



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

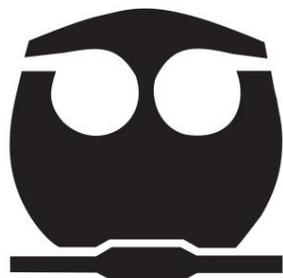
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
TIROSINASA DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DELGRANO
DE AMARANTO (*Amaranthus Hypochondriacus L.*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

ALEJANDRA BECERRIL RAMÍREZ



Ciudad Universitaria, Cd. M.x , 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Hermilo Leal Lara
VOCAL: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar
SECRETARIO: Profesor: Jorge Soriano Santos
1er. SUPLENTE: Profesor: María del Carmen Ortiz Tafoya
2do.SUPLENTE: Profesor: Claudia Cecilia Márquez Mota

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Planta Piloto No.1. Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

ASESOR DEL TEMA: DR. JORGE SORIANO SANTOS

SUSTENTANTE: ALEJANDRA BECERRIL RAMÍREZ

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2 HIPÓTESIS.....	4
1.3 OBJETIVO GENERAL	4
1.4 OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.2 Oscurecimiento enzimático	5
2.1.3 Enzimas implicadas.....	6
2.1.4 Factores que influyen en el oscurecimiento enzimático.....	7
2.1.5 Procesos en los que interviene la tirosinasa.....	7
2.2 Métodos de control e inhibidores de tirosinasa.....	9
2.2.1 Tratamientos Químicos	9
2.2.2 Métodos físicos.....	11
2.2.3 Inhibidores de tirosinasa.....	14
2.3 Aplicación de inhibidores de tirosinasa.....	17
2.3.1 Ventajas y desventajas de los inhibidores de tirosinasa.....	17
2.3.2 Aplicaciones.....	18
2.4. Nuevas propuestas sobre la inhibición de tirosinasa	19
2.4.1 Péptidos bioactivos como inhibidores de tirosinasa	19
2.4.2 Obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas	20
2.4.3. Cosmecéuticos, nutracéuticos y nutricosméticos.....	22
2.5 Amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>).....	25
2.5.1 Origen del amaranto.....	26
2.5.2 Composición química del grano de amaranto	27
2.5.3. Péptidos y aminoácidos presentes en el grano de amaranto.....	29
2.5.4. Compuestos nutracéuticos presentes en el grano de amaranto.....	29
2.5.5 Usos y aplicaciones de la planta y grano de amaranto	3030
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Molienda del grano de amaranto.....	32
3.2 Extracción de albúmina 1 y globulina Na ₂ SO ₄	32

3.3 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina con tripsina y α -quimotripsina	32
3.4 Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-15.....	33
3.5 Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979).....	33
3.6 Capacidad quelante de cobre (Chen y cols., 2006).....	34
3.7 Actividad inhibitoria de tirosinasa (Piao y cols., 2002).....	34
3.8 Estudio de la cinética de inhibición.....	34
3.9 Actividad quelante de cobre en el sitio activo de la enzima.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5. CONCLUSIONES.....	62
6. PERSPECTIVAS.....	63
7. BIBLIOGRAFÍA.....	64
8. APÉNDICES.....	73
APÉNDICE A	73
APÉNDICE B	81
APÉNDICE C.....	82
APÉNDICE D.....	83
APÉNDICE E	84

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Comparación entre las reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático..... 6**
- Figura 2. Apariencia del cultivo de amaranto 25**
- Figura 3. Estrategia experimental para la evaluación del grano de amaranto. 31**
- Figura 4. Perfil de elución de hidrolizado de albúmina 1 (albúmina 1: 2mg/mL, tripsina 2.4mUA/mL, 36 h). Marcador molecular (Mr) 457 KDa..... 42**
- Figura 5. Perfil de elución de hidrolizado de globulina (globulina: 2mg/mL, quimotripsina 2.4mUA/mL, 36 h). Marcador molecular (Mr) 457 KDa 42**
- Figura 6. Actividad quelante de cobre de hidrolizados proteínicos del grano de amaranto. 45**
- Figura 7. Efecto del grado de hidrólisis sobre la actividad quelante de cobre 50**
- Figura 8. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa por hidrolizados proteínicos del grano de amaranto 52**
- Figura 9. Modelo de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para las fracciones peptídicas de albúmina y globulina de mayor actividad inhibitoria de tirosinasa derivadas de la catálisis por tripsina..... 54**
- Figura 10. Modelo de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para las fracciones peptídicas de albúmina y globulina de mayor actividad inhibitoria de tirosinasa derivadas de la catálisis por quimotripsina 54**
- Figura 11. Inhibición de tirosinasa por actividad quelante de cobre del sitio activo..... 57**

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Propiedades estructurales de péptidos biofuncionales selectos.</i>	21
<i>Tabla 2. Comparación de la composición proximal de los granos de amaranto y algunos cereales (g/100g de base seca)</i>	27
<i>Tabla 3. Composición aproximada de varias especies de granos de amaranto</i>	28
<i>Tabla 4. Extracción de las proteínas del grano de amaranto</i>	36
<i>Tabla 5. Grado de hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto</i>	38
<i>Tabla 6. Distribución de pesos moleculares promedio de la filtración en gel de hidrolizados proteicos del grano de amaranto.</i>	44
<i>Tabla 7. Parámetros cinéticos de inhibición de tirosinasa de las fracciones con mayor actividad</i>	55

1. INTRODUCCIÓN.

Las principales pérdidas que se producen después de la recolección de frutas y hortalizas se deben fundamentalmente a daños mecánicos, infecciones fúngicas y bacterianas, desórdenes fisiológicos y bioquímicos, y las ocasionadas por recurrir a condiciones inadecuadas de almacenamiento, transporte y distribución. (Artes y col., 1998). En muchos casos, se producen cambios en la apariencia, textura y color, que comprometen la calidad nutritiva de los alimentos que viene dado por una serie de cambios bioquímicos en los alimentos y de diversos factores que propician la degradación ocasionada por enzimas como la polifenoloxidasa o tirosinasa.

Debido a ello, la industria agroalimentaria ha dedicado investigación para el control de dicha enzima, implementando métodos de inactivación de tipo físico y químico, así como de la inclusión de inhibidores de tipo natural y sintético, para ofrecer alimentos de adecuada calidad nutritiva y que evite riesgos al consumidor. Por otra parte, la enzima tirosinasa ha estado bajo la atención de la comunidad científica internacional por sus múltiples aplicaciones en los campos de la agricultura, la medicina, los cosméticos y los alimentos.

La tirosinasa juega un rol fundamental en la síntesis de la melanina, debido a que regula directamente la cantidad de melanina producida, mientras que otras enzimas solo modifican el tipo de melanina que es sintetizada en la ruta bioquímica de la pigmentación(Ando y col.,2007), su inhibición se ha convertido en una de las estrategias más importantes para el desarrollo de nuevos agentes despigmentantes (Briganti y col.,2003), por lo que ha cobrado relevancia en el mercado de los productos médicos y cosméticos.

En los últimos años el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos, ha experimentado un gran crecimiento, tanto por su valor terapéutico como por su impacto en la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contengan (Santini y col., 2013). Debido a que los alimentos proporcionan componentes alimentarios y muchos de ellos proporcionan beneficios más allá de sus valores tradicionales, como mejorar alguna función del

organismo o bien reduciendo el riesgo de enfermedades. Muchos alimentos como frutas, vegetales y cereales han sido empleados como parte del diseño de nuevas estrategias de carácter médico para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Por su parte, la ciencia de los alimentos ha evidenciado la presencia de compuestos fitoquímicos, en gran cantidad de alimentos que presentan actividades muy variadas, por lo que este trabajo pretende estudiar una de las macromoléculas de mayor importancia en los alimentos; las proteínas, para evaluar su actividad de inhibición de tirosinasa como una propuesta alternativa a los estudios realizados en diversas fuentes naturales.

Las proteínas funcionales y los péptidos bioactivos, además de su valor nutricional por ser fuente de aminoácidos, tienen capacidad de ejercer efectos biológicos específicos (De Gobba y col., 2014; Zhou y col., 2013). La mayoría de los péptidos bioactivos son generados espontáneamente durante la digestión *in vivo* a partir de proteínas de diversos orígenes que los contienen.

De hecho, la existencia de péptidos bioactivos encriptados como parte de la secuencia de aminoácidos en proteínas alimentarias, se conoce desde hace más de 25 años. No obstante, también se han obtenido nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias, mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen vegetal y/o microbiano (Del Piu y col., 2014; Esteve y col., 2014)

En ese sentido, uno de los cultivos nacionales con un importante valor nutritivo es el amaranto (*Amaranthus spp*), debido a su contenido proteínico (entre 13% y 16%) y a que presenta un balance adecuado de aminoácidos esenciales principalmente lisina, metionina y triptófano; aminoácidos que son deficientes en los demás cereales.

El consumo de amaranto se ha asociado a la prevención de problemas cardiovasculares, de diversos tipos de cáncer, de colesterol alto, antihipertensivo, entre otras (Contreras y col., 2010), de ahí la importancia de estudiar dicho grano como una alternativa a las fuentes naturales ampliamente estudiadas.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas que se conocen en la industria alimentaria es el oscurecimiento enzimático provocado por las polifenoloxidasas. Entre estas enzimas se puede mencionar a la tirosinasa que contribuye a la formación de esta reacción. También, existen reportes en la literatura, que esta actividad enzimática contribuye a la formación de manchas en la piel, enfermedad conocida como melasma. Por esta razón, tanto en la industria alimentaria como farmacéutica se utilizan inhibidores de tirosinasa para evitar el oscurecimiento ya sea en alimentos o en la piel.

Existen inhibidores de tirosinasa que se emplean para el tratamiento de la piel como la hidroquinona y el ácido kójico. Sin embargo, hay reportes en los que se demuestra que a ciertos niveles la hidroquinona causa cáncer. Es por esta razón, que recientemente se está en la búsqueda de compuestos inhibitorios de tirosinasa, de origen alimentario o de otros productos naturales que sean relativamente inocuos a la salud humana. Para este fin, se han reportado estudios en los que se ha demostrado que las proteínas alimentarias o de otras fuentes naturales contienen, en su estructura primaria, fracciones peptídicas que son capaces de inhibir la actividad de tirosinasa.

El grano de amaranto contiene proteínas de reserva, sobre todo albúminas y globulinas, que tienen encriptadas secuencias de aminoácidos, conocidas como péptidos bioactivos, que poseen diferentes actividades biológicas como la antihipertensiva, antioxidante, antitrombótica, opiácea, etc.

Con el propósito de contribuir al conocimiento científico, en este estudio, se propone observar si las proteínas del amaranto contienen péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de tirosinasa. De esta manera, se contribuiría al conocimiento de las propiedades farmacológicas de este pseudocereal y hacerlo atractivo para que se fomente su cultivo para la producción de productos de valor agregado.

1.2 HIPÓTESIS

Si las proteínas de fuentes naturales, tienen encriptadas secuencias de aminoácidos que presentan actividad inhibitoria de tirosinasa, entonces, al hidrolizar a las proteínas del grano de amaranto, con proteasas específicas, es posible que se liberen secuencias peptídicas con efecto inhibitorio de tirosinasa, así como con actividad quelante de Cu^{+2} .

1.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar la actividad inhibitoria de la tirosinasa, *in vitro*, de los hidrolizados de las proteínas de reserva del grano de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L.

1.4 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Comparar la actividad inhibitoria de la tirosinasa de hidrolizados enzimáticos de las proteínas de reserva, albúmina 1 y globulina, del grano de amaranto
- Evaluar la actividad quelante de iones de cobre de los hidrolizados enzimáticos de albúmina 1 y globulina.
- Evaluar el peso molecular promedio relativo de los péptidos que componen las fracciones de los hidrolizados proteínicos que presentan actividad inhibitoria de tirosinasa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1.2 Oscurecimiento enzimático

Es provocado por la acción de enzimas, que actúan sobre sustratos, como los polifenoles produciendo que las quinonas se polimericen para dar finalmente el color marrón característico del pardeamiento enzimático. Debido a que este estudio se enfoca en la evaluación de la enzima que produce dicho fenómeno de oscurecimiento se realizará hincapié en detallar más aspectos sobre la misma.

En ese sentido, es necesario mencionar que dicho proceso consiste básicamente, en la oxidación de sustratos fenólicos a *o*-quinonas, moléculas muy reactivas que condensan rápidamente, combinándose con grupos amino o sulfidrilo de las proteínas, y con azúcares reductores, dando lugar a polímeros pardos, rojizos o negros, de alto peso molecular y estructura desconocida.

La formación de *o*-quinonas es una reacción reversible en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, dando lugar a *o*-difenoles incoloros, mientras que la polimerización posterior es irreversible. (Artes y col., 1998, Miranda-Ventura, 2006).

El pardeamiento enzimático ocurre cuando los sustratos fenólicos, la Polifenoloxidasas (PPO) y el oxígeno molecular (O_2) se unen bajo condiciones apropiadas de pH, temperatura y actividad de agua (A_w). Así, cuando el tejido celular es dañado, ya sea por manipulación o por daños físicos de la fruta, pierde su estructura y por ende se ponen en contacto la enzima y el sustrato, y da inicio a las reacciones de pardeamiento (Denoya y col., 2012).

Por ejemplo, en el caso de la cabeza del champiñón procesado en fresco, el pardeamiento enzimático producido como consecuencia de los cortes que sufre en su preparación, se debe a la presencia y a la distribución de la enzima tirosinasa o PPO (EC:1.14.18.1), de nutrientes mono y difenólicos (sustratos) y de otros nutrientes (moduladores) que favorecen o retardan la biosíntesis de melaninas (heteropolímeros de color amarillo-rojizo hasta marrón-negro) (Artes y col., 1998).

El papel de la tirosinasa y su mecanismo de acción han sido estudiados en los últimos años. Sin embargo, la cascada de reacciones que se desencadenan para cada substrato en las que participa la enzima hace compleja la ruta para la formación de los compuestos coloridos antes mencionados. Por otra parte, los dos tipos de oscurecimiento siguen reacciones que se encuentran reguladas por moduladores; como activadores, inactivadores e inhibidores.

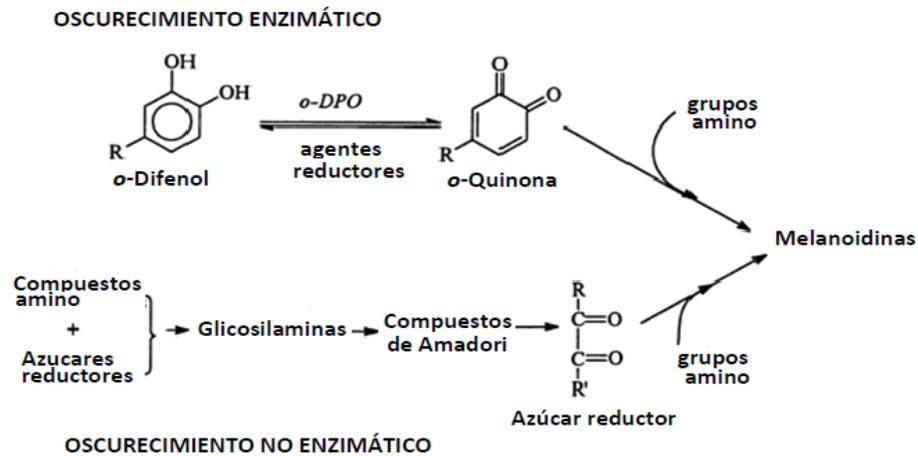


Figura 1. Comparación entre las reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático

Fuente:(Walker, 1995)

2.1.3 Enzimas implicadas.

Actualmente, se reconoce que el oscurecimiento enzimático de plantas y frutas ocurre por acción de un sistema enzimático muy complejo, éste se haya distribuido en la escala filogenética encontrándose tanto en organismos procariones como eucariotes. Recibe distintos nombres según el material biológico del que proceda, así, se denomina tirosinasa, en animales y procariontes, y polifenoloxidasas, en vegetales.

Las enzimas que catalizan la oxidación de los polifenoles se denominan polifenol oxidasas (PPO) y engloban a dos grupos distintos que se clasifican en función del substrato que oxidan. Esta enzima cataliza dos tipos de reacciones acopladas en las que interviene el oxígeno molecular:

1. Actividad cresolasa: hidroxilación de monofenoles en la posición orto para obtener o-difenoles.
2. Actividad catecolasa: oxidación de o-difenoles a sus correspondientes o-quinonas. (Walker, 1995)

La gran variedad de posibles sustratos y la elevada reactividad de las o-quinonas generadas por la tirosinasa, determinan la participación de esta enzima en procesos fisiológicos tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la biosíntesis de melaninas.

2.1.4 Factores que influyen en el oscurecimiento enzimático

Debido a su alto impacto y por los efectos que produce dicha enzima en alimentos, se sabe que las frutas y hortalizas presentan gran susceptibilidad al oscurecimiento enzimático que son el resultado de factores como la especie y variedad, edad de los frutos (la actividad enzimática es más elevada en frutos jóvenes que en los maduros), la naturaleza y cantidad de los sustratos fenólicos, la actividad de las enzimas oxidativas, la disponibilidad de oxígeno, y la compartimentación de las enzimas y de los sustratos.

Existen otros factores secundarios, que en ocasiones desempeñan un papel importante, como son la presencia de compuestos reductores (vitamina C, glutatión, etc.), el pH, la temperatura, los sistemas captadores de oxígeno (actividad superóxido dismutasa) y los cofactores como los iones metálicos Fe^{3+} y Cu^{2+} (Artes y col., 1998).

2.1.5 Procesos en los que interviene la tirosinasa.

El pardeamiento enzimático es uno de los problemas de calidad de frutas y vegetales frescos y procesados. Como ya se mencionó, es de vital importancia su control ya que su presencia y la disponibilidad de sustratos presentes en los alimentos frescos y mínimamente procesados, potencian el rol negativo de dicha enzima en la generación de compuestos pardos-oscuros.

Aunque los efectos debidos a la actividad de la tirosinasa generalmente son negativos, existen ciertos beneficios de su actividad sobre los alimentos, por

ejemplo, es responsable en su totalidad o en parte del color marrón característico de ciertas frutas secas como los dátiles y ciruelas pasas. Durante la fabricación de sidra, perada (jugo de pera fermentada) y vino blanco la acción de O-Difenoloxidasa sobre los compuestos fenólicos y taninos que se producen naturalmente conduce a su posterior condensación y polimerización, reacciones que pueden tener importante papel para ayudar a los procesos posteriores de aclaración, así como astringencia no deseada (Walker, 1995).

La industria cosmética ha dado real importancia a la presencia de dicha enzima, debido a sus efectos en la salud de la piel humana, ya que es la enzima clave para la melanogénesis, el cual es un proceso bioquímico, en el que se genera un pigmento denominado melanina, por acción de tirosinasa, que cuenta con la capacidad de hacer la conversión del aminoácido tirosina en melanina. (Lagarda, 2007).

Como parte de la actividad catalítica de la enzima, se encuentra la formación de toda una familia de pigmentos denominados eumelaninas y feomelaninas, produciendo luego entonces alteraciones en la pigmentación de la piel y poniendo en riesgo la salud de la piel humana.

En los seres humanos, el desarrollo de la melanogénesis es un proceso multifactorial, si bien todos los seres humanos presentamos la misma cantidad de melanocitos, su distribución y capacidad para sintetizar melanina es muy variado, de ello depende que existan diferentes tipos de piel y fototipos como se clasifican actualmente. Se ha mencionado que una diferencia en el pH de los melanosomas dependiente del tipo de piel puede afectar la actividad de la tirosinasa.

En estudios recientes, se ha puesto de manifiesto la actividad carcinogénica y mutagénica desencadenada por las reacciones de oxidación de tirosinasa sobre piel humana (Seo y col., 2003), debido a los compuestos fenólicos generados durante la catálisis, así como de factores intrínsecos al organismo. Debido a ello, el interés de la industria cosmética y del campo de la medicina en general por desarrollar inhibidores eficaces en la prevención de desordenes de la piel.

2.2 Métodos de control e inhibidores de tirosinasa

El pardeamiento enzimático derivado de la actividad de tirosinasa, puede controlarse a través del uso de métodos químicos y físicos, a menudo empleados en combinación porque es más efectivo. Los métodos físicos comúnmente utilizados son la reducción del oxígeno y el uso de atmósferas modificadas o películas de recubrimiento. La utilización de los métodos químicos dependerá de lo que se desee inhibir, ya sea la enzima, el sustrato o los productos (Yupangui, 2016). Existen además, inhibidores de naturaleza distinta debido a su aplicación en alimentos y en el área de la medicina por su efecto sobre la piel humana, por lo que son de origen natural y sintético.

2.2.1 Tratamientos Químicos

El tratamiento más efectivo para evitar el obscurecimiento enzimático se basa en la aplicación de inhibidores o inactivadores de tipo químico, debido a la interacción directa sobre la enzima o el sustrato. Sin embargo, su aplicación puede verse limitada, debido a algunos organismos sanitarios que regulan su uso en alimentos con la finalidad, de evitar riesgos a la salud del consumidor y alteraciones organolépticas en el producto. En la mayoría de países, para productos procesados en fresco solo están autorizados, con límites más o menos estrictos, el ácido ascórbico y sus derivados, el ácido cítrico y los cloruros de sodio y potasio como aditivos químicos más importantes (Philippon y Maestre, 1992).

Inhibidores químicos:

- a) Modificadores de pH:** Uno de los procedimientos más directos para inhibir las actividades enzimáticas, en general, consiste en modificar el intervalo de pH en el que se desarrolle su actividad mediante alcalinización o acidificación. En el caso de la tirosinasa, la alcalinización no puede aplicarse porque los compuestos fenólicos son muy sensibles a la oxidación a pH alcalino.

Por otra parte, la enzima es bastante resistente a pH ácidos, por lo que es relativamente difícil controlar el pardeamiento enzimático

acidificando, salvo que se reduzca el pH por debajo de 4. Algunos ejemplos de acidulantes o modificadores de pH son el ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido gálico, muchos de ellos se adicionan a los alimentos o en formulaciones como aditivos alimentarios.

- **Ácido cítrico:** Se ha demostrado que el ácido cítrico realiza una inhibición eficaz, debido a su doble actuación como agente quelante y como acidulante (Sapers, 1989) reduce el pardeamiento enzimático deteniendo el cobre del sitio activo de la tirosinasa, y potencia el efecto de compuestos tales como el ácido ascórbico (Artes y col., 1998, Denoya y col., 2012).
- **Ácido ascórbico:** El ácido ascórbico reduce las o-benzoquinonas a o-difenoles. Durante la reacción este compuesto, se consume por oxidación, la protección que proporciona es temporal, también pueden aplicarse ácidos orgánicos para controlar el pardeamiento enzimático que disminuyen el pH y garantizan la inocuidad microbiológica (Denoya y col., 2012,). El ácido ascórbico es el más recomendado para evitar o minimizar el pardeamiento enzimático, por su carácter vitamínico que no ocasiona daño alguno al ser humano. Este ácido por sí mismo no es un inhibidor de la enzima: actúa sobre el sustrato, de modo que puede adicionarse después de haberse formado las quinonas; Tiene la propiedad de oxidarse a ácido dehidroascórbico, reduciendo la quinona a fenol.
- **Ácido acético:** Se han observado buenos resultados, empleando soluciones al 5% en la prevención del pardeamiento enzimático en lechuga, su efecto es debido a la inhibición de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima inicial de la ruta biosintética de los compuestos fenólicos y por tanto, a la inhibición de los metabolitos fenólicos inducidos por el corte (Barberan y col., 1997).
- **Cloruros:** Los cloruros de sodio y potasio además de emplearse en la industria alimentaria para controlar el desarrollo de hongos y bacterias, cuando se emplean a $\text{pH} < 5.5$ son buenos inhibidores de pardeamiento

enzimático. A concentraciones de 1 a 2% se utiliza en forma de baño para la conservación de champiñón fresco y de manzana, sin embargo se han detectado sabores extraños cuando la concentración de NaCl es superior al 1% (Rouet-Mayer y Philippon, 1986; Mastrocola y col., 1996).

