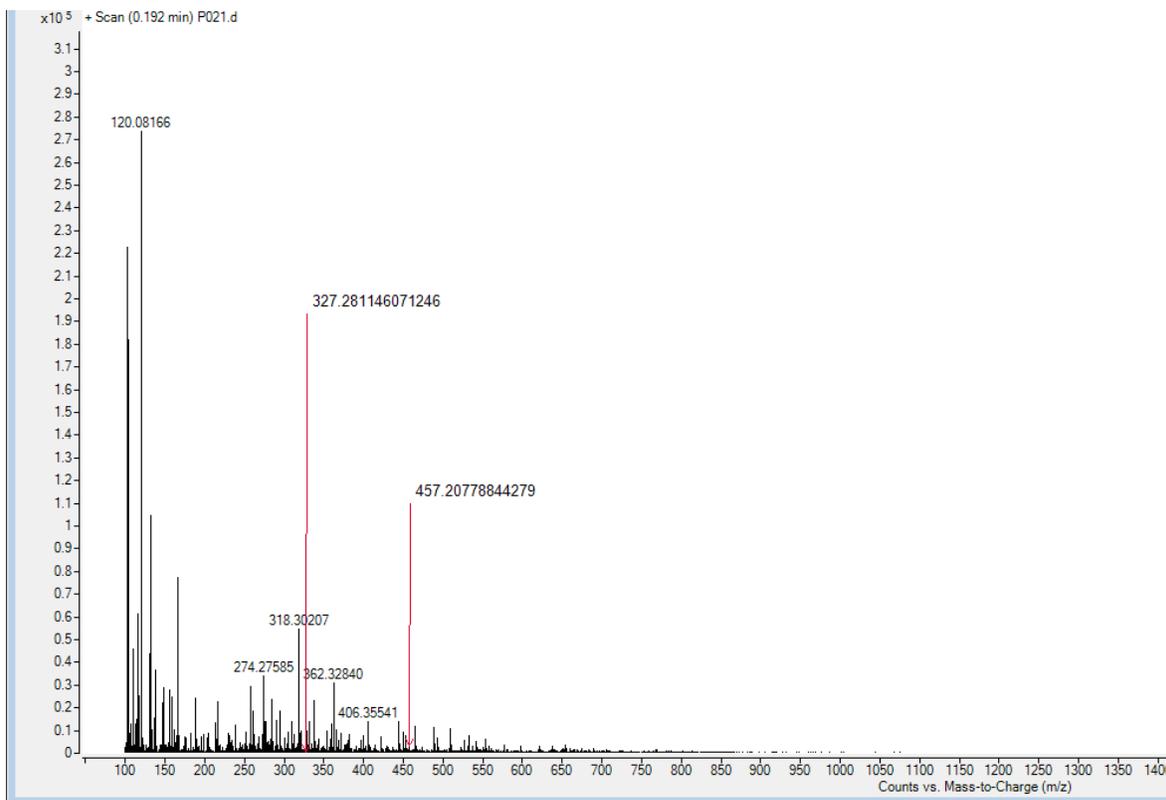
## **E Caracterización de los EAP hidrolizados por TOF LC/MS**

En el **Cuadro 9** y **Figuras 13, 14, y 15** se muestran las masas obtenidas para las muestras obtenidas de harinas de garbanzo procesado y sin fermentar, así como los péptidos de proteína obtenidos de la simulación gástrica. En las **Figuras 13, 14 y 15** de manera general podemos observar que las muestras tienen diferentes patrones de masas. Las masas de los compuestos presentes en los extractos crudo, FES y FES hidrolizado por 5.5 h; se realizó una búsqueda en la base de datos BIOPEP y en la literatura reportada, para poder predecir los posibles péptidos y/o secuencias que



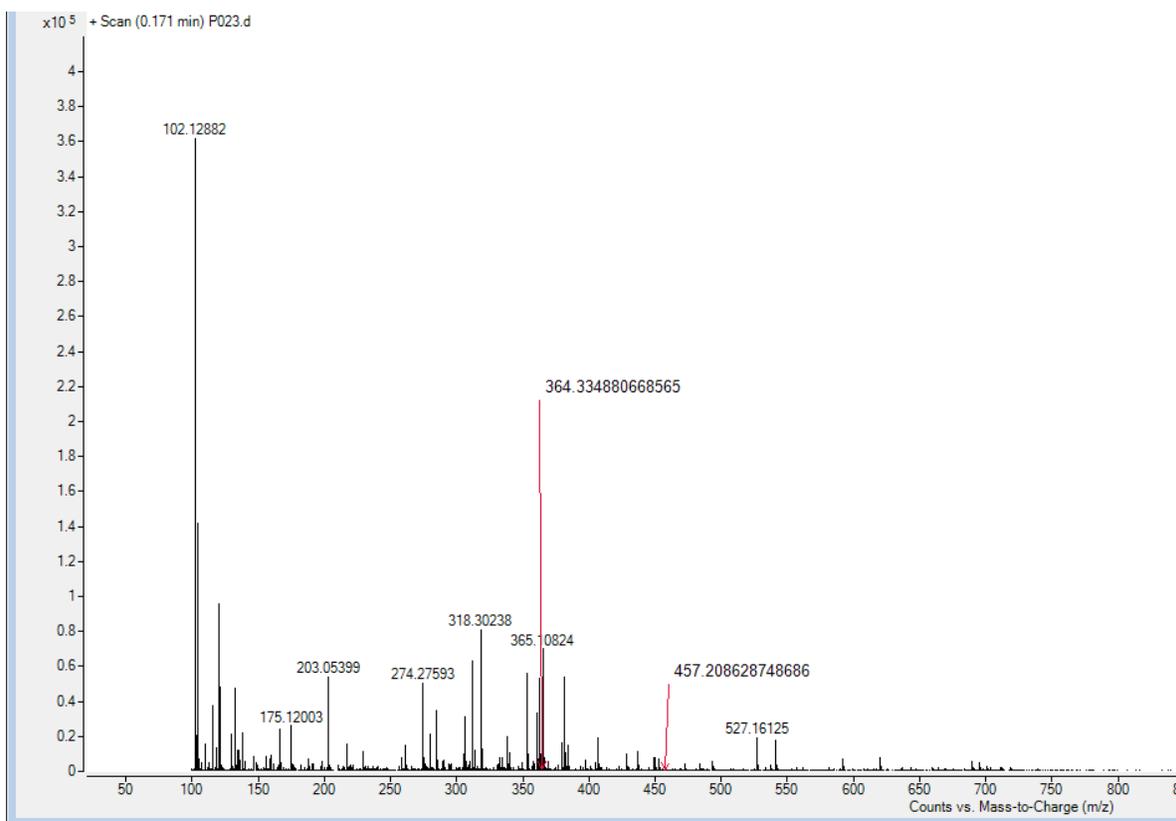
**Figura 13.** Espectro LC/MS del EAP del tratamiento crudo.

