

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes de proteínas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

María Fernanda González Osuna

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes de proteínas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

María Fernanda González Osuna



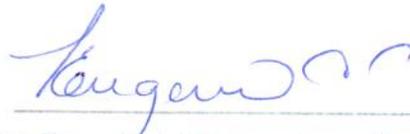
Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez
Directora de la tesis



Dr. Francisco Javier Wong Corral
Miembro del Comité de tesis



Dr. Wilfrido Torres Arreola
Miembro del Comité de tesis



Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes
Miembro del Comité de tesis

Hermosillo, Sonora a 24 de enero de 2020.

Asunto: Cesión de derechos

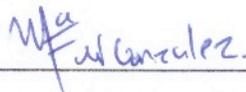
**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes de proteínas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

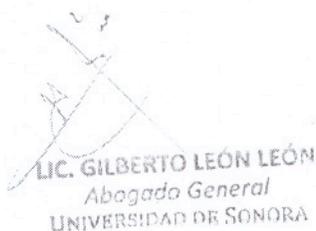
La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



María Fernanda González Osuna



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por brindarme una excelente formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Carmen Lizette Del Toro por dirigirme en mis estudios de maestría. Muchas gracias por todos sus consejos, por su guía y enseñanzas. Gracias por enseñarme a no rendirme en ningún momento y mostrar lo mejor de mí.

A los doctores Carmen Lizette Del Toro y Wilfrido Torres Arreola por todo su apoyo y orientación en la realización del trabajo experimental de esta tesis que, sin ustedes, no habría sido posible.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Carmen Lizette Del Toro, Dr. Francisco Javier Wong, Dr. Wilfrido Torres y Dra. Eugenia Lugo, por sus valiosas aportaciones en mi trabajo de investigación, por brindarme sus recomendaciones y ser parte fundamental de mi formación como maestra en ciencias.

A mis profesores Dra. Marina Ezquerro, Dra. Ofelia Rouzaud, Dra. Ana Ledesma, Dr. Enrique Márquez, Dr. José Luis Cárdenas, Dr. Jesús Borboa y M. C. Guillermo Rodríguez, por toda su ayuda y sus valiosas enseñanzas.

Al personal administrativo del Departamento, en especial a Coty Favela por todo el apoyo, guía y cariño que siempre nos demuestra a todos los alumnos.

A los integrantes del Laboratorio de Productos Marinos: Francisco Cadena, Ángel Tapia, Laura Márquez y Dania Esparza por su compañerismo y amistad. Gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología: Andrés Levy y Rafael Dávila, por el apoyo y las bromas que hacían más ameno nuestro trabajo diario.

A mis hermanos académicos, Liliana Maribel Perez, Aline Reyes Díaz y Ricardo Iván González, por toda la paciencia al explicarme, por enseñarme a realizar mi trabajo de la mejor manera. Gracias por sus consejos, su tiempo y su amistad.

A los integrantes del “Antioxidantes Team” por todas sus observaciones y sugerencias que me han permitido mejorar mi desempeño.

A Isabel Arredondo Parada, Isa, por su apoyo y consejos, por todas las tazas de café que compartimos durante las tardes de arduo trabajo.

A Sol Villalba Urquidy, mi mejor amiga, por todo el cariño, la ayuda incondicional y tantas pláticas y risas que compartimos durante las clases, los seminarios, en el laboratorio y en nuestro día a día. Gracias por el apoyo constante y por motivarme a no darme por vencida con este proyecto; pero, sobre todo, por su amistad.

A mi mejor amigo, Damian Plascencia Martínez, por siempre escucharme y darme ánimos. Por todo el apoyo, cariño y las risas a lo largo de nuestra vida.

A mis amigos Claudia Murrieta, Samara Solorio, Diana Fimbres, Jesús Encinas y Sócrates Almirudis por todas las risas, su cariño y sus sugerencias.

DEDICATORIA

A mis padres, Álvaro y María del Carmen, quienes me han llenado de amor, inmenso cariño y las mejores enseñanzas.

A mis adorados hermanos: Jorge Armando, María Alejandra y José Álvaro, por ser mis cómplices de toda la vida.

¡Gracias por hacer todo esto posible!

RESUMEN

El incremento en la prevalencia de las enfermedades crónico degenerativas en la población mundial, donde el estrés oxidativo juega un papel muy importante, ha impulsado la identificación de compuestos antioxidantes de fuentes naturales, como los péptidos provenientes de matrices vegetales, que puedan emplearse en la prevención y tratamiento de dichas enfermedades. El alto contenido de proteína del garbanzo, además de la composición de aminoácidos, lo hacen una fuente idónea para la obtención de péptidos antioxidantes. El método más utilizado para la obtención de péptidos es la hidrólisis enzimática, la cual puede ser apoyada con un pretratamiento con ultrasonido para facilitar la obtención de péptidos con mayor capacidad antioxidante. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de hidrolizados y fracciones peptídicas antioxidantes de proteína del garbanzo. Se partió de la extracción de proteínas de garbanzo (globulinas, glutelinas y albúminas) con base en su solubilidad, se hidrolizaron con savinasa y se determinó la actividad antioxidante con tres ensayos (ABTS, FRAP y efecto protector en eritrocitos) a las proteínas y los hidrolizados, además se analizaron en electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se aplicó un pretratamiento con pulsos ultrasónicos al extracto de globulina por ser el que presentó mayor actividad antioxidante, seguido de una hidrólisis con savinasa para proceder a determinar el grado de hidrólisis, el perfil electroforético, la actividad antioxidante y el perfil de aminoácidos de los hidrolizados obtenidos. El hidrolizado de globulina obtenido con savinasa (HGb) mostró 91.44% de inhibición de ABTS, 73.04% de inhibición de hemólisis y 5185.57 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para el ensayo de FRAP; por su parte, el hidrolizado de globulina obtenido con un pretratamiento de pulsos ultrasónicos e hidrólisis

(HGb-60) mostró 48.25% de inhibición de ABTS, 100% de inhibición de hemólisis y 2188.53 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra en el ensayo de FRAP. HGb mostró un alto poder reductor, mientras que HGb-60 exhibió una amplia capacidad de donación de protones (HAT). Finalmente, se obtuvieron fracciones peptídicas de HGb y HGb-60 y se determinó la actividad antioxidante, proponiéndose el mecanismo HAT como el mecanismo empleado para ejercer el efecto antioxidante. El uso del pretratamiento con pulsos ultrasónicos permitió la obtención de hidrolizados y fracciones peptídicas antioxidantes con capacidad de donación de hidrógeno, exhibiendo un notorio efecto protector en eritrocitos humanos.

CONTENIDO

	Página
DERECHOS DE AUTOR	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Garbanzo.....	3
Generalidades del Garbanzo.....	3
Importancia del Cultivo.....	3
Proteínas.....	6
Beneficios Potenciales de los Compuestos Nutracéuticos del Garbanzo.....	9
Péptidos Bioactivos.....	9
Interés en la Identificación de Péptidos Bioactivos.....	10
Péptidos Antioxidantes.....	10
Mecanismos de la Actividad Antioxidante.....	12
Medición de la Actividad Antioxidante.....	12
Medición de la Actividad de Atrapamiento del Radical Libre ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS).....	13
Medición del Efecto Protector en Eritrocitos Humanos.....	15
Medición del Poder Antioxidante Reductor Férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP).....	15
Péptidos Antioxidantes de Legumbres.....	17
Propiedades de los Hidrolizados Proteicos, Fracciones Peptídicas y Péptidos del Garbanzo.....	19
Mecanismos de Obtención de Péptidos Antioxidantes.....	21
Hidrólisis Enzimática.....	21
Digestión Gastrointestinal.....	21
Fermentación Microbiana.....	21
Perspectivas.....	22
Ultrasonido.....	22
Fundamento del Ultrasonido.....	22
Pulsos Ultrasónicos.....	22
Variables de los Pulsos Ultrasónicos.....	23
Fenómeno de Cavitación.....	25
Clasificación y Aplicación de los Pulsos Ultrasónicos en Alimentos.....	28
Conservación.....	28
Extracción.....	28
Pretratamiento con Pulsos Ultrasónicos para la Obtención de Péptidos.....	29
Péptidos Antioxidantes.....	29

HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
Objetivo General.....	32
Objetivos Particulares.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Diseño Experimental.....	33
Materiales.....	33
Metodología.....	34
Composición Química del Garbanzo.....	35
Obtención de la Harina de Garbanzo.....	35
Extracción de Proteínas de la Harina de Garbanzo.....	36
Cuantificación de Proteína.....	36
Obtención de Hidrolizados.....	36
Cuantificación de Proteína Soluble.....	37
Determinación de la Actividad Antioxidante.....	37
Medición de la Actividad de Atrapamiento del Radical Libre ácido 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS).....	37
Medición del Efecto Protector en Eritrocitos Humanos.....	37
Medición del Poder Antioxidante Reductor Férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP).....	38
Pretratamiento con Pulsos Ultrasónicos.....	39
Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida.....	39
Determinación del Grado de Hidrólisis.....	39
Perfil de Aminoácidos.....	40
Obtención de las Fracciones Peptídicas Mediante Ultrafiltración.....	40
Análisis Estadístico.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Composición Química del Garbanzo.....	42
Rendimiento de la Obtención de Harina de Garbanzo.....	44
Cuantificación de Proteína de los Extractos Proteicos de Garbanzo.....	46
Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida.....	48
Grado de Hidrólisis.....	53
Perfil de Aminoácidos.....	56
Determinación de la Actividad Antioxidante.....	59
Actividad Antioxidante de los Extractos Proteicos de Garbanzo y sus Hidrolizados.....	59
Medición de la actividad de atrapamiento del radical libre ABTS.....	59
Medición del efecto protector en eritrocitos humanos.....	60
Medición del poder antioxidante reductor férrico (FRAP).....	61
Actividad Antioxidante de los Hidrolizados de Globulina Obtenidos con Pretratamiento de Pulsos Ultrasónicos.....	64
Actividad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas de Globulina.....	68
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS	74
ANEXO 1	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Mecanismo de donación de electrones por parte de los antioxidantes..	11
2	Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante.....	14
3	Estructura del complejo Fe ³⁺ -TPTZ antes y después de la reacción con el antioxidante.....	16
4	Parámetros físicos de los pulsos ultrasónicos.....	24
5	Mecanismo por el cual las burbujas de cavitación liberan los componentes celulares.....	27
6	Esquema general del proceso metodológico.....	34
7	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras de las proteínas de garbanzo y sus hidrolizados.....	50
8	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras de globulina y sus hidrolizados con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU).....	52
9	Evaluación de la actividad antioxidante de extractos e hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU) mediante el ensayo de ABTS y de efecto protector en eritrocitos.....	66
10	Evaluación de la actividad antioxidante de extractos e hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU) mediante el ensayo de FRAP.....	67
11	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de ABTS.....	69
12	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de efecto protector en eritrocitos humanos.....	70
13	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de FRAP.....	71

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Composición química del garbanzo.....	5
2	Comparación de la composición de aminoácidos del garbanzo y los valores indicados por FAO (mg de aminoácidos/100 g de proteína)....	8
3	Péptidos con actividad antioxidante obtenidos de legumbres.....	18
4	Péptidos con actividad antioxidante obtenidos del garbanzo.....	20
5	Estudios relacionados a la obtención de péptidos con actividad antioxidante utilizando pulsos ultrasónicos e hidrólisis enzimática.....	30
6	Composición química del garbanzo Blanco Sinaloa.....	43
7	Rendimientos de la harina obtenida (g) a partir de un kg de garbanzo..	45
8	Contenido de proteína en extractos proteicos obtenidos del garbanzo..	47
9	Determinación del grado de hidrólisis de los hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU).....	55
10	Residuos de aminoácidos por cada 1000 residuos de aminoácidos de los hidrolizados de globulina.....	58
11	Evaluación de la actividad antioxidante de diferentes proteínas obtenidas del garbanzo.....	62
12	Determinación de IC ₅₀ en el ensayo de ABTS de hidrolizados de proteínas de garbanzo.....	63

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum*) es una leguminosa de la familia Fabaceae. En la composición de los granos de garbanzo se destaca un alto contenido proteico (22% peso seco), la presencia de fibra dietaria, vitaminas, minerales y oligosacáridos (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013). Recientemente se han investigado diversos compuestos del garbanzo por los beneficios potenciales que puedan aportar a la salud de los consumidores. Estos compuestos, conocidos como compuestos bioactivos, incluyen fenoles, fitoesteroles, almidón resistente y péptidos. Se ha encontrado que estos compuestos están asociados con la reducción y el manejo de complicaciones clínicas derivadas de las enfermedades crónico-degenerativas que afectan en gran medida a la población mundial: diabetes, obesidad, cáncer, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares (Dhaval *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017).

Dentro de los compuestos bioactivos más estudiados del garbanzo se destacan los péptidos, secuencias de 2 a 20 residuos de aminoácidos, que pueden exhibir diversas bioactividades como antihipertensiva, anticancerígena y antioxidante (Dhaval *et al.*, 2016; Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014). Ghribi *et al.*, (2015) caracterizaron los hidrolizados obtenidos de un concentrado de proteína de garbanzo, identificando dos péptidos con actividad antioxidante, cuyas secuencias se determinaron como DHG y VGDI. En un estudio realizado por Torres-Fuentes *et al.*, (2015) se identificaron cuatro secuencias peptídicas con actividad antioxidante en el garbanzo, atribuida a la presencia de aminoácidos básicos, ácidos e hidrofóbicos: ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH.

Los péptidos antioxidantes de garbanzo se han obtenido a través del proceso conocido como hidrólisis enzimática, que consiste en el uso de proteasas para catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos en proteínas, ocasionando la liberación de los péptidos (Sánchez y Vázquez, 2017; Sepúlveda-Ahumada *et al.*, 2012). En la hidrólisis enzimática, la capacidad antioxidante de los péptidos generados depende de la naturaleza y pretratamiento de la proteína, tipo de proteasa utilizada y de las condiciones en las cuales se lleva a cabo la hidrólisis (Sepúlveda-Ahumada *et al.*, 2012). En ese sentido, en años recientes se ha promovido la utilización de un tratamiento con pulsos ultrasónicos previo a la hidrólisis

enzimática o la aplicación de ultrasonido simultánea a la hidrólisis para la obtención de péptidos antioxidantes de diversas matrices (Sánchez y Vázquez, 2017).

Durante la aplicación del pretratamiento con ultrasonido se produce el fenómeno de cavitación, donde las microburbujas generadas ocasionan cambios conformacionales en la estructura de las proteínas, lo que ocasiona la exposición de regiones hidrofóbicas, lo que a su vez favorece la hidrólisis y permite la liberación de péptidos con mayor actividad biológica (Higuera-Barraza *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018; Yu y Tan, 2017).

Debido a lo anterior, en este estudio se llevó a cabo la aplicación de un pretratamiento con pulsos ultrasónicos seguido de hidrólisis enzimática, con la finalidad de promover la obtención de péptidos con mayor capacidad antioxidante a partir de proteínas de garbanzo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Garbanzo

El garbanzo (*Cicer arietinum*) es una leguminosa perteneciente a la familia Fabaceae (Natural Resources Conservation Service, 2018). Su clasificación taxonómica es como se muestra a continuación:

Reino Plantae
División Magnoliophyta
Clase Magnoliopsida
Subclase Rosidae
Orden Fabales
Familia Fabaceae
Género *Cicer*
Especie *Cicer arietinum* L.

Generalidades del Garbanzo

C. arietinum es una planta anual de raíces profundas, tallos erectos y ramificados, que alcanza una altura de 0.2 a 1.0 m de altura. Las flores son axilares, solitarias y de diversa coloración (blanco, violeta, azul o rosado). Su fruto es una vaina bivalva con una o dos semillas en su interior de color blanco, amarillo, café o rojizo, ligeramente arrugadas, con dos grandes cotiledones. De forma redonda u ovoide, cuyo tamaño varía entre 0.4 y 1.0 cm, según la variedad. Existen dos tipos de garbanzo: kabuli y desi, siendo el primero para consumo humano y el segundo destinado al consumo forrajero (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; González-Cruz *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017).

Importancia del Cultivo

El cultivo de garbanzo es uno de los más antiguos, originado hace 7,450 años en medio oriente, y de importancia en la actualidad, ya que es la tercera legumbre en cuanto a cantidad de producción con 14.2 millones de toneladas (FAO, 2018; Gupta *et al.*, 2017; Ramirez *et al.*, 2018). México, con una producción de 351,796 toneladas, ocupa el décimo lugar en producción de garbanzo a nivel mundial (SIAP, 2019). Según el Servicio de Información

Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en su anuario estadístico de la producción agrícola de 2019, Sonora es el segundo productor a nivel nacional, con una cantidad de 110,455 toneladas.

El amplio consumo del garbanzo se debe a su composición nutricional, donde se destaca un porcentaje elevado de carbohidratos y de proteínas. Además, es una buena fuente de vitaminas (tiamina, niacina, ácido ascórbico) y minerales (Ca, P, Fe, Mg, K) (Tabla 1) (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; González-Cruz *et al.*, 2014).

Tabla 1. Composición química del garbanzo.

Constituyente	Porcentaje (%)	Componentes
Carbohidratos	66.3	Monosacáridos (1.1%) Disacáridos (1.6%) Oligosacáridos (61.3%) Polisacáridos (36 %)
Lípidos	5.0	Grasas saturadas (12%) Ácidos grasos monoinsaturados (19%) Ácidos grasos poliinsaturados (62%) -Ácido palmítico y ácido linoleico
Proteínas	22.7	Globulinas (70%) Albúminas (10-20%) Glutelinas (10-20%) -Alto contenido de Arg y Lys
Minerales	3.0	Ca, P, Fe, Mg, K

Proteínas

El garbanzo es una legumbre con un contenido de proteína en la semilla que varía de 17-22% para la masa total del grano seco. Alrededor del 70 al 80% de la proteína cruda es proteína de reserva, clasificándose con base en sus propiedades de solubilidad en albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas) y glutelinas (solubles en soluciones ácidas/alcalinas), representando del 12%, 56% y 18.1% del contenido total de proteína de reserva, respectivamente. El resto de las proteínas son enzimas, inhibidores de enzimas, hormonas, proteínas estructurales, transportadoras y de reconocimiento (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; Chang *et al.*, 2012; Schuster-Gajzágó, 2009).