- b) Quelantes de metales.** Dichos agentes actúan formando un complejo con el Cu^{2+} y bloqueando el lugar activo de la enzima. Como ejemplos de estos quelantes, se citan el ácido N-etilen diamino tetracético (EDTA) o su sal sódica, el DIECA (dietilditiocarbamato) y algunos polifosfatos ácidos de síntesis. Estos productos se han empleado con resultados relativamente satisfactorios en la inhibición del pardeamiento de productos frescos y transformados, como la manzana mínimamente procesada y su zumo (Sapers y cols, 1989).

2.2.2 Métodos físicos.

Debido a que los inhibidores químicos presentan cierta restricción, por las exigencias cada vez mayores de los consumidores por adquirir alimentos libres de agentes químicos, y de su consideración en perjuicio de su salud, existe un creciente interés en el uso de tratamientos físicos para ofrecer alimentos con adecuada calidad y valor nutritivo. Entre las innovaciones en este campo se encuentran la conservación bajo refrigeración, condiciones gaseosas variables y controladas y programadas y los recubrimientos comestibles.

- a) Refrigeración.** En el caso de los productos hortofrutícolas cortados en fresco, es prácticamente necesario conservarlos a bajas temperaturas, para frenar el deterioro e inactivar o inhibir las enzimas responsables del pardeamiento con la finalidad de preservar la calidad del producto. La temperatura de conservación, debe realizarse a temperaturas inferiores a los 5°C en alimentos mínimamente procesados, a diferencia de los productos intactos, es recomendable conservarlos a temperaturas

próximas al punto de congelación, para prolongar la vida útil pero sin producir daños por enfriamiento.

b) Pretratamiento térmico. El empleo de temperaturas moderadas para inhibir el pardeamiento enzimático, ha sido de gran aplicación, este tratamiento recibe el nombre de escaldado (Mendoza y Herrera, 2012). Por ejemplo, los tratamientos a 45°C durante 120 s, 50°C durante 60 s, o 55 °C durante 30s, aplicados antes de la conservación frigorífica, inhibieron la síntesis de metabolitos fenólicos, a la vez que redujeron la actividad de tirosinasa y el pardeamiento en lechuga Iceberg mínimamente procesada, durante su conservación, aunque a la temperatura superior se observaron daños en los tejidos (Artes y col., 1998). También se ha utilizado con éxito un pretratamiento térmico (45°C durante 2 h) aplicado en manzanas antes del corte para disminuir el pardeamiento enzimático una vez procesadas en rodajas.

c) Atmosferas modificadas. Actualmente para la conservación y distribución de los productos mínimamente procesados resulta prácticamente imprescindible la utilización del envasado en atmosferas modificadas (AM), que consiste en guardar los productos en refrigeración, en una atmósfera esencialmente pobre en oxígeno, y enriquecida en CO₂, con respecto al aire. El envasado a vacío o la inyección de mezclas conocidas de gases (O₂, CO₂, CO y/o N₂) modifica con rapidez la atmósfera del envase, prolongando generalmente la vida útil (Artes y Martinez, 1996).

Al disminuir la concentración de O₂, de la atmósfera de conservación se inhiben o reducen las reacciones enzimáticas de pardeamiento, y al aumentar la concentración de CO₂, se inhibe la síntesis de metabolitos fenólicos, substratos de la tirosinasa que han sido inducidos como consecuencia del daño producido por el corte (Ke y Saltveit, 1989; Mateos y col., 1993).

En productos mínimamente procesados se suele recomendar la atmósfera modificada con concentraciones de O_2 , entre el 2 y el 8 % para evitar el pardeamiento, en tanto que las concentraciones óptimas de CO_2 recomendadas varían entre el 5 y el 15%, dependiendo del producto y condiciones de procesado que se trate (Cantwell, 1992; Ahvenainen, 1996). Por otra parte, es necesario considerar el proceso fisiológico de los productos hortofrutícolas, esto es la producción de etileno. El etileno que se emite como consecuencia del daño causado por el corte durante la preparación de estos productos mínimamente procesados, también es relacionado con los problemas de pardeamiento.

- d) Recubrimientos comestibles.** Estos recubrimientos se caracterizan, entre otras propiedades, por reducir las pérdidas de agua así como proteger al producto del contacto directo con el O_2 , y por tanto retardar las reacciones de pardeamiento (Baldwin y col., 1995). Los recubrimientos comestibles, pueden estar formados por uno o varios polisacáridos, lípidos y/o proteínas, a los que se le añaden plastificantes para mejorar la flexibilidad. Con este tipo de recubrimientos, se intenta crear una atmósfera modificada a través de una barrera que restringe el contacto de O_2 , y el intercambio de CO_2 , así como controlar la pérdida de agua del producto.

Una ventaja adicional de los recubrimientos comestibles, es que pueden utilizarse como soporte para determinados agentes antioxidantes y acidulantes (Baldwin y col., 1995) y también de fungicidas y bactericidas que pueden coadyuvar en la prevención del pardeamiento y del crecimiento de microorganismos, respectivamente.

- e) Altas presiones.** Un método alternativo de reducción de la función catalítica de las enzimas son los tratamientos por altas presiones hidrostáticas combinadas con temperaturas medias y/o altas (PATP, por sus siglas en inglés, Pressure Assisted Thermal Processing). La combinación de presión y temperatura para el procesado de alimentos

presenta una gran ventaja puesto que cuando la presión es aplicada al alimento, el cambio de temperatura se produce de forma rápida y uniforme. Esto acelera la inactivación enzimática, reduciendo el tiempo de procesado a alta temperatura, disminuyendo la severidad del procesado en comparación con el tratamiento térmico convencional y mejorando la calidad final del alimento (Matser y col., 2004)

2.2.3 Inhibidores de tirosinasa.

Existen diferentes mecanismos de regulación de la tirosinasa, estos son de dos tipos: reguladores externos como los inhibidores o inactivadores, y reguladores internos como los inactivadores suicidas que es un mecanismo particular de esta enzima.

Los inhibidores de tirosinasa, son moléculas que desvían la ruta de biosíntesis de melaninas generando otras *o*-quinonas distintas a *o*-dopaquinona en lugar de que ocurra una interacción inhibidor/enzima directa. Se han aislado e identificado un gran número de inhibidores tanto de fuentes naturales como sintéticos (Del Mar-García, 2015). Muchos de estos inhibidores se estudian utilizando tirosina/dopa como sustratos y la actividad enzimática se sigue midiendo con la formación de dopacromo.

Desde el punto de vista experimental la inhibición de la tirosinasa puede ser clasificada en 6 tipos diferentes:

- A. Agentes reductores** que producen la reducción de *o*-dopaquinona a L-dopa. En este tipo se encuentran inhibidores clásicos como ácido ascórbico, que se utiliza como inhibidor de la melanogénesis ya que, al reducir la *o*-dopaquinona, impide la formación de dopacromo y, por tanto, la formación de melaninas.
- B. Eliminadores de *o*-dopaquinona**, que reaccionan también con esta y forman compuestos de color marrón y pardo. En este tipo destacan los compuestos tiólicos como la cisteína que forma un aducto con la *o*-quinona y ralentiza el proceso de formación de eumelaninas hasta que el compuesto tiólico es consumido.

- C. Sustratos enzimáticos alternativos.** En este tipo se encuentran compuestos fenólicos cuyo producto quinónico absorbe en una longitud de onda del espectro electromagnético diferente a la del dopacromo. Cuando la enzima tiene una buena afinidad por estos compuestos, la formación de dopacromo disminuye y, por tanto, son clasificados erróneamente como inhibidores de la enzima.
- D. Inactivadores enzimáticos no específicos.** En este tipo se encuentran los ácidos y bases, los cuales inespecíficamente desnaturalizan a la enzima inactivándola.
- E. Inactivadores específicos de tirosinasa.** Estos son los inhibidores basados en el mecanismo de la enzima, entre los que destacan los sustratos suicidas. Inactivan irreversiblemente a la enzima induciéndole una inactivación suicida.
- F. Inhibidores específicos de tirosinasa.** Son aquellos inhibidores que se unen reversiblemente a la enzima reduciendo su actividad catalítica. (Cabanés y col., 1994; Chen y col., 1991).

De todas las formas de inactivación anteriormente presentadas, los tipos E y F son considerados verdaderos inhibidores ya que se unen a la enzima y la inhiben. Por otra parte, de éstos verdaderos inhibidores se desprende otra clasificación en tres subtipos: a) Inhibidores competitivos, b) Inhibidores acompetitivos, c) Inhibidores no competitivos.

Hasta el momento se han descrito inhibidores de tirosinasa de fuentes naturales como sintéticos, siendo el ácido kójico el inhibidor de tirosinasa por excelencia. De acuerdo a la naturaleza química de los inhibidores se reconocen 5 clases de inhibidores de tirosinasa, a continuación se presentan:

- 1. Polifenoles.** Es un grupo muy amplio y es generalmente reconocido como uno de los mejores sustratos/inhibidores de tirosinasa, su actividad es debida a la posición de los grupos hidroxilos en la molécula, se encuentran en hojas, semillas, raíces y flores de plantas, se dividen en siete grupos:

flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides, chalconas y cumarinas (Chang, 2009).

- 2. Derivados del benzaldehído y del benzoato.** Compuestos derivados del ácido benzoico y del benzaldehído actúan como inhibidores de tirosinasa, algunos ejemplos son el el ácido cinámico, ácido anísico, anisaldehído y el ácido metoxicinámico, aunque el ácido benzoico es el inhibidor clásico de tirosinasa (Lee, 2002), De acuerdo con la literatura los derivados de ácido inhiben a la enzima uniéndose a los átomos de cobre del sitio activo, mientras que derivados del benzaldehído, probablemente lo hacen por su capacidad de formar bases de Schiff con un grupo amino primario en la enzima (Conrad y col., 1994, Kubo y col., 2000).
- 3. Lípidos de cadena larga y esteroides.** En este grupo de compuestos destacan el ácido trans-geránico (Masuda y col., 2008) y la trilinoleína (triacilglicerol del ácido linoleico) (Jeon y col., 2006), caracterizados como inhibidores de potencia similar al ácido kójico.
- 4. Péptidos.** Los oligopéptidos se están estudiando y utilizando recientemente como candidatos para el tratamiento de distintos desórdenes de la piel. Por ejemplo, se ha probado que el octapéptido (Arg-Ala-Asp-Ser-Arg-Ala-Asp-Cys) y el decapeptido (Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr) inhiben la actividad de tirosinasa de champiñón y humana (Abu Ubeid y col., 2009).

5. Inhibidores

Este tipo de compuestos producen la inactivación permanente de la tirosinasa, normalmente actuando en el sitio activo de ésta. Entre ellos destacan captopril, que forma un complejo con el cobre a través de su grupo tiol libre provocando la quelación del cobre (Espín y Wichers, 2001), el anión 3,5-dihidroxifenil decanoato y el cardol trieno, inhibidor de tipo competitivo (Zhuang y cols., 2010).

Si bien una de las múltiples aplicaciones de la tirosinasa es capitalizada por la industria cosmética y médica, se han abierto nuevas áreas de investigación en busca de diseñar inhibidores de tirosinasa que muestren los mejores efectos de inhibición sin perjudicar la salud del consumidor, esto es, ampliar las

pruebas experimentales de citotoxicidad para prevenir efectos adversos derivados de su utilización

2.3 Aplicación de inhibidores de tirosinasa

2.3.1 Ventajas y desventajas de los inhibidores de tirosinasa.

La conservación de las propiedades organolépticas de los productos frescos en los procesados, así como los compuestos responsables del color de los vegetales es una de las demandas principales del consumidor. Las nuevas tecnologías emergentes, se encaminan a satisfacer esa necesidad impuesta por los consumidores, y tratan de aplicar procesos menos agresivos a los productos, evitando la pérdida de las propiedades benéficas a la salud (García-Parra y col., 2011) así como preservar los compuestos termosensibles.

Los pigmentos más comunes responsables de la coloración en vegetales son los carotenos y antocianos. Ambos grupos son termolábiles, por lo que tratamientos térmicos convencionales suelen degradar su contenido en cantidades apreciables (Terefe y col., 2010).

En contra parte, los métodos químicos de inhibición de tirosinasa, resultan ser más efectivos debido a que presentan mayores ventajas en cuanto al tipo de inhibición, ya sea por la enzima, sustrato o reducción de oxígeno. Sin embargo, las demandas actuales de los consumidores exigen alimentos mínimamente procesados, con la menor cantidad de aditivos y compuestos químicos para evitar riesgos a la salud.

Por otra parte, la única desventaja que presentan los inhibidores químicos frente a los inhibidores físicos son residuos traza de compuestos químicos o sabores indeseables. En ese sentido, suelen ser más efectivos y de fácil acceso como las soluciones poco concentradas de ácido ascórbico, ácido cítrico, málico, tartárico, entre otros, además de que no representan un riesgo que implique el deterioro de la calidad del alimento ni de las propiedades organolépticas.

2.3.2 Aplicaciones.

Como se mencionó anteriormente, la inhibición de tirosinasa ha cobrado relevancia en muchos sectores, siendo primordial en la agricultura y la industria de los alimentos, la medicina y la industria cosmética.

En el área de la agricultura y la industria de los alimentos, los principales focos de interés de inhibición de dicha enzima, se centran en retardar los procesos de oxidación o pardeamiento enzimático en las frutas y verduras, para garantizar la calidad organoléptica de los alimentos durante toda la cadena alimenticia. Dicho fenómeno es de gran interés ya que produce pérdidas económicas muy elevadas.

La velocidad del pardeamiento enzimático depende de la concentración de tirosinasa y compuestos fenólicos, de la disponibilidad de oxígeno, del pH y de las condiciones de temperatura del tejido (Martínez y Whitaker, 1995). Las técnicas convencionales actuales para disminuir el pardeamiento incluyen el uso de autoclave y el blanqueado, pero estos procesos causan pérdidas importantes de peso y nutrientes en el producto (Konanayakam y Sastry, 1988). Otro método utilizado es el uso de microondas, pero tiene el inconveniente de que se forma un gradiente de temperatura en el producto, lo que causa que en las regiones más calientes se produzca una inactivación enzimática total, mientras que en las regiones más frías esta inactivación sólo ocurra de manera parcial.

En la industria cosmética, tiene importancia en la prevención de las alteraciones de pigmentación y el uso de coadyuvantes en formulaciones para la despigmentación. Sin embargo, no todos han mostrado la eficacia requerida ya que presentan riesgos de toxicidad para uso humano. Entre estos agentes destacan el ácido linoleico, el hinokitiol, el ácido kójico, la arbutina o la hidroquinona, que inhiben eficazmente a la tirosinasa. Sin embargo, la hidroquinona también ha mostrado efectos secundarios (Maeda y Fukuda, 1991: Parvez y col., 2007).

Actualmente la arbutina y la aloesina se utilizan en cosmética. Ambos compuestos se usan conjuntamente ya que se ha comprobado que el co-tratamiento de

tirosinasa con arbutina y aloesina producía una inhibición sinérgica de esta enzima (Jin y col., 1999). La aloesina actúa mediante una inhibición no-competitiva mientras que la arbutina se comporta como inhibidor competitivo.

En el campo de la medicina se han utilizado los inhibidores de tirosinasa en ensayos clínicos, por ejemplo, se ha investigado el efecto de 8-hidroxi-6,7-dimetil-2-pteridina metilamina como sustrato suicida de la enzima, en células de melanoma B16 y en voluntarios humanos (Tai y col., 2009). Estos estudios mostraron que este sustrato suicida es diez veces más potente que el ácido kójico, al actuar tanto sobre células de melanoma y directamente, como crema despigmentante, sobre la piel humana.

2.4. Nuevas propuestas sobre la inhibición de tirosinasa

Las proteínas presentes en la dieta son tradicionalmente conocidas como fuentes de energía y aminoácidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de diversas funciones fisiológicas. Además contribuyen a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos ricos en proteína. En los últimos años, las proteínas de los alimentos han adquirido un valor agregado debido al conocimiento de la actividad de los péptidos fisiológicamente activos (Vioque y Millán 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006; Sarmadi-Ismail, 2010).

Por lo anterior, la comunidad científica ha dado pie a la investigación de péptidos bioactivos para el desarrollo de nutraceuticos y alimentos funcionales que si bien ofrecen un efecto benéfico a la salud, también resulta en muchos casos difícil la extracción de dichos compuestos. Una de las fuentes más económicas y rentables para la obtención de fitoquímicos y compuestos bioactivos, es la utilización de fuentes naturales como las plantas y vegetales, que ofrecen las mejores condiciones a la investigación.

2.4.1 Péptidos bioactivos como inhibidores de tirosinasa

Los péptidos bioactivos son secuencia de aminoácidos (fragmentos específicos de la proteína) de peso molecular menor a 6 KDa, con tamaño de entre 2 y 20 aminoácidos, aparentemente inactivas dentro de la proteína intacta pero que

pueden activarse al ser liberados, bien durante la digestión del alimento en el organismo del individuo, o por un procesado previo del mismo (por ejemplo hidrólisis enzimática, fermentación, maduración) ejerciendo diversos efectos benéficos para la salud (Vioque y Millan, 2005; Korhonen y Pihlanto, 2006; Sarmandi e Ismail 2010).

Enseguida de la digestión del alimento, los péptidos bioactivos intactos pueden ser absorbidos a través del intestino y pasar a circulación sanguínea para ejercer efectos sistémicos o producir efectos locales en el tracto gastrointestinal. Dependiendo de su secuencia de aminoácidos, estos péptidos pueden exhibir diversas actividades biológicas, incluyendo acción tipo opioide, antitrombótica, hipercolesterolémica, inmunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva. Muchos de los péptidos bioactivos conocidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados. Dado su potencial de mejoramiento de la salud y sus perfiles de seguridad pueden ser considerados como componentes de alimentos funcionales o nutracéuticos (Erdmann-Cheung y col, 2008; Sarmadi e Ismail 2010).

2.4.2 Obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas

Los péptidos biológicamente activos pueden ser producidos a partir de fuentes proteicas naturales siguiendo 3 metodologías: a) hidrólisis enzimática mediante enzimas digestivas, b) fermentación utilizando cultivos iniciadores de proteólisis y c) proteólisis mediante enzimas obtenidas de microorganismos o plantas. En muchos estudios, la combinación de estos procedimientos ha sido probada para la generación de pequeños péptidos funcionales (Korhonen y Pihlanto, 2006; Sarmadi e Ismail, 2010).

Muchos de los péptidos bioactivos identificados han sido producidos por acción de enzimas gastrointestinales, usualmente pepsina y tripsina. Otras enzimas digestivas y diferentes combinaciones de proteasas incluyendo alcalasa, quimotripsina, pancreatina y pepsina han sido utilizadas en la generación de péptidos bioactivos provenientes de diversas proteínas. (Korhonen y Pihlanto 2006).

Tabla 1. Propiedades estructurales de péptidos biofuncionales selectos.

ACTIVIDAD	ELEMENTOS ESTRUCTURALES	OBSERVACIONES
Inhibición enzima ACE	Pro o hidroxipro como C-terminal Pro, Lys o Arg como C-terminal Tyr o Phe como C-terminal	Usualmente resistente a degradación por enzimas digestivas Preferentemente residuos
Antioxidante	Elevadas cantidades de His y aminoácidos hidrofóbicos Péptidos con secuencia Pro-His-His	Contribuyen a la potencia antioxidante Muestran la mayor actividad antioxidante
Antitrombótica	Residuos de Ile108, Lys112, Asp125 en caso platelina Contenido de azúcares	Importantes para la actividad antitrombótica. Correlación positiva con actividad antitrombótica
Hipocolesterolémica	Bajas proporciones de metionina-glicina y lisina-arginina en la ingesta proteica Elevadas cantidades de aminoácidos hidrofóbicos	Favorecen el efecto hipocolesterolémico Péptidos hidrofóbicos pueden unirse a los ácidos biliares y promover la excreción fecal de esteroides
Antiobesidad	Péptidos largos Múltiples residuos de Arg	Influyen en la actividad de liberación-CCK (diferentes cantidades de proteínas ingeridas en la dieta) Condición necesaria para la liberación de CCK a través de la unión directa a las células del intestino

Fuente: Erdmann, Cheung y col., 2008

Estas proteasas presentan diferencia en especificidad de sustrato, la tripsina rompe predominantemente a las proteínas en el carboxilo terminal unido a lisina y arginina, excepto cuando cualquiera de estos se encuentran unidos a prolina. La tripsina está considerada como una endopeptidasa, pues el rompimiento ocurre

dentro de la cadena polipeptídica más que en los aminoácidos terminales al final de la cadena, mientras que la quimotripsina rompe los enlaces peptídicos en el carboxilo unido a tirosina, triptófano y fenilalanina, aunque también puede hidrolizar enlaces amida, particularmente aquellos con carboxilos donadores de leucina (Gauthier 2003; Olsen y col. 2004).

Los péptidos bioactivos de la leche han sido los más estudiados, sin embargo también se han aprovechado las proteínas y sus péptidos de fuentes como cereales, leguminosas, carne, huevo, pescado entre muchas más. Finalmente la biofuncionalidad de los péptidos depende de sus propiedades estructurales. Los péptidos de cadena larga (10-51 aminoácidos) presentes en los alimentos de la dieta, pueden ser absorbidos intactos a través del intestino y producir efectos biológicos, aunque la potencia de éstos disminuye cuando incrementa la longitud de la cadena. Los péptidos cortos, constituidos por dos o tres aminoácidos, son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres (Preza-Lerma, 2010)

2.4.3. Cosmecéuticos, nutracéuticos y nutricosméticos.

Una adecuada alimentación acompañada de actividad física, es lo que recomiendan los expertos para mantener un estado saludable, además es esencial para prevenir enfermedades crónicas, por otra parte ayuda a prevenir algunos cambios cutáneos debido al envejecimiento como son la aparición de arrugas, pigmentaciones, atrofia y elastosis los cuales repercuten en el autoestima y el bienestar social.

En este sentido diversos estudios apuntan hacia una mayor protección de la piel contra el daño causado por la exposición solar mediante el consumo de suplementos de vitamina E, vitamina C, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, es difícil determinar con precisión qué nutriente puede ser responsable de los efectos benéficos.

Si bien la industria alimentaria exige alimentos con nuevas características organolépticas y con un alto contenido nutricional, la industria cosmética y farmacéutica ha desarrollado nuevos productos para sectores específicos en el

mercado, introduciendo términos como nutracéuticos, cosmeceúticos y nutricosméticos para desarrollar nuevas tendencias en el cuidado de la salud de manera integral.