Las líneas que se muestran en rojo son masas de péptidos que se han reportado en la literatura, la masas 327.2957 y 402.4350 pudieran corresponder a los péptidos DHG y VGDI respectivamente, ambos han sido reportado con actividad antioxidante, tomado de la base de datos BIOPEP.



**Figura 14.** Espectro LC/MS del EAP del tratamiento procesado por FES.

Las líneas que se muestran en rojo son masas de péptidos de garbanzo que se han reportado en la literatura, la masas 327.2811 y 457.2077 pudieran corresponder a los péptidos DHG y HGDE respectivamente, ambos han sido reportado con actividad antioxidante, tomado de la base de datos BIOPEP y (Torres-Fuentes y col 2015).



**Figura 15.** Espectro LC/MS del EAP del tratamiento procesado por FES e hidrolizado por 5.5 h.

Las líneas que se muestran en rojo son masas de péptidos de garbanzo que se han reportado en la literatura, la masas 364.3348 y 457.2086 pudieran corresponder a los péptidos AHH y HGDE respectivamente, ambos han sido reportado con actividad antioxidante, tomado de (Torres-Fuentes y col 2015).

**Cuadro 9.** Masas obtenidas por espectrometría de los diferentes tratamientos.

	<b>Tratamiento</b>		
	<b>EAP Crudo</b>	<b>EAP FES</b>	<b>EAP FES hidrolizado</b>
	102.12881	120.08166	102.12882
	175.12021	274.27585	175.12003
	327.29571799	318.30207	203.05399
<b>Ion (m/z)</b>	365.10784	327.281146071246	274.27593
	402.435076761805	362.32840	318.30238
	437.19718	406.35541	365.10824
	541.17789	457.20778844279	364.334880668565
	689.21510		457.208628748686
			527.16125

Identificación de masas de posibles péptidos presentes en los EAP, se presentan las masas más abundantes arrojadas por el espectrómetro de masas.

se obtuvieron y relacionar esas masas con bioactividades reportadas en la literatura para proteína de garbanzo procesado y sin procesar.

En el tratamiento crudo se encontraron ocho masas en un rango de 102.12 – 689.2151 m/z más abundantes entre las cuales, dos de ellas se encontraron en la base de datos BIOPEP (327.2957 y 402.4350) a las cuales se les ha asociado con péptidos de garbanzo y una actividad antioxidante con secuencias de Asp-His-Gly y Val-Gly-Asp-Ile respectivamente.

Por otro lado en el tratamiento procesado por FES (**Figura 14**) se pudo observar un rango de masas de 120.0816 – 457.2077, observando que dos señales con masas de 327.2811 y 457.2077 se han reportado en la base de datos BIOPEP con que presentan actividad antioxidante y estos péptidos se han reportado con secuencias de aminoácidos Asp-His-Gly y His-Gly-Asp-Glu respectivamente, también se analizó el EAP FES con 5.5 h de hidrólisis, para estudiar el efecto de la hidrólisis sobre la generación de péptidos, en este tratamiento se encontraron las masas de 364.3348 y 457.1612 que corresponden a las secuencias de aminoácidos Ala-His-His e His-Gly-Asp-Glu respectivamente reportados como péptidos antioxidantes por Torres-Fuentes y col. (2015) quienes identificaron y caracterizaron péptidos antioxidantes de hidrolizados de garbanzo (Torres-Fuentes y col 2015) sin procesar. *R oligosporus*, es un microorganismo que sintetiza proteasas, las cuales ayudan a romper las proteínas presentes en los granos que se utilizan durante el proceso de fermentación. En el presente estudio, podemos observar que el proceso de Fermentación en Estado Solido podría ser una herramienta, la cual podría facilitar el

proceso de digestión de las proteínas de los granos. Lo cual ayudaría a obtener una mezcla compleja de péptidos con actividades biológicas específicas.