Las globulinas representan el 56% de las proteínas de la semilla de las legumbres y se componen de dos grandes grupos, caracterizados por sus coeficientes de sedimentación, la 11S (320-400 kDa) o legúmina, y la 7S (145-190 kDa) o vicilina. La legúmina es una proteína de almacenamiento principal que representa una fuente de energía, carbón y nitrógeno reducido para la germinación y el crecimiento. La legúmina representa alrededor del 52% del contenido total de proteína y el 97% de las globulinas en la semilla de garbanzo. El peso molecular aproximado de la legúmina es 360 kDa, está conformada de seis α - β -subunidades unidas por un antiprisma triangular por enlaces no covalentes. Las subunidades α tienen pesos de 40.6 y 39.5 kDa, mientras que las subunidades β tienen pesos de 23.5 y 22.5 kDa. Cada una de las cadenas α está unida a las cadenas β por enlaces disulfuro. Las cadenas β son el corazón hidrofóbico de la proteína, y las cadenas α hidrofílicas están en el exterior de la molécula. La estructura y composición de la vicilina no ha sido tan estudiada, sin embargo, se determinó que es una fracción proteica que consiste principalmente de subunidades de 50.7 y 15.5 kDa, con un peso molecular de 150 kDa (Chang, 2006; González-Cruz *et al.*, 2014).

Las glutelinas pertenecen a la familia de proteínas 11-12S. Se componen de subunidades de alrededor de 58-51 y 38.1-26.2 kDa, que se separan postraduccionalmente para dar cadenas polipeptídicas ácidas y básicas unidas por un único enlace disulfuro (Chang, 2006, 2010). En cuanto a las albúminas, Papalamprou *et al.*, (2009) reportaron subunidades con pesos moleculares de 87, 31.4 y 23.9 kDa; mientras que Chang (2010) reportó bandas proteicas con

pesos de 93.6, 63.6, 55.3, 51, 41.7, 38.9, 36.3, 28.5, 24.3 y 21 kDa para albúmina de garbanzo (bajo condiciones desnaturalizantes).

La fracción de globulina es deficiente en metionina y cisteína, mientras que las fracciones de albúmina y glutelina contienen una cantidad ligeramente mayor de estos aminoácidos. Aunque la fracción de globulina tiene una cantidad baja de aminoácidos azufrados, el garbanzo se considera una fuente de proteína de alta calidad. El contenido de lisina, histidina, leucina, valina y arginina es elevado, por lo que su consumo, combinado con la ingesta de cereales, proporciona los aminoácidos esenciales para una correcta nutrición (Tabla 2) (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; González-Cruz *et al.*, 2014).

Tabla 2. Comparación de la composición de aminoácidos del garbanzo y los valores indicados por FAO (mg de aminoácidos/100 g de proteína).

Aminoácido	FAO	Garbanzo
Histidina	1.9	3
Lisina	5.8	7.2
Leucina	6.6	8.7
Isoleucina	2.8	4.8
Metionina + Cisteína	2.5	1.7
Fenilalanina + Tirosina	6.3	8.3
Treonina	3.4	3.1
Triptófano	1.1	0.9
Valina	3.5	4.6

Fuente: González-Cruz *et al.*, (2014).

Beneficios Potenciales de los Compuestos Nutraceuticos del Garbanzo

Las nuevas tendencias en el consumo de alimentos se han enfocado a buscar productos más saludables que además de su aporte nutricional tengan un efecto benéfico a la salud. Estas necesidades han impulsado a la búsqueda de alternativas para la producción de alimentos funcionales, donde las propiedades del garbanzo lo hacen una matriz alimenticia con alto potencial de aprovechamiento para este fin (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; González-Cruz *et al.*, 2014).

Esta legumbre representa una fuente importante de proteína dietaria, además de contener componentes que no son nutritivos pero que desempeñan funciones metabólicas benéficas para la salud, tales como fitoesteroles, compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e isoflavonas) y una gran variedad de oligosacáridos. Los fitoesteroles han demostrado diversas actividades como antiinflamatoria, antibacterial, antifúngica y antitumoral. Mientras que los polifenoles son conocidos por su capacidad antioxidante, por su parte, los oligosacáridos pueden servir como prebióticos (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; González-Cruz *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017). Se ha encontrado que estos compuestos están asociados con el manejo de complicaciones clínicas derivadas de varias enfermedades como diabetes, obesidad, cáncer, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares (Gupta *et al.*, 2017).

Recientemente, las investigaciones se han orientado a un grupo particular de compuestos del garbanzo: los péptidos bioactivos, ya que poseen diversas propiedades como anticancerígena, antihipertensiva y antioxidante, jugando un papel de gran relevancia en la industria alimentaria (Gupta *et al.*, 2017).

Péptidos Bioactivos

Las proteínas son biomoléculas constituidas por subunidades aminoacídicas unidas covalentemente por medio de enlaces peptídicos (Solomon *et al.*, 2008). Los péptidos bioactivos son secuencias de 2 a 20 residuos de aminoácidos, que pueden exhibir distintas actividades biológicas. Son derivados de las proteínas y, aunque algunos existen de forma libre en su fuente natural, la gran mayoría de los péptidos conocidos están encriptados en la estructura de las proteínas, siendo liberados principalmente por procesos como hidrólisis

enzimática, fermentación microbiana o mediante la digestión gastrointestinal (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Sánchez y Vázquez, 2017; Singh *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015).

Interés en la Identificación de Péptidos Bioactivos

En años recientes se ha incrementado la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas (ECD) en todo el mundo (Dhaval *et al.*, 2016). La OMS (2017) reportó 40 millones de muertes al año debido a las enfermedades no transmisibles, que equivalen al 70% de todas las muertes a nivel global. Las principales afecciones causantes de las muertes son las enfermedades cardiovasculares (17.7 millones), cáncer (8.8 millones), enfermedades respiratorias (3.9 millones) y diabetes (1.6 millones). En México la situación es parecida, donde el 50% de las muertes es debida a las ECD, siendo las principales afecciones la diabetes mellitus, las enfermedades del corazón y el cáncer (Soto-Estrada *et al.* 2016).

Debido a lo anterior, se han incrementado los estudios para la identificación de compuestos biológicamente activos en los alimentos que puedan servir en la prevención y regulación del desarrollo de las ECD (Dhaval *et al.*, 2016). Entre los alimentos más estudiados se destacan las matrices vegetales, de las que se pueden obtener péptidos con actividades biológicas muy importantes, como lo es la antioxidante (Roy *et al.*, 2010; Torres-Fuentes *et al.*, 2015).

Péptidos Antioxidantes

Los péptidos antioxidantes evitan el proceso oxidativo ocasionado por los radicales libres. Los radicales libres (especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno) son aquellas especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el nivel de valencia, dándole una configuración espacial muy inestable. Debido a su gran reactividad sobre las distintas biomoléculas, provocan daño celular oxidativo en proteínas, lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), ácidos nucleicos y carbohidratos que al acumularse puede desencadenar la aparición de enfermedades crónico-degenerativas (Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Venereo-Gutiérrez, 2002). Los antioxidantes actúan como eliminadores de los radicales libres al cederles su electrón, estabilizándolos y oxidándose a sí mismos (Figura 1); evitando así alteraciones de lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos. Ya que los antioxidantes se oxidan al neutralizar al radical libre, es necesaria la reposición continua de ellos, mediante la ingesta de alimentos que los contengan (Venereo-Gutiérrez, 2002).

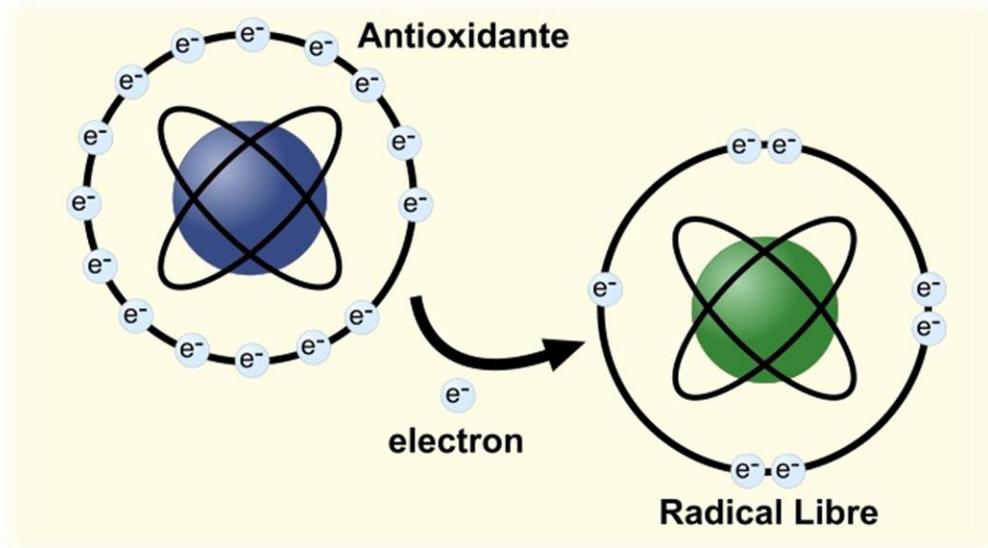


Figura 1. Mecanismo de donación de electrones por parte de los antioxidantes.
Fuente: Phytonutrimient Canada (2017).

Mecanismos de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los péptidos depende directamente del tipo de aminoácidos que los componen y, de modo más específico, de los grupos que se encuentran en las cadenas laterales de cada unidad aminoacídica. Regularmente, los péptidos antioxidantes son ricos en residuos de aminoácidos hidrofóbicos, ácidos y básicos. Además, la posición específica de los aminoácidos en la secuencia peptídica también puede contribuir a su bioactividad. Por lo tanto, los aminoácidos hidrofóbicos tanto en N-terminal como en C-terminal se consideran significativos. Mientras que los aminoácidos polares (histidina y arginina) en la posición C-terminal también contribuyen a la actividad antioxidante (Torres-Fuentes *et al.*, 2015).

Los aminoácidos hidrofóbicos son particularmente importantes para los efectos antioxidantes en los sistemas de lípidos, ya que aumentan la solubilidad de los lípidos. En el caso de la actividad antioxidante celular, la alta solubilidad en lípidos puede ser decisiva para mostrar efectos antioxidantes, ya que los péptidos pueden unirse a la membrana celular o atravesarla, lo que facilita la accesibilidad a los radicales hidrofóbicos. Por lo tanto, pueden actuar evitando la oxidación de la membrana celular mediada por radicales peroxilo o inhibiendo la oxidación intracelular (Torres-Fuentes *et al.*, 2015).

Por su parte, aminoácidos como el ácido aspártico y el ácido glutámico pueden ser importantes para inhibir el proceso de oxidación mediado por metales debido a su capacidad para unir metales por sus residuos cargados (Ghribi *et al.*, 2013; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Mientras que los aminoácidos básicos como histidina y arginina contribuyen a los efectos antioxidantes a través de su capacidad para actuar como donantes o aceptores de protones a través de sus respectivos grupos imidazol y guanidino. En particular, la histidina ha mostrado una fuerte actividad de eliminación de radicales debido a la descomposición del anillo de imidazol. Además, la histidina puede ser el principal aminoácido implicado en la actividad quelante de metales y la inhibición del proceso de oxidación mediado por metales, ya que puede unir metales a través de su anillo de imidazol (Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2014).

Medición de la actividad antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa (Roginsky y Lissi, 2005). La actividad antioxidante no puede ser

medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado, como son los distintos ensayos de actividad antioxidante (Tovar Del Río, 2013).

Con base a las reacciones químicas involucradas, la gran mayoría de los ensayos de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) los ensayos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones (SET) (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Los métodos basados en HAT miden la capacidad de un antioxidante de inhibir radicales libres por medio de la donación de hidrógeno: $X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$ (Prior *et al.*, 2005). A su vez, los métodos con mecanismo SET detectan la capacidad de un potencial antioxidante de transferir un electrón para reducir a cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, es decir, se trata de una reacción de óxido-reducción: $X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{+\bullet}$ (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha hecho gran uso de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los compuestos de interés. Estos ensayos se basan en la reacción de un radical, catión radical o formación de un complejo con una molécula antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno o un electrón (Pisoschi y Negulescu, 2011). Dentro de los más utilizados, se destacan los métodos de ABTS, medición del efecto protector en eritrocitos humanos y FRAP.

Medición de la actividad de atrapamiento del radical libre ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico $ABTS^{+\bullet}$ que absorbe a 734 nm (dando un color verde-azulado) se forma por la pérdida de un electrón por el átomo de nitrógeno de ABTS. En presencia de Trolox (o de otro antioxidante que pueda donar electrones o átomos de hidrógeno), el átomo de nitrógeno atrapa un electrón o un hidrógeno, produciendo una decoloración de la solución (Pisoschi y Negulescu, 2011). De manera que, en este ensayo, se mide la capacidad de los compuestos de interés para disminuir el color reaccionando directamente con el radical $ABTS^{+\bullet}$ (Prior *et al.*, 2005). El mecanismo de acción del antioxidante se ilustra en la Figura 2.

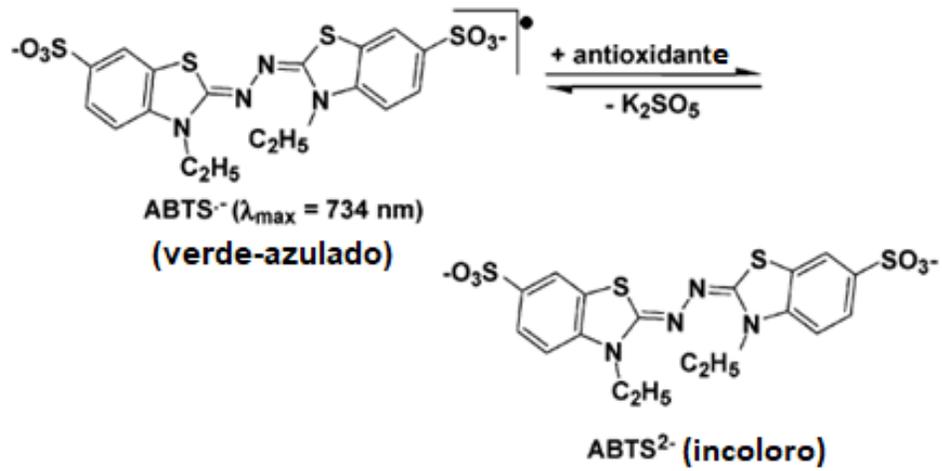


Figura 2. Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante.
Fuente: Huang *et al.* (2005).

Medición del efecto protector en eritrocitos humanos. En este ensayo se emplea AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro), un compuesto termolábil y soluble en agua, que al descomponerse forma radicales libres que actúan como iniciadores de la peroxidación lipídica de las membranas de los eritrocitos, induciendo la hemólisis (Liu *et al.*, 2003). Dicha hemólisis puede ser evitada por compuestos antioxidantes que estabilicen al radical libre de AAPH. El mecanismo de inhibición para este radical es el HAT. Los antioxidantes transfieren protones para estabilizar al radical impidiendo que tenga contacto con la membrana plasmática, evitando el consecuente daño celular y la hemólisis (Lu *et al.*, 2010).

Medición del poder antioxidante reductor férrico (Ferric reducing antioxidant power, FRAP). El ensayo de FRAP se basa en la reducción, por transferencia de un electrón del antioxidante, del complejo incoloro ion férrico-TPTZ (2,4,6-tri(2piridil)-1,3,5-triazina) a ion ferroso-TPTZ. El producto final (ion ferroso-TPTZ) tiene un color azul marino muy intenso con una absorbancia máxima a 593 nm. El cambio en la absorbancia está relacionado con el potencial antioxidante del compuesto a evaluar (Benzie y Strain, 1996; Pisoschi y Negulescu, 2011; Rubio *et al.*, 2016). La reducción del Fe^{3+} -TPTZ a Fe^{2+} -TPZT se ilustra en la Figura 3.

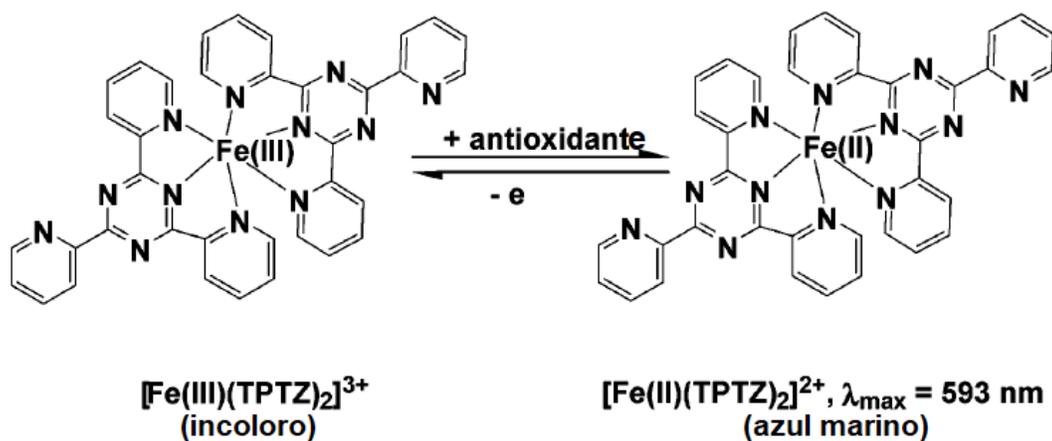


Figura 3. Estructura del complejo Fe^{3+} -TPTZ antes y después de la reacción con el antioxidante. Fuente: Huang *et al.* (2005).

Péptidos Antioxidantes de Legumbres

La búsqueda de péptidos con efectos benéficos a la salud ha llevado al uso de diversas matrices alimentarias, donde destacan legumbres como la soya, el cacahuete y la lenteja, de las cuáles se han obtenido péptidos antioxidantes (Tabla 3), demostrando que las legumbres son una buena fuente de este tipo de péptidos (Coscueta *et al.*, 2016; García-Mora *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014). De igual forma, se observa una preferencia al uso de proteasas para la obtención de péptidos bioactivos, donde se destaca la savinasa, una endopeptidasa obtenida de *Bacillus* sp., empleada por primera vez en el estudio de Garcia-Mora *et al.*, (2014) y que brindó mejores resultados que alcalasa y protamex para la obtención de péptidos antioxidantes y antihipertensivos de lenteja. En otro estudio, Garcia-Mora *et al.*, (2015) obtuvieron péptidos antihipertensivos de frijol empleando savinasa y alcalasa, observándose una IC₅₀ de 0.23 mg proteína/mL para el hidrolizado de savinasa, la cual fue menor que la del obtenido con alcalasa (IC₅₀ = 0.26 mg proteína/mL de hidrolizado). Esto debido a que el uso de savinasa produjo secuencias peptídicas cortas, con residuos de aminoácidos aromáticos, básicos y ácidos a los que pueden deberse las actividades antioxidantes y antihipertensivas.

Las secuencias peptídicas obtenidas son prometedoras para la elaboración de alimentos funcionales, por lo que la investigación se ha orientado a determinar el efecto de distintas enzimas en la obtención de péptidos, además de estudiar otras legumbres, entre ellas el garbanzo.

Tabla 3. Péptidos con actividad antioxidante obtenidos de legumbres.