Los cosméticos se definen como artículos destinados a ser frotados, vertidos, rociados o aplicados, que se utilizan en cualquier parte del cuerpo humano con la finalidad de limpiar, embellecer, promover la atracción o alterar apariencia, además son compuestos destinados para su uso como un componente en la formulación de tales artículos (Zhang y Falla, 2009). Con ellos se busca contrarrestar o prevenir los efectos adversos sufridos en la piel debido a la exposición prolongada a los rayos solares, lo que desencadena diversas patologías, que van desde las superficiales hasta las más complejas (Bissett, 2009).

- **Nutracéuticos.**

En 1989, Stephen DeFelice acuñó el término “nutracéutico”, definido como “un alimento (o parte de un alimento) que provee de beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención y/o tratamiento de la enfermedad”. Sin embargo, el término ha sido ampliamente empleado en forma indiscriminada, sin seguir ningún tipo de definición regulatoria (Warren y col., 1991). Otros autores reconocen como un alimento nutracéutico aquel que contiene algunos componentes alimenticios, más o menos aislados pero no se trata de un alimento de consumo ordinario en la dieta corriente, sino más bien de uso temporal o esporádico. (Barberá-Mateos, 2011). Nutracéuticos serían, por ejemplo, las vitaminas antioxidantes o las isoflavonas de soja presentadas en forma de comprimido.

En principio, los nutracéuticos difieren de los suplementos nutricionales en que no sólo suplementan la dieta, sino que ayudan a prevenir y/o tratar enfermedades. Los nutracéuticos representan un rango muy amplio de alimentos, desde nutrientes aislados hasta alimentos procesados industrialmente. El mercado de alimentos funcionales o nutracéuticos, ha aumentado ante el crecimiento de la población adulta mayor. Los nutracéuticos pueden ser agrupados dependiendo de su fuente, modo de acción y estructura química.

A medida que incrementa el estrés oxidativo, se acelera el proceso de envejecimiento. En este contexto, dado que la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres son las causas más importantes del proceso de envejecimiento, los nutraceuticos antioxidantes pueden combatirlos, disminuyendo la progresión de este proceso e incrementando la expectativa de vida. Los nutraceuticos antioxidantes pueden ser enzimas antioxidantes, compuestos donadores de hidrógeno, quelantes de metales y supresores de radicales de oxígeno. (Weisburger, 1999)

- **Cosmecéticos.**

En 1984, Albert Kligman acuñó el término “cosmecético” para referirse a sustancias que pueden ejercer efectos beneficiosos a nivel cosmético y terapéutico. Estas sustancias suelen contener principios biológicamente activos y, por lo general, aún cuando son difundidas en forma amplia, existe información muy limitada sobre la eficacia de las mismas. (Catani y col, 2005; Chiu y Kimball, 2003).

Suele tratarse de agentes de uso tópico, dirigidos a un segmento de la población que busca alternativas no quirúrgicas y no invasivas para retardar y disminuir los efectos del envejecimiento cutáneo. Los cosmecéticos representan el segmento de mayor crecimiento en la industria del cuidado personal.

- **Nutricosméticos.**

Los especialistas en nutrición hacen mucho énfasis en que llevar una alimentación balanceada beneficia a la salud, pero no sólo eso, también ayuda a mejorar la apariencia física de las personas. Partiendo de esto, la industria cosmética, junto con la industria de alimentos, han puesto a la venta una nueva categoría de productos que tienen como finalidad principal mejorar la apariencia de la piel, cabello y uñas, conocidos actualmente como nutricosméticos (Wildman, 2001; Fogg-Johnson, 2007; Tabor y col., 2009; Draelos, 2010). Los cosméticos nutritivos, mejor conocidos en la industria como nutricosméticos, son suplementos nutricionales que pueden apoyar y/o mejorar la función y estructura de la piel.

Estos productos tienen como característica principal no ser de aplicación tópica, a pesar de ser considerados cosméticos, ya que la presentación en la que se distribuyen debe ser de consumo oral, proporcionando de esta forma no sólo beneficios estéticos, sino también nutricionales (Morganti, 1991; Gruenwald, 2007; Tabor y Blair, 2009).

Diversos estudios relacionan el consumo de productos específicos con la mejora de la piel, ejemplo de ellos son el ácido o-silícico (atenuación de arrugas y aumenta la maleabilidad de las uñas), el colágeno hidrolizado (mejora la hidratación de la piel), la niacinamida (inhibe la inmunomodulación inducida por radiación solar en piel), la vitamina C (protege y restaura fibras de colágeno) (Morganti y col., 1986; Oesser y Seifert, 2003; Tabor y Blair, 2009)

2.5 Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)

El amaranto es una planta dicotiledónea de la familia de las amarantáceas, presenta varias ventajas agronómicas ya que crece rápido y resiste la sequía, es una planta que puede crecer en climas calientes y templados donde el suministro de agua es limitado; es tolerante a condiciones áridas y suelos pobres, condiciones que son altamente adversas para el cultivo de cereales. Por dichas características es denominado un pseudocereal, porque sus semillas son como las de los cereales, ricos en materiales harinosos y aptos para la panificación.

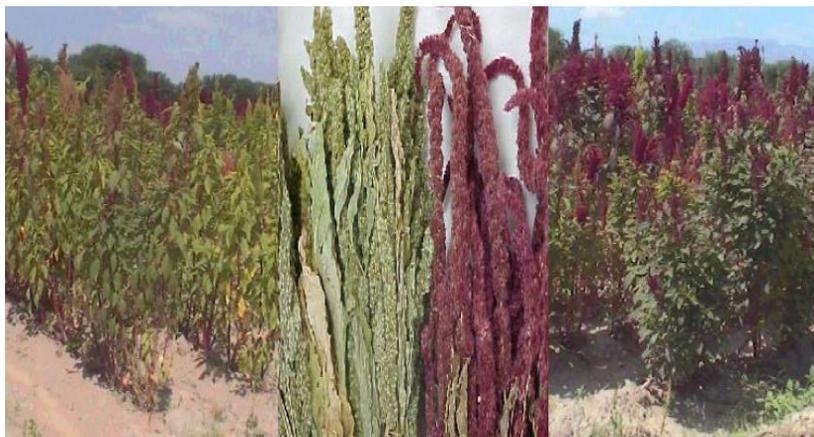


Figura 2. Apariencia del cultivo de amaranto

2.5.1 Origen del amaranto.

Históricamente el amaranto es uno de los cultivos más antiguos, fue cultivado en América desde hace 5000 a 7000 años por las civilizaciones Inca, Maya y Azteca, donde fue utilizado como un alimento básico y junto con el maíz y el frijol, fue un cultivo fundamental para las civilizaciones Mesoamericanas y Sudamericanas. (Silva, 2007; Rivillas, 2008; Asociación mexicana del amaranto, 2012).

Los mayas lo nombraban "xtes", apreciaban principalmente su valor alimenticio y probablemente fueron los primeros en utilizarlo como un cultivo de alto rendimiento. Los aztecas lo conocían como "huatli" y lo ligaban con sus ritos religiosos. Por su parte los Incas lo denominaron "Kiwicha" (pequeño gigante) y lo respetaban principalmente por sus poderes curativos. A la llegada de los españoles se le denominó amaranto, que proviene del latín y significa "flor que nunca muere" o "vida eterna". (Silva, 2007; Rivillas, 2008).

Existen cerca de 20 especies del género *Amaranthus* en México que crecen en forma silvestre (Mapes, 1986). Dos de ellas *A. hypochondriacus L.* y *A. cruentus L.* fueron domesticadas por algunos grupos étnicos prehispánicos de México, quienes las utilizaban como parte de su dieta alimenticia y de sus rituales religiosos (Alejandre y Gómez, 1986, 1999; Granados y López, 1986). En México se cultiva en los estados de Puebla, Veracruz, Morelos, Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México.

Se ha descrito la presencia de fitoquímicos y compuestos con actividad biológica en las proteínas del grano de Amaranto, resultando de interés ya que es uno de los cultivos de mayor importancia en México. Las principales formas de consumo en nuestro país son, semillas reventadas o esponjadas, dulces denominados "alegrías", harina y botanas elaboradas con la semilla. El procesamiento del amaranto involucra inicialmente una limpieza, de la cual se genera un subproducto que contiene restos de flores, semillas vanas y cascarilla. Este material es considerado un subproducto que, por el momento, no tiene usos o aplicaciones específicos.

2.5.2 Composición química del grano de amaranto

El pequeño grano de amaranto, aproximadamente de 1 mm de diámetro, posee notables propiedades nutricionales. En general, el grano se caracteriza por tener relativamente mayores niveles de proteínas y lípidos y niveles inferiores en almidón a los principales cereales (maíz, arroz y trigo). Una comparación de la composición química media de amaranto (*A. Hypochondriacus*) y el maíz, el arroz y el trigo se muestra en la tabla 2. El análisis de la composición química media de los granos de varias especies de amaranto indica que hay algunas variaciones entre y dentro de especies.

Comparando las composiciones de granos convencionales, se observa que los niveles de proteínas, grasa, fibra y cenizas son más altos en el amaranto, mientras que la humedad e hidratos de carbono son más bajos. El alto potencial del amaranto como fuente alimenticia se basa en su alto contenido de proteína, además del adecuado balance de aminoácidos esenciales. El amaranto contiene altos niveles de lisina, sin embargo la leucina es invariablemente el principal aminoácido limitante (Saunders y Becker, 1984). El contenido de lípidos oscila entre 6.5 y 7.7 % para *A. hypochondriacus*, el aceite de amaranto contiene una cantidad considerable de ácido linoleico, oleico, palmítico, unas trazas de linolénico y otros ácidos grasos, en total alrededor del 76% del aceite es altamente insaturado.

Tabla 2. Comparación de la composición proximal de los granos de amaranto y algunos cereales (g/100g de base seca)

Componente	Amaranto ^a	Trigo	Maíz	Arroz
Carbohidratos	59.2	66.9	67.7	75.4
Proteína cruda	16.6 ^b	14.0 ^c	10.3 ^d	8.5
Grasa	7.5	2.1	4.5	2.1
Fibra cruda	4.1	2.6	2.3	0.9
Cenizas	3.3	1.9	1.4	1.4
Humedad	9.6	12.5	13.8	11.7

^a Valores promedio de harinas de diferentes especies de amaranto (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*).

^bNx5.85, ^cNx5.7, ^dNx6.25 (son los factores de conversión de nitrógeno a proteínas)

Fuente Cai y col., 2004

De acuerdo con Sandoval (2005), el aceite del grano amaranto contiene grandes cantidades de escualeno (entre el 5.5 y 5.6% del total) producto altamente demandado por la industria farmacéutica ya que se ocupa en la manufactura de cosméticos de alta calidad.

Además la cantidad de almidón puede variar entre 58 y 66%, con una baja temperatura de gelificación, contiene un 9 a 16% de fibra, que es más fina y blanda que la del trigo y posee un 2.7 a 5 % de cenizas y la humedad varía entre 8 hasta 10% (Tosi y col., 2000). Finalmente, las altas concentraciones de calcio, fósforo, hierro, potasio, zinc, vitamina E y del complejo vitamínico B, así como de bajas concentraciones de factores antinutricionales, hacen de este grano un producto de interés en la elaboración de nuevos alimentos.

Tabla 3. Composición aproximada de varias especies de granos de amaranto

Componente	<i>A.cadatus</i>	<i>A.cruentus</i>	<i>A.hybridus</i>	<i>A.hypochondriacus</i>
Carbohidratos	59.6-62.8	60.7-62.6	58.6	57.0
Proteína cruda^a	17.6-18.4	13.2-18.2	14.0	17.9
Grasa	6.9-8.1	6.3-8.1	6.7	7.7
Fibra cruda	3.2-5.8	3.6-4.4	6.6	2.2
Cenizas	3.1-4.4	2.8-3.9	3.6	4.1
Humedad	0.5-11.6	6.2-8.8	10.5	11.1

^aNX5.85

Fuente: Cai y cols., 200

Además se ha descrito la presencia de dos tipos de albúmina en el grano de amaranto (Martínez y col. 1997) entre las que se encuentran albúmina 1, la cual es extraída con agua y/o soluciones salinas y albúmina 2 que es extraída con agua después de que en la harina se ha extraído mediante soluciones salinas la albúmina 1 y la globulina. Para efecto de este trabajo únicamente se evaluaron algunas actividades sobre albúmina 1 y globulina del grano de amaranto.

2.5.3. Péptidos y aminoácidos presentes en el grano de amaranto

Uno de los aspectos más relevantes en el estudio del amaranto, es la calidad de su proteína y el balance de aminoácidos, además de los altos niveles de lisina con respecto a los demás cereales. Aunado a que las proteínas del grano de amaranto contienen altas cantidades de aminoácidos esenciales; sin embargo, su contenido depende de las especies de plantas y cultivo (Juan y col., 2007). Se ha demostrado que el perfil de composición de aminoácidos del amaranto es más parecido al de las leguminosas que a los granos de cereales, a excepción de los aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína), que están presentes en mayor cantidad en el amaranto que en legumbres (Venskutonis y Kraujalis, 2013). En investigaciones recientes, se ha demostrado que los péptidos presentes en las fracciones solubles en buffer de fosfato de aislados proteicos, fracciones de proteínas, hidrolizados por serin proteasas muestran actividad antioxidante. En otro estudio, se demostró que el aislado de proteína y el hidrolizado con alcalasa de *A. mantegazzianus*, neutralizó los radicales libres después de la digestión gastrointestinal, haciéndolos ingredientes prometedores para el desarrollo de alimentos funcionales (Tironi y Añón, 2010, Delgado y col., 2011).

2.5.4. Compuestos nutraceuticos presentes en el grano de amaranto

En los últimos años se han realizado estudios clínicos acerca de las propiedades del amaranto en la reducción de colesterol, como agente antioxidante, anticancerígeno, antitrombótico, agente antihipertensivo y como un alimento para los pacientes con enfermedad celíaca e inmunodeficiencias (Silva, 2007).

La mayoría de estas propiedades se explican por la presencia de sustancias presentes en los alimentos; como la soya que presenta un péptido denominado Lunasina, con efectos antitumorales, o sustancias con potencial antihiperlipidémico, antidiabético y antihelmíntico que se encuentran en los extractos metanólicos, así como de aquellas sustancias con propiedades antidiarreicas, antifúngicas y antipalúdicos presentes en los extractos acuosos de las semillas (Huerta-Ocampo y col., 2011).

Flavonoides específicos, como la rutina y algunos ácidos fenólicos, como el ácido gálico, p-hidroxibenzoico y el ácido vanílico con efectos antioxidantes también están presentes en semillas de amaranto y sus brotes (Pasko y col., 2008).

2.5.5 Usos y aplicaciones de la planta y grano de amaranto

La planta de amaranto es un producto que puede ser aprovechado integralmente ya que tanto los granos como las hojas son comestibles y presentan una gran alternativa para variar la dieta humana. Hasta donde se conoce, cualquier semilla de amaranto es comestible simplemente con tostarlo o molerlo, su sabor es muy parecido al de un cereal (Rivillas, 2008).

Respecto a los usos del grano, puede ser procesado de diversas maneras para el consumo, siendo la forma de grano reventado quizás la más popular. Al ser reventado por calor provee un cereal que puede ser utilizado para la preparación de alimentos conocidos como las “alegrías”, mazapanes, cereal reventado y harinas de amaranto.

También se logran a través del amaranto productos como cereales enriquecidos para suplementación de dietas, harinas, concentrados, extruidos, almidones, aceites y colorantes derivados del amaranto. Éstos sirven como insumos para otras industrias de alimentos y bebidas, cosmetología, farmacéutica, etc. Se utilizan las proteínas de amaranto como sustitutos de proteína animal en la alimentación de pollos, cerdos de engorda y desarrollo de nuevos productos (Silva, 2007).

Finalmente, el amaranto es una excelente opción para personas que padecen alergia a gluten y de personas alérgicas a los cereales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

A continuación se presenta el plan de trabajo que se siguió para la obtención de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto. Cada una de las actividades evaluadas fueron realizadas por triplicado y reportados con sus respectivas desviaciones.

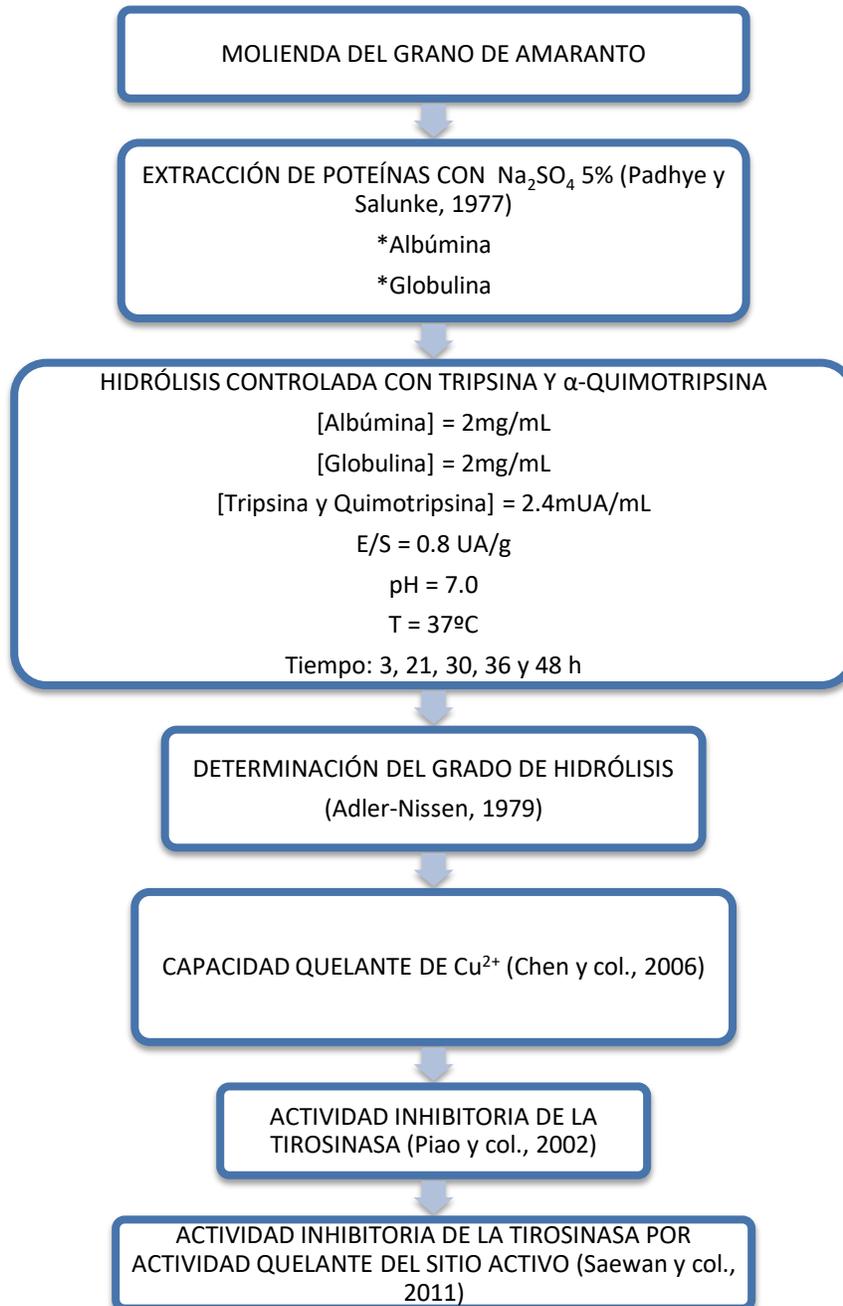


Figura 3. Estrategia experimental para la evaluación del grano de amaranto.

3.1 Molienda del grano de amaranto.

Se muelen los granos de amaranto en un mortero y se pasan por un tamiz de malla No. 60 hasta obtener un tamaño de partícula de 0.25 mm. Una vez obtenida la harina conservarla en un recipiente hermético bajo refrigeración (5°C).

3.2 Extracción de albúmina 1 y globulina Na₂SO₄.

Una vez obtenida la harina, se mezclaron 100g de esta y 600 mL de Na₂SO₄ al 5%, se mantuvo en agitación durante 30 min a 5°C. Centrifugar a 10 000 rpm, 20 min, 5°C (Rotina 420R, Hettich). Se separa el sobrenadante (no tirar) y el residuo de la harina, a este último se agrega 400 mL de Na₂SO₄ al 5% y agitar por 30 min a 5°C. Se centrifuga a 10 000 rpm, 20 min, 5°C y se junta el sobrenadante con el primer sobrenadante. A ello se adiciona una solución de (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100 % para saturar y precipitar las proteínas. Se centrifuga en cada uno de los niveles de saturación por 20 min a 10 000rpm (13 000g). Posteriormente se dializa el precipitado con agua durante 24 h con cuatro cambios de agua destilada. Se centrifuga por 20 min a 10000 rpm. El sobrenadante es la fracción que contiene las proteínas solubles en agua (albúmina 1). El sólido contenido después de la diálisis se somete a una segunda diálisis en solución de Na₂SO₄ al 10% durante 24 h. Finalmente se centrifuga por 20 min a 10 000 rpm. El sobrenadante es la fracción que contiene la fracción de la globulina.

3.3 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina con tripsina y α -quimotripsina

El tratamiento enzimático con tripsina y α -quimotripsina ocurre por separado, para desarrollar dicho procedimiento se establece el orden de adición de los reactivos a continuación: en un tubo falcon se adicionan 320 μ L de buffer de fosfatos 0.5 M pH=7.4, seguido de 600 μ L de la fracción proteica a 2mg/mL. Se incuba durante 5 min a 50°C. Posteriormente se adicionan 80 μ L de Tripsina a 2.4 mUA/mL en solución de buffer de fosfatos 0.5M pH=7.4, que corresponde una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g. Se procede a la hidrólisis a 50 °C con los siguientes intervalos de tiempo: 3, 21, 30, 36 y 48 h. Se emplea como blanco una

mezcla de todos los reactivos sin ser sometido a hidrólisis. Al término de cada uno de los tiempos de hidrólisis se añadieron 100 μ L de solución de fenilmetilsilfonilo (PMSF) a una concentración de 2 mg/ml en etanol para detener la reacción.

3.4 Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-15.

Las muestras de hidrolizados de albúmina 1 y globulina se hicieron pasar a través de una columna de filtración en gel empacada con Sephadex G-15, de un rango de fraccionamiento de peso molecular de 1 a 1500 Da. Para la determinación del volumen vacío y volumen total de la columna se utilizó azul dextrano (2mg/mL) y DNP-alanina (0.5 mg/mL).

El volumen inyectado fue de 500 μ L y se eluyó con buffer de β -mercaptoetanol, colectando fracciones de 1 mL en un colector de fracciones. Para cada una de las fracciones colectadas se midió absorbancia a 280 nm.

Se seleccionaron las fracciones que mostraron los picos de mayor absorbancia para determinar su peso molecular relativo mediante una curva patrón de marcadores de peso molecular conocido: triosafosfato-isomerasa (26.6 KDa), mioglobina (17KDa), α -lactoalbúmina (14.2KDa), aprotinina (6.5KDa), insulina (3.5 KDa) y bradicina (1.06 KDa).