Durante el proceso de simulación se utilizaron las enzimas pepsina y pancreatina. La pepsina puede llevar a cabo rompimientos en aminoácidos aromáticos y donde hay Met y Leu bajo condiciones acidas (pH 2), en cambio la pancreatina por ser un conjunto de enzimas (quimotripsina y tripsina) posee una amplia especificidad de corte siempre y cuando se encuentre a pH de 7.5. El proceso de FES, es un proceso complejo donde están involucrados una gran cantidad de enzimas que sintetiza el hongo, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios para ver qué pasa con las fracciones proteínas NO solubles, así como también para conocer las secuencias y bioactividad específica de cada uno de los péptidos obtenidos.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron modelos matemáticos de predicción adecuados y reproducibles [ $R^2 \geq 0.80$ , nivel de significancia  $p < 0.05$ , coeficiente de varianza (CV)  $\leq 10\%$ , prueba de falta de ajuste  $> 0.1$ ] para cada una de las variables de respuesta estudiadas (GH, PS y AAox).
2. La mejor combinación de variables de proceso de fermentación es estado sólido (Temperatura y tiempo de fermentación) para la producción de HGO con valores altos de GH (35%), PS (5.3mg/mL) y AAox (5.18  $\mu\text{mol ET/ mg}$  proteína) fue  $TF=34^\circ\text{C}/tF=113$  h.
3. La FES incremento el GH (33%), en cuanto a la PS hubo una disminución en comparación con el crudo (38%) y la AAox incremento 9 veces.
4. El proceso de simulación gástrica nos permitió conocer la supervivencia que tienen los péptidos una vez consumidos y ser absorbidos por el tracto gastrointestinal.
5. La AAox de los péptidos en el extracto acuoso proteico sometidos a simulación gástrica incremento un 4.4% en comparación con el tiempo 0 de hidrólisis.
6. El proceso de FES permite obtener péptidos de garbanzo con potencial nutracéutico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbo S, Molina C, Jungmann R, Grusak M, Berkovitch Zy col. 2005. Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 111(2): 185-195.
- Abugoch LE, Romero N, Tapia CA, Silva J y Rivera M. 2008. Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *J Agric Food Chem*. 56(12): 4745-4750.
- Aguilar-Raymundo V y Vélez-Ruiz J. 2013. Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*. 7(2): 25-34.
- Aguilera Y, Dueñas M, Estrella I, Hernández T, Benitez Vy col. 2011. Phenolic profile and antioxidant capacity of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as affected by a dehydration process. *Plant foods for human nutrition*. 66(2): 187-195.
- Ajibola CF, Fashakin JB, Fagbemi TN y Aluko RE. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(10): 6685-6702.
- Alajaji SA y El-Adawy TA. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(8): 806-812.
- Aluko R. 2016. Editorial overview: Functional foods and nutrition. *Current Opinion in Food Science*(8): vii-ix.
- Ame S, Shigrenaga M y Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 7915-7922.
- Andary C y Mondolot-Cosson L. 1997. Histolocalization of plant polyphenols in tissues and cell walls. Some applications. En: Polyphenols in foods. Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, Aberdeen, Scotland. 41-44.
- Anderson JW. 1995. Dietary fibre, complex carbohydrate and coronary artery disease. *The Canadian Journal of Cardiology*. 11: 55G-62G.
- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo Ry col. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*. 106(1): 106-112.
- Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Atiba J, McLaren CEy col. 2000. Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia.
- Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QAY col. 2000. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clinical Cancer Res*. 6(12): 4684-4691.
- Asif M, Rooney LW, Ali R y Riaz MN. 2013. Application and opportunities of pulses in food system: a review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*. 53(11): 1168-1179.

- Asp N-G y Björck I. 1989. Nutritional properties of extruded foods. *Extrusion Cooking*: 399-434.
- Avanza M y Añón M. 2006. Efecto del tratamiento térmico en las propiedades fisicoquímicas de albúminas y globulinas de *Amaranthus Hypochondriacus*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. Resumen: E-031*: 1-4.
- Babu PD, Bhakayaraj R y Vidhyalakshmi R. 2009. A low cost nutritious food "Tempeh"- a review. *World Journal Dairy Food Science*. 4(1): 22-27.
- Badshah A, Khan M, Bibi N, Khan M, Ali Sy col. 2003. Quality studies of newly evolved chickpea cultivars. *Advances in Food Sciences*. 25(3): 96-99.
- Ballester M y Honorem V. 1996. Antioxidantes, radicales libres y salud: un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina Clínica*. 107(13): 509-515.
- Barbana C y Boye JI. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*. 43(6): 1642-1649.
- Barrios-González J. 2012. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47(2): 175-185.
- Baumann U y Bisping B. 1995. Proteolysis during tempe fermentation. *Food Microbiology*. 12: 39-47.
- Beckman KB y Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. 78(2): 547-581.
- Belstein J. 2001. The protective factors of fruit and vegetables. *Food Technology International*. 10: 12-14.
- Bellomo G y Mirabelli F. 1992. Oxidative Stress and Cytoskeletal Alterationsa. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 663(1): 97-109.
- Benditt DG, Pritchett L, Smith WM, Wallace AG y Gallagher JJ. 1978. Characteristics of atrioventricular conduction and the spectrum of arrhythmias in low-ganong-levine syndrome. *Circulation*. 57(3): 454-465.
- Bhatty R. 1982. Albumin proteins of eight edible grain legume species. Electrophoretic patterns and amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30(3): 620-622.
- Bisping B, Hering L, Baumann U, Denter J, Keuth Sy col. 1993. Tempe fermentation: Some aspects of formation of  $\gamma$ -linolenic acid, proteases and vitamins. *Biotechnology Advances*. 11(3): 481-493.
- Blair D, HABICHT J-P, Sims EA, SYLWESTER D y Abraham S. 1984. Evidence for an increased risk for hypertension with centrally located body fat and the effect of race and sex on this risk. *American Journal of Epidemiology*. 119(4): 526-540.
- Bodenheimer T, Wagner EH y Grumbach K. 2002. Improving primary care for patients with chronic illness. *Jama*. 288(14): 1775-1779.
- Boschin G, Scigliuolo GM, Resta D y Arnoldi A. 2014. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*. 145: 34-40.
- Cabiscol E, Tamarit J y Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*. 3(1): 3-8.
- Cadenas E. 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 6(4): 391-397.