Matriz	Secuencia peptídica	Capacidad antioxidante	Método de extracción y caracterización	Autores
Cacahuete	YP	55 ^a	Fermentación con <i>B. subtilis</i> , desalinización con resina macroporosa, cromatografía de filtración en gel Sephadex G-15, HPLC de fase inversa y espectrometría de masas	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Soya	IRHFNEGDVLVIPPGVPY	3.26 ^b	Hidrólisis enzimática con corolasa-PP, cromatografía por exclusión de tamaño y espectrometría de masas	Coscueta <i>et al.</i> , 2016
	IRHFNEGDVLVIPPGVPYW	3.26 ^b		
	IYNFREGDLIAVPTG	3.26 ^b		
	VSIIDTNSLENQLDQMPPR	3.26 ^b		
	YRAELSEQDIFVIIPAG	3.26 ^b		
Lenteja	LLSGTQNQPSFLSGF	14.29 ^c	Hidrólisis enzimática con savinasa, UHPLC y espectrometría de masas	García-Mora <i>et al.</i> , 2017
	NSLTLPIRLYL	9.66 ^c		
	TLEPNSVFLPVLHH	12.59 ^c		

^a Expresado como porcentaje de inhibición del radical DPPH.

^b Expresado como equivalentes Trolox ($\mu\text{mol ET}/\text{mg}$ proteína).

^c Expresado como equivalentes Trolox ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$ péptido puro).

Propiedades de los hidrolizados proteicos, fracciones peptídicas y péptidos del garbanzo

Los componentes antioxidantes del garbanzo son objeto de estudio debido a los efectos benéficos que pueden ejercer a la salud. Los antioxidantes, al controlar el efecto oxidante de los radicales libres y peróxidos, son de notorio interés en la industria alimenticia y farmacéutica. En el estudio de Li *et al.*, (2008) se obtuvieron hidrolizados de un aislado proteico de garbanzo empleando alcalasa. Se empleó cromatografía de exclusión por tamaño para obtener fracciones peptídicas, las cuales presentaron porcentajes de inhibición del radical DPPH de 44.31 al 85.82%. A su vez, en el estudio de Yust *et al.*, (2012) se realizó una hidrólisis secuencial con alcalasa y flavourzyme para obtener hidrolizados de garbanzo, que presentaron valores de inhibición del radical DPPH de 54 al 60%.

Kou *et al.*, (2013) caracterizaron una secuencia peptídica de un hidrolizado antioxidante de albúmina de garbanzo, RQSHFANAQP. Ghribi *et al.*, (2015) realizaron la hidrólisis enzimática de un concentrado de proteína de garbanzo, obteniendo dos subfracciones peptídicas con actividad antioxidante, cuyas secuencias se determinaron como DHG y VGDI. Por otra parte, Guo *et al.*, (2014) reportaron la purificación de un péptido con actividad antioxidante, cuya secuencia se identificó como NRYHE. En el estudio de Torres-Fuentes *et al.*, (2015) se identificaron cuatro secuencias peptídicas con actividad antioxidante en el garbanzo: ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH, donde destaca la presencia de histidina, aminoácido al que se le ha atribuido la capacidad antioxidante (Tabla 4).

Tabla 4. Péptidos con actividad antioxidante obtenidos del garbanzo.

Secuencia peptídica	Inhibición del radical DPPH (%)	Método de extracción y caracterización	Autores
RQSHFANAQP	41.3	Hidrólisis enzimática con alcalasa y cromatografía por exclusión de tamaño, LC-ESI-MS/MS	Kou <i>et al.</i> , 2013
NRYHE	45.33	Hidrólisis enzimática con alcalasa, HPLC de fase inversa y desorción/ionización láser asistida en matriz	Guo <i>et al.</i> , 2014
DHG	51.66	Hidrólisis enzimática con alcalasa, HPLC de fase inversa, ionización por electrospray y espectrometría de masas	Ghribi <i>et al.</i> , 2015
VGDI	67.32		
ALEPDHR	73.2	Hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina, HPLC de fase inversa y espectrometría de masas	Torres-Fuentes <i>et al.</i> , 2015
TETWNPNHPEL	87		
FVPH	87		
SAEHGSLH	51		

Mecanismos de Obtención de Péptidos Antioxidantes

Los péptidos antioxidantes son obtenidos de tres maneras principales: empleando enzimas proteolíticas del sistema digestivo o de origen microbiano, digestión gastrointestinal y fermentación microbiana (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014); mismos que se describen a continuación.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática consiste en el uso de proteasas para catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos en proteínas (Sánchez y Vázquez, 2017). Es el mecanismo más utilizado para la producción de péptidos debido a su rapidez y a su especificidad, lo que proporciona un mejor control de la hidrólisis para obtener perfiles de pesos moleculares y composiciones peptídicas consistentes, además de que proporciona altos rendimientos de los productos obtenidos, ya sea al emplearse una o varias enzimas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014; Soares de Castro y Sato, 2015). Entre las enzimas más utilizadas se encuentran la alcalasa, la pepsina y la flavourzyme (Guo *et al.*, 2014; Torres-Fuentes *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

Digestión gastrointestinal

Los cambios estructurales y químicos que ocurren en las proteínas de los alimentos por la hidrólisis enzimática durante el proceso digestivo conducen a la liberación de péptidos bioactivos. Los péptidos generados podrían ejercer una función directa en el tracto gastrointestinal, o, en el caso de ser absorbidos, viajarían a través de la circulación sistémica hacia órganos y tejidos diana (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014).

Fermentación microbiana

Durante los procesos de fermentación, las bacterias ácido-lácticas (BAL) hidrolizan proteínas en péptidos y aminoácidos que son empleados como fuentes de nitrógeno necesario para su crecimiento, por lo tanto, se pueden generar péptidos bioactivos de grado alimenticio (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014). En el estudio de Stanisavljevic *et al.*, (2015), se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* para producir hidrolizados proteicos de chícharo con actividad antioxidante; mientras que, en el estudio de Zhang *et al.*, (2014) se llevó a cabo

una fermentación con *Bacillus subtilis* para obtener el péptido YP a partir de proteína de cacahuate.

Perspectivas

En años recientes surgió el uso de diferentes técnicas como pretratamiento para la obtención de péptidos con distintas actividades biológicas, sobre todo cuando se realiza hidrólisis enzimática. Dentro de esas técnicas se destaca el ultrasonido, siendo de gran utilidad para modificar la estructura de las proteínas e incrementar la eficiencia de hidrólisis enzimática (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Ultrasonido

La historia de los avances científicos del ultrasonido se remonta a 1687 cuando Isaac Newton propuso su teoría de las ondas sonoras. La diferencia del sonido y el ultrasonido radica en la frecuencia de la onda. Las ondas sonoras se dividen en tres categorías que abarcan diferentes rangos de frecuencia: las ondas sonora que son audibles por el ser humano que se encuentran de 10 Hz a 20 kHz, las ondas infrasónicas que están por debajo del rango audible con una frecuencia menor a 16 Hz; y las ondas ultrasónicas, cuyas frecuencias son superiores al rango audible (> 20 kHz) y menores a las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz) (Higuera-Barraza *et al.*, 2016; Rutkowska *et al.*, 2017; Tiwari, 2015).

Fundamento del Ultrasonido

El mecanismo funcional del ultrasonido se basa en ondas ultrasónicas que crean regiones de presión alta y baja, esta variación en la presión acústica es directamente proporcional a la cantidad de energía aplicada al sistema, y le brinda la cualidad de tener diversas aplicaciones comerciales dependiendo del tipo de ultrasonido del cual se trate, destacando entre ellos los pulsos ultrasónicos (Higuera-Barraza *et al.*, 2016; Tiwari, 2015).

Pulsos Ultrasónicos

El ultrasonido pulsado o pulsos ultrasónicos, consiste en pulsos de ultrasonido separados por intervalos de tiempo. Dicho de otra manera, un pulso ultrasónico se constituye por unos

cuantos ciclos de ultrasonido, para el cual se aplican algunos parámetros como la intensidad, frecuencia, temperatura y tiempo (Kremkau, 2015).

VARIABLES DE LOS PULSOS ULTRASÓNICOS

Entre los parámetros físicos de los pulsos ultrasónicos se encuentran: la frecuencia, el periodo, la duración del pulso, el factor de trabajo, la amplitud y la intensidad del sonido (Figura 4). La frecuencia se define como el número de pulsos que ocurren en un segundo y se mide en kilohertz (kHz). El periodo hace referencia al tiempo desde el inicio de un pulso hasta el comienzo del siguiente pulso, midiéndose en milisegundos (ms). Estas variables presentan una relación recíproca: el periodo disminuye mientras que la frecuencia incrementa, cuantos más pulsos ocurran en un segundo, el tiempo entre ellos disminuirá. La duración del pulso es el tiempo, en microsegundos, que tarda un pulso en producirse y es igual al periodo multiplicado por el número de ciclos en el pulso. La duración del pulso decrece si el número de ciclos en un pulso es disminuido o si la frecuencia es incrementada (reduciendo el periodo). El factor de trabajo se define como la fracción de tiempo que los pulsos ultrasónicos están activados. Como es una fracción con tiempo (μs) tanto en el numerador como en el denominador no tiene unidades y se expresa en decimales o como un porcentaje (Kremkau, 2015).

Los cuatro parámetros descritos anteriormente hacen referencia a intervalos de tiempo, mientras que la amplitud, la potencia y la intensidad son indicadores de la energía propia del ultrasonido. La primera es la variación máxima que se produce en una variable acústica. Consiste en el valor máximo que alcanzan las ondas sonoras menos el valor normal (sin sonido), se expresa en megapascales (MPa). La potencia es la velocidad donde la energía se transfiere de una parte de un sistema a otra, es decir, la tasa de transferencia y se mide en watts (W). La intensidad es la velocidad a la que la energía pasa a través de un área unitaria y se calcula dividiendo la potencia de una onda sobre el área por la cual se extiende la energía. Las unidades de intensidad incluyen miliwatts (mW/cm^2) y watts por centímetro al cuadrado (W/cm^2) (Kremkau, 2015). Entre estas variables también hay una relación, ya que la intensidad es proporcional a la amplitud ultrasónica; pero una amplitud mayor puede no ser favorable, a altos niveles aumentará la agitación y reducirá el nivel de cavitación (Tiwari, 2015) que se explicará más adelante.

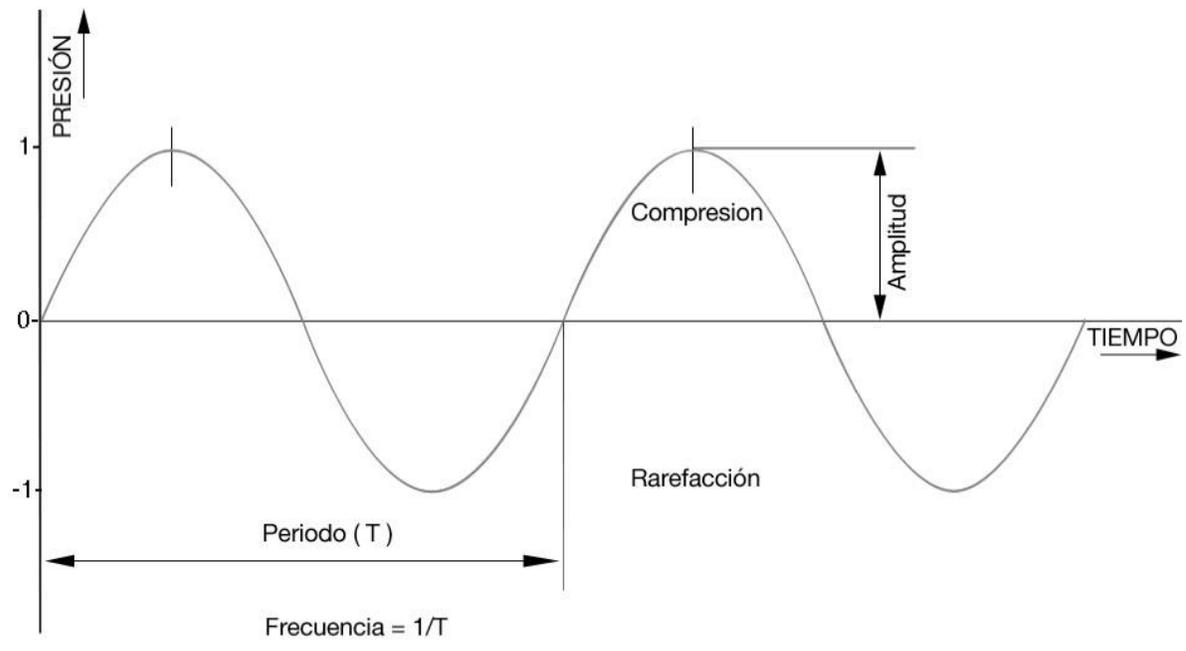


Figura 4. Parámetros físicos de los pulsos ultrasónicos. Fuente: Vazquez (2016)

No solo los parámetros físicos influyen en el proceso del ultrasonido, también están aquellos propios de la aplicación que se les desee dar a los pulsos ultrasónicos, por ejemplo, en el caso de la extracción de compuestos, destacan el tipo de solvente, el tiempo de extracción y la temperatura de extracción (Rutkowska *et al.*, 2017). El solvente a utilizarse en un tratamiento de extracción por ultrasonido debe elegirse cuidadosamente, cuidando parámetros como su viscosidad, tensión superficial y presión de vapor. También es necesario considerar la polaridad y la solubilidad del compuesto deseado en el solvente. La temperatura tiene un efecto sobre el solvente, ya que un solvente viscoso podría evaporarse si la extracción se lleva a cabo a altas temperaturas durante tiempos prolongados (Rutkowska *et al.*, 2017; Tiwari, 2015).

El tiempo de extracción puede verse afectado por diversas variables físicas, pero se pueden considerar dos resultados posibles: un tiempo largo de extracción mejora los rendimientos de la extracción, pero un tiempo muy prolongado puede inducir cambios indeseables en el compuesto extraído ya que puede haber efectos adversos por parte de la temperatura (Tiwari, 2015). Es importante elegir una temperatura de extracción acorde al compuesto diana de la extracción, especialmente cuando se trabaja con compuestos termolábiles. La optimización de la temperatura permite obtener un mejor rendimiento de extracción de las moléculas sin degradación. La mayoría de las temperaturas de extracción reportadas varían de 10°C a 80°C, donde se ha observado que una temperatura alta mejora la cavitación (Rutkowska *et al.*, 2017; Tiwari, 2015).

Fenómeno de Cavitación

El ultrasonido consiste en ondas mecánicas que requieren un medio elástico para extenderse y, a medida que pasan a través de dicho medio, se induce un desplazamiento longitudinal de las partículas. De hecho, la fuente de la onda sonora actúa como un pistón en la superficie del medio, dando como resultado una sucesión de fases de compresión y rarefacción, al estar el pistón en su posición abierta y en su posición contraída, respectivamente. Cada medio tiene una distancia molecular crítica: por debajo de este valor crítico, el líquido permanece intacto, pero por encima de esta distancia, el líquido se rompería y se podrían generar huecos en el líquido (Chemat *et al.*, 2011).

En el caso de los pulsos ultrasónicos, si el ciclo de rarefacción es suficientemente fuerte, la distancia entre las moléculas contiguas puede alcanzar o incluso superar la distancia molecular crítica del líquido. Los huecos creados en el medio son las burbujas de cavitación. Estas burbujas de cavitación crecen durante las fases de rarefacción y disminuyen su tamaño durante los ciclos de compresión. Cuando el tamaño alcanza un punto crítico, colapsan durante un ciclo de compresión y liberan grandes cantidades de energía. La temperatura y la presión al momento del colapso se han estimado de hasta 5000 K y 2000 atmósferas en un baño ultrasónico a temperatura ambiente. Cuando estas burbujas colapsan sobre la superficie de un material sólido, ocasionan la destrucción de las paredes celulares, permitiendo la liberación de los compuestos de interés (Figura 5) (Chemat *et al.*, 2011; Tiwari, 2015).

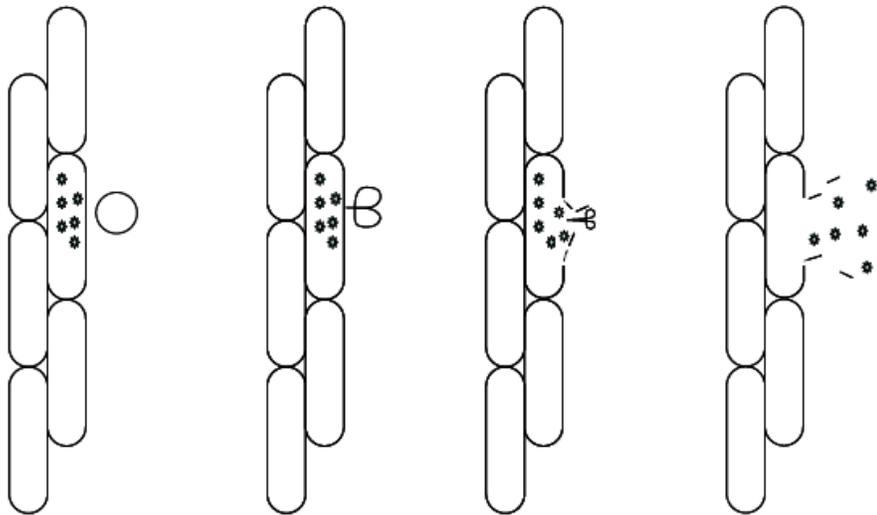


Figura 5. Mecanismo por el cual las burbujas de cavitación liberan los componentes celulares. Fuente Chemat *et al.* (2011).

Clasificación y Aplicación de los Pulsos Ultrasónicos en Alimentos

El ultrasonido se puede dividir en dos grupos: ultrasonido diagnóstico y ultrasonido de potencia. El ultrasonido diagnóstico, de intensidad baja ($<1 \text{ W/cm}^2$) y frecuencia alta (5–10 MHz), es usado comúnmente como una técnica analítica no destructiva para procesos de control y calidad, especialmente de propiedades fisicoquímicas como la composición, la estructura y el estado físico de la materia; mientras que el ultrasonido de potencia, de intensidad alta (10–1000 W/cm^2) y frecuencia baja (20–100 kHz) es utilizado para extracción y aplicaciones de procesamiento (Higuera *et al.*, 2016; Rutkowska *et al.*, 2017; Tiwari, 2015).

Conservación

Los factores primarios responsables del deterioro de los alimentos son los microorganismos, como bacterias y esporas, y las enzimas. El procesamiento térmico convencional mata los microorganismos vegetativos y algunas esporas, e inactiva las enzimas. Sin embargo, el tiempo y la temperatura del proceso son proporcionales a la cantidad de pérdida de nutrientes, al desarrollo de sabores indeseables y al deterioro de las propiedades funcionales de los productos alimenticios. Una de las técnicas nuevas de preservación es el uso del ultrasonido de potencia ya que, al producir temperaturas y presiones altas debido a las burbujas de cavitación, ocasiona lisis celular y desnaturalización de las enzimas. Al combinarse el ultrasonido con el tratamiento térmico, acelera la velocidad de esterilización de los alimentos, reduciendo tanto la duración como la intensidad del tratamiento térmico y, por ende, los daños resultantes (Chemat *et al.*, 2011).