3.5 Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979).

Se diluye 1:2 el hidrolizado de albúmina 1 y globulina, se mezclan 64 μ L de dicha dilución en un tubo de ensaye con 1.0 mL de buffer de fosfatos 0.2 M de pH 8.2 y 500 μ L de ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) al 0.5% en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 8.2. Se incuba en la oscuridad a 50 $^{\circ}$ C durante 30 min. Después de la incubación, se adiciona 1.0 mL de sulfito de sodio 0.1M. Se deja enfriar y se mide absorbancia a 340 nm. Se realiza el análisis por triplicado y los datos se analizan mediante estadístico de Tukey al 95% de confianza, empleando el programa SPSS.

3.6 Capacidad quelante de cobre (Chen y cols., 2006).

El análisis quelante de Cu^{2+} se realiza con 1 mL de la disolución muestra, a la cual se adiciona 1 ml de buffer de hexamina 20 mM que contiene 20 mM KCl y 3 mM CuSO_4 , después se adiciona 0.25 mL de 1 mM de tetrametil murexida (TMM). Se mide absorbancia a 530 nm. El experimento se realiza por triplicado y se analizan al 0.05% de significancia empleando la prueba de Tukey.

3.7 Actividad inhibitoria de tirosinasa (Piao y cols., 2002)

La estrategia experimental se realiza agregando 650 μL de buffer de fosfato de potasio 0.067M pH= 6.8, 150 μL de solución de L-Tirosina 5mg/ml disuelta en buffer de fosfato de potasio 0.067M pH= 6.8 y 200 μL de una solución de tirosinasa de champiñón a 480 U/ml. El volumen final es de 1mL teniendo una actividad enzimática de 96 U/ml. Se mide absorbancia a 475nm de la mezcla control incubando previamente a 37°C, midiendo cada 2 minutos por un tiempo total de 10 minutos. La prueba se realizó por triplicado.

Para determinar la actividad inhibitoria de la tirosinasa de los hidrolizados proteicos del grano de amaranto, se sigue la misma estrategia. La mezcla de ensayo se agrega 500 μL de buffer de fosfato de potasio 0.067M pH= 6.8, 150 μL de solución de L-Tirosina 5mg/ml disuelta en buffer de fosfato de potasio 0.067M pH= 6.8, 150 μL de inhibidor (hidrolizados proteicos) y 200 μL de la solución de tirosinasa de champiñón a 480 U/ml. Incubar la mezcla a 37 °C y realizar lecturas cada 2 minutos a 475nm por un tiempo total de 10 minutos. Se realiza por duplicado el experimento. Los resultados se analizan mediante SPSS, empleando la prueba de Tukey a una significancia del 0.05%.

3.8 Estudio de la cinética de inhibición

La cinética de inhibición se estudió por el método grafico de Lineweaver y Burk (doble-recíproco). Con el mismo protocolo utilizado en el "ensayo enzimático de la actividad de la tirosinasa," usando las siguientes concentraciones de L-tirosina 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml. Las velocidades de reacción (V) se midieron cada min durante 10 min y sin un inhibidor en la parte lineal de la cinética (tasas iniciales) donde la

cantidad de sustrato no es el parámetro limitante. Los resultados se analizan de acuerdo con la representación de Lineweaver y Burk método que permite la determinación de la constante de Michaelis (K_m) y velocidad máxima ($V_{máx}$).

3.9 Actividad quelante de cobre en el sitio activo de la enzima.

Para la determinación de la actividad quelante de cobre en la enzima por los hidrolizados del grano de amaranto, la mezcla de reacción consistió de 1000 μL de 0.1M de buffer de fosfatos pH 6.8, 100 μL de tetrametilmurexida, 500 μL de la muestra y 100 μL de una solución de tirosinasa a 138 unidades, incubando a 25°C por 20 min, se realizó lectura a 530 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A diferencia de otros granos, como el maíz y el trigo, el grano de amaranto posee una notable diferencia en cuanto al contenido de proteína. Para ello se obtuvo la harina del grano de amaranto y se procedió a extraer las proteínas aprovechando su solubilidad. Únicamente se decidió extraer albúmina 1 y globulina, debido a la facilidad de extracción.

En la tabla 4, se presenta los resultados de la extracción a partir de 100g de harina de amaranto. Con base en los resultados para albúmina 1, se obtuvo el mayor peso para esta proteína, mientras que la fracción de globulina se extrajo en menor cantidad, por lo que las diferencias de ambas fracciones puede ser debida a su solubilidad.

Tabla 4. Extracción de las proteínas del grano de amaranto

	Albúmina 1	Globulina
Peso proteína (g)	2.09	1.77
Concentración (mg/mL)	23.86	56.61
Rendimiento (%)	0.27	0.45

Se cuantificaron los extractos por el método de Bradford, en donde a partir de una curva patrón de albúmina sérica bovina se determinó, que la fracción de albúmina 1 tenía una concentración de 23.86 mg/mL, en tanto que el extracto de globulina se obtuvo en mayor concentración siendo de 56.61 mg/mL conforme se observa en la tabla 4.

La producción de péptidos biológicamente activos generalmente sucede mediante hidrólisis enzimática, como se mencionó al inicio de este trabajo, la alcalasa es una de las enzimas más empleadas para la generación de éste tipo de péptidos. Sin embargo, el uso de otras serin proteasas como la tripsina y la quimotripsina han dado grandes aportaciones para el estudio no solo en el área de los alimentos, sino de la cosmética y la medicina.

Una vez realizado el tratamiento enzimático controlado de las proteínas del grano de amaranto se evaluó el grado de hidrólisis derivado de ambas proteasas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(tripsina y quimotripsina). En la tabla 5, se muestra el grado de hidrólisis en relación al tiempo, se observa que tanto la albúmina como globulina se exponen a un grado de hidrólisis mayor conforme aumenta el tiempo de dicho tratamiento.

Así mismo, puede observarse que la albúmina sufrió un grado de hidrólisis mayor respecto a la globulina para ambos tratamientos esto es debido a las condiciones catalíticas a las que fueron sometidas las enzimas. Además se ha demostrado que las serinproteasas son relativamente inespecíficas, en estudios de cinética se ha encontrado una gran especificidad hacia glicina, como residuo, con predilección a residuos grandes hidrofóbicos unidos a ella.

La glicina, flanqueada por dos aminoácidos hidrofóbicos grandes, pareciera ser la mínima secuencia de aminoácidos para una catálisis efectiva de las serin proteasas. En tanto, el caso de la tripsina da como resultado 14 sitios de corte (De la Fuente, 2003) ofreciendo una amplia variación de péptidos de tamaños diversos.

En lo que se refiere al tratamiento con tripsina (T), la AlbúminaT y la GlobulinaT, presentan un grado de hidrólisis casi constante a partir de las 36 horas de tratamiento alcanzando valores cercanos al 21% y 17 % respectivamente. En tanto, el tratamiento con quimotripsina (Q), la AlbúminaQ y la GlobulinaQ presentan un grado de hidrólisis más intenso, registrando valores de 25% y 23% respectivamente (tabla 5).

Luego de la hidrólisis, las proteínas disminuyen su tamaño y conformación, así mismo sufren la ruptura de enlaces peptídicos, que es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. En este sentido, el grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El cual está determinado por las condiciones empleadas (Benítez y col. 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Grado de hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto

Tiempo (h)	% Grado de Hidrólisis			
	AlbúminaT	GlobulinaT	AlbúminaQ	GlobulinaQ
3	16.25±0.036 ^a	10.260±0.056 ^A	14.022±0.014 ^a	8.531±0.070A
21	18.29±0.027 ^a	14.091±0.035B	17.493±0.079b	10.863±0.068 ^a
30	20.05±0.029 ^a	16.914±0.030B	19.101±0.057b	16.275±0.044B
36	21.78±0.040b	17.640±0.032C	21.781±0.014b	19.153±0.041B
48	21.91±0.035b	17.883±0.046C	25.996±0.038c	23.990±0.039C

a,b,c,d: Medias de albúmina de tratamiento con tripsina y quimotripsina

A,B,C,D: Medias de globulina de tratamiento con tripsina y quimotripsina

Medias con la misma letra no son ($p < 0.05$) significativamente diferentes por tratamiento

Cabe señalar que el comportamiento observado en el grado de hidrólisis (GH) de las proteínas del grano de amaranto, puede ser debido a diversos factores como son las condiciones de la hidrólisis, el pH, temperatura, tiempo de incubación, la relación enzima-sustrato. Otro factor que puede ser determinante en el grado de hidrólisis, es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez y cols. 2008).

Para la generación de péptidos de tamaño variable, se emplearon serin proteasas de estructura y actividad similares. Sin embargo, presentan diferencias claves. Se encuentran clasificadas como endopeptidasas, y poseen el mismo sitio catalítico; que se caracteriza por contener un residuo de serina y se diferencian en su especificidad de acción para hidrolizar una proteína.

De acuerdo con Olsen y cols. (2004) el pH óptimo de acción de tripsina es de 7.8 y la temperatura óptima es 37°C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos Arginina (Arg) o Lisina (Lys) en la cadena, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial, salvo que estos últimos se encuentren enlazados a prolina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por su parte, la quimotripsina es una enzima caracterizada por su alta inespecificidad, presenta mayor afinidad de hidrólisis con enlaces peptídicos que contiene grupos carbonilo de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) o hidrofóbicos, el pH de catálisis esta entre 7 y 9, la especificidad de la quimotripsina depende completamente de cuál sea el aminoácido situado en el lado amino terminal del enlace peptídico que se va a escindir.

Si bien la hidrólisis enzimática ocurre como una secuencia de pasos, en donde ocurre la interacción del sustrato con la enzima, cabe resaltar que el proceso puede ser más lento cuando se trata de proteínas globulares como en éste caso. Las conformaciones de albúmina y globulina pueden ser diferenciadas en cuanto al arreglo espacial y debido a ello resulte que el grado de hidrólisis mediante la actividad catalítica de la tripsina sea menor debido a la inaccesibilidad a las proteínas.

Respecto a la actividad catalítica con quimotripsina, esto concuerda al trabajo de Benítez y cols. (2008) en el caso de proteínas globulares, la mayoría de los enlaces peptídicos están localizados en el interior de la proteína y no son accesibles para la enzima, por esto, se considera que para proteínas globulares es necesario efectuar la desnaturalización de la proteína antes de proceder a hidrolizarla, ya que después de la desnaturalización estarán expuestos más enlaces peptídicos.

Aunque la diferencia porcentual parece no ser tan acusada en el tratamiento con quimotripsina entre albúmina y globulina, como en el tratamiento con tripsina, estos puntos ayudarán a determinar el empleo de una o ambas enzimas para la generación de péptidos bioactivos así como de las consideraciones intrínsecas y extrínsecas de las enzimas y las proteínas anteriormente mencionadas.

En ese sentido, conviene hidrolizar las proteínas del grano de amaranto a un tiempo de 36 horas, por lo que de inicio podría no ser necesario ampliar el tratamiento enzimático. Sin embargo, en la literatura científica se muestra un amplio intervalo en relación al grado de hidrólisis para ambas enzimas (tripsina y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

quimotripsina), por lo que esperar valores mayores o menores no son un indicativo de que la hidrólisis fue completa o correcta, porque depende del tipo de proteína (fuente natural) en cuestión, así que los valores alcanzados son los generados y propiciados por el ambiente hidrolítico conforme a las condiciones de acción de las enzimas y las proteínas de este trabajo.

Si bien el tratamiento con tripsina, refleja valores casi constantes a partir de las 36 horas de hidrólisis, Sathivel y col. (2003) explican que cuando el grado de hidrólisis aumenta rápidamente en la etapa inicial de hidrólisis, tiende a entrar en una fase estacionaria, debido a que la acción proteolítica de las enzimas disminuyó el número de enlaces peptídicos susceptibles, por lo tanto, se obtiene un valor de GH constante conforme el tiempo de reacción aumenta.

No obstante, considerando los valores alcanzados durante la hidrólisis enzimática, dichos resultados concuerdan con la literatura, ya que al sufrir un menor grado de hidrólisis es posible obtener un mayor número de fracciones de peso molecular similar, lo que ocurre con la globulina de amaranto. Por otra parte, la albúmina presenta una mayor facilidad tanto de desnaturizar como de hidrolizar por lo que es más factible la obtención de distintas fracciones de variado peso molecular.

En el caso de la catálisis por tripsina y quimotripsina, se logra un menor grado de hidrólisis que varía entre el 10% y 20%, con distintos sitios de corte, dando mayor posibilidad a distintas fracciones o péptidos distintos, mientras que una catálisis por alcalasa recordando que es la proteasa más utilizada en la generación de péptidos bioactivos, se logra un grado de hidrólisis mayor en un intervalo del 20% al 60%, con sitios más específicos de corte en un polipéptido (De la Fuente Betancourt, 2007).

En consecuencia, la hidrólisis de las proteínas genera productos diversos, de manera que se puede generar distintos grados de hidrólisis. Recientemente se ha descrito que las proteínas que son expuestas a hidrólisis enzimática y que en consecuencia presentan un grado de hidrólisis por arriba del 10%, se reconoce que son hidrolizados extensivos; con grado de hidrólisis superior al 10% se destinan en alimentación especializada, bien como suplemento proteínico o en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dietas médicas (Meredith y cols., 1990; Boza y cols., 2000, Benitez y cols., 2008) por lo que el potencial de los péptidos puede ser aplicado en distintas áreas de investigación.

Finalmente la especificidad de la enzima no daña la composición de péptidos y aminoácidos libres, así como su secuencia de aminoácidos (Doucet y cols., 2003). Sin embargo, se hace uso de ellas para alcanzar determinados grados de hidrólisis para obtener actividades específicas.

La adecuada separación y caracterización, de los péptidos de un hidrolizado complementaría la información dada por la determinación del grado de hidrólisis y la distribución de pesos moleculares, y ayudaría a un mejor conocimiento de la composición del producto. Con base en la técnica de separación basado en la exclusión de partículas por diferencia de tamaño (Gallegos, 2012), el cual se llevó a cabo en una columna empacada con Sephadex G-15, se obtuvieron distintas fracciones para cada tratamiento.

En general, se observa que conforme aumenta el tiempo de hidrólisis se obtienen un mayor número de fracciones derivadas de albúmina y globulina. Los cromatogramas se pueden observar en el anexo al final de este trabajo. En dichos perfiles de elución para cada uno de los hidrolizados de albúmina y globulina, se aprecia que el efecto de elución es ligeramente variado en cuanto a las fracciones obtenidas se refiere.

Si bien la metodología no es de todo automatizada por lo que podrían acarrear algunos factores externos, como la preparación de la muestra, el flujo del eluyente, que pudieran determinar la eficiencia con que son separadas cada una de las fracciones de la proteína en la columna. Sin embargo, se observa que los picos correspondientes a las fracciones colectadas están resueltas de otras fracciones adyacentes, el tamaño e intensidad de las bandas pudiera ser debido al tamaño del péptido y composición que determina una señal más o menos intensa como respuesta a la absorbancia, principalmente los anillos y grupos aromáticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presenta un ejemplo de los perfiles de elución de los hidrolizados proteínicos en una columna sephadex G-15.



Figura 4. Perfil de elución de hidrolizado de albúmina 1 obtenido por hidrólisis de tripsina a las 36 horas. (albúmina 1: 2mg/mL, tripsina 2.4mUA/mL, 36 h). Marcador molecular (Mr) 457 KDa



Figura 5. Perfil de elución de hidrolizado de globulina obtenido de la hidrólisis por quimotripsina a las 48 horas (globulina: 2mg/mL, quimotripsina 2.4mUA/mL, 36 h). Marcador molecular (Mr) 457 KDa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A manera de ejemplo, se presentan dos perfiles de elución, uno correspondiente a albúmina 1 (figura 4) y globulina (figura 5) a distintas condiciones con la finalidad de apreciar los distintos picos resueltos que se generan de la filtración en gel. La flecha de la izquierda representa el volumen de vacío que se mide tras los primeros minutos de la filtración y que es una herramienta que ayuda a determinar el peso molecular relativo de las fracciones filtradas. En seguida, aparecen dos flechas que señalan una o dos bandas, las cuales fueron seleccionadas bajo el criterio de intensidad de los picos y a los cuales se les determinó el peso molecular aparente para establecer alguna relación entre el peso determinado y la posible actividad de inhibición de tirosinasa.

El resto de los perfiles pueden consultarse al final de este trabajo. Y la mayoría de ellos presentan una adecuada resolución de las bandas, además conforme aumenta el tiempo de hidrólisis no existe un comportamiento que correlacione que a mayor grado de hidrólisis más bandas aparecerán en los perfiles de elución, por lo que vale la pena detenerse a evaluar las bandas y su comportamiento.

En relación a la caracterización conjunta del grado de hidrólisis y del tamaño de los péptidos generados, se puede decir que se prefiere extender el tiempo de hidrólisis para generar péptidos de menor tamaño. Sin embargo, pueden variarse las condiciones de la catálisis así como emplear de manera conjunta enzimas del tipo endo y exo para lograr la hidrólisis total de ambas proteínas.

Se empleó el método de estimación del peso molecular promedio empleado por Tovar-Pérez (2008), para las fracciones obtenidas tras la hidrólisis y filtradas en gel, dichos resultados se pueden observar en la tabla 6, donde se tiene que el mayor peso molecular es para un tiempo de hidrólisis de 3 horas para ambos tratamientos enzimáticos, lo que puede ser debido a que no es el tiempo necesario para que las enzimas realicen un gran número de rupturas de enlaces peptídicos.

Se determinó que el peso molecular promedio de albúmina es de 23 KDa y para la globulina de 18 KDa en el tratamiento por tripsina, en tanto que la albúmina registró 21 KDa y 13 KDa para globulina por quimotripsina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Distribución de pesos moleculares promedio de la filtración en gel de hidrolizados proteínicos del grano de amaranto.

PESOS MOLECULARES PROMEDIO (KDa)				
Tiempo de hidrólisis (h)	Tripsina		Quimotripsina	
	Albúmina	Globulina	Albúmina	Globulina
3	22.82	18.2	21.7	13.59
21	18.41	13.12	17.54	12.15
30	13.69	9.22	12.11	7.28
36	11.57	4.17	7.35	3.23
48	3.21	0.97	1.51	0.84

Con base en los resultados de la tabla 6, se observa que el tratamiento por quimotripsina genera péptidos de menor tamaño, lo que en consideración podría reflejar una mejor digestión de las proteínas de acuerdo al tipo de proteasa y la especificidad de la misma. En ese sentido, se prefiere la generación de péptidos de tamaño menor, ya que el trabajo de Preza-Lerma (2010) indica que la biofuncionalidad de los péptidos depende de sus propiedades estructurales y los péptidos cortos presentan mejores efectos biológicos. Sin embargo, la batería de pruebas que se realizaron para caracterizar los hidrolizados podría dar pie para la investigación *in vivo* de los efectos algunos péptidos en particular.

Como parte de la caracterización de los hidrolizados obtenidos, se evaluó la actividad quelante de cobre, midiendo la habilidad de las familias de péptidos obtenidas en la formación de un quelato con el ión Cu^{2+} , esta actividad determina una de las características principales de los péptidos bioactivos, siendo su capacidad de captar radicales libres y secuestro de metales para evitar procesos de oxidación en los sistemas biológicos.

Dicha habilidad para formar el complejo con cobre se observa en la figura 6, donde se muestra que conforme aumenta el tiempo de hidrólisis aumenta la actividad quelante de cobre, esto para ambas proteínas. Se tiene un porcentaje de actividad máxima a las 48 horas para ambos hidrolizados. Puede observarse que

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

existen diferencias menores, los hidrolizados que fueron catalizados por quimotripsina muestran mayor actividad quelante de cobre.

El tratamiento enzimático con tripsina logra una actividad quelante de cobre del 80% y el 78% para albúmina y globulina respectivamente, por otra parte, el tratamiento hidrolítico con quimotripsina parece ofrecer los mejores resultados, obteniéndose el 82% para albúmina y globulina. Como se ha mencionado anteriormente, la especificidad de las serin proteasas puede variar, dando como resultado péptidos de tamaño variado y actividad distinta. En cuanto a la respuesta de ambos hidrolizados respecto al tiempo de hidrólisis, puede ser debido a que el grado de hidrólisis menor de la globulina respecto a la albúmina propicie de acuerdo a su conformación y estructura péptidos con mayor actividad por lo que se registran dichas actividades.

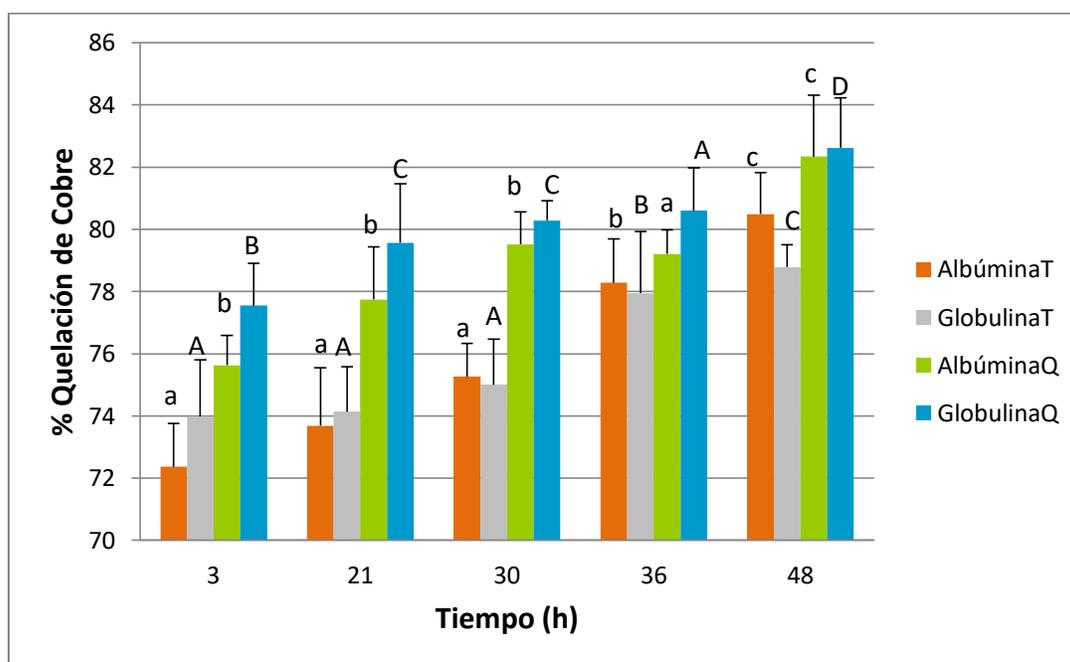


Figura 6. Actividad quelante de cobre de hidrolizados proteínicos del grano de amaranto.

a,b,c,d: medias de albúmina del tratamiento con tripsina y quimotripsina

A,B,C,D: medias de globulina del tratamiento con tripsina y quimotripsina

Medias con la misma letra no son ($p < 0.05$) significativamente diferentes por tratamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en el análisis estadístico, se observa que durante las primeras 30 horas de tratamiento enzimático, la respuesta en la actividad quelante parece no tener diferencia significativa para ambas proteínas en ambos tratamientos. Sin embargo, pasado ese tiempo, se observan diferencias claves de las 36h a las 48 h, sobre todo en el caso del tratamiento enzimático por tripsina, se tiene una menor respuesta de actividad quelante de globulina respecto a la albúmina, mientras que el tratamiento por quimotripsina parece no variar a las 48 horas, siendo la mejor respuesta del tratamiento.