- Campos-Vega R, Loarca-Piña G y Oomah BD. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*. 43(2): 461-482.
- Campos-Vega R, Reynoso-Camacho R, Pedraza-Aboytes G, Acosta-Gallegos J, Guzman-Maldonado Sy col. 2009. Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food science*. 74(7): T59-T65.
- Cárdenas Hidalgo MK. 2016. Obtención de aislados proteicos de chíá (*Salvia hispánica* L.) y evaluación in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.
- Case DB, Atlas SA, Laragh JH, Sealey JE, Sullivan PAy col. 1978. Clinical experience with blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system by an oral converting-enzyme inhibitor (SQ 14,225, captopril) in hypertensive patients. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 21(3): 195-206.
- Casey R, Domoney C y Smith A. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products.
- Çiftçi H, Ozkaya A, Cevrimli BS y Bakoglu A. 2010. Levels of fat-soluble vitamins in some foods. *Asian Journal of Chemistry*. 22(2): 1251.
- Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista Jy col. 2000. Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(1): 79-84.
- Córdova-Villalobos JÁ, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta My col. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*. 50(5): 419-427.
- Cruzado M y Cedrón JC. 2013. Nutracéuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química*. 26(1-2): 33-36.
- Cuevas-Rodríguez E, Milan-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Cardenas-Valenzuela O y Reyes-Moreno C. 2004. Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. *LWT-Food Science and Technology*. 37(1): 59-67.
- Cheftel J, Cuq J y Lorient D. 1993. Aminoácidos péptidos y proteínas. "Química de los alimentos". *Fenema. OR Acribia, 2da edición. España. Capítulo. 5: 275-414*.
- Chen AY y Chen YC. 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*. 138(4): 2099-2107.
- Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K y Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(1): 49-53.
- Cheng K-C, Wu J-Y, Lin J-T y Liu W-H. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* spp. *European Food Research and Technology*. 236(6): 1107-1113.
- Cheung H-S, Wang F-I, Ondetti MA, Sabo EF y Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme.

- Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 255(2): 401-407.
- Cheung H y Cushman D. 1973. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 293(2): 451-463.
- Chi C-F, Wang B, Wang Y-M, Zhang B y Deng S-G. 2015. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*. 12: 1-10.
- Cho S-J, Oh S-H, Pridmore RD, Juillerat MA y Lee C-H. 2003. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(26): 7664-7670.
- Davila M, Sangronis E y Granito M. 2003. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 53: 348-354.
- Daza CH. 2002. La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colombia Médica*. 33(2): 72-80.
- De Backer G, Ambrosionie E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R y col. 2003. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 10(1 suppl): S1-S78.
- de Castro RJS y Sato HH. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*. 74: 185-198.
- De Reu J, Ramdaras D, Rombouts F y Nout M. 1994. Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. *Food chemistry*. 50(2): 171-175.
- Decker EA. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*. 55(11): 396-398.
- Denter J y Bisping B. 1994. Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 22(1): 23-31.
- Denter J, Rehm H-J y Bisping B. 1998. Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 45(2): 129-134.
- Dey TB y Kuhad RC. 2014. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnology Reports*. 4: 120-127.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA y Keaney Jr JF. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England Journal of Medicine*. 337(6): 408-416.
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*. 77(2): 67-82.
- Economos C y Clay W. 1999. Nutritional and health benefits of citrus fruits. *Energy (kcal)*. 62(78): 37.