Extracción

La extracción asistida por ultrasonido es una tecnología emergente, que reduce el tiempo de trabajo al permitir que las extracciones completas puedan realizarse en cuestión de minutos en vez de horas o días como con los métodos convencionales. Entre sus ventajas se encuentran: una fácil reproducibilidad, manipulación y procesamiento simplificado, mayor pureza del producto final y eliminación del tratamiento posterior de los desechos. Consume solamente una fracción de la energía fósil necesaria normalmente para un método de extracción convencional como la extracción de Soxhlet, la maceración o la destilación de vapor. Los pulsos ultrasónicos se han empleado en el campo de extracción de compuestos como aromas,

pigmentos, antioxidantes y péptidos de una gran variedad de matrices (principalmente tejidos animales, alimentos y materiales vegetales). Las ondas ultrasónicas alteran las propiedades físicas y químicas tras la interacción con el objeto de estudio, y su efecto de cavitación facilita la liberación de compuestos extraíbles al romper las paredes celulares (Chemat *et al.*, 2011).

Pretratamiento con Pulsos Ultrasónicos para la Obtención de Péptidos

El tratamiento con pulsos ultrasónicos puede realizarse de manera previa a la hidrólisis enzimática o de modo simultáneo, observándose que gracias al efecto de cavitación que produce, se presentan cambios conformacionales de las proteínas, ya que se rompen los puentes disulfuro y las estructuras de agregados de proteínas se debilitan, lo que incrementa la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Yu y Tan, 2017). A su vez, el ultrasonido despliega las moléculas de proteínas, lo que destruye las interacciones hidrofóbicas de las proteínas y expone las regiones hidrofóbicas, lo que permite que la enzima empleada pueda hidrolizar segmentos de proteína que contengan aminoácidos hidrofóbicos, los cuales son muy importantes para la actividad antioxidante de los péptidos (Yu y Tan, 2017).

Péptidos antioxidantes

El tratamiento con pulsos ultrasónicos se ha utilizado para obtener péptidos de diversas matrices (huevo, caupí, soya y tilapia), observándose reducciones en el tiempo de hidrólisis e incrementos de la capacidad antioxidante debidos al tratamiento con ultrasonido (Kangsanant *et al.*, 2015; Knezevic-Jugovic *et al.*, 2012; Quansah *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015). Existen algunas variedades, como en el estudio de Yu *et al.*, (2012), donde se realizó un análisis de superficie de respuesta en conjunto a la extracción enzimática para la obtención de péptidos antioxidantes del cacahuate; o el estudio de Zhu *et al.*, (2011), donde se realizó una hidrólisis con alcalasa simultánea a la aplicación de pulsos ultrasónicos para la obtención de péptidos del gluten de trigo, observándose que los hidrolizados tratados con ultrasonido presentaron mayor actividad antioxidante y bajos pesos moleculares en comparación al grupo control (Tabla 5).

Debido a lo anterior, en el presente estudio, se propuso utilizar la enzima savinasa para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas de garbanzo, además de emplear un pretratamiento con pulsos ultrasónicos para la obtención de péptidos de garbanzo con capacidad antioxidante.

Tabla 5. Estudios relacionados a la obtención de péptidos con actividad antioxidante utilizando pulsos ultrasónicos e hidrólisis enzimática.

Matriz	Método de extracción	Resultado	Autores
Gluten de trigo	Hidrólisis enzimática con alcalasa y ultrasonido (0.707 W, frecuencias de 25, 47 y 69 kHz, 30 minutos) al mismo tiempo	Actividad quelante del ion ferroso (93.59%) y mayor poder reductor (0.378)	Zhu <i>et al.</i> , 2011
Cacahuete	Hidrólisis enzimática con alcalasa y ultrasonido a diferentes potencias (150, 180 y 210 W), temperatura 62°, pH 8.5	Inhibición del DPPH 90.06% bajo tratamiento de ultrasonido	Yu <i>et al.</i> , 2012
Soya	Pretratamiento con ultrasonido a 45 °C, potencia (0, 200, 300, 400 y 500 W), a 45°C, durante 30 minutos e hidrólisis enzimática con neutrasa	Incremento de inhibición de DPPH (8.31%) y de capacidad reductora (10.19%)	Xu <i>et al.</i> , 2015

HIPÓTESIS

Al someter las proteínas de garbanzo a un tratamiento de ultrasonido previo a la hidrólisis enzimática, habrá un incremento en la actividad antioxidante de los hidrolizados y las fracciones peptídicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes de proteínas de garbanzo (*C. arietinum*).

Objetivos Particulares

1. Determinar la fracción proteica de garbanzo (*C. arietinum*) con mayor potencial antioxidante.
2. Obtener hidrolizados con actividad antioxidante a partir de proteínas de garbanzo mediante un pretratamiento con pulsos ultrasónicos.
3. Fraccionar los hidrolizados con mayor actividad antioxidante y determinar su actividad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El experimento consistió en dos fases. En la primera de ellas la estructura de tratamientos fue unifactorial, completamente al azar. Donde la variable independiente era el tipo de proteína (albúmina, globulina y glutelina), mientras que las variables de respuesta fueron la concentración de proteína y la actividad antioxidante (expresada como porcentaje de inhibición del radical ABTS, porcentaje de inhibición de hemólisis y $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra seca en FRAP).

En la segunda fase del experimento, se realizó un pretratamiento con pulsos ultrasónicos al concentrado de globulina, donde las variables independientes fueron el tiempo de aplicación de los pulsos ultrasónicos (10, 20 y 30 minutos) y la amplitud de éstos (30, 60 y 90%), tratándose de un diseño de 2 factores, completamente al azar. Las variables dependientes fueron la actividad antioxidante (expresada como porcentaje de inhibición del radical ABTS, porcentaje de inhibición de hemólisis y $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra seca en FRAP), el grado de hidrólisis y el contenido de aminoácidos.

Materiales

Los granos de garbanzo para esta investigación fueron del tipo kabuli, variedad Blanco Sinaloa, calibre 14, cultivados en el campo “El Compa” que se encuentra en la costa de Hermosillo, Sonora, México (Latitud: 28.596062 N, Longitud: -111.468929 O), de la cosecha de 2017. El garbanzo fue donado por el Grupo Aliansa (Carretera a Sahuaripa km 2.5, Parque Industrial Hermosillo, Sonora).

Los diversos reactivos químicos y la enzima savinasa se obtuvieron de Sigma-Aldrich Inc. y Bio-Rad Laboratories Inc.

Metodología

De manera general, la metodología llevada a cabo en esta investigación fue la siguiente (Figura 6). Se partió de la extracción de proteínas de garbanzo albúmina (Al), globulina (Gb) y glutelina (Gt) con base en su solubilidad, se hidrolizaron con savinasa y se les determinó la actividad antioxidante (con 3 ensayos distintos) a las proteínas y los hidrolizados, además se analizaron en electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida Posteriormente, se aplicó un pretratamiento con pulsos ultrasónicos al extracto de globulina, seguido de una hidrólisis con savinasa para proceder a determinar la actividad antioxidante, el grado de hidrólisis, y el perfil de aminoácidos, realizándose también una electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida. Finalmente, se obtuvieron fracciones peptídicas de los hidrolizados de globulina, a las que se les determinó la actividad antioxidante.

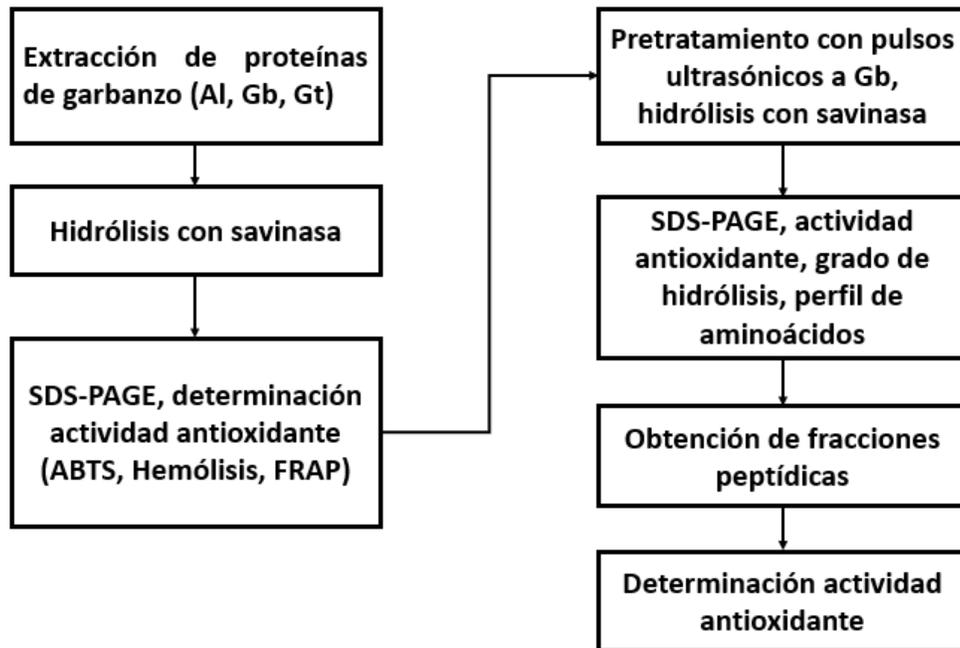


Figura 6. Esquema general del proceso metodológico.

Composición Química del Garbanzo

Para conocer la composición química del garbanzo Blanco Sinaloa, se realizó un análisis proximal siguiendo la metodología propuesta por la AOAC (2016) para la determinación del contenido de humedad (método 925.09), cenizas (método 923.03), proteína (método 960.52), grasa (método 920.39) y fibra dietaria total (método 985.29). El contenido de carbohidratos fue determinado por diferencia.

Obtención de la Harina de Garbanzo

Para obtener la harina de garbanzo, se siguió la metodología descrita por Tovar-Pérez *et al.*, (2017), con modificaciones. Se liofilizaron 4.5 kg de grano de garbanzo crudo en un liofilizador DC401 (Yamato Scientific Co., Ltd., Tokio, Japón) durante 7 días con la finalidad de remover el agua contenida en el garbanzo. Posterior a ello, los granos de garbanzo liofilizados se molieron en un molino Thomas-Wiley Modelo 4 (Thomas Scientific, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) obteniendo una harina con un tamaño de partícula de 2 mm. Sin embargo, entre más pequeña la partícula se tiene mayor posibilidad de obtener más rendimientos durante la extracción de compuestos bioactivos, por lo tanto, al final se consiguió un tamaño de partícula de 0.425 mm, empleando un procesador de alimentos marca Braun modelo KSM 2 (Gillette Commercial, Massachusetts, Estados Unidos de América) y un tamiz No. 40 (W. S. Tyler, Ohio, Estados Unidos de América).

Se procedió al desgrasado de la harina con éter de petróleo, empleando 100 mL de éter de petróleo por cada 20 g de harina. Se realizaron dos recambios del solvente, dejándose en agitación constante durante 24 horas. Para la extracción de alcaloides se emplearon 100 mL de cloroformo por cada 20 g de harina desgrasada. De igual manera, se realizaron dos recambios del solvente, bajo agitación constante durante 24 horas (Tontul *et al.*, 2018; Tovar-Pérez *et al.*, 2017). Para remover los polifenoles de la harina desgrasada y sin alcaloides, se empleó acetona según la metodología de Kirchhoff *et al.*, (1989). Se realizaron dos extracciones con acetona, a una proporción 1:3 harina/solvente, bajo agitación constante durante 24 horas. Se evaporó hasta sequedad y la harina resultante se almacenó a -18°C para los análisis posteriores.

Extracción de Proteínas de la Harina de Garbanzo

Para la extracción de las proteínas solubles de la harina de garbanzo se siguió la metodología de Voigt *et al.*, (1993) y de Tovar-Pérez *et al.*, (2017) con modificaciones. La harina obtenida del procedimiento anterior se trató con soluciones de Tris-HCl 10 mmol/L (conteniendo EDTA 2 mmol/L, pH 7.5), de NaCl 0.5 mol/L (conteniendo EDTA 2 mmol/L y Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.5) y NaOH 0.1 mol/L, para extraer albúmina (Al), globulina (Gb) y glutelina (Gt), respectivamente, en una proporción de 10 mL de solución por cada 5 g de harina. Las suspensiones se agitaron durante 5 minutos y después se centrifugaron a 9,000 rpm durante 80 min a 4°C. Cada sobrenadante fue dializado empleando una membrana de diálisis de celulosa (poro de 12 kDa) contra agua deionizada durante 48 horas a 4°C, con un cambio a las 24 horas. Para finalizar, el contenido de los tubos de diálisis se liofilizó y se almacenó a -18°C.

Cuantificación de Proteína

Para la cuantificación de las distintas proteínas (Al, Gb y Gt), se realizó una determinación de la concentración total de proteína. Se determinó como nitrógeno total empleando micro Kjeldahl, siguiendo el método 960.52 (AOAC, 2016). El factor de conversión para calcular el contenido de proteínas a partir del nitrógeno determinado fue de 6.25 (García-Mora *et al.*, 2014).

Obtención de Hidrolizados

Para la obtención de hidrolizados se siguió la metodología de García-Mora *et al.*, (2014, 2017) con algunas modificaciones. Las proteínas liofilizadas se suspendieron en agua deionizada (100 mg de proteína en 5 mL de agua). Se ajustó a 8 el pH de las soluciones proteicas empleando NaOH 0.1 M y se estabilizaron a temperatura de 40°C en un baño de agua. Después de 10 min, se llevó a cabo la proteólisis con Savinasa (Savinase® 16 L) a una relación enzima sustrato (E/S) de 0.1 U/mg de proteína soluble durante 2 horas, a 40°C y pH 8. Posteriormente, las muestras se calentaron a 80°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Finalmente, los hidrolizados se centrifugaron a 10,000 rpm a 10°C durante 10 min, se liofilizaron y se almacenaron hasta su uso, denominándoseles hidrolizado de albúmina (HA), hidrolizado de globulina (HGb) e hidrolizado de glutelina (HGt).

Cuantificación de Proteína Soluble

La concentración de proteína de los hidrolizados se determinó utilizando el método de Bradford (1976), empleando como estándar albúmina de suero bovino (1 mg/mL), cuantificando la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de las proteínas de garbanzo y sus hidrolizados (HA1, HGb y HGt) mediante el método de ABTS, el ensayo de efecto protector en eritrocitos humanos y el método de FRAP.

Medición de la Actividad de Atrapamiento del Radical Libre ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS)

La preparación del radical se realizó según la metodología de Re *et al.*, (1999). Se mezclaron 19.3 mg de ABTS con 5 mL de agua destilada para preparar el radical catiónico ABTS. Se agregaron 88 µL de persulfato de potasio a la solución preparada de ABTS^{•+} y se dejó reposar en la oscuridad por 16 horas. Se tomaron 270 µL de la solución del radical catiónico preparado y se adicionaron 20 µL de muestra leyendo a una absorbancia de 734 nm después de 30 minutos de reposo. Para la lectura de absorbancia se empleó un lector de microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Nueva York, Estados Unidos de América). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de ABTS como lo indica la ecuación 1.

$$\text{Ec. 1: Porcentaje de ABTS inhibido} = \frac{\text{ABS inicial} - \text{ABS final}}{\text{ABS inicial}} \times 100$$

Donde ABS inicial es la absorbancia del blanco y ABS final es la absorbancia del radical más la muestra.

Medición del Efecto Protector en Eritrocitos Humanos

Para evaluar el efecto protector en eritrocitos humanos, se indujo hemólisis con 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) según el procedimiento descrito por Hernández-Ruiz *et al.*, (2018). Los eritrocitos se lavaron tres veces con buffer salino de fosfatos (PBS) a

pH 7.4. Se preparó una suspensión de eritrocitos humanos en 2% en PBS. Se realizó una mezcla de eritrocitos (100 µL), la muestra (100 µL) y AAPH (100 µL), y se incubó a 37 °C en agitación a 30 rpm, en oscuridad, durante 3 h. Después se añadió a la solución 1 mL de PBS y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm usando un lector de microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Nueva York, Estados Unidos de América). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de hemólisis (PIH) como lo indica la ecuación 2.

$$\text{Ec. 2: Porcentaje de inhibición de hemólisis} = \frac{\text{AHI-AM}}{\text{AHI}} \times 100$$

Donde AHI es la absorbancia de la hemólisis inducida por el AAPH y AM es la absorbancia de la muestra.

Medición del Poder Antioxidante Reductor Férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)

El poder antioxidante por reducción del ión férrico a ferroso, se determinó utilizando la metodología de Benzie y Strain (1996) con modificaciones. Primero se elaboró una solución stock, la cual se preparó en condiciones ácidas (pH 3.6), que incluye una solución de buffer de acetato de sodio (300 mmol/L a un pH de 3.6), posteriormente se preparó el complejo de hierro-TPTZ con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/L) en una solución de TPTZ (2,4,6-tri(2piridil)-1,3,5-triazina) en HCl (40 mmol/L). Una vez preparadas las soluciones stock, se procedió a preparar la solución de trabajo (solución de FRAP). Para ello, se agregaron las soluciones a una relación de 10:1:1 (Buffer: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: TPTZ·HCl). Se tomaron 280 µL de la solución de FRAP y se adicionaron 20 µL de muestra, para tomar lecturas de su absorbancia en un lector de microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Nueva York, Estados Unidos de América) a una absorbancia de 638 nm. Cada medición se realizó en intervalos de 10 minutos durante 40 minutos, para observar cambios significativos en el tiempo de reacción de cada muestra. Se realizó una curva estándar con trolox, con concentraciones desde 0 a 200 µmol. Los resultados se expresaron como µmol ET/g de muestra seca.

Pretratamiento con Pulsos Ultrasónicos

Se eligió la proteína con mayor actividad antioxidante (Gb) para realizar el pretratamiento con pulsos ultrasónicos. El ultrasonido se aplicó en 3 condiciones: 30% de amplitud durante 10 minutos, 60% de amplitud durante 20 minutos y 90% de amplitud durante 30 minutos, con tiempo de encendido y de apagado de los pulsos de 2 segundos (Wang *et al.*, 2015). Se empleó el procesador ultrasónico Branson Digital Sonifier SFX 550 (Branson Ultrasonics Corporation, Connecticut, Estados Unidos de América), que cuenta con un sonotrodo con punta de 12.7 mm de diámetro. Se utilizaron 100 mg de proteína liofilizada que se disolvieron en 20 mL de agua destilada para tener soluciones proteicas con una concentración de 5 g/L, mismas que se colocaron en vasos de precipitados rodeados por un baño de hielo para mantener la muestra a temperatura ambiente durante el tratamiento de ultrasonido. Inmediatamente después de la aplicación del pretratamiento con ultrasonido, se realizó la hidrólisis con savinasa según las condiciones descritas anteriormente (García-Mora *et al.*, 2014, 2017). Se determinó la concentración de proteína (Bradford, 1976) y se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos (Benzie y Strain, 1996; Hernández-Ruiz *et al.*, 2018; Re *et al.*, 1999).