Dado que se conoce que un 65% de la proteína del grano de amaranto proviene del germen y 35% del endospermo, podría sugerirse que esta última representa las reservas de proteína del grano. Por lo tanto, es de interés insistir en que el patrón de aminoácidos de cada una de las fracciones anatómicas ayuda a comprender la relación entre el contenido de aminoácidos y el de proteína, y en consecuencia con la actividad biológica que estos pueden ofrecer.

Si bien el contenido de aminoácidos puede atribuirse a la especie y variedad, también es un factor determinante el método de extracción de las proteínas del grano, por lo que en trabajos de métodos de análisis de aminoácidos dichos autores indican qué aminoácidos esenciales predominan en las cuatro fracciones de proteína del grano de amaranto. Las albúminas por ejemplo, aportan lisina, treonina y triptófano; las globulinas: lisina, aminoácidos azufrados y aromáticos, y triptófano (Duarte-Correa y col., 1986; Bressani y col. 1990; Gorinstein y col., 1991).

De todo ello, podemos recalcar el potencial nutricional que tiene el amaranto, por otra parte, la importancia de dichos estudios radica en la posibilidad de seleccionar variedades con niveles mayores que algunas de las fracciones proteínicas con el fin de obtener un grano más rico en los principales aminoácidos esenciales que bien podría ampliar camino hacia la investigación no sólo de las proteínas como compuestos con actividad biológica en estudio hacia los procesos de pigmentación de la piel, sino para mejorar la nutrición y salud integral de los seres humanos.

La literatura indica que existen diferentes maneras para la extracción de las proteínas del grano de amaranto, por lo que son variadas las condiciones de hidrólisis y los métodos para evaluar las características fisicoquímicas de los péptidos obtenidos, de manera que dichas condiciones determinaran la aptitud de los péptidos generados. En ese sentido, Soriano y Escalona (2013) reconocen que el grado de hidrólisis depende significativamente del tiempo y la relación E / S. En consecuencia, conforme aumenta la proporción E/S y el tiempo, mayor será el grado de hidrólisis. Así mismo los autores reconocen que fracciones de péptidos de 1 a 10 KDa determina algunas propiedades fisicoquímicas.

Cabe mencionar, que una de las fuentes naturales de excelente calidad proteica es el grano de soya, al respecto existen numerosos estudios que evidencian la actividad biológica de los péptidos, tal es el caso de Carrasco y cols. (2012) que aislaron péptidos con un peso mayor a 1 KDa, reportando una actividad quelante de cobre en un intervalo de 40 a 50%, mientras que péptidos menores a 1KDa presentaron un intervalo de actividad muy variado de entre 20 a 80%. Con esto, puede hacerse notar que la composición de las proteínas y la familia de péptidos obtenidos es necesario purificarse para atribuir las actividades estudiadas, lo mismo que sucede en este trabajo con el grano de amaranto.

Continuando con la temática sobre la composición estructural de los péptidos obtenidos, es necesario considerar interacciones entre los mismos, que permitan la unión con el ión cobre para establecer así el quelato. Consideraciones desde la perspectiva de la química de coordinación y de interacciones de los extremos amino y carboxilo así como de cadenas laterales son fundamentales para conformar un sistema de polipéptidos enlazados a un ión común.

Aunque no se tiene con exactitud la composición de las familias de péptidos obtenidas, es necesario tener en cuenta todas las posibilidades en las que se involucren la formación de dichos complejos.

Tal es el caso de Sovago y col. (2012), que indican que la formación de complejos-péptidos depende de la presencia o ausencia de ciertos residuos voluminosos (por ejemplo, Leu, Trp o Phe) restando estabilidad termodinámica a los complejos dando como resultado la distorsión de la estructura.

No obstante, se observa que aminoácidos como leucina, histidina, tirosina y metionina mejoran la actividad secuestrante de radicales libres de ciertos péptidos (Castel y col., 2010).

Si bien, una vez que el péptido es capaz de secuestrar metales y formar un complejo con estos, es probable que dicho péptido sea capaz de captar radicales libres según el ambiente en el que se encuentre. Sin embargo, dicha actividad está en función de factores como el grado de hidrólisis, las condiciones de la hidrólisis enzimática y por supuesto de la composición y tamaño del péptido.

Ciertos metales como el cobre y hierro, son elementos traza fundamentales que juegan un papel vital como cofactores de muchas enzimas. Así mismo, se sabe que ciertos aminoácidos como histidina, metionina y cisteína así como pequeños péptidos, pueden unirse al cobre y permitir su absorción a través de un sistema de transporte de aminoácidos (Gallegos y col., 2013). Por otra parte Peng y col. (2009) realizaron una hidrólisis con alcalasa, encontrando que el tratamiento condujo a mejorar la capacidad quelante de Cu (II) debido a que aumenta la concentración de grupos de ácido carboxílico, mostrando que la tirosina disponible en el carbono terminal es importante para la eliminación de radicales por parte de algunos péptidos.

Además, el uso de proteasas comerciales como tripsina y quimotripsina también ofrecen una alternativa para la generación de péptidos, con actividad quelante de cobre, aunque los requerimientos catalíticos de la alcalasa son distintos a las enzimas empleadas, la respuesta sobre la actividad quelante se ve beneficiada por la gran variedad de péptidos generados por dichas enzimas, así mismo el contenido de aminoácidos pudo verse preferido para los que brindan una respuesta importante sobre la quelación del ión metálico y del secuestro de radicales libres.

Los péptidos quelantes de cobre son ricos en histidina y previenen la actividad oxidativa del cobre mediante la quelación del ion metálico. Por otra parte, también se ha observado que estos péptidos son ricos en arginina. Aunque este aminoácido carece de propiedades quelantes, puede que favorezca la unión del

péptido con el ión metálico. Así la abundancia de arginina en los péptidos quelantes se debe probablemente a la abundancia de este residuo cerca de los residuos de histidina, aunque también podría deberse a un posible efecto de la arginina sobre la unión al cobre (Gallegos y cols., 2013; Megías y cols., 2008).

El auge que ha tenido esta área de la ciencia, que productos funcionales con péptidos biológicamente activos están disponibles en el mercado y por lo que el tipo y cantidad de los mismos depende de la fuente proteica utilizada así como del grado y tipo de hidrólisis empleado. En consecuencia el empleo de una fuente natural no convencional como lo es el amaranto, ofrece ventajas tecnológicas y nutricias para ser competitivo en diferentes sectores del mercado como lo son alimentos funcionales y nutracéuticos.

Con motivo de interpretar el efecto que tiene la hidrólisis sobre la actividad quelante de cobre, se trazo la figura 7 que muestra los resultados de la experimentación las cuales tienen una tendencia lineal. Sin embargo, no es una respuesta directa entre el grado de hidrólisis y la actividad quelante de cobre.

La respuesta que se produce es positiva; si bien se observa que las líneas de cada proteína describen comportamientos distintos, se observa que en efecto conforme aumenta el grado de hidrólisis, existe una tendencia por aumentar la actividad quelante de cobre. El efecto que presenta la tripsina sobre la globulina y la quimotripsina sobre la albúmina no reflejan una tendencia lineal, de manera que la actividad catalítica de la quimotripsina sobre ambas proteínas arroja una mejor respuesta de actividad quelante de cobre que la actividad de tripsina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

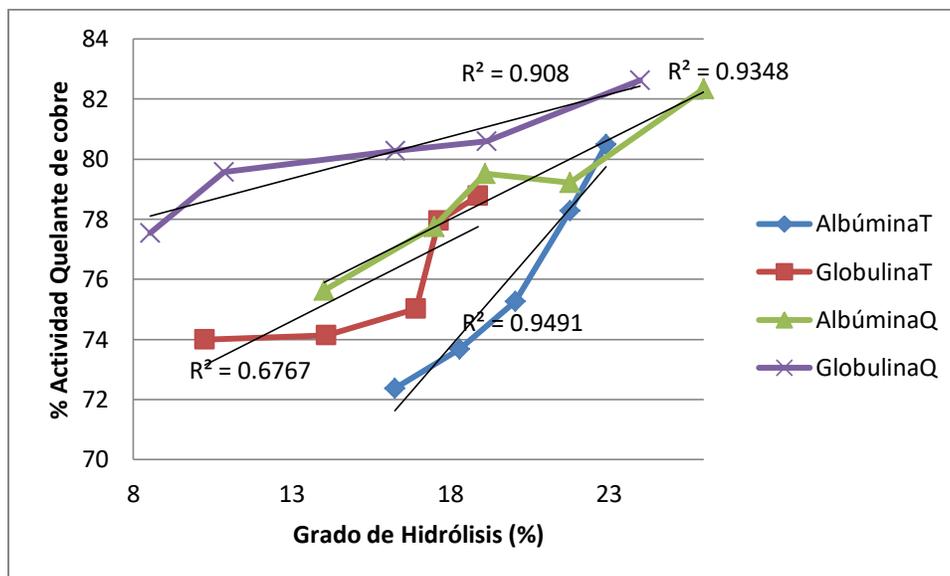


Figura 7. Efecto del grado de hidrólisis sobre la actividad quelante de cobre

Así mismo, se muestran las líneas de tendencia y los valores de correlación lineal los cuales no son nada despreciables para el tratamiento con quimotripsina, de los cuales puede deducirse que existe un porcentaje al cual se atribuye la actividad quelante conforme al grado de hidrólisis.

Partiendo de la premisa de que al aumentar el grado de hidrólisis, se genera la ruptura de un mayor número de enlaces peptídicos, se piensa que se generan péptidos de menor tamaño. Con base en la literatura, los péptidos de menor tamaño se ven favorecidos para experimentar respuestas importantes sobre el secuestro de radicales libres y de quelación de iones metálicos.

Además hay que considerar que los péptidos de menor peso molecular fueron generados a un tiempo de hidrólisis de 48 horas, aunque esto no es un indicativo que asegure la mejor respuesta de actividad quelante de cobre. En ese sentido, se sobreentiende que se prefiere extender el tiempo de hidrólisis para generar péptidos de tamaño pequeño, que pudiesen presentar diferentes aptitudes ante la quelación de cobre, y por supuesto estos presentarían una estructura aminocídica variable, de ahí a que presenten o no respuesta a dicha actividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sabe que las proteínas del grano de amaranto presentan aminoácidos esenciales que en combinación pueden generar péptidos con posible actividad antioxidante y quelante de metales, obteniendo así péptidos de carácter antagónico o sinergista que pudiera mejorar una o ambas actividades mencionadas.

Considerando el desarrollo de la metodología, un punto clave para la generación de péptidos con actividad biológica del grano de amaranto, fue la hidrólisis de las proteínas con las enzimas seleccionadas, ya que comparando el tratamiento con una simulación gástrica, las proteasas en cuestión serían pepsina, tripsina y pancreatina, y han demostrado una respuesta positiva, frente a la generación de péptidos con actividad quelante de metales como cobre y hierro, así como un barrido amplio de radicales libres. Por lo que, la propuesta de éste trabajo para realizar la hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto con endopeptidasas, pudiese ampliar el conocimiento para seleccionar la mejor opción en la generación con péptidos con actividad biológica

Por otra parte, de todos los inhibidores de tirosinasa descritos hasta hoy, sólo unos cuantos son utilizados como agentes despigmentantes, debido principalmente a riesgos de toxicidad para uso humano. Entre estos agentes destacan el ácido linoléico, el hinokitiol, el ácido kójico, la arbutina o la hidroquinona, que inhibe eficazmente a tirosinasa. Sin embargo, la hidroquinona también ha mostrado efectos secundarios (Del Mar, 2015) que van desde la picazón, escozor, sensación de quemadura hasta el desarrollo de una dermatitis aguda y cáncer de piel.

El mecanismo de acción de la mayoría de los inhibidores no está completamente entendido. Esto se debe fundamentalmente a la complejidad del mecanismo de tirosinasa, el cual implica tres formas enzimáticas distintas y dos ciclos interpenetrados para explicar su acción sobre monofenoles y *o*-difenoles. Generalmente muchos inhibidores competitivos se parecen estructuralmente al sustrato y su modo de acción implica bien la quelatación de cobre o la inhibición estructural competitiva. (Del Mar, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para efecto de este trabajo se mide la formación de dopacromo mediante la inhibición de las fracciones de hidrolizados de albúmina y globulina empleando tirosinasa de champiñón. En la figura 8, se presenta el porcentaje de inhibición con mayor respuesta para cada una de las fracciones de albúmina y globulina de acuerdo al tratamiento enzimático. Dado que al realizar el experimento con los hidrolizados a cada tiempo respectivo de hidrólisis no se encontró respuesta de inhibición de la tirosinasa, de manera que se evalúa cada una de las fracciones por tanto se obtienen actividades de inhibición muy variadas.

De manera general, puede observarse que es necesario extender el tiempo de hidrólisis hasta 48 horas para lograr respuestas positivas sobre la inhibición de tirosinasa. Como resultado de esta prueba, la proteína del grano de amaranto que presentó un mayor porcentaje de inhibición fue la globulina tanto por hidrólisis con tripsina como con quimotripsina, además se observa que las fracciones peptídicas de mayor peso molecular que fueron obtenidas a un tiempo de hidrólisis de 3 horas, las cuales registraron actividades muy distintas.

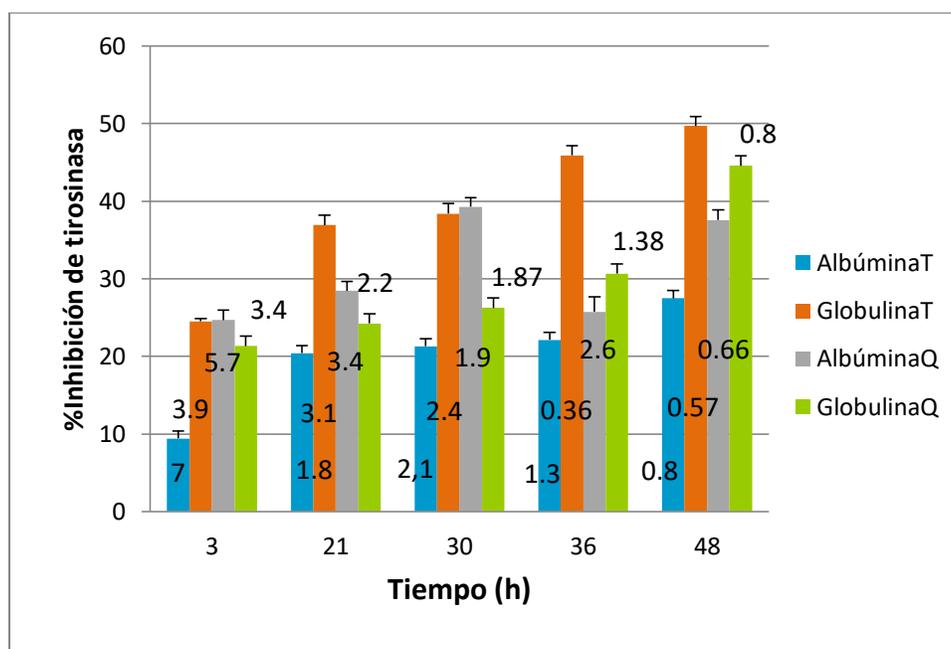


Figura 8. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa por hidrolizados proteínicos del grano de amaranto

Además se presentan los pesos moleculares de las fracciones con mayor actividad inhibitoria, siendo las familias de péptidos de menor peso obtenidos hasta las 48 horas de tratamiento enzimático. Los péptidos con un peso de 0.3 y 0.8 KDa derivados de globulina y albúmina resultan ser los más efectivos. Cabe señalar que se obtuvieron actividades de inhibición muy variadas así como de pesos moleculares, lo que convendría profundizar en las características y composición de dichos péptidos para proponer algunas respuestas en cuanto al mecanismo de inhibición que estos pudieran haber seguido.

Por otra parte, el tratamiento con las proteasas para el caso de globulina se ve favorecido sobre la albúmina para el desarrollo de péptidos con mayor actividad de inhibición. Recordando de las pruebas anteriores, la hidrólisis con quimotripsina parece generar péptidos con mayor actividad quelante de cobre y actividad antioxidante.

No obstante, las actividades encontradas entre albúmina y globulina son muy variadas, debido a ello es conveniente suponer la presencia de distintas combinaciones de aminoácidos las cuales son las responsables de dichas actividades. Así mismo, convendría analizar un sistema combinado con ambas enzimas para definir el mejor efecto sobre cada una de las respuestas evaluadas y así ofrecer una alternativa certera a la industria alimentaria y la medicina sobre inhibición de tirosinasa.

Para obtener más información sobre el tipo de inhibición ejercida de los péptidos generados, se analizó el comportamiento cinético durante a oxidación de L-tirosina por el método de doble recíproco de Lineweaver-Burk. Las gráficas de actividad inhibitoria de tirosinasa en presencia de concentraciones crecientes de L-Tirosina. Se presentan dos figuras (figura 9 y figura 10) con la información referente a la actividad de dos familias de péptidos derivadas de albúmina 1 y globulina obtenidos mediante la catálisis con tripsina y quimotripsina.

En dichas figuras se muestran familias de rectas con pendientes diferentes que cruzan en el segundo cuadrante. El comportamiento en ambas figuras es el mismo, las fracciones peptídicas de albúmina y globulina no afectan la K_m de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tirosinasa, pero si disminuyen la velocidad máxima, por lo que las líneas presentan un comportamiento característico de un tipo de inhibición no competitiva.

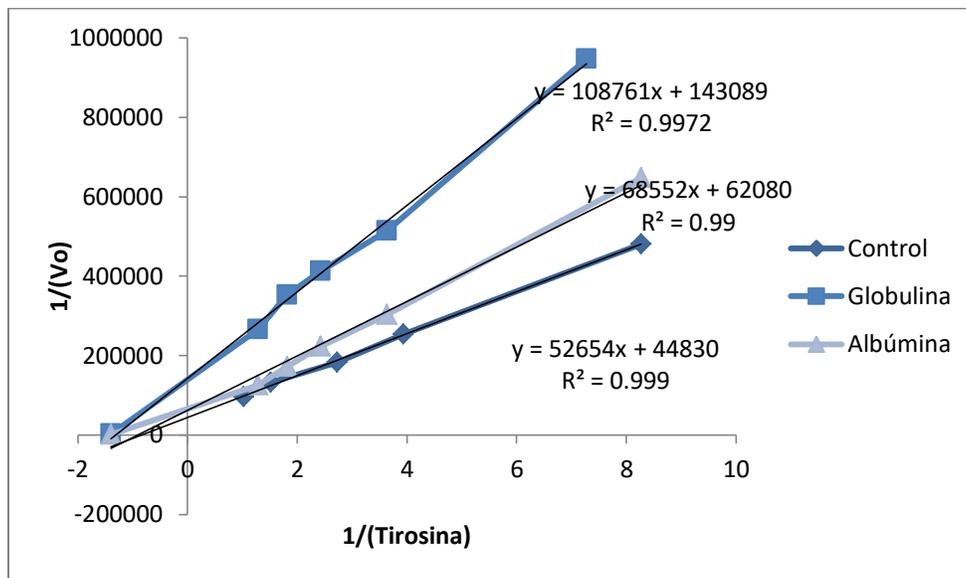


Figura 9. Modelo de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para las fracciones peptídicas de albúmina y globulina de mayor actividad inhibitoria de tirosinasa derivadas de la catálisis por tripsina

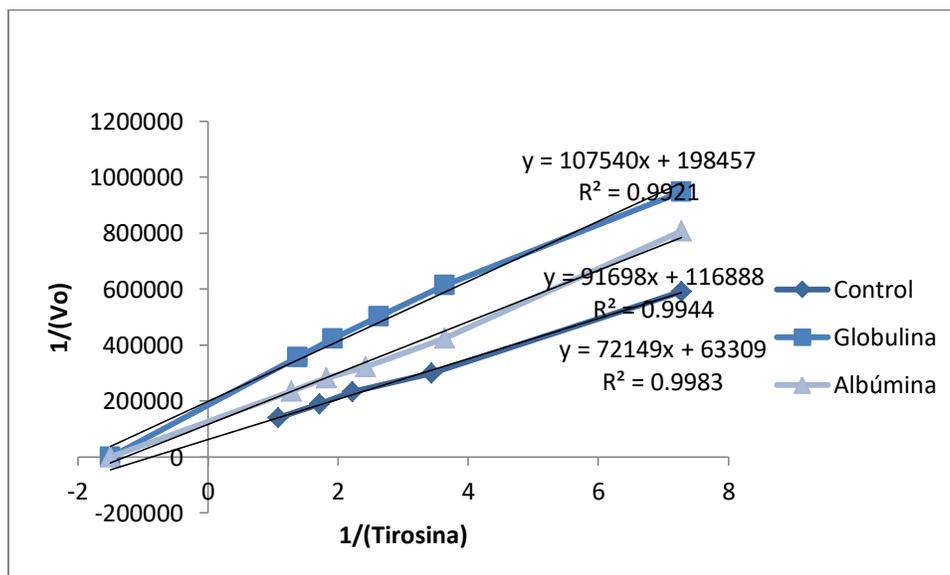


Figura 10. Modelo de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para las fracciones peptídicas de albúmina y globulina de mayor actividad inhibitoria de tirosinasa derivadas de la catálisis por quimotripsina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros cinéticos de la enzima determinados por diagramas de Lineweaver-Burk, se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de inhibición de tirosinasa de las fracciones con mayor actividad

Fracción	KM (mmol/ml)	Vmáx. ($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{mín}^{-1}$)
AlbúminaT (0.8 KDa)	3.4	5.9
GlobulinaT (0.57KDa)	3.3	5.03
AlbúminaQ (0.66 KDa)	3.3	5.48
GlobulinaQ (0.8KDa)	3.2	5.06

Debido al tipo de inhibición que se presenta, es posible que la unión del inhibidor (péptido) se presente en sitios diferentes al complejo enzima-sustrato, sin afectar el sitio activo de la enzima, por lo que la enzima puede reducir su actividad pero no verse afectada con la unión con el sustrato. Por otra parte, las fracciones peptídicas que se analizaron pudieran encontrarse unidas con otras moléculas como los polifenoles, las cuales se encuentran en el grano del amaranto y también han demostrado un grado menor de inhibición de tirosinasa.

Por lo tanto, no podría decirse que el sitio activo de la tirosinasa esté libre de cualquier compuesto inhibidor, ya que en la evaluación de la actividad quelante de Cu^{2+} estas familias de péptidos registraron buena actividad, las cuales podrían presentar mayor afinidad al complejo enzima-sustrato que al sitio de catálisis, por lo que los posibles mecanismos de inhibición de la enzima están relacionados con quelación del ión cobre del sitio activo de la enzima, haciendo que este pierda su actividad o bien mediante la unión de los péptidos a puntos distintos al sitio catalítico, deformando a la tirosinasa e impidiendo su unión con el sustrato.