- Egounlety M y Aworh O. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*. 56(2): 249-254.
- Elkhalifa AEO, Bernhardt R, Bonomi F, Iametti S, Pagani MA y col. 2006. Fermentation modifies protein/protein and protein/starch interactions in sorghum dough. *European Food Research and Technology*. 222(5-6): 559.
- Escott-Stump S. 2009. Krause, dietoterapia, Elsevier/Masson.
- Espín JC y Tomás-Barberán FA. 2005. Constituyentes bioactivos no-nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. *Alimentos funcionales*: 101-165.
- Esquivel Solís V y Jiménez Fernández M. 2010. Aspectos nutricionales en la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista costarricense Salud Pública*. 19(1): 42-47.
- Eyre H, Kahn R, Robertson RM, Clark NG, Doyle Cy col. 2004. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association\*†. *CA: a Cancer Journal For Clinicians*. 54(4): 190-207.
- FAOSTAT. 2014. Producción mundial de garbanzo.
- FDA. 2001.
- Fedtke N, Boucheron J, Walker V y Swenberg JA. 1990. Vinyl chloride-induced DNA adducts II: Forming and persistence of 7-(2'oxoethyl) guanine and N2, 3 ethenoguanine in rat tissue DNA. *Carcinogenesis*. 11(8): 1287-1292.
- Fernando RL, Varghese Z y Moorhead JF. 1998. Differential ability of cells to promote oxidation of low density lipoproteins in vitro. *Clinica Chimica Acta*. 269(2): 159-173.
- Ferreira S. 1965. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 24(1): 163-169.
- Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(1): 6-29.
- Frimpong A. 2010. A study of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed starch concentration, composition and enzymatic hydrolysis properties.
- Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G y Añón MC. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*. 126(3): 878-884.
- Ghribi AM, Sila A, Przybylski R, Nedjar-Arroume N, Makhoulouf I y col. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *Journal of Functional Foods*. 12: 516-525.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R y Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*. 37(2): 123-131.
- Girón-Calle J, Vioque J, del Mar Yust M, Pedroche J, Alaiz My col. 2004. Effect of chickpea aqueous extracts, organic extracts, and protein concentrates on cell proliferation. *Journal of Medicinal Food*. 7(2): 122-129.

- Gisela PR. 1997. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 11(1): 46-57.
- Glass GA y Gershon D. 1984. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochemical Journal*. 218(2): 531-537.
- Goldstein JL, Ho Y, Basu SK y Brown MS. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(1): 333-337.
- Gonzalo JR y Alonso MG. 2002. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimentación Nutrición y Salud*. 9(2): 31-38.
- Gorinstein S, Martin-Belloso O, Lojek A, Číž M, Soliva-Fortuny Ry col. 2002. Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(10): 1166-1170.
- Guardado-Félix D, Serna-Saldivar SO, Cuevas-Rodríguez EO, Jacobo-Velázquez DA y Gutiérrez-Urbe JA. 2017. Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chemistry*. 226: 69-74.
- Guo H, Kouzuma Y y Yonekura M. 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*. 113(1): 238-245.
- Guzmán-Urriarte ML, Sánchez-Magaña LM, Angulo-Meza GY, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado Ry col. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. *Food and Nutrition Sciences*. 4(4): 480.
- Hachmeister KA y Fung DY. 1993. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*. 19(3): 137-188.
- Haider SR, Reid HJ y Sharp BL. 2012. Tricine-SDS-PAGE. *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*: 81-91.
- Häkkinen SH y Törrönen AR. 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*. 33(6): 517-524.
- Halliwell B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 46(5): 531-542.
- Halliwell B y Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142(2): 231-255.
- Hannum SM. 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(1): 1-17.
- Haque E y Chand R. 2008. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*. 227(1): 7-15.
- Harman D. 1993. Free radical involvement in aging. *Drugs & aging*. 3(1): 60-80.
- He R, Ma H, Zhao W, Qu W, Zhao Jy col. 2011. Modeling the QSAR of ACE-inhibitory peptides with ANN and its applied illustration. *International Journal of Peptides*. 2012.

- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina Ry col. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*. 155(4): 381-386.
- Hesseltine CW. 1965. A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia*. 57(2): 149-197.
- Hoyle NT y Merritt J. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*. 59(1): 76-79.
- Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F y Daydé J. 2008. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chemistry*. 109(4): 709-721.
- Hulse J. 1989. Nature, composition and utilization of grain legumes. *Uses of Tropical Grain Legumes*. 27: 11.
- Hutkins RW. 2008. Microbiology and technology of fermented foods, John Wiley & Sons.
- Huynh NT, Van Camp J, Smagghe G y Raes K. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *International Journal Of Molecular Sciences*. 15(11): 19369-19388.
- Ikasari L y Mitchell D. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10(3): 320-324.
- Jaruga P y Dizdaroglu M. 1996. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic acids research*. 24(8): 1389-1394.
- Jin B, van Leeuwen HJ, Patel B, Doelle HW y Yu Q. 1999. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. *Process Biochemistry*. 34(1): 59-65.
- Jukanti AK, Gaur PM, Gowda C y Chibbar RN. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*. 108(S1): S11-S26.
- Kalt W. 2001. Health functional phytochemicals of fruit. *Horticultural Reviews*. 27: 269-315.
- Karyadi D y Lukito W. 2000. Functional food and contemporary nutrition-health paradigm: tempeh and its potential beneficial effects in disease prevention and treatment, Elsevier.
- Kaur C y Kapoor HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*. 36(7): 703-725.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK y He J. 2004. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *Journal of hypertension*. 22(1): 11-19.
- Kedziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, Kornatowski T, Motyl Jy col. 2004. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 9(4A): 635-641.
- Keuth S y Bisping B. 1993. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(5): 427-434.
- Kiers JL, Nout MR, Rombouts FM, Nabuurs MJ y van der Meulen J. 2007. A high molecular weight soluble fraction of tempeh protects against fluid losses in