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

La presencia de las proteínas (albúmina, globulina y glutelina) y la degradación de éstas por efecto de la hidrólisis fueron analizadas mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, basándose en el método de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% y se cargaron 20 μ L de muestra, usando para la separación de proteínas 100 V. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y desteñidos en una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v). Se utilizaron las condiciones descritas anteriormente para analizar el efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos sobre los hidrolizados de globulina.

Determinación del Grado de Hidrólisis

Para la determinación del grado de hidrólisis de los hidrolizados de globulina obtenidos con el pretratamiento con pulsos ultrasónicos se siguió el método de ninhidrina, donde se mezclaron

200 μ L de cada muestra con 500 μ L de ninhidrina al 1.5%, por triplicado. Se incubó a 100°C por 15 minutos, dejándose enfriar a temperatura ambiente, para después añadir 2.5 mL de etanol al 50%, formando un compuesto de color morado, al cual se leyó su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, utilizando un estándar de tirosina (Moore y Stein, 1948). Los resultados fueron expresados como mmol de tirosina/mg de proteína.

Perfil de Aminoácidos

El contenido de aminoácidos de los hidrolizados con mayor actividad antioxidante se determinó por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un sistema de HPLC serie 1200 de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania) (Vazquez-Ortiz *et al.*, 1997). Brevemente, las muestras se hidrolizaron usando HCl 6 M en un evaporador por 12 h en tubos sellados a 150°C. Los hidrolizados se diluyeron con un buffer de borato de sodio 0.4 M ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), derivatizado con o-ftalaldehído (OPA) para la determinación de los aminoácidos primarios. Se registraron los cromatogramas y las integraciones se calcularon utilizando el software ChemStation (Agilent Technologies Inc., California, Estados Unidos de América). La emisión de fluorescencia se controló continuamente a 330 y 418 nm.

Obtención de las Fracciones Peptídicas Mediante Ultrafiltración

Se utilizaron los hidrolizados que presentaron mayor actividad antioxidante, según el análisis estadístico, para proceder a la obtención de fracciones peptídicas de distinto tamaño mediante ultrafiltración, siguiendo la metodología descrita por Tovar-Pérez *et al.*, (2017) con algunas adaptaciones. Se utilizó el equipo Amicon® stirred cell modelo 8200 (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos de América) y membranas de ultrafiltración con poros de corte de las siguientes medidas: 3 kDa y 10 kDa, obteniendo 3 fracciones peptídicas para cada hidrolizado, con tamaños de > 10 kDa, 10-3 kDa y < 3 kDa. Posteriormente se determinó la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas como se describió anteriormente.

Análisis Estadístico

Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la composición química del grano, los rendimientos de harina obtenida, la determinación de proteína, el grado de hidrólisis, el perfil de aminoácidos de los hidrolizados y el porcentaje de inhibición de ABTS y de hemólisis, además de una prueba de comparaciones de medias de Tukey ($p < 0.05$).

Se utilizó regresión lineal para medir el porcentaje de inhibición del radical ABTS y para medir el poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Los resultados experimentales fueron expresados como medias \pm desviación estándar ($n=3$) con un grado de significancia del 5% ($p < 0.05$).

Para el análisis electroforético se empleó el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, Estados Unidos de América).

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software JMP versión 8 (SAS Institute Inc.; Carolina del Norte, Estados Unidos de América) y los gráficos con el software SigmaPlot versión 10 (Systat Software Inc., Illinois, Estados Unidos de América).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Química del Garbanzo

El garbanzo Blanco Sinaloa estudiado presentó un contenido de 17.53% de proteína, 5.71% de grasa, 63.08% de carbohidratos, 2.80% de cenizas y 10.88% de fibra dietaria (de los cuales, 9.43% correspondían a fibra dietaria insoluble y 1.45% a fibra dietaria soluble) por cada 100 g de grano (en base seca) (Tabla 6). Las cantidades determinadas se encuentran dentro del rango reportado en la literatura, ya que el contenido de proteína para el garbanzo va de 17 a 22%, el contenido de grasa de 3.4 a 8.8%, el de cenizas de 3 a 4.1%, el contenido de carbohidratos es superior al 60%, mientras que el contenido de fibra oscila desde 3 al 8% (Aguilar-Raymundo y Vélez-Ruiz, 2013; Muhammad *et al.*, 2013). Las diferencias entre los distintos componentes químicos son debidas a dos factores muy importantes: la variedad de garbanzo de la cual se trate y a las condiciones de cultivo, donde la fertilización nitrogenada juega un papel muy importante, al incrementar el contenido de proteína (El Hadi y Elsheikh, 1999; Rulfo y Miranda, 1972).

En ese sentido, en el estudio de Cota *et al.*, (2010) se evaluó el efecto de la variedad y la fertilización en la calidad proteica de dos variedades de garbanzo (Costa y Blanco Sinaloa), encontrándose valores de proteína mayores para Blanco Sinaloa (20.11-23.81% base seca) que los de Costa (20.17-22.66%). Los autores atribuyeron las diferencias de la composición química al factor genético, aunado a factores como el tipo de suelo, condiciones de fertilización, preparación del terreno y fecha de siembra, lo que a su vez podría explicar las diferencias entre el garbanzo Blanco Sinaloa utilizado en este estudio en comparación con el de Cota *et al.*, (2010).

Según la caracterización química realizada, el garbanzo es rico en proteínas que pueden ser aprovechadas para obtener péptidos con actividad antioxidante, ya que, además de ser abundante la cantidad de proteína, el garbanzo es una legumbre en cuya composición de aminoácidos hay una cantidad elevada de aminoácidos hidrofóbicos, ácidos y básicos; mismos que han sido identificados en secuencias peptídicas con actividad antioxidante (González-Cruz *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2013; Torres-Fuentes *et al.*, 2015).

Tabla 6. Composición química del garbanzo Blanco Sinaloa.

Componente	Contenido (%)
Proteína	17.53 ± 0.18
Lípidos	5.71 ± 0.04
Cenizas	2.80 ± 0.00
Fibra soluble	1.45 ± 0.28
Fibra insoluble	9.43 ± 0.43
Carbohidratos	63.08

Cantidades expresadas en porcentaje (%) en base seca. Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia.

Rendimiento de la Obtención de Harina de Garbanzo

A partir de 4 kg de grano de garbanzo liofilizado se obtuvieron 3.992 kg de harina con tamaño de partícula de 2 mm (obtenida del molino Thomas-Wiley), con un promedio de 998 ± 0.81 g de harina por cada kg. Por su parte, se obtuvieron 3.308 kg de harina con tamaño de partícula de 0.425 mm (obtenida a partir de la partícula de 2 mm empleando un procesador de alimentos Braun KSM 2 y el tamiz No. 40), con un promedio de 827 ± 14.35 g de harina por cada kg (Tabla 7). A su vez, a partir de los 3.308 kg de harina con tamaño de partícula de 0.425 mm, se obtuvieron 2.930 kg de harina desgrasada, sin alcaloides y sin polifenoles, con un rendimiento final de 73.25 ± 3.93 g de harina desgrasada, sin alcaloides y sin polifenoles, por cada 100 g de garbanzo (Tabla 7). Este rendimiento puede ser atribuido a que se removieron los componentes como la grasa y polifenoles, además de la testa del grano, que representa el 15% de la composición del grano y que, por su dureza, debe ser removida por remojo (Navarro-Contreras, 1997). En esta investigación, se empleó garbanzo crudo que, aunque liofilizado, seguía presentando dureza, hecho que se comprobó con la testa que no se molió al tamaño de partícula deseado.

Tabla 7. Rendimientos de la harina obtenida (g) a partir de un kg de garbanzo.

	Harina de 2 mm	Harina de 0.425 mm	Harina desgrasada	Harina sin alcaloides	Harina sin polifenoles	Rendimiento (%)
Promedio	998±0.81	827±14.35	768.5±42.72	752±40.82	732.5±39.65	73.25 ± 3.93

Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$).

Cuantificación de Proteína de los Extractos Proteicos de Garbanzo

Tras realizarse la extracción de las proteínas de garbanzo con base en su solubilidad, se obtuvieron tres extractos: albúmina, globulina y glutelina, en cantidades de 1.93 ± 0.26 , 2.93 ± 0.64 y 3.51 ± 0.56 g por 100 g de harina, respectivamente (Tabla 8). El extracto de glutelina mostró mayor rendimiento que el de albúmina ($p < 0.05$). Diversos estudios han reportado un mayor contenido de globulina y glutelina en comparación al contenido de albúmina, como ocurrió en este estudio. Liu *et al.*, (2008) encontró un contenido del 28.5% de albúmina, inferior al 43.5% de globulina. Por su parte Singh y Jambunathan (1982) reportaron un contenido de 56.6% y 18.1% de globulina y glutelina, superiores al contenido de albúmina. Por su parte, Chang (2010) reportó un rendimiento de 40.05%, 16.31% y 13.17% de albúmina, globulina y glutelina de garbanzo en una extracción secuencial. Lo anterior sugiere que puede haber variaciones en el rendimiento de los extractos proteicos obtenidos, donde las diferencias se deben a factores como: la variedad de la semilla, el método de fraccionamiento y las condiciones de almacenamiento (Liu *et al.*, 2008; Tóvar-Pérez *et al.*, 2017).

En cuanto al contenido de proteína de los extractos, los valores oscilaron entre 82.73 y 85.23 g por 100 g de extracto, sin diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 8). El contenido de proteína es similar al descrito en la literatura, donde se reportan valores de 83.57 ± 0.22 a 84.8 ± 0.3 g por 100 g de extracto de globulina de garbanzo (Ahmed, 2014; Paredes *et al.*, 1991). Sin embargo, el contenido de proteína en el extracto de albúmina y en el de glutelina es superior al reportado por Chang (2010), quien determinó 43.06 ± 0.91 y 27.50 ± 1.50 g por 100 g, respectivamente. Nuevamente, las diferencias podrían deberse a la variedad de garbanzo utilizado y al método de extracción de cada estudio (Liu *et al.*, 2008).

El que los extractos proteicos contengan alta concentración de proteína es favorable ya que indica que hay, a su vez, una cantidad mayor de proteína de la que se pueden obtener hidrolizados proteicos para evaluar su actividad antioxidante.

Tabla 8. Contenido de proteína en extractos proteicos obtenidos del garbanzo.

Extracto proteico	Cantidad de proteína (g/100 g de harina*)	Contenido de proteína (g/100 g de extracto)
Albúmina	1.93 ^b ± 0.26	82.73 ^a ± 1.19
Globulina	2.93 ^{ab} ± 0.64	82.25 ^a ± 4.77
Glutelina	3.51 ^a ± 0.56	85.23 ^a ± 6.58

Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones (n ≥ 3).
Diferentes superíndices en minúsculas en la misma columna significan diferencias significativas (p<0.05).

*Harina desgrasada, sin alcaloides y sin fenoles.

Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida

En la Figura 7 se observa el perfil electroforético de las proteínas de garbanzo y los hidrolizados obtenidos en este estudio. Del carril B al D se encuentra el perfil de los extractos de albúmina (Al), globulina (Gb) y glutelina (Gt), mientras que del carril E al G se encuentran los respectivos hidrolizados (HAl, HGb y HGt). El distinto perfil electroforético de los carriles B, C y D comprueba que la extracción seriada de las proteínas se realizó adecuadamente en función de la solubilidad de cada una de las proteínas. En el perfil electroforético de albúmina se aprecian bandas con pesos desde los 97 kDa hasta debajo de los 21 kDa, siendo tres las principales bandas de proteína, con pesos de alrededor de 97, 48 y 40 kDa. Papalamprou *et al.*, (2009) reportaron bandas con pesos moleculares de 87, 31.4 y 23.9 kDa, correspondientes a la fracción de albúmina del garbanzo; mientras que Chang (2010) reportó bandas proteicas con pesos de 93.6, 63.6, 55.3, 51, 41.7, 38.9, 36.3, 28.5, 24.3 y 21 kDa en una fracción de albúmina de garbanzo analizada en un gel SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras (como las del presente estudio), cuyos pesos son similares a los determinados en esta investigación.

Por su parte, en el carril C se aprecia el perfil electroforético del extracto de globulina, con un complejo patrón de bandeo desde los 97 kDa hasta aproximadamente los 21 kDa, con tres bandas principales a los 70, 60 y 50 kDa. En el estudio de Chang (2010) los pesos de las bandas proteicas de un extracto de globulina fueron de 93.6, 63.6, 56, 51, 40.7, 34.6, 29.2, 26.5 y 22.4 kDa. Chang *et al.*, (2012) identificaron bandas con pesos de 70.2, 50.7 y 35 kDa, correspondientes a subunidades de vicilina, bandas con pesos de 40.6 y 39.5 kDa, correspondientes a subunidades de legúmina α y bandas con pesos de 23.5 y 22.5 kDa, correspondientes a subunidades de legúmina β . De manera que las bandas de 70 y 50 kDa identificadas en este estudio corresponderían a la fracción de vicilina de la globulina de garbanzo. Mientras que las bandas con pesos entre 30 y 21 kDa corresponderían a subunidades de legúmina β , y la banda alrededor de los 40 kDa correspondería a una subunidad de legúmina α . Legúmina y vicilina son los dos grandes grupos de proteínas que componen la globulina de las legumbres como el garbanzo (Chang, 2006).

En el carril D se presenta el perfil electroforético de la glutelina de garbanzo, con bandas desde un peso aproximado de 60 kDa hasta aproximadamente los 25 kDa, encontrándose las bandas principales de proteína alrededor de los 55 y los 35 kDa de peso. Chang (2006) reportó el perfil electroforético de un extracto de glutelina de garbanzo, encontrando pesos de 58, 55 y 54 kDa para sus subunidades. Por su parte, Chang (2010) reportó pesos de 51, 38.1 y 26.2 kDa para las subunidades de glutelina. Los resultados encontrados en este estudio coinciden con lo reportado por Chang (2006, 2010), ya que las bandas de proteína con mayor intensidad se encuentran en el rango de 55-50 y 40-35 kDa.

En los carriles E, F y G se aprecia la degradación de las subunidades de proteína de mayor peso molecular por efecto de la hidrólisis enzimática con savinasa, debido a la presencia de bandas con pesos menores a 30 kDa hasta 21 kDa para los hidrolizados de albúmina (carril E), y bandas con pesos de 45 a 21 kDa para los hidrolizados de globulina y glutelina (carriles F y G, respectivamente). Sin embargo, es importante considerar que los hidrolizados de interés seguramente tienen pesos menores a los 21 kDa, por lo que es necesario analizarlos en un gel de electroforesis con un mayor grado de entrecruzamiento.

La enzima savinasa, durante el proceso de hidrólisis enzimática, realizó el rompimiento de enlaces peptídicos de la proteína, causando la liberación de cadenas peptídicas de menor peso molecular en comparación al de los extractos proteicos (Tovar-Pérez *et al.*, 2017). En el estudio de Garcia-Mora *et al.*, (2014) el uso de savinasa causó una degradación completa de las subunidades de proteína de lenteja en un tiempo de hidrólisis de dos horas, formándose fragmentos de menor tamaño, como ocurrió en este estudio. La formación de hidrolizados se constató realizando una determinación del grado de hidrólisis (Tabla 9) y con la evaluación de la actividad antioxidante (Tabla 11).

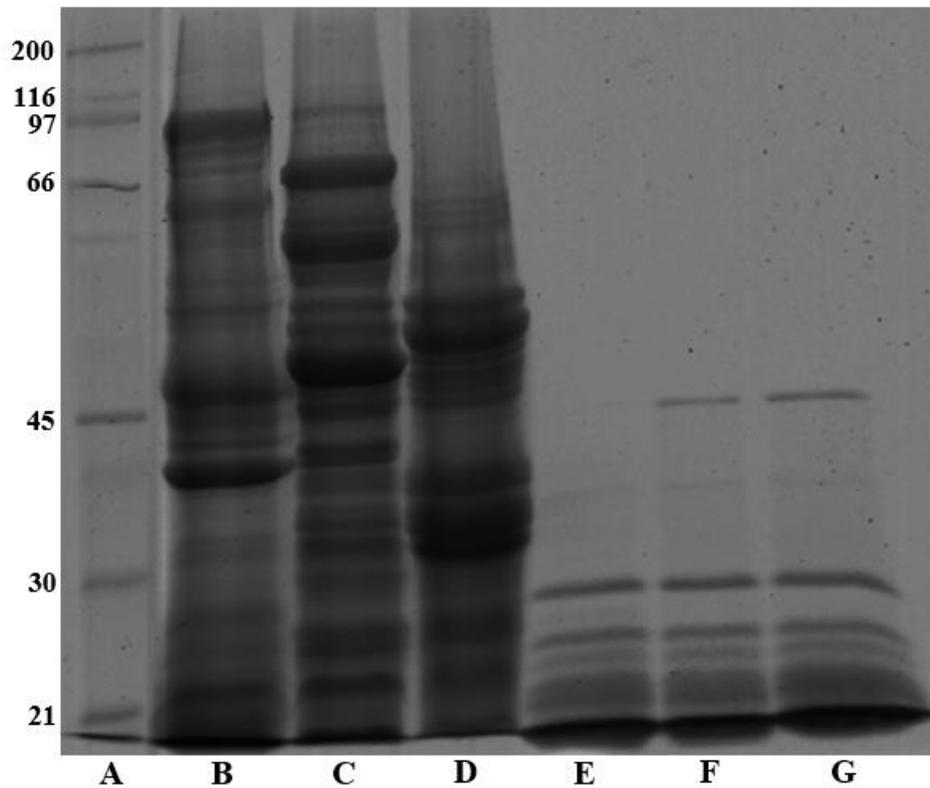


Figura 7. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras de las proteínas de garbanzo y sus hidrolizados. Carril A: marcador de peso molecular; Carril B: albúmina; Carril C: globulina; Carril D: glutelina; Carril E: hidrolizado de albúmina; Carril F: hidrolizado de globulina; Carril G: hidrolizado de glutelina.