Respecto a esta última prueba, Rescigno y col. (2002) mencionan que existe una posibilidad de enlazar el sustrato a un ión de cobre en el sitio catalítico, lo que sugiere un mecanismo de activación alostérico. Sin embargo, explica que el mecanismo aun no es posible plantearlo de esa manera. Como regla general,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

establece que grupos voluminosos y/o atestados se encuentren cerca del hidroxilo impiden o al menos hacen más difícil cualquier interacción de la enzima con el sustrato, de ahí las posibilidades en la variación de la respuesta inhibitoria de tirosinasa como una consecuencia de los aminoácidos que conforman el péptido.

Si bien la inhibición parece no impactar de manera importante, es decir, esperar valores (porcentajes) mayores podría ser debido a la complejidad de los mecanismos que intervienen para inhibir a la enzima, algunos estudios (Sánchez-Ferrer y col.,1995) mencionan que existe un “tiempo de retraso”, el cual puede verse disminuido de acuerdo con la concentración de enzima, la presencia de cantidades catalíticas monofenol y o-difenol o iones metálicos (Fe, Cd, Ni,Cu,Co,Zn), de éste modo, se parte de la premisa de inhibición por efecto alostérico.

Hallazgos del mismo grupo de colaboradores encontraron que DOPA a bajas concentraciones no era un inhibidor competitivo de tirosina, sino más bien un activador no competitivo de tirosina lo que resulta en un aumento de la velocidad de reacción, y es coherente pensar esto, ya que el inicio de la oxidación de tirosina para dar lugar a DOPA es una reacción favorable que pudiese ocurrir en un par de minutos de allí que se pudiese monitorear la reacción y que en otros casos haya sido tan rápido que no se pudiera registrar valores de inhibición.

En general, la tirosinasa de humanos parece ser relativamente específico para L-tirosina y L-DOPA, por ello el interés de que se encuentre presente dicho aminoácido, además de que se pretende determinar el tipo de inhibición que ejercen los hidrolizados del grano de amaranto para su clasificación.

Los inhibidores de melanogénesis cuya acción reside principalmente en alguna interferencia en la formación de melanina, estos suelen determinarse en presencia de tirosina o DOPA como el sustrato enzimático necesario para la formación de dopacromo, en tanto que los inhibidores verdaderos, se encuentran los quelantes de cobre y de sustrato que son inhibidores de tipo competitivo. Sin embargo, estudios evidencian que no puede atribuirse a un grupo en particular la capacidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de inhibición, debido a que muchos de ellos se comportan como inhibidores de tipo mixto (competitivos/ no competitivos) (Rescigno y col. 2002).

Por otra parte, conviene aprovechar la estructura y la química de coordinación que presenta la enzima, debido a que presenta un centro activo binuclear de cobre el cual podría ser inhibido o inactivado para evitar cualquier proceso catalítico que la enzima pudiera desarrollar, para ello se siguió la técnica de Saewan y col. (2011) para inhibir la tirosinasa mediante la quelación de cobre del sitio activo por lecturas espectrofotométricas. Dichos resultados se presentan en la figura 11.

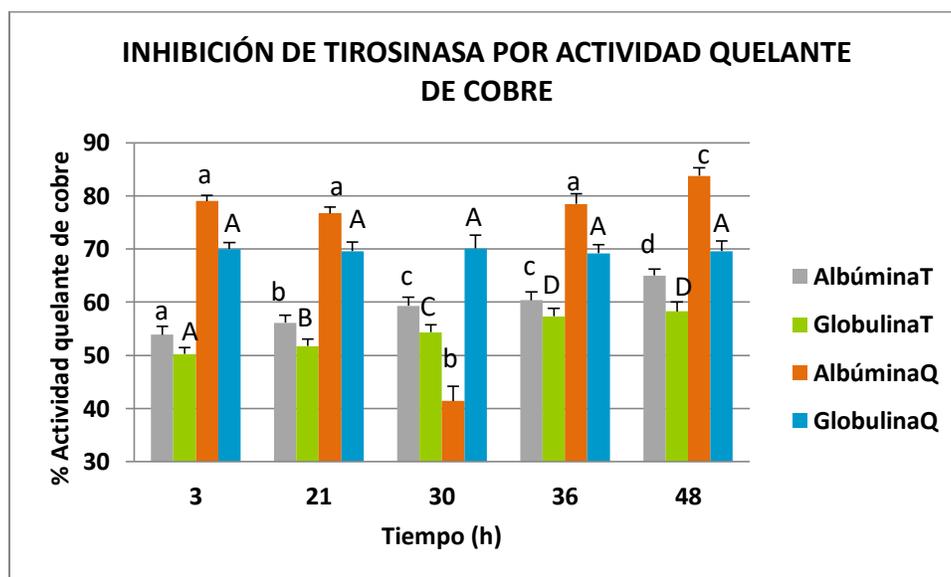


Figura 11. Inhibición de tirosinasa por actividad quelante de cobre del sitio activo.

a,b,c,d: Medias de albúmina de tratamiento de tripsina y quimotripsina

A,B,C,D: Medias de globulina de tratamiento de tripsina y quimotripsina

Medias con la misma letra no son ($p < 0.05$) significativamente diferentes por tratamiento

Respecto al estadístico de prueba, indica diferencias significativas en los tratamientos en la globulina del grano de amaranto, mientras que la albúmina presento las mejores condiciones para la formación de quelatos con el cobre del sitio activo de la enzima con la mayor respuesta de inhibición, bajo la hidrólisis con quimotripsina.

Aunque es muy frecuente encontrar efectos de tipo batocrómico e hipsocrómico en este tipo de estudios, generalmente suceden interacciones de algunas sustancias con polifenoles o compuestos antioxidantes. Saewan y col. (2011) indican que es posible encontrar variaciones conforme a la naturaleza y tipo de moléculas en

cuestión, además mencionan que la quelación del ión Cu^{2+} del sitio activo reduce la actividad de tirosinasa, reportan además que compuestos como la quercetina y la luteolina presentan un modo de inhibición competitivo y no competitivo respectivamente, aunque tiene sus reservas la aplicación de la metodología debido a la estabilidad de los compuestos.

Desde el enfoque de la química de coordinación, existen diferentes factores a considerar como los ligandos participantes en la quelación de proteínas, que si bien se tiene en una categoría donde no ocurre de manera natural en sistemas vivos, bien puede ocurrir conforme las evidencias de Sóvago y col. (2012), dicho equipo de trabajo, menciona que existe una etapa intermedia entre los aminoácidos y las proteínas en donde suceden distintas reacciones o efectos de la química de coordinación, en las cuales intervienen las funciones carboxilato terminales y amino para la formación de quelatos estables, ofreciendo así una serie de procesos versátiles en la formación de complejos de péptidos, como el caso de la ausencia de residuos de la cadena lateral de coordinación (por ejemplo, los péptidos de Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Fe, Trp) y la presencia de diferentes iones metálicos, por lo que el cobre no es la excepción.

De acuerdo con Schurink y col. (2007) el mecanismo de inhibición se da como normalmente ocurre con inhibidores de tipo aromático, por un bloqueo espacial del sitio activo de la enzima e impide el acceso de otros sustratos oxidables, es decir, una inhibición competitiva de la enzima tirosinasa. Los péptidos fuertes de unión a la tirosinasa contienen siempre uno o más residuos de arginina, en combinación con fenilalanina, mientras que péptidos con residuos de lisina parecen tener unión moderada a tirosinasa.

La unión a la tirosinasa se da mediante interacción con 11 residuos: Ile, Met, Arg, Trp, Asn, His, Val, Ala, Met y Thr. (Gutiérrez y Rojano, 2009). En ese sentido, un estudio basado en la caracterización de la bibliotecas de proteínas vegetales e industriales, mencionan que los péptidos inhibidores de tirosinasa fuerte (entre 10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y 80%) contienen Arg y/o Phe con (combinaciones de) Val, Ala y /o Leu (Schurink y col.,2007).

Como parte del perfil para la caracterización de actividades de los hidrolizados del grano de amaranto, radica la importancia de la actividad quelante de cobre sobre la actividad de tirosinasa, ya que los péptidos quelantes de cobre determinan un rol importante en el mecanismo de inhibición.

Actualmente no esta del todo explicado y entendido dicho mecanismo, se sabe que su acción depende de reacciones de tipo redox en el sitio activo de la enzima, así como de interacciones químicas de coordinación por lo que resulta relevante, determinar dicha actividad sobre los hidrolizados que si bien no es despreciable, puede atribuirse entonces que el mecanismo de inhibición de tirosinasa pudiese estar ligado entre la interacción de los péptidos así como del ambiente químico y espacial con la enzima para quelar el cobre del sitio activo, o de otra manera para sugerir una inhibición competitiva por el sustrato de manera inmediata a la enzima.

Si bien los compuestos fenólicos ofrecen mayor respuesta de inhibición sobre todo aquellos de origen vegetal debido a su compatibilidad tanto con sustrato como con inhibidores por lo que se presume desarrollen un mecanismo de inhibición competitivo. Estudios de (Kubo y cols., 2000, 1999) demostraron que la quercetina, el flavonoide con mayor actividad de inhibición dentro de ese grupo, inhibía la oxidación enzimática de L-DOPA por quelación de cobre en la enzima. El mecanismo de quelación parece ser específico para los flavonoides mientras el 3-hidroxilo está libre.

Tomando en cuenta que este estudio de inhibición siguió la formación de dopacromo y que la tirosinasa cataliza una reacción de compuestos fenólicos (tirosina y L-DOPA) y oxígeno, la complejidad de la oxidación de sustratos se ve incrementada con la presencia de iones divalentes, como cobre que aceleran dicha reacción, así como la presencia de aminoácidos libres como serina o cisteína dirigiendo hacia la síntesis de feomelaninas y eumelaninas, (Sánchez-Ferrer y col., 1995), pudiendo ser la posible respuesta, de que algunas fracciones colectadas de los hidrolizados no hayan presentado actividad de inhibición, y por

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el contrario con la presencia de los aminoácidos mencionados en los péptidos generados hubiesen sido un factor para catalizar de manera rápida hacia la formación de dopacromo.

Si bien la metodología, sugiere que dentro de los primeros diez minutos es posible detectar un cambio de coloración debido a la oxidación de la tirosina para la formación de dopacromo, en algunos casos esta reacción sucedió de manera inmediata por lo que la activación del sustrato y la enzima sucedió instantáneamente.

Por otra parte, como se presentó en la figura 8, las principales fracciones que mostraron una respuesta de reducción a la formación de dopacromo a los diez minutos de reacción, por lo que es posible que los péptidos presentes en esa fracción en particular, participen como bloqueadores o inhibidores de tipo espacial, por lo que su conformación y secuencia de aminoácidos pudiese presentar aminoácidos hidrofóbicos, que generen un espacio poco inaccesible para lograr la unión de la enzima con el sustrato, por lo que ocurre el llamado tiempo de retraso, desviando la ruta hacia la formación de dopacromo.

Queda claro que la tirosinasa requiere un microambiente muy variado y posiblemente complejo para que pueda catalizar una amplia variedad de reacciones, que si bien han sido estudiadas no se tiene conocimiento a detalle de éstas. Sin embargo, es esencial profundizar en ello, para conocer el mecanismo de modulación de la enzima y la unión de ésta con las proteínas para generar actividades varias, ya que las soluciones proteicas pudieran verse interferidas por algunos componentes de tipo fenólico que sumen actividades de inhibición a la respuesta registrada, además las proteínas del grano de amaranto representan una alternativa nada despreciable para continuar el estudio detallado de la biosíntesis de melanina, y la investigación profunda en los aspectos bioquímicos, cinéticos, mecánicos de reacción y estructurales de la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otra parte, es necesario considerar la disponibilidad comercial de la enzima y los grados de pureza que esta alcanza, ya que los estudios *in vitro* son buenos. Sin embargo, resulta insuficiente y complicada la investigación *in vivo* para obtener tirosinasa humana y detallar así mecanismos de inhibición. Es una perspectiva tal vez a un futuro lejano, siendo de utilidad para el desarrollo de inhibidores específicos y para probar ensayos en humanos de manera paralela, que si bien actualmente se intenta desarrollar el mercado de los cosmeceúticos a partir del aprovechamiento de fuentes naturales.

En concreto, se requiere ampliar los estudios de los inhibidores encontrados con un punto de vista clínico, así como de la vinculación de la industria cosmética y de la biotecnología. Finalmente, se logra la caracterización de las proteínas del grano de amaranto, y aunque pueden ser las primeras pruebas de plataforma, se cuenta con información que indica el posible potencial de éstas para su aplicación en el campo de los alimentos y de la medicina, de manera que se cumple con el objetivo de la obtención de péptidos con un alto potencial biológico, aunque las pruebas son *in vitro*, queda abierta la posibilidad de aplicarlos en sistemas biológicos.

5. CONCLUSIONES.

- Las proteínas de reserva, albúmina 1 y globulina, del grano de *Amaranthus hypochondriacus* L. es una fuente potencial para la obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la tirosinasa.
- La magnitud de la actividad inhibitoria de la tirosinasa depende del grado de hidrólisis de las proteínas, en un intervalo que se encuentra entre 38 a 49%.
- La actividad inhibitoria de tirosinasa, de los péptidos contenidos en los hidrolizados de albúmina 1 y globulina es mayor a medida que el peso molecular disminuye en un rango que va de 0.8 kDa a 3 kDa.
- La actividad quelante de iones de cobre fue del 82% para el hidrolizado de albúmina 1 de 48 h y del 83% para un hidrolizado de globulina de 48 h.
- La tirosinasa se inhibe por la presencia de biopéptidos presentes en hidrolizados de albúmina 1 de 48 h y de globulina de 48 h de manera no competitiva. Los péptidos presentes en estos hidrolizados son capaces de adherirse en alguna parte de la enzima provocando que la tirosinasa no interaccione con su substrato.
- La tirosinasa se inhibe, adicionalmente, por la capacidad quelante del Cu^{2+} de los péptidos presentes en los hidrolizados. El Cu^{2+} del medio de reacción pueden quelarse por los péptidos disminuyendo la actividad de la enzima. También los péptidos tienen la capacidad de quelar el Cu^{2+} del sitio activo de la enzima, con lo cual pierde su actividad.

6. PERSPECTIVAS.

Para ampliar el conocimiento sobre las actividades evaluadas y el potencial que presentan las proteínas del grano de amaranto, sería importante el uso de otras técnicas de separación y de la identificación cada una de las secuencias de aminoácidos de los péptidos para conocer con certeza la secuencia aminocídica que provee dichas actividades, de esta manera se podrían aplicar tecnologías en el procesamiento que pudieran enfocarse en aspectos importantes como mantener el máximo de bioactividad durante el procesamiento del grano así como de la extracción de los componentes bioactivos deseados, además de que el grano de amaranto para ser una alternativa para la generación de péptidos con actividad biológica, deberá considerarse que los procesos aplicados para el desarrollo de productos de tipo cosmético y alimentario no afecten la estabilidad de los compuestos bioactivos para proporcionar un producto eficaz y seguro al consumidor.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Ubeid, A., Zhao, L., Wang, Y. y Hantash, B.M. (2009) Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2242-2249.
- Adler-Nissen J. (1979). "Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 24, p. 1090-1093.
- Alejandre I G, L F Gómez (1999) Cultivo del amaranto en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 245 p.
- Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M., Hearing, V. J., (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *The Society for Investigative Dermatology*, 127, 751-61.
- Artes, F., Castaner, M., & Gil, M. I. (1998). Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*, 4(6), 377-389. 2
- Artés F. y Martínez J. A. (1996). Influence of packing treatments on the keeping quality of Salinas lettuce. *Lebensmittell Wissenschaft and Technologic* 29:664-668
- Ahvenainen R. (1996). New approaches in improving the self life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 7 179:187
- Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O. y Baker R.A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 509-524.
- Barberá Mateos J.M., Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación, cap 1. La imagen de la salud: ¿Nutracéuticos o Funcionales?, INUTCAM, Madrid, España, 2011, p, 15-18
- Barberán Tomás, F.A., Gil M.M., Castañer M., Artés F. y Saltveit M.E. (1997). Effect of select browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 583-587
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42(2), 227-36.
- Boza, J.J., Moënnoz, D., Vuichoud, J., Jarret, A.R., Gaudard-de-Weck, D. Ballèvre, O. 2000. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr.* 39, 237-243
- Bressani, R. Velasquez, L., Acevedo, E. 1990. Contenido de fibra dietética en varias

- especies del grano de amaranto y efecto del procesamiento. *Amaranth Newsletter* No.1
- Briganti, S., Camera, E., & Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16(2), 101–110.
- Cabanes, J., Chazarra, S. y Garcia-Carmona, F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46, 982-985.
- Cantwell M. (1992). Postharvest handling systems: Minimally processed fruits and vegetables. En: Kader, A.A. (ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 2aed. Publ. 3311. Oakland: University of California. pp. 277-281.
- Carrasco, C. J., Hernández, A.J., Jiménez, C. M., 2012. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. 135: 1792, 1794-1795.
- Castel, M. V., Carrara, C. R., 2010. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto. *Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química*, 13-15, 20-25.
- Catani, M.V., Savini I., Rossi A., Melino G., and Avigliano L., 2005, Biological Role of Vitamin C in Keratinocytes, *Nutrition Reviews*, Vol. 63, No.3 , p 81-90
- Chang, T.S. (2009) An update review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440-2475.
- Chen, J.S., Wei, C. y Marshall, M.R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1897-1901.
- Chen MJ, Liu JR, Sheu JF, Lin CW y Chuang CL. 2006. Study on skin care properties of milk Kefir Whey. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2006. Vol 19, No. 6 : 905-908
- Chiu, A., & Kimball, A. B. (2003). Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British Journal of Dermatology*, 149(4), 681–691.
- Conrad, J.S., Dawso, S.R., Hubbard, E.R., Meyers, T.E. y Strothkamp, K.G. (1994) Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry* 33, 5739-5744.
- Contreras, E., Jaimez, J., Porras, G., Juárez, L.F., Añorve, J., Villanueva S., 2010. Propiedades fisicoquímicas y sensoriales de harinas para preparar atole de amaranto. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, V. 60 n.2, 1-3.
- De Gobba, C., Tompa, G., & Otte, J. (2014). Bioactive peptides from caseins released by

- cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205–215.
- De la Fuente Betancourt, M. G. (2007). *Alcalasa: Vestida para la ocasión*. *Biotecnología*, 9(2), 17–21.
- De la fuente, M.G.B, 2003. *Alcalasa: vestida para la ocasión*. *Biotecnología* Vol. 9, No.2, 17-19.
- Del Piu, L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D. Gianotti, A. (2014). Exploitation of starch industry liquid by product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food Chemistry*. 155, 199-206
- Del Mar, G., 2015. Nuevos aspectos en las actividades catalíticas de Tirosinasa. Universidad de Murcia. Facultad de Biología, 144-149, 172
- Delgado, M., Tironi, V.A., Añón, M.C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1752-1760.
- Denoya, G. I., Ardanaz, M., Sancho, A. M., Benítez, C. E., Gonzáles, C., & Guidi, S. (2012). Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Conicet, 38(3), 263-267
- Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric. Food. Chem.* 2003;51 (21):6300–6308.
- Draelos, Z. D. 2010. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinic in Dermatology*. 28: 400-408.
- Duarte Correa, A., Tike, L., Carlsson, R. 1986. Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its functions. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 36, 466-476
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y. y cols. (2008), "The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease." *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, p643-654
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (2001) Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1544, 289-300.
- Esteve, C., Marina, M. L., García, M. C. (2014). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food*

- Chemistry, 167, 272-280
- Fogg-Johnson, N. 2007. Venture capital investment drives health & wellness innovation. *Nutraceuticals World*. 10: 70-86.
- Gallegos, S., 2012. Actividad antioxidante y quelante de los productos de hidrólisis de proteínas de *Jatropha curcas* L. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de productos bióticos, 12-15.
- Gallegos, T. S., Che, G. L., Corzo, J. R., Martínez, A.L.A., 2013. Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. *OmniaScience*. Cap. 4: 112-113, 115-116
- García-Parra J., González-Cebrino F., Delgado J., Lozano M., Hernández T., Ramírez R. (2011) Effect of thermal and High-Pressure Processing on the nutritional value and quality attributes of a nectarine puree with industrial origin during the refrigerated storage. *Journal of Food Science* 76, 618-625.
- Gauthier, S. F. P., Y. (2003). "Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins". *Journal of dairy science*. 86, p 78-87.
- Gorinstein, S., Mosha, R., Greene, L.J., Arruda, P. 1991. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39, 851-854
- Gorinstein, S.; Vargas, O.J.M.; Jaramillo, N.O.; Salas, I.A.; Ayala, A.L.M.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Katrich, E. y Trakhtenberg, S. (2007). "The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals". *European Food Research and Technology*. New York. v. 225, n. 3-4, p. 321-328.
- Granados S D, R G López (1986) *Chinampas: Historia y etnobotánica de la alegría (Amaranthus hypochondriacus L.)*. Domesticación de la verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) y romerillo (*Suaeda difusa* Wats.). In: Primer Seminario Nacional del Amarantho. El Amarantho *Amaranthus* spp. (Alegría), su Cultivo y Aprovechamiento. A Trinidad S, F Gómez L, G Suárez R (comps). México. 577 p.
- Gruenwald, J. 2007. Discovering active food and nutraceutical ingredients. *Nutraceuticals Worl*. 10: 30-31.
- Gutiérrez, P. A., Rojano, B. A., 2009. Docking of Tyrosinase cicloartane inhibitors. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín*. Vol 16. No. 2; 246-247, 250.
- Huerta-Ocampo, J.A., Barba de la Rosa, A.P. (2011). Amaranth: A pseudo-cereal with nutraceutical properties, *Current Nutrition and Food Science*, Bentham Science Publishers Ltd., 1-9.