- Escherichia coli-infected piglet small intestine. *British Journal of Nutrition*. 98(02): 320-325.
- King A y Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 99(2): 213-218.
- Klein BP y Kurilich AC. 2000. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *Horticultural Science*. 35(4): 580-584.
- Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe My col. 1988. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 155(1): 332-337.
- Korhonen H. 2002. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*. 55(2): 79-88.
- Kuznetsov N, Abulela A, Kulagin I, Neskromnyi V y Babin I. 1995. Lipid peroxidation in patients with hypertension and renal hypertension against a background of diabetes mellitus. *Likars' ka sprava/Ministerstvo okhorony zdorov'ia Ukrainy*(5-6): 117-118.
- Lachance PA, Nakat Z y Jeong W-S. 2001. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*. 17(10): 835-838.
- Landmesser U y Harrison DG. 2001. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coronary Artery Disease*. 12(6): 455-461.
- Larone DH. 1993. Medically important fungi: a guide to identification, American Society for Microbiology.
- Lassègue B y Clempus RE. 2003. Vascular NAD (P) H oxidases: specific features, expression, and regulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 285(2): R277-R297.
- Lebiedzińska A y Szefer P. 2006. Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry*. 95(1): 116-122.
- Lee I-H, Hung Y-H y Chou C-C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*. 121(2): 150-156.
- Levine RL y Stadtman ER. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*. 36(9): 1495-1502.
- Lim G, Tan T y Rahim N. 1987. Variations in amylase and protease activities among *Rhizopus* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 3(3): 319-322.
- Lonsane B, Ghildyal N, Budiartman S y Ramakrishna S. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 7(6): 258-265.
- Mahan LK, Escott-Stump S y Raymond JL. 2013. Krause dietoterapia, Elsevier.
- Malkowicz SB, McKenna WG, Vaughn DJ, Wan XS, Propert KJy col. 2001. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 48(1): 16-28.
- Marcuse R. 1960. Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*. 186(4728): 886-887.
- Martínez-Navarrete N, Vidal MdMC y Lahuerta JJM. 2008. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética*. 12(2): 64-68.
- Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, Tomizuka N y Suzuki H. 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme

- inhibitors derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51(6): 1581-1586.
- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA y De Caterina R. 2010. Nutraceuticals and Prevention of Atherosclerosis: Focus on  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mediterranean Diet Polyphenols. *Cardiovascular Therapeutics*. 28(4): e13-e19.
- Mauricio Hernández Ávila JRD, Teresa Shamah Levy, Lucia Cuevas Nasu, Luz María Gómez Acosta, Elsa Berenice Gaona Pineda, Martín Romero Martínez, Ignacio Méndez Gómez-Humarán, Pedro Saturno Hernández, Salvador Villalpando Hernández, Juan Pablo Gutiérrez, Marco Antonio Ávila Arcos, Eric Rolando Mauricio López, Jesús Martínez Domínguez, David Efraín García López,. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.
- McCabe MJ, Nicotera P y Orrenius S. 1992. Calcium-Dependent Cell Death Role of the Endonuclease, Protein Kinase C, and Chromatin Conformation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 663(1): 269-278.
- Medina-Godoy S, Ambriz-Pérez DL, Fuentes-Gutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado Ry col. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(9): 1974-1981.
- Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz My col. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*. 41(10): 1973-1977.
- Meisel H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*. 8(5-6): 363-373.
- Mellish K. 1999. Phytonutrients, the nutrients of the future. *Ingr Health Nutr*. 2: 25-26.
- Messina M, McCaskill-Stevens W y Lampe JW. 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(18): 1275-1284.
- Meyers RH y Montgomery DC. 2002. Response surface methodology. *Process and Product Optimisation Using Design Experiments, second ed, Willey, New York, NY*.
- Miszekiewicz H, Bizukojc M, Rozwandowicz A y Bielecki S. 2003. Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentations. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 68(2; PART A): 313-316.
- Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB y Croft KD. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 27(3): 152-159.
- Moskovitz J, Yim MB y Chock PB. 2002. Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 397(2): 354-359.
- Mulyowidarso R y Buckle K. 1991. Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. *International Journal of Food Science & Technology*. 26(6): 595-606.
- Müntz K, Belozersky M, Dunaevsky Y, Schlereth A y Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*. 52(362): 1741-1752.

- Murthy VS, Waldron TL, Goldberg ME y Vollmer RR. 1977. Inhibition of angiotensin converting enzyme by SQ 14,225 in conscious rabbits. *European journal of pharmacology*. 46(3): 207-212.
- Nakahara T, Yamaguchi H y Uchida R. 2012. Effect of temperature on the stability of various peptidases during peptide-enriched soy sauce fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113(3): 355-359.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K y Takano T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*. 78(6): 1253-1257.
- Nam K, You S y Kim S. 2008. Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*. 73(4): C249-C255.
- Olivares-Corichi IM, Medina-Navarro R, Torres-Ramos D y Montes-Cortés DH. 2006. Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 14(4): 237-240.
- OMS. 2002. Quantifying selected major risks to health. *The World Health Report*. 2002: 47-97.
- OMS. 2015. Día Mundial de la Hipertensión.
- OMS. 2015. Noncommunicable diseases.
- Organization WH. 2002. Quantifying selected major risks to health. *The World Health Report*. 2002: 47-97.
- Ortega-Camarillo C y Guzmán-Grenfell A. 1999. Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Molecular Reproduction and Development*. 52(3): 264-268.
- Ottesen M y Svendsen I. 1970. [11] The subtilisins. *Methods in enzymology*. 19: 199-215.
- Packer L, Hiramatsu M y Yoshikawa T. 1999. Antioxidant food supplements in human health, Academic Press.
- Pandey A, Soccol CR y Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35(10): 1153-1169.
- Paredes-Lopez O y Harry G. 1989. Changes in selected chemical and antinutritional components during tempeh preparation using fresh and hardened common beans. *Journal of Food Science*. 54(4): 968-970.
- Paredes López O, Guevara Lara F y Bello Pérez LA. 2009. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*. 92(092).
- Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán Fy col. 2002. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(9): 960-965.
- Pi-Sunyer FX, Becker DM, Bouchard C, Carleton R, Colditz Gy col. 1998. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68(4): 899-917.
- Plietz P, Damaschun G, Zirwer D, Gast K, Schwenke Ky col. 1986. Shape and quaternary structure of alpha-globulin from sesame (*Sesamum indicum* L.) seed as revealed by small angle x-ray scattering and quasi-elastic light scattering. *Journal of Biological Chemistry*. 261(27): 12686-12691.