En la Figura 8 se presenta el perfil electroforético del extracto de globulina y los hidrolizados de globulina sometidos a un pretratamiento de pulsos ultrasónicos obtenidos en este estudio. En el carril B se encuentra el extracto de globulina, del carril C al D el extracto de globulina con tres distintos pretratamientos pulsos ultrasónicos, mientras que en el F se encuentra el hidrolizado de globulina obtenido con savinasa y, por último, del carril G al I se encuentran los hidrolizados de globulina obtenidos con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (3 tratamientos distintos) seguido de hidrólisis con savinasa. Bajo las condiciones aplicadas en la electroforesis no se logran detectar diferencias en el patrón de bandeo entre los tratamientos con pulsos y el tratamiento sin pulsos (carriles B, C, D y E).

En cuanto a los hidrolizados de globulina (carriles F-I), la diferencia en el perfil electroforético radica en la desaparición de la banda de 45 kDa del carril F (encerrada en un óvalo en la Figura 8), misma que no aparece en los carriles G, H e I, en los cuales se empleó un pretratamiento con pulsos ultrasónicos. La ausencia de la banda de 45 kDa puede deberse a que el uso de un pretratamiento con ultrasonido provoca cambios conformacionales en la proteína, ocasionando que la proteasa se una más fácilmente con el sustrato, llevando a un incremento en la eficiencia de la hidrólisis (Kadam *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

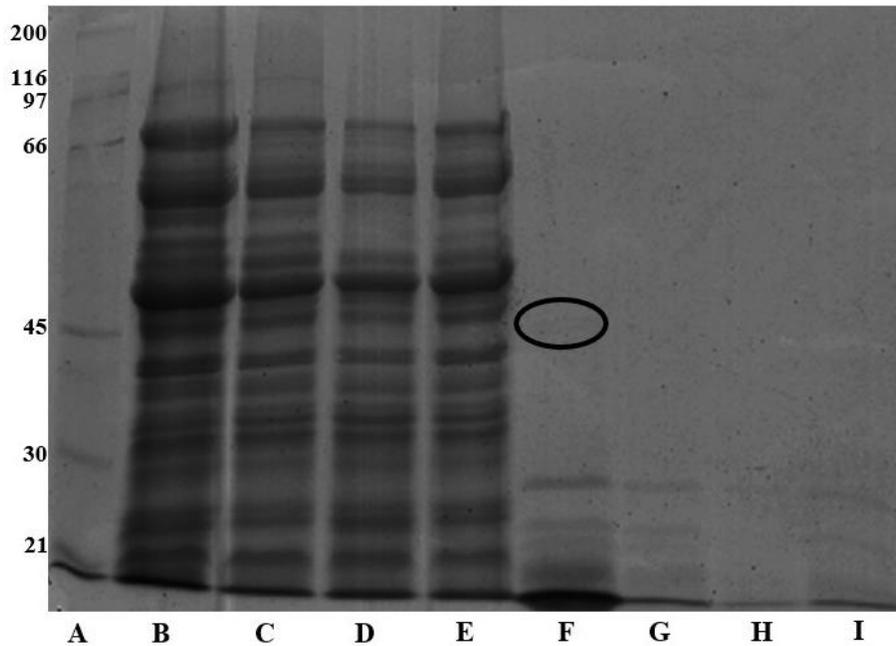


Figura 8. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras de globulina y sus hidrolizados con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU). Carril A: marcador de peso molecular; Carril B: globulina; Carril C: globulina con PU de 30% amplitud 10 minutos; Carril D: globulina con PU de 60% amplitud 20 minutos; Carril E: globulina con PU de 90% amplitud 30 minutos; Carril F: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa; Carril G: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 30% amplitud 10 minutos e hidrólisis con savinasa; Carril H: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa, Carril I: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 90% amplitud 30 minutos e hidrólisis con savinasa.

Grado de Hidrólisis

Los resultados de la determinación del grado de hidrólisis de los extractos e hidrolizados de globulina sometidos a un pretratamiento de pulsos ultrasónicos se presentan en la Tabla 9. No se encontraron diferencias en el grado de hidrólisis del extracto de globulina y del extracto sometido a los tres tratamientos distintos de ultrasonido (Gb-30, Gb-60 y Gb-90), siendo de 0 mmol de tirosina/mg de proteína en todos los casos. El resultado obtenido concuerda con lo reportado por diversos autores, ya que un pretratamiento con pulsos ultrasónicos ocasiona cambios a nivel estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas (Chemat *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2018; Yu y Tan, 2017).

Evidentemente, la incubación con savinasa del extracto de globulina ocasionó un incremento del grado de hidrólisis (Tabla 9). Al comparar el grado de hidrólisis de HGb con los hidrolizados con pretratamiento de pulsos ultrasónicos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con dos de los tratamientos: HGb-30 y HGb-60. El incremento del grado de hidrólisis de HGb-30 en comparación al grado de hidrólisis de HGb es debido al pretratamiento con pulsos ultrasónicos, ya que durante su aplicación ocurre la formación de burbujas de cavitación, las cuales, al colisionar con las proteínas ocasionan cambios conformacionales, exponiendo regiones hidrofóbicas, lo que facilitó la unión de la endopeptidasa usada en este estudio (savinasa) y el sustrato proteico, incrementando la eficiencia de la hidrólisis (Chemat *et al.*, 2017; Garcia-Mora *et al.*, 2014; Kadam *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Se han reportado incrementos en el grado de hidrólisis en hidrolizados proteicos de avena (incremento del 16% al 19%) y en hidrolizados proteicos de maíz (incremento del 10% al 12%) por efecto del pretratamiento con ultrasonido seguido de una hidrólisis enzimática con alcalasa en ambos casos (Ren *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

La disminución del grado de hidrólisis para HGb-60 se debió al incremento de amplitud del ultrasonido, ya que una amplitud mayor conduce a un proceso de colapso de burbujas más violento, lo que intensifica la agitación del solvente, reduciendo a su vez el nivel de cavitación necesario para exponer los sitios hidrofóbicos del sustrato y facilitar la unión con la enzima (Chemat *et al.*, 2017; Rutkowska *et al.*, 2017; Tiwari, 2015). A su vez, un incremento en el tiempo de aplicación del ultrasonido tiene un efecto negativo en el grado de hidrólisis, ya que

el exceso de tiempo puede causar que la proteína se pliegue nuevamente, ocasionando que los sitios expuestos se envuelvan en el interior de la proteína, revirtiendo el cambio conformacional logrado con un menor tiempo de aplicación de ultrasonido (Wang *et al.*, 2015). Dicho comportamiento fue observado en el presente estudio, ya que el grado de hidrólisis de HGb-90 fue igual al de HGb ($p < 0.05$).

Tabla 9. Determinación del grado de hidrólisis de los hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU).

Muestra	Grado de hidrólisis
Gb ¹	0 ^d
Gb-30 ²	0 ^d
Gb-60 ³	0 ^d
Gb-90 ⁴	0 ^d
HGb ⁵	14.84 ^b ± 0.10
HGb-30 ⁶	16.77 ^a ± 0.53
HGb-60 ⁷	10.91 ^c ± 0.85
HGb-90 ⁸	14.79 ^b ± 1.32

Cantidades expresadas en mmol de tirosina/mg de proteína. Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones (n ≥ 3).

Diferentes superíndices en minúsculas en la misma columna significan diferencias significativas (p<0.05). Gb¹: globulina, Gb-30²: globulina con PU de 30% amplitud 10 minutos, Gb-60³: globulina con PU de 60% amplitud 20 minutos, Gb-90⁴: globulina con PU de 90% amplitud 30 minutos, HGb⁵: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-30⁶: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 30% amplitud 10 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-60⁷: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-90⁸: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 90% amplitud 30 minutos e hidrólisis con savinasa.

Perfil de Aminoácidos

Los hidrolizados de globulina con mayor actividad antioxidante fueron seleccionados para realizarles un análisis cuantitativo de aminoácidos primarios. Los perfiles de aminoácidos del hidrolizado obtenido con savinasa (HGb) y del hidrolizado obtenido con pretratamiento de pulsos ultrasónicos de 60% de amplitud, 20 minutos e hidrólisis con savinasa (HGb-60) se presentan en la Tabla 10. Los aminoácidos presentes en mayor concentración para ambos hidrolizados fueron: ácido aspártico, arginina, serina, treonina, glicina y alanina (D, R, S, T, G, A, respectivamente). Tres de los aminoácidos mayoritarios determinados en este estudio (Asp, Arg y Ser) coinciden con lo reportado por Paredes *et al.*, (1991), quienes determinaron que los aminoácidos principales en un extracto de globulina fueron: ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, serina y leucina. Por su parte, en el estudio de Liu *et al.*, (2008) los aminoácidos mayoritarios en el extracto de globulina fueron: ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y leucina.

Es importante resaltar que se determinó un alto contenido de aminoácidos de naturaleza ácida, básica e hidrofóbica; aminoácidos reiteradamente reportados como principales en la composición de aminoácidos del garbanzo y que además son los que brindan capacidad antioxidante a los péptidos que los contienen (González-Cruz *et al.*, 2014). Los aminoácidos determinados como los más abundantes en este estudio (D, R, S, T, G, A), forman parte de la secuencia de aminoácidos (señalados en negritas) de péptidos antioxidantes de garbanzo: **RQSHFANAQP**, **NRYHE**, **DHG**, **VGDI**, **ALEPDHR**, **TETWNPNHPEL** y **SAEHGSLH** (Kou *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Ghribi *et al.*, 2015; Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Seguramente los aminoácidos mencionados son los que se encuentran en las secuencias de los hidrolizados obtenidos y son los que les brindan la capacidad antioxidante.

La presencia de alanina es muy importante ya que este aminoácido hidrofóbico incrementa la solubilidad de los péptidos en lípidos, ocasionando que los péptidos antioxidantes puedan interactuar con los órganos diana a través de interacciones hidrofóbicas con la bicapa lipídica de las células, promoviendo la interacción con radicales hidrófobos, neutralizándolos. A su vez, los aminoácidos cargados negativamente como el ácido aspártico pueden neutralizar radicales libres debido al exceso de electrones que poseen (Yu y Tan, 2017; Zou *et al.*, 2016).

Por su parte, la arginina, aminoácido básico, tiene la capacidad de actuar como donante de protones gracias a su grupo guanidino (Torres-Fuentes *et al.*, 2015). Ambos mecanismos, SET y HAT, se presentaron en los hidrolizados de globulina determinados en este estudio, según los diversos ensayos de actividad antioxidante realizados.

Finalmente, no hubo diferencias en el perfil de aminoácidos de HGb y HGb-60, ya que provenían de la misma fuente y por el análisis realizado (Vazquez-Ortiz *et al.*, 1997). Estos resultados coinciden con lo reportado por Misir y Koral (2019), quienes evaluaron el perfil de aminoácidos de hidrolizados de subproductos de trucha arcoíris obtenidos en una hidrólisis con alcalasa asistida con pulsos ultrasónicos y sin ellos. Estos autores no encontraron diferencias significativas en el contenido de aminoácidos de los distintos hidrolizados.

Tabla 10. Residuos de aminoácidos por cada 1000 residuos de aminoácidos de los hidrolizados de globulina.

Aminoácido	HGb ¹	HGb-60 ²
Ácido aspártico	119	106
Ácido glutámico	18	15
Histidina	37	39
Serina	147	144
Arginina	96	99
Glicina	113	114
Treonina	169	174
Alanina	105	106
Tirosina	25	27
Metionina	7	8
Valina	18	22
Fenilalanina	33	31
Isoleucina	7	9
Leucina	48	43
Lisina	58	64
Total	1000	1000

Los valores son el promedio de dos repeticiones, con desviaciones estándar menores al 5%. El análisis de los datos se realizó con un nivel de significancia de $P < 0.05$. HGb¹: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-60²: hidrolizado de globulina obtenido con pretratamiento de pulsos ultrasónicos de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Actividad Antioxidante de los Extractos Proteicos de Garbanzo y sus Hidrolizados

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante de las proteínas de garbanzo y sus respectivos hidrolizados por medio de tres métodos: inhibición del radical ABTS, inhibición de hemólisis de eritrocitos y medición del poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Los resultados se muestran en la Tabla 11. Se puede observar que, en los tres ensayos antioxidantes, los tres hidrolizados (HA1, HGb y HGt) mostraron mayor actividad antioxidante que las proteínas de las que provenían, a excepción del hidrolizado de albúmina en la prueba de inhibición de hemólisis. El incremento en la actividad antioxidante se debe a que los compuestos de menor tamaño, formados por el proceso de hidrólisis, tienen más disponibles las cadenas laterales de los aminoácidos en comparación a las proteínas de las que se obtuvieron, de manera que las cadenas laterales pueden interactuar con los radicales (ABTS, AAPH) o con el completo ion férrico-TPTZ, cediendo protones o electrones (Yu y Tan, 2017). A continuación, se analizarán de manera particular los resultados de actividad antioxidante para cada uno de los métodos realizados.

Medición de la actividad de atrapamiento del radical libre ABTS

Las tres proteínas de garbanzo mostraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de ABTS, siendo mayor para glutelina (37.07%), seguido de globulina (33.10%) y albúmina (10.68%). Sin embargo, al obtener los hidrolizados, el que presentó mayor actividad antioxidante fue el hidrolizado de albúmina (92.37%), seguido del hidrolizado de globulina (91.44%) y finalmente el de glutelina (87.75%), con diferencias significativas entre ellos. Al compararlo con lo reportado previamente para hidrolizados de otras legumbres, Evangelho *et al.*, (2017) encontraron 68% de inhibición de ABTS en hidrolizados de globulina de frijol, mientras que Ngoh y Gan (2016) determinaron una inhibición del $53.33\% \pm 3.24$ de ABTS en hidrolizados proteicos de frijol. Por su parte, Reyes-Jara *et al.*, (2018) evaluaron la actividad antioxidante de hidrolizados de un aislado proteico de soya, determinando $68.7\% \pm 2.4$ de inhibición de ABTS. Los valores de inhibición de ABTS determinados en el presente estudio fueron notoriamente mayores a los descritos anteriormente, hecho que puede deberse a la enzima empleada para el proceso de hidrólisis que fue savinasa, la cual ha permitido la

obtención de hidrolizados con mayor actividad antioxidante de proteína de lenteja que los obtenidos con alcalasa o protamex (García-Mora *et al.*, 2014), enzimas empleadas en los estudios descritos anteriormente.

Adicionalmente, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en el ensayo de ABTS (Tabla 12) de los hidrolizados (HA1, HGb y HGT), encontrándose, como se esperaba, un valor mayor para el hidrolizado de glutelina en comparación de los otros dos hidrolizados, para los cuales no hubo diferencias significativas. Al comparar los resultados con la IC₅₀ de hidrolizados de otras legumbres como mungo, soya y poroto, con valores de 54.65 ± 1.83 , 31.6 ± 0.2 y $84.14 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, los tres hidrolizados de garbanzo presentaron mayor actividad antioxidante (Guerra *et al.*, 2017; Reyes-Jara *et al.*, 2018; Guerra-Almonacid *et al.*, 2019). Las diferencias en el valor de IC₅₀ puede deberse a la enzima empleada, ya que en los estudios descritos se empleó alcalasa. Como ya se ha mencionado con anterioridad, el uso de savinasa permite obtener hidrolizados con mayor actividad antioxidante que los obtenidos con alcalasa (García-Mora *et al.*, 2014).

Medición del efecto protector en eritrocitos humanos

En el ensayo de inhibición de hemólisis, se encontró un mayor valor para el extracto de albúmina (80.38%), seguido de globulina (67.38%) y glutelina (64.89%), sin diferencias significativas entre los dos últimos. Tras la hidrólisis con savinasa, el porcentaje de inhibición de hemólisis de los hidrolizados de glutelina (77.40%) y globulina (73.04%) fueron mayores en comparación al de albúmina (58.76%), sin diferencias significativas entre los dos primeros. El incremento de la inhibición de hemólisis de los hidrolizados de globulina y glutelina, en comparación a los extractos de los que se originaron, se debe a la exposición de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en los hidrolizados, que pueden actuar donando protones para estabilizar al AAPH y detener la reacción en cadena del radical, evitando así el daño a los eritrocitos (Liu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2010; Sbroggio *et al.*, 2016).

La mayoría de los estudios de efecto protector en eritrocitos humanos son para compuestos como fenoles, ginsenósidos y flavonoides (Hernández-Ruiz *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2010). En el caso de compuestos de naturaleza proteica, el estudio de Villalba-Urquidy (2019) reporta porcentajes de inhibición de hemólisis superiores al 85% para hidrolizados

obtenidos de colágeno de calamar gigante a través de un proceso de hidrólisis secuencial, cantidades superiores a las determinadas en este estudio. Por su parte, Zheng *et al.*, (2016) estudiaron el efecto protector en eritrocitos humanos de distintos dipéptidos contra los efectos que ocasiona la oxidación inducida por el AAPH, encontrando inhibiciones del 76.88% para Cys-Gly y del 76.7% para Met-Gly, resultados cercanos a los determinados para los hidrolizados de garbanzo del presente estudio.

Medición del poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

En el ensayo de FRAP se encontraron valores desde 128.07 hasta 644.27 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para las proteínas del garbanzo, siendo mayor para globulina, seguido de glutelina y albúmina. En cuanto a los hidrolizados, éstos mostraron alta capacidad de donación de electrones, encontrándose valores de 5185.57 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para el hidrolizado de globulina, seguido de 1624.41 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para albúmina y 1323.83 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para glutelina, sin diferencias significativas entre los dos últimos. Silva *et al.*, (2017) analizaron el poder reductor férrico de hidrolizados de proteína de linaza obtenidos con alcalasa, reportando valores de 20 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra. Por su parte, Dos Santos-Aguilar *et al.*, (2018) obtuvieron hidrolizados de proteína de arroz empleando alcalasa y una proteasa de *Bacillus licheniformis*, encontrando valores de 18.78 ± 0.15 para el hidrolizado de la proteasa de *B. licheniformis* y 19.31 ± 0.19 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra para el hidrolizado de alcalasa. Por último, Piñuel *et al.*, (2019) estudiaron un extracto proteico de frijol, con un poder reductor de 95.80 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, mientras que el hidrolizado obtenido tras una digestión gastrointestinal *in vitro* presentó 225.77 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra.

Al comparar las cifras de la literatura con las de este estudio, los hidrolizados de garbanzo y, principalmente, los de globulina, se presentan como compuestos antioxidantes con gran capacidad de donación de electrones, lo cual puede explicarse por los aminoácidos que se encuentran en abundancia en esa fracción proteica. En el perfil de aminoácidos realizado al hidrolizado de globulina (HGb, Tabla 10) se determinó un alto contenido de ácido aspártico, un aminoácido cargado negativamente que posee exceso de electrones que pueden ser donados, reduciendo al complejo ion férrico-TPTZ a ion ferroso-TPTZ. Los aminoácidos ácidos pueden interactuar con metales de transición a través de sus residuos cargados evitando

procesos oxidativos. Además, se encontró un alto contenido de treonina y serina, aminoácidos polares sin carga que han sido asociados a procesos de quelación de metales, como el Fe⁺³, en péptidos antioxidantes (Benzie y Strain, 1996; Sepúlveda-Ahumada *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2016).