- Jeon,H.J., Noda,M., Maruyama,M., Matoba,Y., Kumagai,T. y Sugiyama,M. (2006) Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake less. *J Agric. Food. Chem.* 54, 9827-9833.
- Jin,Y.H., Lee,S.J., Chung,M.H., Park,J.H., Park,Y.I., Cho,T.H. y Lee,S.K. (1999) Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* 22, 232-236.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Megias, C., Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y aceites*, 58 (1), 49-55
- Konanayakam,M. y Sastry,S.K. (1988) Kinetics and shrinkage of mushroom during blanching. *J. Food Sci.* 53, 1406-1411.
- Korhonen, H. and Pihlanto (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality. Review", *International Dairy Journal* 16, p 945-960
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4121-4125.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Sanchez,Y.; Ogura, T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*. Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1585-1591.
- Lagarda, G. G. (2007). La melanina: un pigmento con múltiples aplicaciones L. *Academia de Ciencias de Morelos*, 43
- Lee,H.S. (2002) Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1400-1403.
- Maeda,K. y Fukuda,M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42, 361-368.
- Mapes C (1986) Una revisión sobre la utilización del género *Amaranthus* en México. In: Primer Seminario Nacional del Amaranto. El Amaranto *Amaranthus* spp. (Alegría), su Cultivo y Aprovechamiento. A Trinidad S, F Gómez L, G Suárez R (comps). México. 577 p.
- Martínez E. N., Castellani O.F., Añón M.C., 1997. Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal Agriculture Food Chemistry.* 45, 3832-3839
- Martinez,M.V. y Whitaker J.R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 6,195-200.
- Mastrocola D., PittiaP. Y Lericci C.R. (1996). Quality of apple slices processed by combined techniques. *Journal of Food Quality* 19:133-146
- Masuda,T., Odaka,Y., Ogawa,N., Nakamoto,K. y Kuninaga,H. (2008) Identification of

- geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *J. Agric. Food Chem.* 56, 597-601.
- Matser A.M., Krebbers B., Van den Berg R.W., Bartels P.V. (2004) Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology* 15(2), 79-85.
- Megías, C. Pedroche, J., Yust M. M., Girón-Calle, J., Alaíz, M. Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT- Food Science and Technology*, 41 (10), 1973-1977
- Mendoza, R., & Herrera, A. O. (2012). Cinética de Inactivación de la enzima peroxidasa, Color y Textura en Papa Criolla (*Solanum tuberosum* Grupo phureja) sometida a tres Condiciones de Escaldado. *Informacion Tecnologica*, 23(4), 73-82.
- Meredith, J.W., Ditesheim, J.A., Zaloga, G.P. 1990. Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. *The J Trauma*. 30, 825-829.
- Miranda, G., & Ventura, J. (2006). Actividad citotóxica y antioxidante de los productos de la reacción de Maillard de los sistemas modelo D-glucosa – glicina y D-glucosa – L-lisina. *Sociedad Química Peru*, 4(73), 1–11
- Morganti, P. 1991. The future of cosmetic dermatology. *Oral cosmesis: a new frontier. Every Day Problems in Dermatology: The Cosmetic Connection*. 2: 291-300.
- Olsen, J. V., S. E. Ong y M. Mann. (2004). "Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues". *Molecular and cellular proteomics*. 3, p. 608-614.
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197, 1160–1167.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S. y Bae, H. (2007) Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* 21, 805-816.
- Pasko, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S., Zachwieja, Z. (2008). Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta chromatographica*, 20, 661-672.
- Peng, X. Y., Xiong, Y. L., & Kong, B. H. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113, 196–201.
- Philippon J. y Maestre J. (1992). El pardeamiento enzimático de las frutas y hortalizas.

- Mecanismos y métodos industriales de prevención. II Congreso Internacional de Tecnología y Desarrollo Alimentario, Murcia. pp. 30-52.
- Piao XL, Baek SH, Park MK, Park JH. 2004. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1144-1146.
- Preza y Lerma, A. M., 2010. Obtención de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática de proteínas de reserva de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.). Instituto Politécnico Nacional., 3-6
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., & Sanjust, E. (2002). Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17(4), 207–18.
- Ribeiro, S. M. R. (2005). "A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico". *Bioscience Journal*. Uberlândia. v. 21, n. 3, p. 133-149.
- Rivillas Acevedo, L. A., 2008. Aislamiento y purificación de péptidos antimicrobianos de las semillas de *Amaraanthus hypochondriacus*. Tesis de doctorado. Doctorado en ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rouet-Mayer M.A. y Philippon J. (1986). Inhibition of chatechol oxidases from apples by sodium chloride. *Phytochemistry* 25: 2717-2719
- Saewan N., Koysomboom S. and Chantrapromma (2011) Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC., *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(6), pp1018-1025
- Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1247(1), 1–11.
- Sandoval Cortés, E. 2005. Desarrollo de un proceso de extracción para la obtención de fracciones enriquecidas de escualeno a partir de amaranto. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Santini, A., Novellino, E., Armini, V., & Ritieni, A. (2013). State of the art of ready-to-use therapeutic food: A tool for nutraceuticals addition to foodstuff. *Food Chemistry*, 140(4), 843–849.
- Sapers, G. M.; Douglas, F. W. Jr, Bilyk, A.; Hsu, A. F.; Dower, H. W.; Garzarella L.; Kozempel, M. (1989) Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. *Journal of Food Science*, 54 (2): 362-365
- Sarmadi, B., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949–1956.

- Sathivel, S., Bechtel, P., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K., & Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(7), 2196-2200.
- Saunders, R. M., Becker, R. (1984). *Amaranthus*: A potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology*, 6, 357-393
- Schurink, M., van Berkel, W.J., Wichers, H.J. y Boeriu, C.G. (2007) Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* 28, 485-495.
- Seo, Sung-Yum., Sharma, Vinay K., Sharma, Niti., (2003). Mushroom tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853
- Silva Sanchez, C., 2007. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. Tesis de doctorado. Instituto Potosino de Investigación científica y tecnológica, A. C.
- Soriano, J.S., Escalona, H.B, 2013. Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain. 2,5-7
- Sóvágó, I., Kállay, C., & Várnagy, K. (2012). Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19–20), 2225–2233.
- Tabor, A. y Blair, R. M. 2009. *Nutritional cosmetics: Beauty from within*. William Andrew: Applied Science Publisher.
- Tai, S.S., Lin, C. G., Wu, M.H. y Chang, T.S. (2009) Evaluation of depigmenting activity by 8-hydroxydaidzein in mouse B16 melanoma cells and human volunteers. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 4257-4266
- Tironi, V. A., & Añón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43(1), 315–322.
- Terefe N.S., Yang Y.H., Knoerzer K., Buckow R., Versteeg C. (2010) High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 52–60.
- Tosi, E. A., Ré, E., H. Lucero, R. Masciarelli, R. 2000, Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. *Food Chemistry*, pp 441-443
- Tovar Perez, E.G. (2008), "Evaluación de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina-I, obtenidos de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis de maestría, Universidad Autónoma

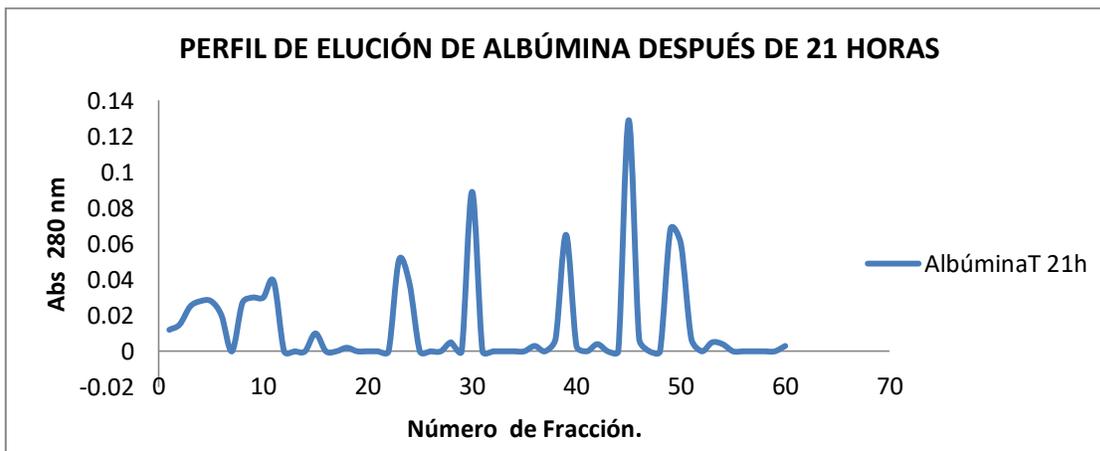
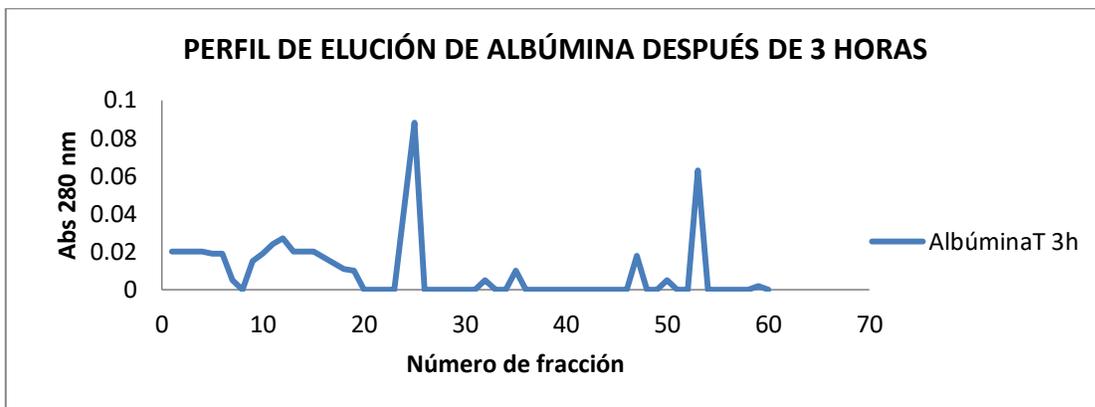
- Metropolitana. pag 64,65
- Venskutonis, P. R. and Kraujalis, O. 2013. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 381-412
- Vioque, J. y Millán F. (2005), "Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud". *CTC Alimentación* 26, p 103-107.
- Walker, J. R. L. (1995). Enzymatic Browning in Fruits - Its Biochemistry and Control. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, 600(1), 8–22.
- Warren R, Gartstein V, Kligman AM, Montagna W, Allendorf RA, Ridder GM. (1991) Age, sunlight, and facial skin: a histologic and quantitative study. *Journal of the American Academy Dermatology*;25 (5) , 751-760
- Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea (1999). *Food Chem Toxicol* ;37:843-844.
- Wildman, R. E. C. 2001. Nutraceuticals: a brief review of historical and theological aspects. *Nutraceutical and Functional Food*. 1-12.
- Yupangui Tenesaca, M. G., 2016. "Métodos utilizados para evitar el pardeamiento enzimático y no enzimático en el puré de banano en la industria alimenticia". Tesis de licenciatura, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la salud, Machala
- Zhang, L. y Falla, T. J. 2009. Cosmeceuticals and peptides. *Clinics Dermatology*. 27: 485-494.
- Zhou, P., Yang, C., Ren, Y., Wang, C., & Tian, F. (2013). What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chemistry*, 141(3), 2967–2973. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.140>
- Zhuang, J.X., Hu, Y.H., Yang, M.H., Liu, F.J., Qiu, L., Zhou, X.W. y Chen, Q.X. (2010) Irreversible competitive inhibition kinetics of cardol triene on mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem*. 58, 12993-12998.

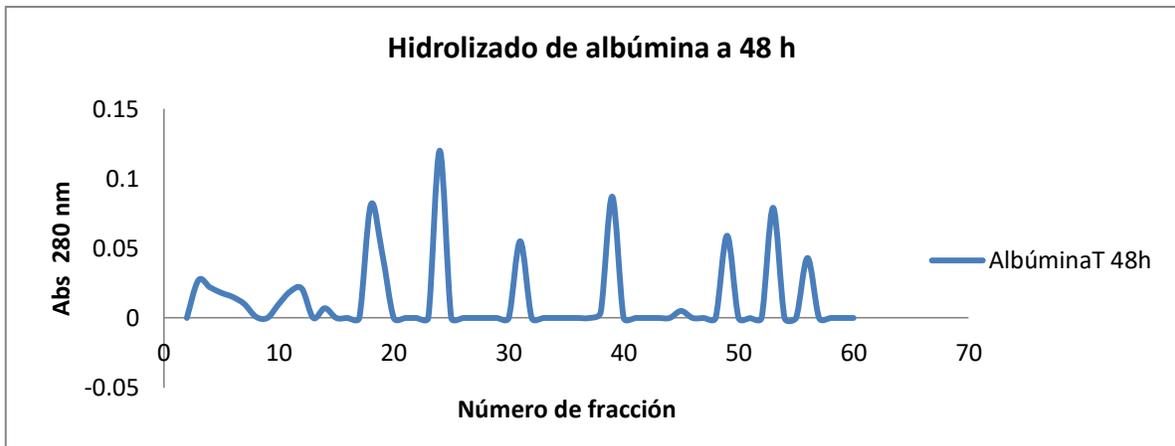
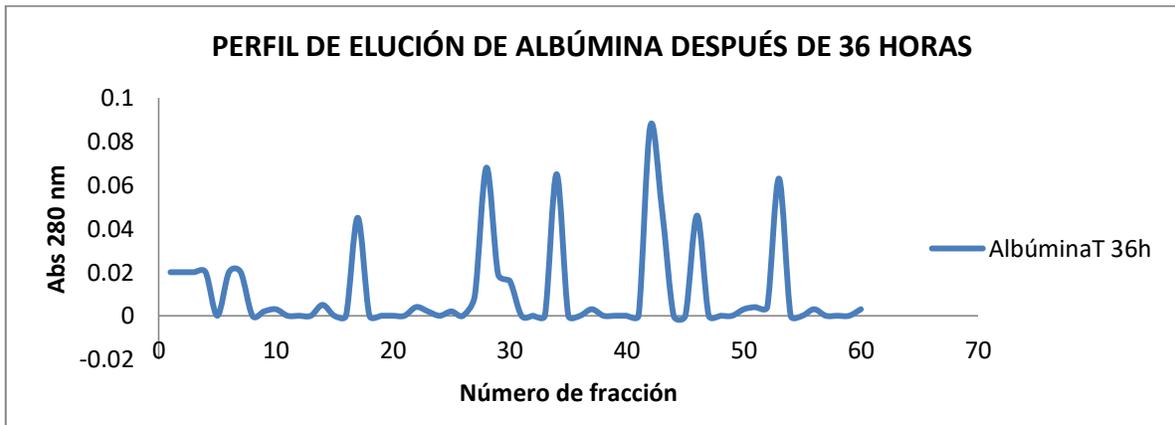
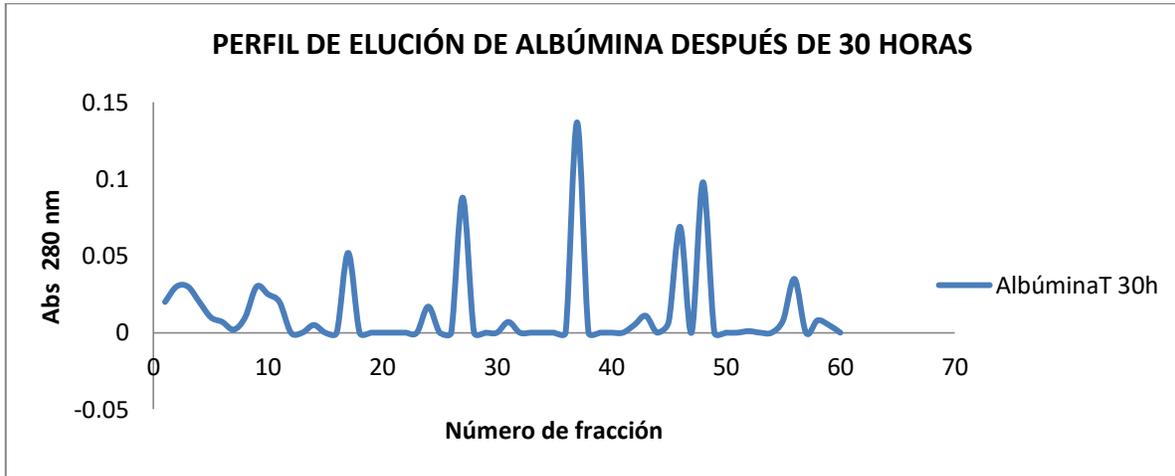
8. APÉNDICES

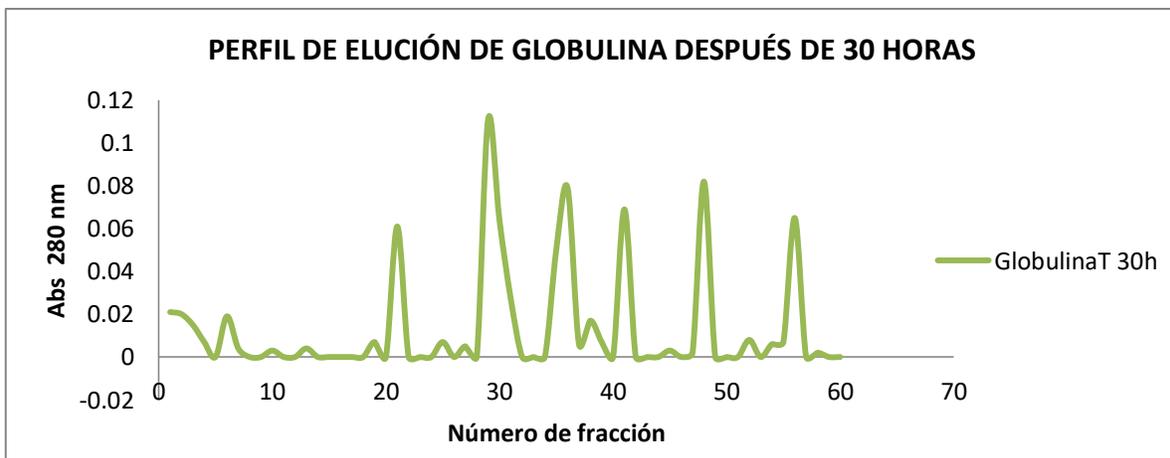
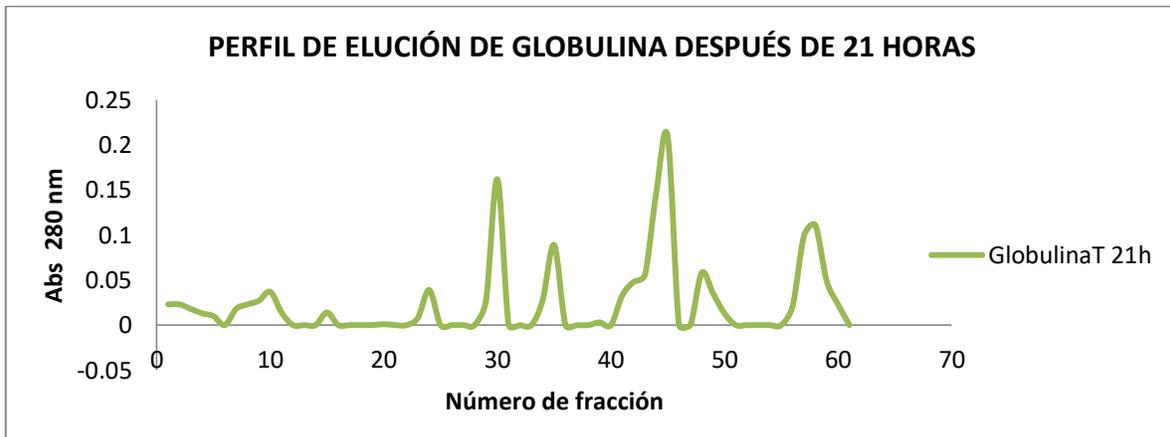
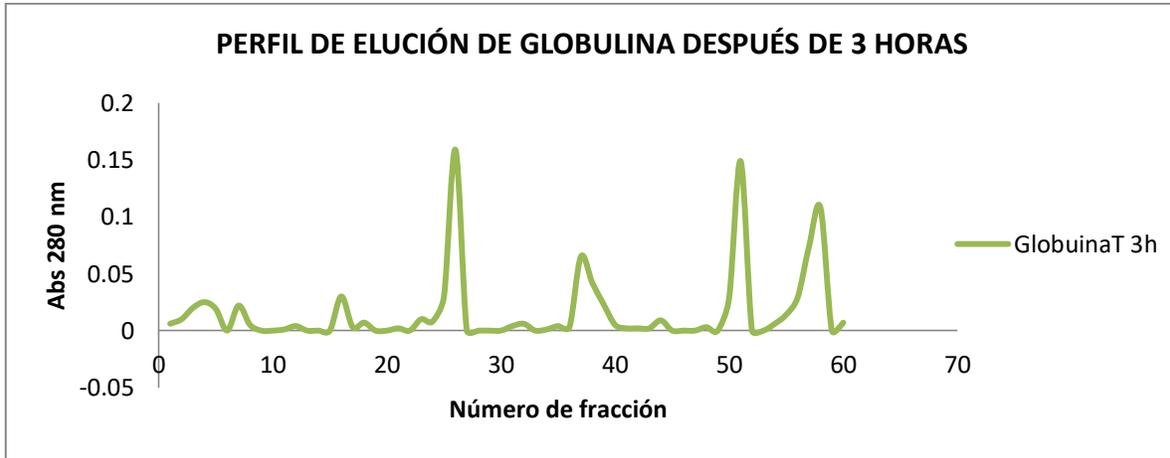
APÉNDICE A

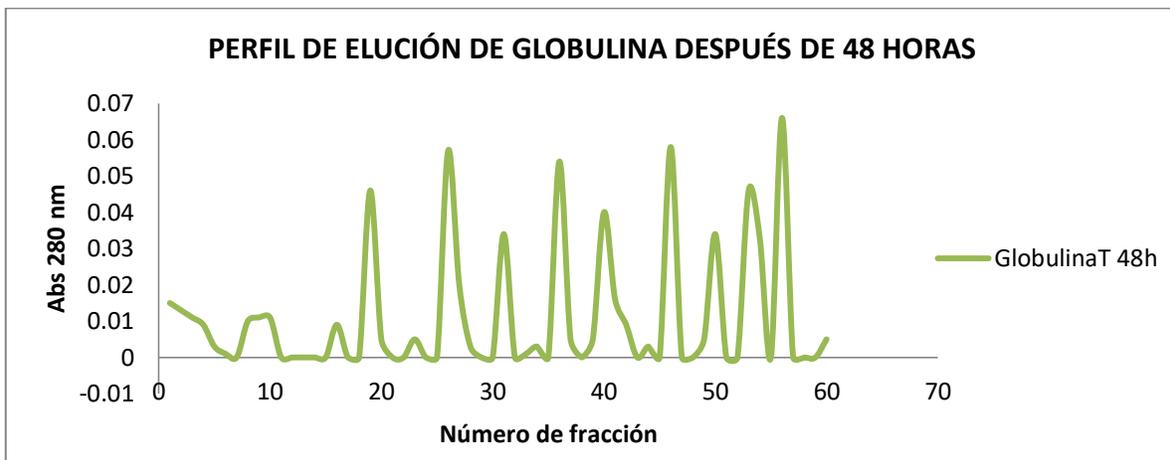
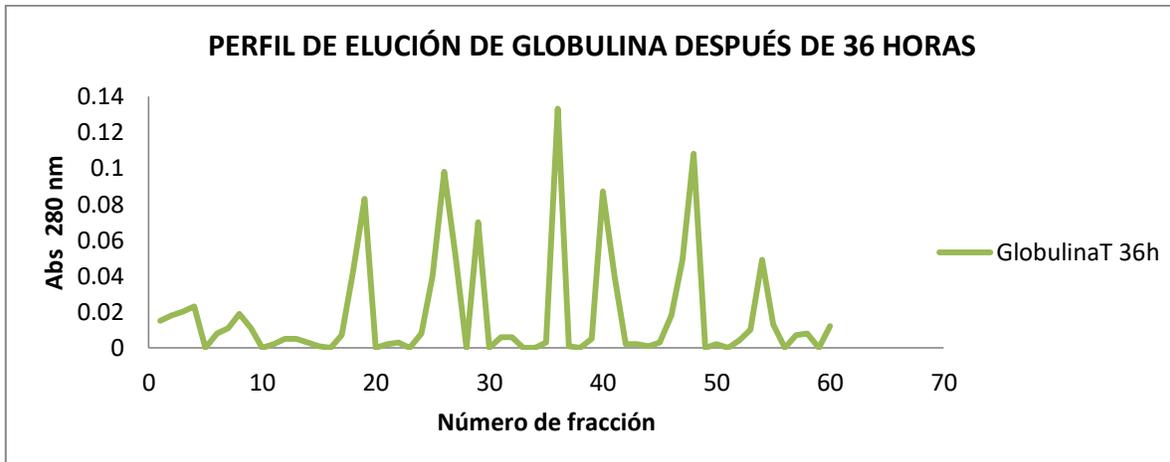
PERFILES DE ELUCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS DEL GRANO DE AMARANTO

Perfiles de filtración de albúmina y globulina derivados de la hidrólisis con Tripsina.