- Prieto GM. 2012. Las legumbres. arveja y garbanzo. *Para mejorar la producción*(47).
- Prinsen Geerligts H. 1895. Enige Chinese voedingsmiddelen uit soyabean bereid. *Pharm. Weekblad*. 32.
- Rai AK, Sanjukta S y Jeyaram K. 2015. Production of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory (ACE-I) Peptides during Milk Fermentation and Their Role in Reducing Hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (just-accepted): 00-00.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3): 26-27.
- Ramírez-Torres G, Ontiveros N, Lopez-Teros V, Ibarra-Diarte JA, Reyes-Moreno Cy col. 2017. Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*. 22(11): 1905.
- Rao GN y Berk BC. 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation Research*. 70(3): 593-599.
- Ravi R. 2005. Rheology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour suspensions and characterisation of fried product–Boondi, University of Mysore.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang My col. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9): 1231-1237.
- Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez E, Milán-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela O y Barrón-Hoyos J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(3): 271-278.
- Ricketts M-L, Moore DD, Banz WJ, Mezei O y Shay NF. 2005. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16(6): 321-330.
- Rivett A. 1985. Regulation of intracellular protein turnover: covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Current Topics in Cellular Regulation*. 28: 291-337.
- Roberfroid MB. 1999. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *The Journal of Nutrition*. 129(7): 1398S-1401s.
- Rochín-Medina JJ, Gutiérrez-Dorado R, Sánchez-Magaña LM, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EOy col. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 66(5): 498-504.
- Romero Alvira D, Villalba Martín M y Bueno Gómez J. 1991. Papel de la prooxidacion y la antixidacion en la etiologia de la hipertension arterial. *Medicina clínica*. 97(14).
- Romero Alvira D, Villalba Martín MP, Mur Villaplana M, Cabeza Lambán F, Guerrero Navarro Ly col. 1990. Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana. *Medicina clínica*. 94(2): 69-75.
- Ross JA y Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of Nutrition*. 22(1): 19-34.

- Roubos-van den Hil PJ, Schols HA, Nout MR, Zwietering MH y Gruppen H. 2010. First characterization of bioactive components in soybean tempe that protect human and animal intestinal cells against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 58(13): 7649-7656.
- SAGARPA-SIAP. 2017. Producción nacional de garbanzo.
- Salunkhe DK y Kadam S. 1989. Crc handbook of world food legumes: nutritional chemistry, processing technology, and utilization.
- Samaranayaka AG y Li-Chan EC. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3(4): 229-254.
- Sánchez-Magana LM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Valdez-Ortiz Ay col. 2014. Solid-state bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 65(5): 558-564.
- Sánchez-Valle V y Méndez-Sánchez N. 2013. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur de Mexico*. 20(3): 161-168.
- Sanjukta S, Rai AK, Muhammed A, Jeyaram K y Talukdar NC. 2015. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods*. 14: 650-658.
- Santiago RC, Moreira-Araújo R, e Silva MP y Arêas J. 2001. The potential of extruded chickpea, corn and bovine lung for malnutrition programs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2(3): 203-209.
- Santos-Buelga C y Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7): 1094-1117.
- Sarmadi BH y Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31(10): 1949-1956.
- Sarrette M, Nout M, Gervais P y Rombouts F. 1992. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37(4): 420-425.
- Scandalios JG. 1992. Molecular biology of free radical scavenging systems, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Segev A, Badani H, Kapulnik Y, Shomer I, Oren-Shamir My col. 2010. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of food science*. 75(2).
- Sharma A y Khetarpaul N. 1997. Effect of fermentation on phytic acid content and in vitro digestibility of starch and protein of rice-blackgram dhal-whey blends. *Journal of food Science and Technology*. 34(1): 20-23.
- Shi X, Jiang H, Mao Y, Ye J y Saffiotti U. 1996. Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology*. 106(1-3): 27-38.
- Shimamura T, Sakaguchi K, Noguchi K, Ishiyama M, Fujimura Yy col. 2007. Assay of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyric acid. *Analytical Biochemistry*. 364(2): 104-111.