Tabla 11. Evaluación de la actividad antioxidante de diferentes proteínas obtenidas del garbanzo.

Muestra	ABTS		Hemólisis		FRAP	
	% de inhibición		% de inhibición		μmol ET/g muestra	
	Proteína	Hidrolizado	Proteína	Hidrolizado	Proteína	Hidrolizado
Albúmina	10.68 ^{cB} ± 1.53	92.37 ^{aA} ± 0.12	80.38 ^{aA} ± 2.84	58.76 ^{bB} ± 8.24	128.07 ^{bB} ± 13.06	1624.41 ^{bA} ± 131.92
Globulina	33.10 ^{bB} ± 0.76	91.44 ^{bA} ± 0.55	67.38 ^{bB} ± 2.40	73.04 ^{aA} ± 3.10	644.27 ^{aB} ± 150.28	5185.57 ^{aA} ± 698.59
Glutelina	37.07 ^{aB} ± 0.68	87.75 ^{cA} ± 0.66	64.89 ^{bB} ± 2.99	77.40 ^{aA} ± 6.27	446.07 ^{aB} ± 45.89	1323.83 ^{bA} ± 178.18

Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones (n ≥ 3). Diferentes superíndices en minúsculas en la misma columna significan diferencias significativas (p<0.05). Diferentes superíndices en mayúsculas entre columnas por cada método antioxidante significan diferencias significativas (p<0.05).

Las concentraciones de las proteínas y de los hidrolizados fueron 200 μg/mL.

Tabla 12. Determinación de IC₅₀ en el ensayo de ABTS de hidrolizados de proteínas de garbanzo.

Hidrolizado	IC ₅₀ (μg/mL)
Albúmina	1.54 ^b ± 0.06
Globulina	1.56 ^b ± 0.17
Glutelina	2.12 ^a ± 0.02

IC₅₀ expresada como concentración del hidrolizado en μg muestra/mL necesaria para inhibir el radical ABTS en un 50%. Los datos se muestran como la media ± DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones (n ≥ 3). Diferentes superíndices en minúsculas en la misma columna significan diferencias significativas (p<0.05).

Actividad Antioxidante de los Hidrolizados de Globulina Obtenidos con Pretratamiento de Pulsos Ultrasónicos

El efecto de la aplicación del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la actividad antioxidante se analizó con las pruebas de ABTS, inhibición de hemólisis y FRAP. En las Figuras 9 y 10, se observa que la aplicación de los pulsos ultrasónicos afecta en gran medida en los ensayos en los que se evalúa la capacidad de donación de electrones, como son ABTS y FRAP, ya que hay una evidente reducción del porcentaje de inhibición de ABTS en los extractos proteicos y en los hidrolizados que recibieron pretratamiento de ultrasonido en comparación al extracto de globulina y al hidrolizado sin ultrasonido; mientras que en el ensayo de FRAP se observa el mismo comportamiento, donde el hidrolizado de globulina tiene mayor poder reductor que los hidrolizados con pretratamiento de pulsos ultrasónicos, al igual que el extracto de globulina tiene un mayor poder antioxidante que los extractos pretratados con ultrasonido. Efectos similares se han descrito en la literatura, pues Xia *et al.*, (2019) reportaron la utilización de un pretratamiento con ultrasonido en la obtención de hidrolizados antioxidantes de proteína de la microalga *Dunaliella salina*, donde el uso del ultrasonido generó una disminución de la actividad antioxidante (evaluada como % de inhibición de DPPH) en un lapso de 30 minutos, como ocurrió en el presente estudio en las pruebas de ABTS y FRAP. Por su parte, Misir y Koral (2019) encontraron mayor porcentaje de inhibición de ABTS para hidrolizados proteicos de trucha arcoíris obtenidos de manera convencional en comparación a los obtenidos con una hidrolisis asistida por ultrasonido, al igual que en esta investigación.

Hay que destacar que, aunque se dio una disminución en el poder reductor férrico en los hidrolizados obtenidos con pretratamiento de ultrasonido, éstos presentan un poder reductor de 1134.34 ± 22.63 a 2188.53 ± 61.76 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra en el ensayo de FRAP, lo cual es notoriamente superior a lo reportado para hidrolizados de arroz y frijol, cuyo poder férrico se determinó de 19.31 ± 0.19 y 225.77 $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra, respectivamente (Dos Santos-Aguilar *et al.*, 2018; Piñuel *et al.*, 2019).

Para el ensayo del efecto protector en eritrocitos (Figura 9), el uso del pretratamiento con ultrasonido favoreció en gran medida a los hidrolizados de globulina, ya que, al aplicarlo, se

alcanzó el 100% de inhibición de la hemólisis de los eritrocitos para los tres tratamientos con ultrasonido previo a la hidrólisis con savinasa, porcentaje notoriamente superior al alcanzado por el hidrolizado de globulina sin ultrasonido ($73.04\% \pm 3.10$). De igual manera, al comparar el porcentaje de inhibición con el obtenido por un control de ácido gálico a la misma concentración ($81.55\% \pm 2.23$), el poder inhibitorio de los hidrolizados con pretratamiento de ultrasonido fue mayor. Diversos autores han reportado que el uso de pulsos ultrasónicos genera incrementos en la actividad antioxidante en ensayos como inhibición del DPPH y radical hidroxilo (Shi *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015).

Los resultados observados en los tres ensayos indican que el uso de pulsos ultrasónicos favorece la obtención de hidrolizados con capacidad de donación de protones. En el perfil de aminoácidos, para el hidrolizado con pretratamiento de ultrasonido (HGb-60, Tabla 10) se encontró un alto contenido de arginina, aminoácido básico que tiene la capacidad de actuar como donante de protones (Guo *et al.*, 2014). También hay que considerar el alto contenido de alanina, aminoácido hidrofóbico que confiere capacidad antioxidante a los hidrolizados al incrementar su solubilidad en sustratos afines. Este aminoácido pudo ser expuesto por efecto del pretratamiento con ultrasonido, ocasionando que se obtuvieran hidrolizados ricos en este aminoácido, lo que pudo facilitar la unión de los hidrolizados de globulina con las membranas lipídicas de los eritrocitos, donando protones al AAPH, inhibiendo su efecto dañino (Sepúlveda-Ahumada *et al.*, 2012; Yu y Tan, 2017).

Inhibición de ABTS⁺ y de hemólisis

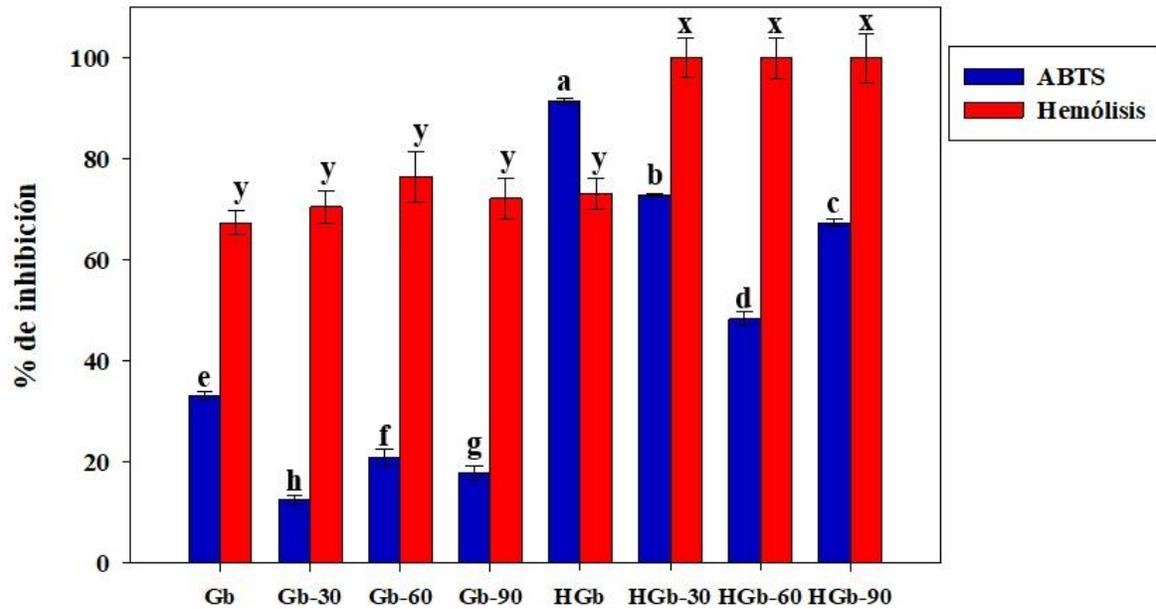


Figura 9. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos e hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU) mediante el ensayo de ABTS y de efecto protector en eritrocitos. Los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). Diferentes letras significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de las proteínas e hidrolizados fueron 200 $\mu\text{g/mL}$. Gb: globulina, Gb-30: globulina con PU de 30% amplitud 10 minutos, Gb-60: globulina con PU de 60% amplitud 20 minutos, Gb-90: globulina con PU de 90% amplitud 30 minutos, HGb: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-30: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 30% amplitud 10 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-60: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-90: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 90% amplitud 30 minutos e hidrólisis con savinasa.

Evaluación de la actividad antioxidante mediante FRAP

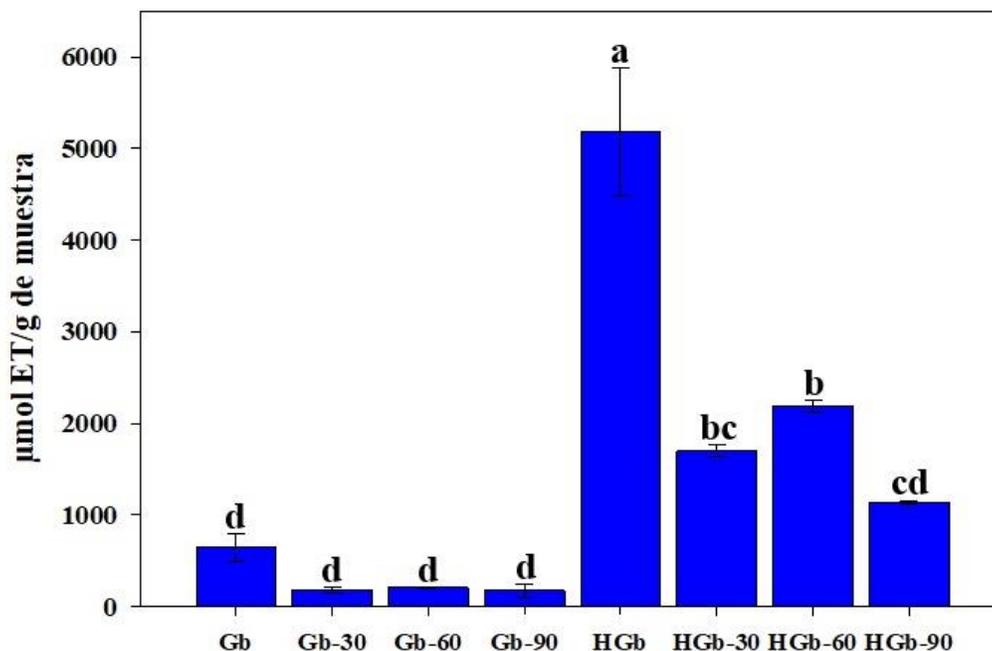


Figura 10. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos e hidrolizados de globulina con pretratamiento de pulsos ultrasónicos (PU) mediante el ensayo de FRAP. Los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). Diferentes letras significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de las proteínas e hidrolizados fueron $200 \mu\text{g/mL}$. Gb: globulina, Gb-30: globulina con PU de 30% amplitud 10 minutos, Gb-60: globulina con PU de 60% amplitud 20 minutos, Gb-90: globulina con PU de 90% amplitud 30 minutos, HGb: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-30: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 30% amplitud 10 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-60: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa, HGb-90: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 90% amplitud 30 minutos e hidrólisis con savinasa.

Actividad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas de Globulina

Tras determinar cuáles fueron los hidrolizados de globulina con mayor actividad antioxidante (HGb y HGb-60), se procedió a obtener 3 fracciones peptídicas (con tamaños de >10 kDa, 10-3 kDa, < 3 kDa) de cada uno por medio de ultrafiltración, para evaluar su actividad antioxidante con los tres métodos descritos previamente. En la prueba de ABTS, las fracciones peptídicas tuvieron una notoria disminución del porcentaje de inhibición, siendo menores que los hidrolizados de los que provenían e incluso menores que el extracto de globulina (Figura 11). Este comportamiento se repitió al evaluar el poder reductor de las fracciones peptídicas, pues todas tuvieron menor capacidad antioxidante que los hidrolizados de los que se obtuvieron, sin embargo, en este caso, eran estadísticamente iguales al extracto de globulina (Figura 13). Ngho y Gan (2016) reportaron un comportamiento similar para fracciones peptídicas obtenidas de hidrolizados de frijol, donde el hidrolizado presentó un porcentaje más alto de inhibición del radical ABTS (53.3%), en comparación a lo encontrado en tres fracciones peptídicas del mismo peso a las de este estudio (19.79, 2.61 y 42.18%).

En el ensayo de inhibición de hemólisis (Figura 12), se encontraron resultados favorables de la ultrafiltración, pues las fracciones peptídicas obtenidas de H-Gb mostraron mayor porcentaje de inhibición en comparación al hidrolizado, incluso la fracción de 10-3 kDa llegó al 100% de inhibición. En cuanto a las fracciones peptídicas obtenidas de HGb-60, éstas mantuvieron la capacidad de inhibición de hemólisis, con valores del 100%, lo cual puede deberse al efecto del pretratamiento con pulsos ultrasónicos en la obtención de hidrolizados con mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, lo que permite obtener fracciones peptídicas con aminoácidos hidrofóbicos, facilitando la interacción entre las fracciones peptídicas y las membranas de los eritrocitos (Yu y Tan, 2017). Las fracciones peptídicas obtenidas de los hidrolizados HGb y HGb-60 presentan capacidad antioxidante, donde su mecanismo de acción es a través de la transferencia de protones. El incremento de la capacidad antioxidante de las fracciones peptídicas de HGb puede deberse a que los péptidos de bajo peso molecular, al ser una cadena corta de residuos de aminoácidos, tienen menor impedimento estérico en comparación a los hidrolizados, lo que permite que los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos interactúen con mayor facilidad, lo que, a su vez permite que reaccionen con los radicales libres, neutralizándolos (Xia *et al.*, 2019).

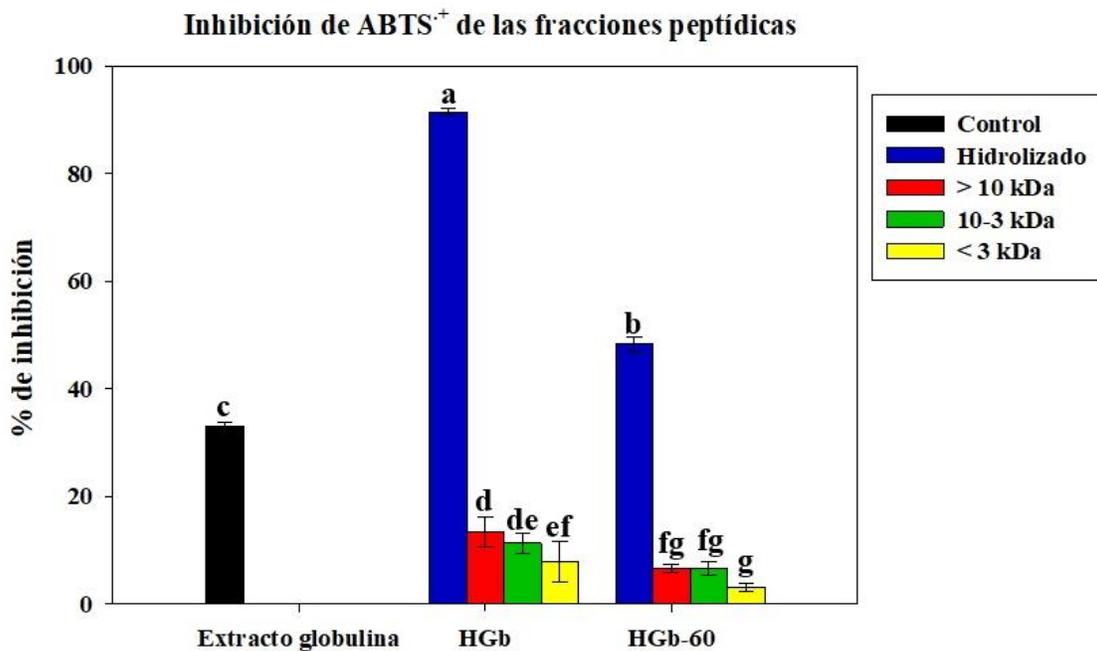


Figura 11. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de ABTS. Los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). Diferentes letras significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de la proteína, hidrolizados y las fracciones peptídicas fueron 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HGb: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-60: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa.

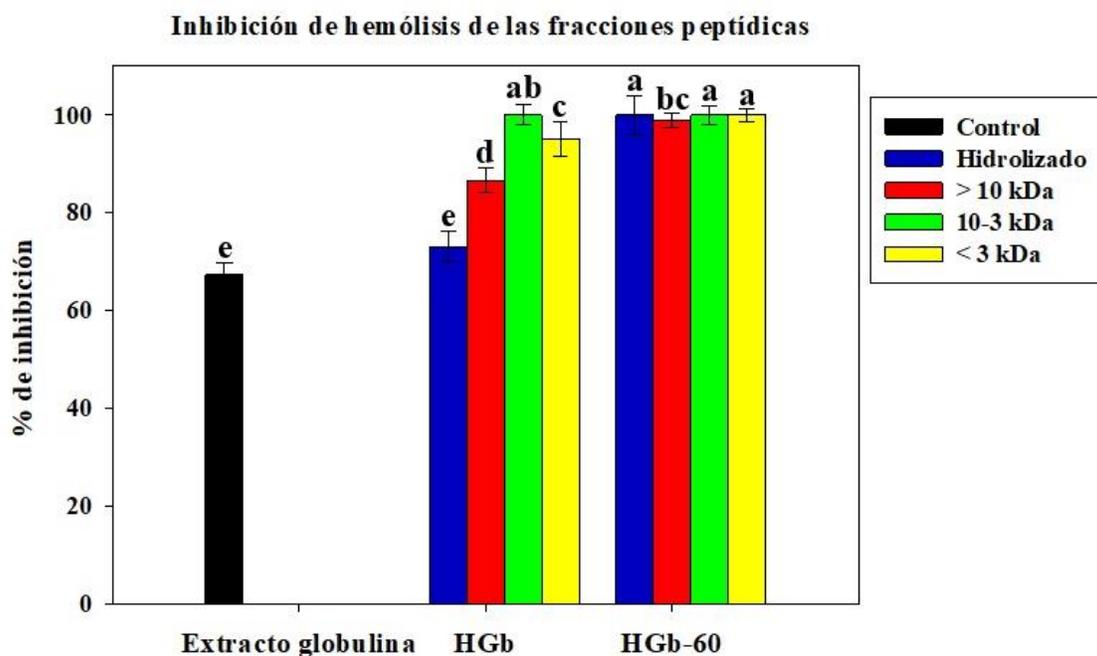


Figura 12. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de efecto protector en eritrocitos humanos. Los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). Diferentes letras significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de la proteína, hidrolizados y las fracciones peptídicas fueron $200 \mu\text{g/mL}$. HGb: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-60: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa.

Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas mediante FRAP

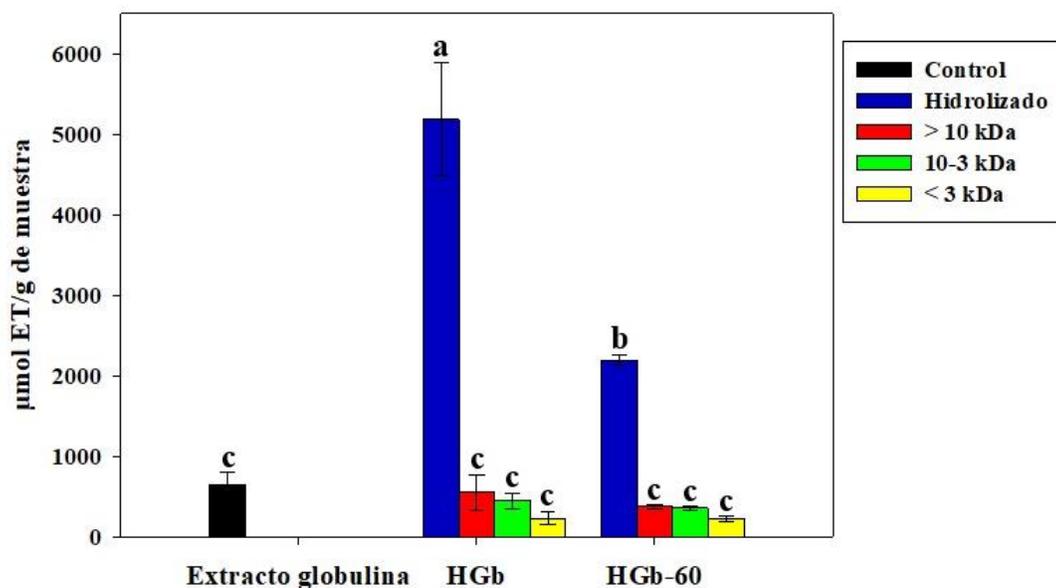


Figura 13. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto, hidrolizados y fracciones peptídicas de globulina mediante el ensayo de FRAP. Los datos se muestran como la media \pm DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n \geq 3$). Diferentes letras significan diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de la proteína, hidrolizados y las fracciones peptídicas fueron $200 \mu\text{g/mL}$. HGb: hidrolizado de globulina obtenido con savinasa, HGb-60: hidrolizado de globulina obtenido con PU de 60% amplitud 20 minutos e hidrólisis con savinasa.

CONCLUSIONES

Los hidrolizados de albúmina, globulina y glutelina de garbanzo obtenidos con savinasa presentan actividad antioxidante, exhibiendo un alto poder reductor, sobre todo los hidrolizados de globulina, lo cual se atribuye al contenido elevado de ácido aspártico en dicha proteína.

Los hidrolizados de globulina obtenidos con pretratamiento de pulsos ultrasónicos muestran una notoria actividad antioxidante basada en la donación de protones, que se atribuye al contenido elevado de arginina y a la exposición del elevado contenido de alanina por efecto del ultrasonido.

Las fracciones peptídicas de globulina presentan un elevado efecto protector en eritrocitos humanos, debido a la exposición de aminoácidos hidrofóbicos, abundantes en la globulina de garbanzo, lo que ayuda a que los aminoácidos básicos contenidos en las fracciones peptídicas exhiban el mecanismo de donación de protones.

El uso de un pretratamiento con pulsos ultrasónicos facilita la obtención de hidrolizados y fracciones peptídicas de garbanzo con mayor actividad antioxidante basada en un mecanismo de donación de protones, esto debido a los cambios conformacionales que genera en las proteínas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la caracterización químico-estructural de los hidrolizados y fracciones peptídicas obtenidas, llevando a cabo la determinación del punto isoeléctrico y la identificación de la secuencia de aminoácidos.

Además, se recomienda evaluar otras bioactividades en ensayos *in vitro* a los hidrolizados y fracciones obtenidas, como la actividad antiinflamatoria, ya que los hidrolizados obtenidos con savinasa han mostrado diversas actividades biológicas.

Finalmente, los péptidos obtenidos podrían ser incorporados a una matriz alimentaria para evaluar su efecto en un estudio *in vivo*, llevando al desarrollo de un alimento funcional.

REFERENCIAS

Aguilar-Raymundo V. G., y Vélez-Ruiz, J. F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 25-34.

Ahmed, M. A. (2014). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its application in cake. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8(11), 1101-1107.

AOAC (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20th ed.). Arlington, VA, USA.

Badui-Dergal, S. (2013). Química de los alimentos, Quinta edición. Pearson, México. 744 pp.

Benzie, I. F. F., y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Chang, Y. W. (2006). Isolation and characterization of proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. Tesis de Maestría. Department of Food Science and Agriculture Chemistry, McGill University. Montreal, Quebec.

Chang, Y. W. (2010). Isolation and characterization of protein fractions from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. Tesis de Doctorado. Department of Food Science and Agriculture Chemistry, McGill University. Montreal, Quebec.

Chang, Y. W., Alli, I., Molina, A. T., Konishi, Y., y Boyce, J. I. (2012). Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. *Food Bioprocess Technology*, 5, 618-625.

Chemat, F., Huma, Z. E., y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms,

techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

Coscueta, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., y Pintado, M. E. (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198, 36-44.

Cota, A. G., Yañez, G. A., Esquer, E., Anduaga, R., y Barrón, J. M. (2010). Efecto de la variedad y la fertilización en indicadores de calidad proteica in-vitro de dos variedades y una línea de garbanzo (*Cicer arietinum*). *Revista Chilena de Nutrición*, 37(2), 193-200.

Dhaval, A., Yadav, N., y Purwar, S. (2016). Potential applications of food derived bioactive peptides in management of health. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22, 377-398.

Dos Santos-Aguilar, J. G., de Castro, R., y Sato, H. H. (2018). Optimization of the enzymatic hydrolysis of rice protein by different enzymes using the response surface methodology. 3 *Biotech*, 8(8), 372. doi:10.1007/s13205-018-1401-1

El Hadi, E. A., y Elsheikh, E. A. E. (1999). Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization on yield and protein content of six chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars in marginal soils under irrigation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 54, 57-63.

Evangelho, J. A. D., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., Berrios, J. J., Dias, A. R. G., y Zavareze, E. D. R. (2017.). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460-467.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). Production data. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/en/?#data>. Consultado el 16 de noviembre de 2018.

García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., Zielinska, D., y Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319-332.

García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Bonache, M. A., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., y Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464-472.

García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., y Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4166-4174.

Ghribi, A. M., Sila, A., Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N., Makhoul, I., Blecker, C., Attia, H., Dhulster, P., Bougatef, A., y Besbes, S. (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.

González-Cruz, L., Filardo-Kerstupp, S., Juárez-Goiz, J. M. S., Güemes-Vera, N., y Aurea-Bernardino, N. (2014). Características nutricionales del garbanzo. *Los alimentos en México y su relación con la salud*. 135-147 pp.

Guerra-A., C. M., Murillo, W., y Méndez-A., J. J. (2017). Antioxidant potential use of bioactive peptides derived from mung bean hydrolysates (*Vigna Radiata*). *African Journal of Food Science*, 11(3), 67-73.

Guerra-Almonacid, C. M., Torruco-Uco, J. G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. J., y Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(4), 288-296.

Guo, J., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., y Wu, W. (2014). The effects of and antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*, 7, 719-726.

Gupta, R. K., Gupta, K., Sharma, A., Das, M., Ansari, I. A., y Dwivedi, P. D. (2017). Health risks and benefits of chickpea (*Cicer arietinum*) consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 6-22.

Hernández-Ledesma, B., del Mar-Contreras, M., y Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 23-35.

Hernández-Ruiz, K. L., Ruiz-Cruz, S., Cira-Chávez, L. A., Gassos-Ortega, L. E., Ornelas-Paz, J. J., Del-Toro-Sánchez, C. L., Márquez-Ríos, E., López-Mata, M. A., y Rodríguez-Félix, F. (2018). Evaluation of antioxidant capacity, protective effect on human erythrocytes and phenolic compound identification in two varieties of plum fruit (*Spondias* spp.) by UPLC-MS. *Molecules*, 23, 3200.

Higuera-Barraza, O. A., Del Toro-Sanchez, C. L., Ruiz-Cruz, S., y Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 558-562.

Ho, S. K., Tan, C. P., Thoo, Y. Y., Abas, A., y Ho, C. W. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants in Misai Kucing (*Orthosiphon stamineus*). *Molecules*, 19, 12640-12659.

Huang, D., Ou, B., y Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., y O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 60-67.

Kangsanant, S., Thongraung, C., Jansakul, C., Murkovi, M., y Seechamnaturakit, V. (2015). Purification and characterisation of antioxidant and nitric oxide inhibitory peptides from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 660-665.

Kirchhoff, P. M., Biehl, B., y Crone, G. (1989). Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chemistry*, 31(4), 295–311.

Knezevic-Jugovic, Z., Stefanovic, A., Zuza, M., Milovanovic, S., Jakovetic, S., Manojlovic, V., y Bugarski, B. (2012). Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Periodica Technologica*, 43, 33-41.

Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., y Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *Food Science and Technology*, 50, 591-598.

Kremkau, F. W. (2015). *Sonography Principles and Instruments*. Novena edición. Elsevier Health Sciences. China. 304 p.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., y Liu, J. (2008) Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106, 444-450.

Liu, L. H., Hung, T. V., y Bennett, L. (2008). Extraction and characterization of chickpea (*Cicer arietinum*) albumin and globulin. *Journal of Food Science*, 73(5), 299-305.

Liu, Z. Q., Luo, X. Y., Liu, G. Z., Chen, Y. P., Wang, Z. C., y Sun, Y. X. (2003). In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2555-2558.

Lu, J., Jin, Y., Liu, G., Zhu, N., Gui, M., Yu, A., y Li, X. (2010). Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 205-208.

Misir, G. B., y Koral, S. (2019). Effects of ultrasound treatment on structural, chemical and functional properties of protein hydrolysate of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by-products. *Italian Journal of Food Science*, 31, 205-223.

Moore, S., y Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 367-388

Muhammad, A., Lloyd, W. R., Rashida, A., y Mian, N. R. (2013). Application and opportunities of pulses in food system: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11), 1168-1179.

Natural Resources Conservation Service. Classification for kingdom plantae down to species *Cicer arietinum* L. Obtenido de: <https://plants.usda.gov>. Consultado el 5 de septiembre de 2018.

Navarro-Contreras, A. L. (1997). Caracterización parcial de las proteínas mayoritarias de garbanzo nacional, de exportación y rezaga y su posible relación con calidad comercial. Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Sonora, México.

Ngoh, Y. Y., y Gan, C. Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331-337.

Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., Biliaderis, C. G., y Kiosseoglou, V. (2009). Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 23, 337-343.

Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C., y Olivares-Vázquez, M. R. (1991). Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science*, 56(3), 726-729.

Phytonutrient Canada. (2017). Mecanismo de acción de los antioxidantes. Obtenido de: <http://www.bmccanada.com>. Consultado el 17 de noviembre de 2017.

Piñuel, L., Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, D. A., Morales, D., Pinto, A., Moran, R., Samaniego, I., y Carrillo, W. (2019). Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9, 45-58.

Pisoschi, A. M., y Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1, 106.

Prior, R. L., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Quansah, J. K., Udenigwe, C. C., Saalia, F. K., y Yada, R. Y. (2013). The effect of thermal and ultrasonic treatment on amino acid composition, radical scavenging and reducing potential of hydrolysates obtained from simulated gastrointestinal digestion of cowpea proteins. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(1), 31-38.

Ramirez, M. L., Cendoya, E., Nichea, M. J., Zachetti, V. G. L., y Chulze, S. N. (2018). Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. *Current Opinion in Food Science*, 23, 32-37.

Re, R., Pellegrini N., Protoggente A., Pannala A., Yang M., y Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical. *Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Ren, X., Ma, H., Mao, S., y Zhou, H. (2014). Effects of sweeping frequency ultrasound treatment on enzymatic preparations of ACE-inhibitory peptides from zein. *European Food Research and Technology*, 238(3), 435-442.

Reyes-Jara, A. M., Liggieri, C. S., y Bueno, M. A. (2018). Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. *Food Chemistry*, 264, 326-333.

Roginsky, V., y Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254.

Roy, F., Boye, J. I., y Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43, 432-442.

Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., y Ceron, J. J. (2016). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An update. *BMC Veterinary Research*, 12, 166.

Rulfo, F., y Miranda, H. (1972). Leguminosas de grano. PCCMCA. Nicaragua. 233 pp.

Rutkowska, M., Namiesnik, J., y Konieczka, P. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction. En F. Pena-Pereira y M. Tobiszewski (Eds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes* (1° ed., pp. 301-324). Netherlands: Elsevier.

Sánchez, A., y Vázquez, S. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1, 29-46.

Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G., Georgetti, S. R., y Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2), 375-381.

Schuster-Gajzágó, I. (2009). Cultivated plants, primarily as food sources. Vol. 1. Nutritional aspects of legumes. 372 pp.

Segura-Campos, M., López-Von, G., Chel-Guerrero, L., y Betancur-Ancona, D. (2010). Calidad nutrimental de un hidrolizado proteínico de *Phaseolus lunatus* y su incorporación en una crema de zanahoria. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 50, 9-16.

Sepúlveda-Ahumada, D. R., García-Amezquita, L. E., Martínez-Alvarenga, M. S., Martínez-Rodríguez, E. Y., y Peña-Ramos, E. A. (2012). Péptidos con actividad antioxidante. En: Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., De la Rosa, L. A., y Ayala-Zavala, J. F (Eds.), *Antioxidantes en Alimentos y Salud* (pp. 201-227). AM EDITORES.

Servicio de Información Agrícola y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2019. Obtenido de: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019. Consultado el 18 de noviembre de 2019.

Shi, R. J., Chen, Z. J., Fan, W. X., Chang, M. C., Meng, J. I., Liu, J. Y., y Feng, C. P. (2018). Research on the physicochemical and digestive properties of *Pleurotus eryngii* protein. *International Journal of Food Properties*, 21(1): 2785-2806.

Silva, F. G. D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M., y Miralles, B. (2017). Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 140–146.

Singh, B. P., Vij, S., y Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.

Singh, U., y Jambunathan, R. (1982). Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 31, 347-354.

Soares-Castro, R. J., y Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes of their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.

Solomon, E. P., Berg, L. R., y Martin, D. W. (2008). Biología, Octava edición. McGraw-Hill Interamericana, China. 1234 pp.

Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., y Pahuja-Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(6), 8-22.

Stanisavljevic, N., S., Vukotic, G. N., Pastor, F. T., Suznjevic, D., Jovanovic, Z. S., Strahinic, I. D., Fira, D. A., y Radovic, S. S. (2015). Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 1033-1042.

Tiwari, B. K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Tontul, I., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., y Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253-1259.

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.

Tovar Del Río, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Risaralda, Colombia.

Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Becerra, L., y Lugo-Cervantes, E. (2017). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed, CyTA. *Journal of Food*, 15(4), 489-496.

Vazquez, J. (2016). Propiedades físicas del sonido. Obtenido de: <https://sites.google.com/site/megafoniajenny/t01-prin-bas-del-sonido/1-2-propiedades-fisicas-del-sonido>. Consultado el 26 de septiembre de 2017.

Vazquez-Ortiz, F., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M., & Villegas-Ozuna, R. (1997). Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 158-165.

Venereo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 31(2), 126-133.

Villalba-Urquidy, B. S. (2019). Actividad antioxidante de péptidos generados durante una hidrólisis secuencial de proteínas del tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.

Voigt, J., Biehl, B., y Wazir, S. K. S. (1993). The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry*, 47(2), 145-151.

Wang, B., Atungulu, G. G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y., y Wu, B. (2015). Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ACE-inhibitory peptides from oat-isolated protein. *Food Biophysics*, 10(3), 244-252.

World Health Organization. (2017). Noncommunicable diseases. Obtenido de: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Consultado el 21 de mayo de 2018.

Xia, E., Zhai, L., Huang, Z., Liang, H., Yang, H., Song, G., Li, W., y Tang, H. (2019). Optimization and identification of antioxidant peptide from underutilized *Dunaliella salina* protein: Extraction, *in vitro* gastrointestinal digestion, and fractionation. *BioMed Research International*.

Xue, Z., Wen, H., Zhai, L., Yu, Y., Li, Y., Yu, W., Cheng, A., Wang, C., y Kou, X. (2015). Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 77, 75-81.

Xu, J., Zhao, Q., Qu, Y., y Ye, F. (2015). Antioxidant activity and anti-exercise-fatigue effect of highly denatured soybean meal hydrolysate prepared using neutrase. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1982-1992.

Yu, H. C., y Tan, F. J. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant hydrolysates from porcine liver by using response surface methodology. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(11), 1612-1619.

Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C., y Yang, Q. (2012). Ultrasonic-Assisted Enzymolysis to Improve the Antioxidant Activities of Peanut (*Arachin conarachin* L.) Antioxidant Hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 9051-9068.

Yust, M. M., Millán-Linares, M. C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., y Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 92, 1994-2001.

Zhang, Y., Liu, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Qi, X., y Qian H. (2014). Isolation and identification of an antioxidant peptide prepared from fermented peanut meal using *Bacillus subtilis* fermentation. *International Journal of Food Properties*, 17(6), 1237-1253.

Zheng, L., Dong, H., Su, G., Zhao, Q., y Zhao, M. (2016). Radical scavenging activities of Tyr, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes. *Food Chemistry*, 197, 807-813.

Zhou, C., Ma, H., Yu, X., Liu, B., Yagoub, A. A., y Pan, Z. (2013). Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: Effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1390-1400.

Zhu, K. X., Su, C. Y., Guo, X. N., Peng, W., y Zhou, H. M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1053-1059.

Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., y Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.

ANEXOS

Anexo 1. Nomenclatura de los Aminoácidos

Aminoácido	Nomenclatura de 3 letras	Nomenclatura de 1 letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

Adaptado de Badui-Dergal (2013).