- Shin Z-I, Yu R, Park S-A, Chung DK, Ahn C-Wy col. 2001. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(6): 3004-3009.
- Shurtleff W y Aoyagi A. 2001. The book of tempeh, a cultured soyfood. *Ten Speed, Berkeley*.
- Simon JA, Hodgkins ML, Browner WS, Neuhaus JM, Bernert JTy col. 1995. Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology*. 142(5): 469-476.
- Singh F y Diwakar B. 1993. Nutritive value and uses of pigeonpea and groundnut, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Singh U, Subrahmanyam N y Kumar J. 1991. Cooking quality and nutritional attributes of some nely developed cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 55(1): 37-46.
- Slater TF. 1988. Free radical mechanisms in tissue injury. En. *Cell Function and Disease*, Springer: 209-218.
- Stadtman ER y Oliver CN. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*. 266(4): 2005-2008.
- Steinkraus K. 1995. Handbook of Indigenous Fermented Foods, revised and expanded, CRC Press.
- Steinkraus K, Cullem R, Pederson C, Nellis L y Gavitt B. 1983. Indonesian Tempeh and Related Fermentations: Handbook of Indeginous Fermented Foods, Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Steinkraus K, VanBuren J, Hackler L y Hand D. 1965. A pilot-plant process for production of dehydrated tempeh. *Food Technology*. 19(1): 63-+.
- Tahir AABAB. 2015. Nutritional Quality of Fermented Sorghum-Soybean Composite Flour, uofk.
- Tintoré SG, Guerrero LC, Ríos LJC y Ayala ALM. 2013. Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales.
- Torino MI, Limón RI, Martínez-Villaluenga C, Mäkinen S, Pihlanto Ay col. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*. 136(2): 1030-1037.
- Torres-Fuentes C, del Mar Contreras M, Recio I, Alaiz M y Vioque J. 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food chemistry*. 180: 194-202.
- Torres WH. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens Bioquim*. 26: 19-53.
- Tosh SM y Yada S. 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*. 43(2): 450-460.
- Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower MEy col. 1995. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*. 332(8): 481-487.
- Trock BJ, Hilakivi-Clarke L y Clarke R. 2006. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(7): 459-471.

- Tsimidou M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*. 10(2): 99-116.
- UAM. 2014. Enfermedades crónico-degenerativas: primera causa de mortalidad en México.
- Usmani N y Noorani R. 1986. Studies on soybean tempeh. I. Optimization of factors affecting fermentation in commercial production of tempeh with respect to pilot plant studies. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 29: 145-147.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur My col. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39(1): 44-84.
- Van Der Merwe R y SMIT A. 2016. Seed yield potential of vegetable type soybean genotypes in south africa. *Índice–index*.
- Varea ÁB, Abdelaziz KM, Zaragoza JAA, Blasco CB, Aguilar PSy col. 2015. El estrés oxidativo como predictor de longevidad; estudio de casos y controles. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*. 50(1): 16-21.
- Vega A, Ampuero N, Díaz L y Lemus R. 2005. El Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista chilena de nutrición*. 32(3): 208-214.
- Veiga Alvarez E, Aguilar Doreste J, Clavo Varas B y LLanes Menéndez L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*. 22(89): 201-216.
- Vennat B, Pourrat A, Pourrat H, Gross D, Bastide Py col. 1988. Procyanidins from the roots of *Fragaria vesca*: characterization and pharmacological approach. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 36(2): 828.
- Vogt W. 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(1): 93-105.
- Waladkhani A y Clemens MR. 1998. Effect of dietary phytochemicals on cancer development. *International Journal of Molecular Medicine*. 1: 747-754.
- Wang H, Cao G y Prior RL. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(3): 701-705.
- Wang H, Swain E y Hesseltine C. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *J. Food Sci*. 40: 168-170.
- Wang W, Mejia D y Gonzalez E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4(4): 63-78.
- Watanabe N, Fujimoto K y Aoki H. 2007. Antioxidant activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58(8): 577-587.
- Williams P y Singh U. 1987. Nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programmes. *The chickpea*: 329-356.
- Winarno F. 1986. Tempe in Legume-Based Fermented Foods. Reddy N, Pierson M, Salunkhe D, Eds, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Witztum JL y Steinberg D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 88(6): 1785.
- Wolff SP, Garner A y Dean RT. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences*. 11(1): 27-31.

- Wongputtisiri P, Khanongnuch C, Pongpiachan P y Lumyong S. 2007. Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation.
- Wood J y Grusak M. 2007. Nutritional value of chickpea. *Chickpea breeding and management*. 101-142.
- Xu S y Touyz RM. 2006. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Canadian Journal of Cardiology*. 22(11): 947-951.
- Xue Z, Wen H, Zhai L, Yu Y, Li Yy col. 2015. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*. 77: 75-81.
- Yang Y, Marczak ED, Yokoo M, Usui H y Yoshikawa M. 2003. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(17): 4897-4902.
- Ye X, Ng T y Rao P. 2002. Cicerin and arietin, novel chickpea peptides with different antifungal potencies. *Peptides*. 23(5): 817-822.
- Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takeyama Hy col. 2001. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 128(1): 27-33.
- You L, Zhao M, Regenstein JM y Ren J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 120(3): 810-816.
- Yust Mdel M, Millan-Linares Mdel C, Alcaide-Hidalgo JM, Millan F y Pedroche J. 2012. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal Science of Food Agriculture*. 92(9): 1994-2001.
- Zamora JD. 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 34(1): 17-26.
- Zanuy MV. 2013. Nutrición e hipertensión arterial. *Hipertensión y riesgo vascular*. 30(1): 18-25.
- Zhang J-H, Tatsumi E, Ding C-H y Li L-T. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chemistry*. 98(3): 551-557.
- Zhu Y, Fan J, Cheng Y y Li L. 2008. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (*Meitauza*) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*. 19(7): 654-661.
- Zhuang H, Tang N y Yuan Y. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*. 5(4): 1810-1821.
- Zorrilla García AE, Eirez Izquierdo M y Izquierdo Expósito M. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 23(1): 51-57.