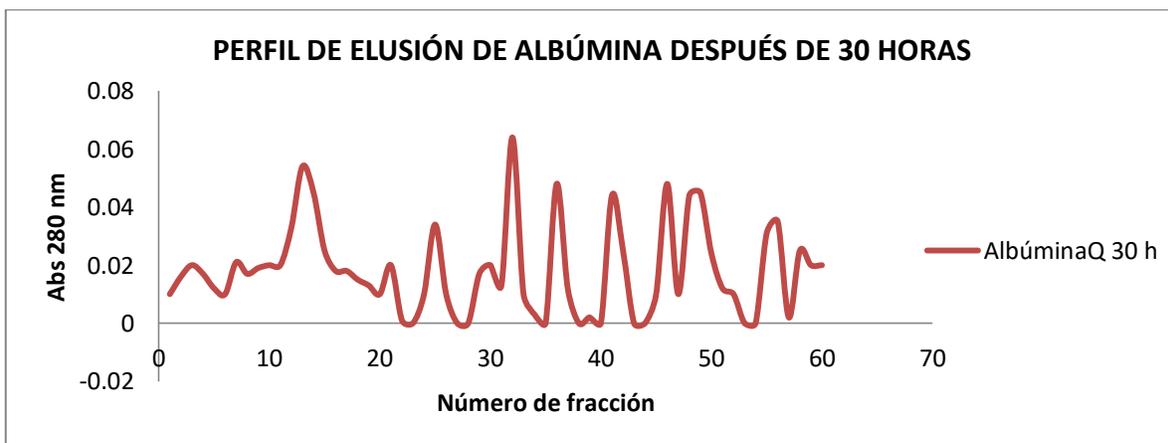
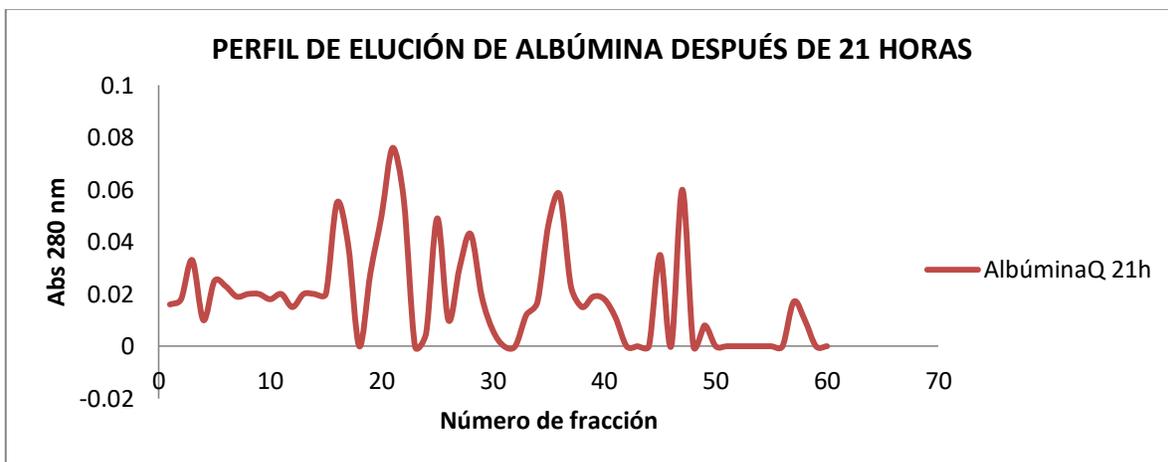
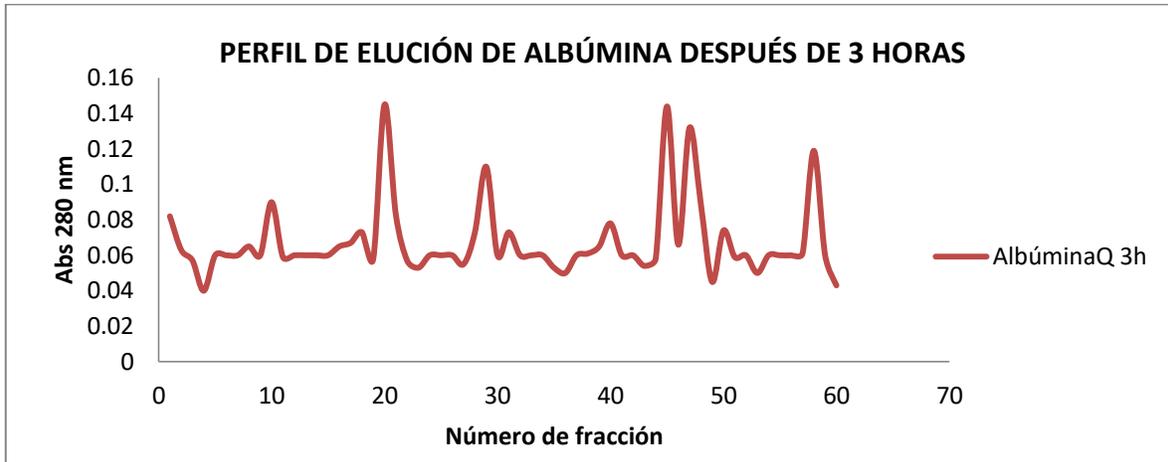


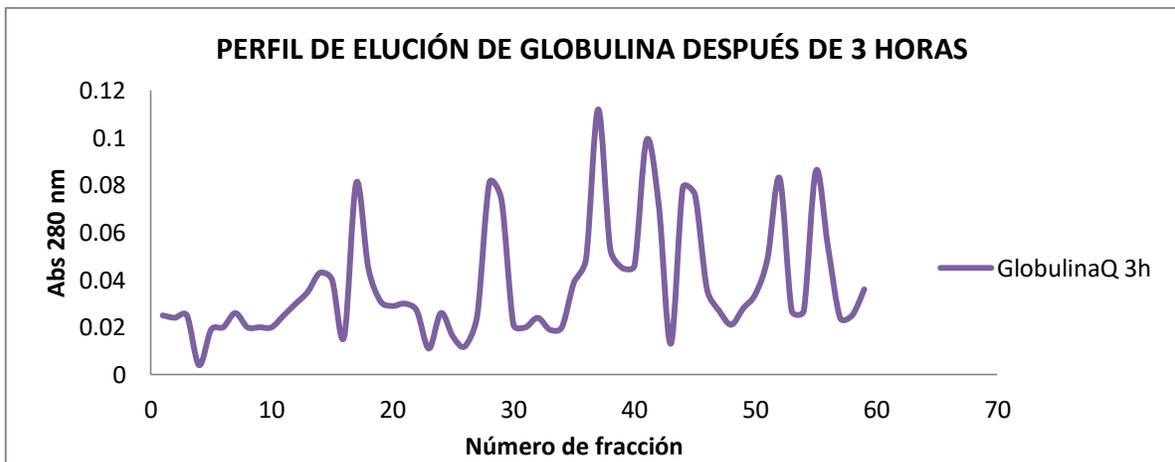
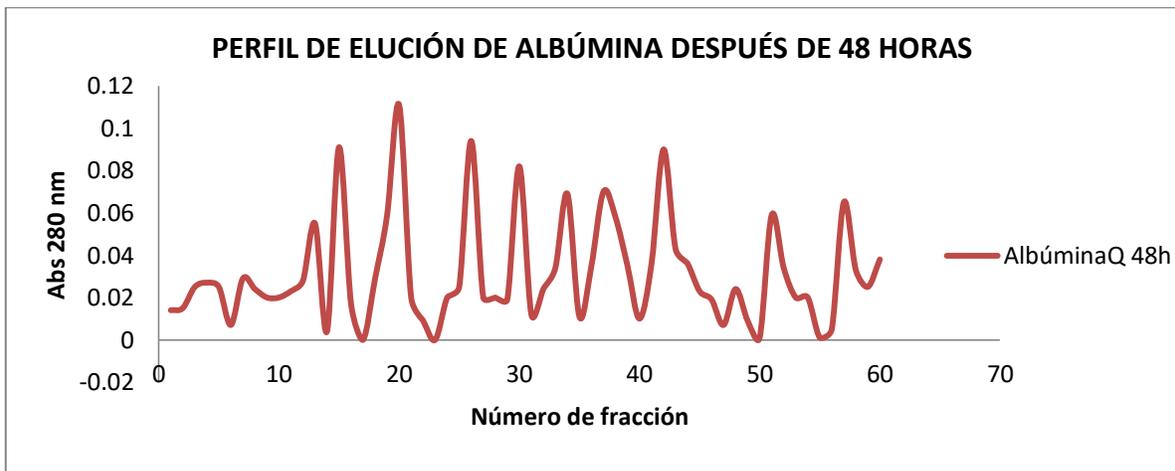
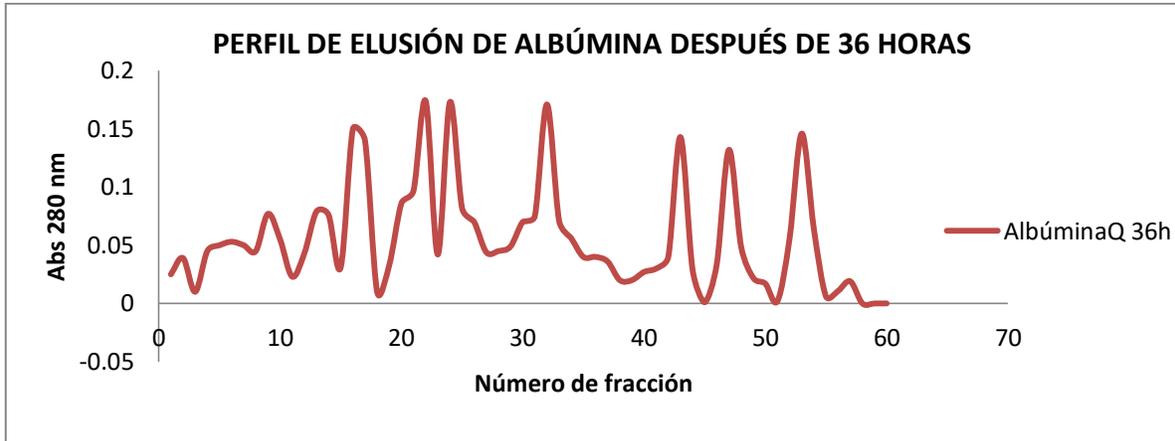


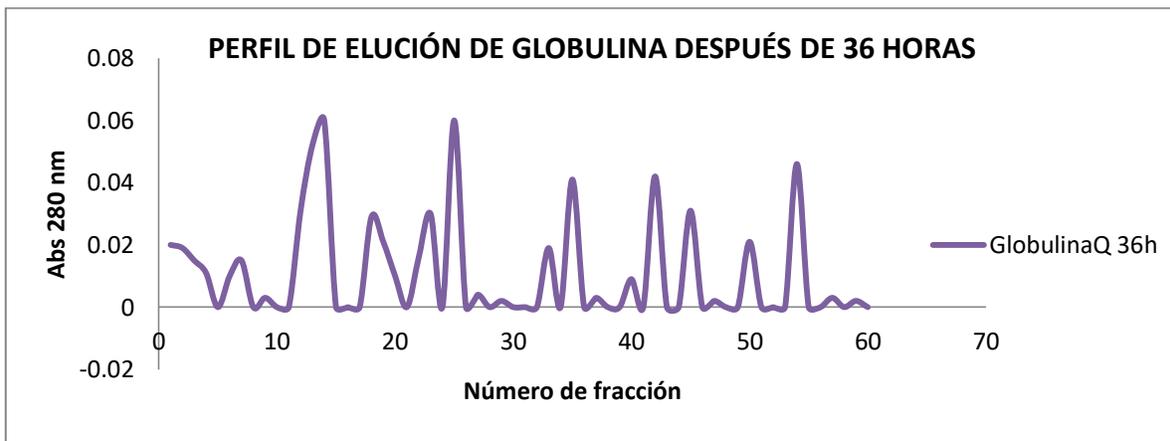
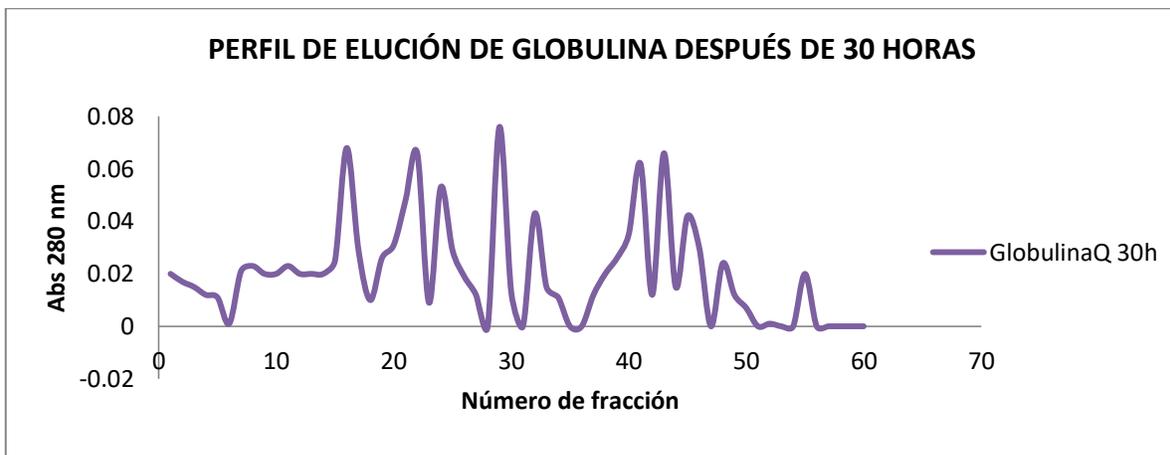
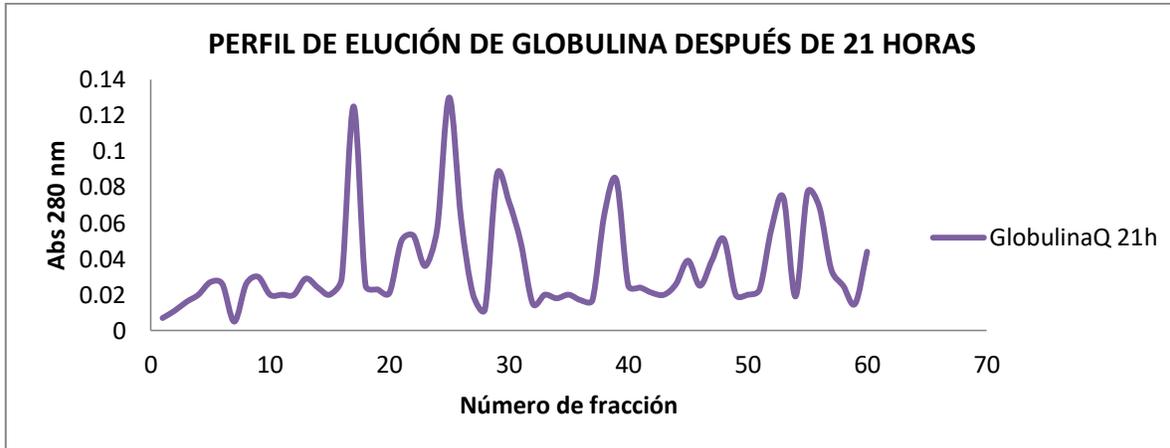


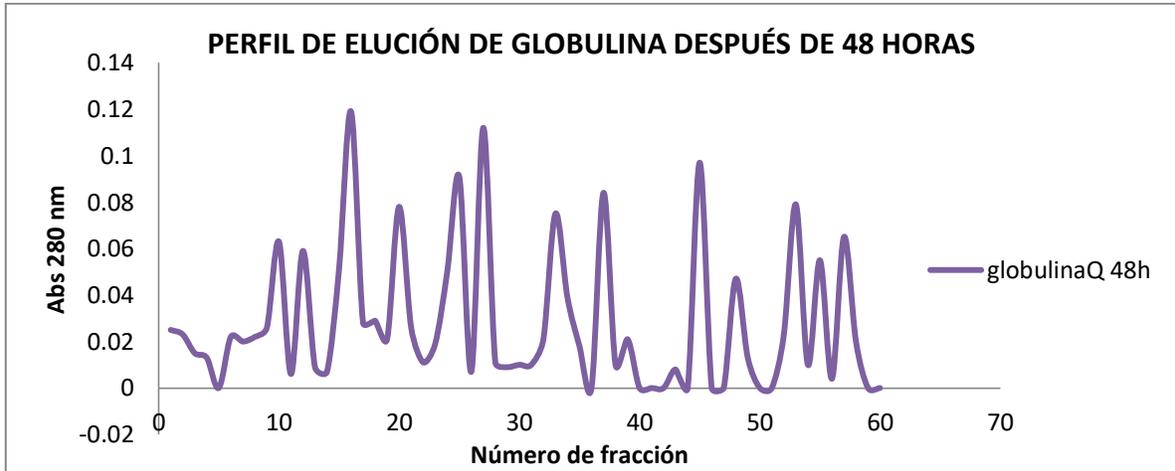


Perfiles de filtración de albúmina y globulina debidos a la hidrólisis con quimotripsina









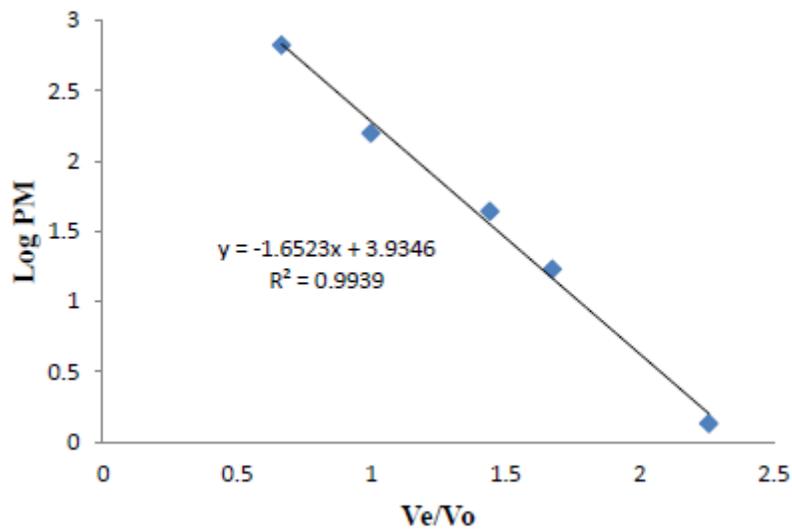
APÉNDICE B

Curva patrón de marcadores utilizados en filtración en gel Sephadex G-15

Estandar	Ve/Vo	Log(PM)
Triosafosfatoisomerasa	0.607	1.425
Mioglobina	1.221	1.23
αLactoalbúmina	1.513	1.152
Aprotinina	2.133	0.813
Insulina	2.667	0.544
Bradicinina	3.487	0.025

a Volumen de elución/volumen vacío

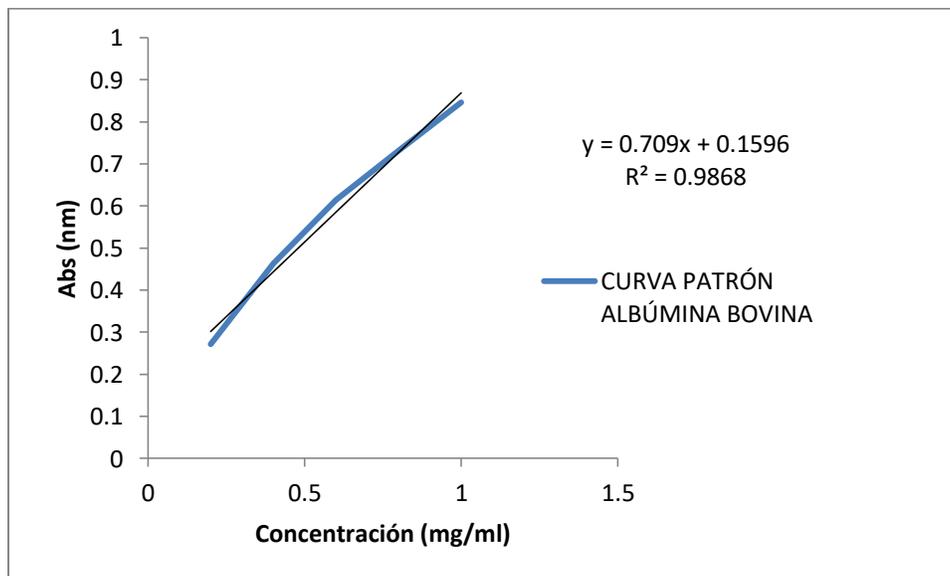
b Peso molecular



APÉNDICE C.

Curva de calibración de albúmina

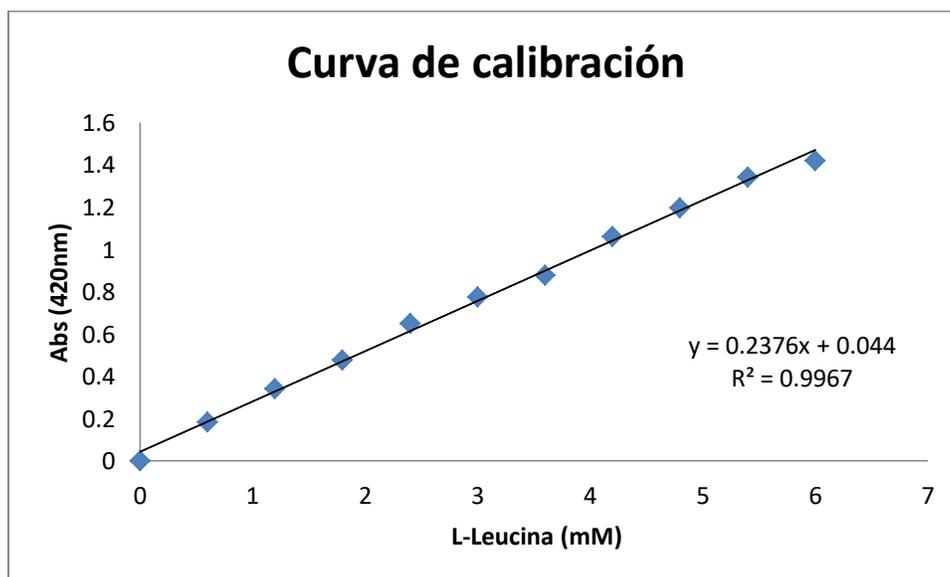
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (nm)
0.2	0.271
0.4	0.463
0.6	0.614
0.8	0.731
1.0	0.846



APÉNDICE D.

Curva de calibración de L-Leucina

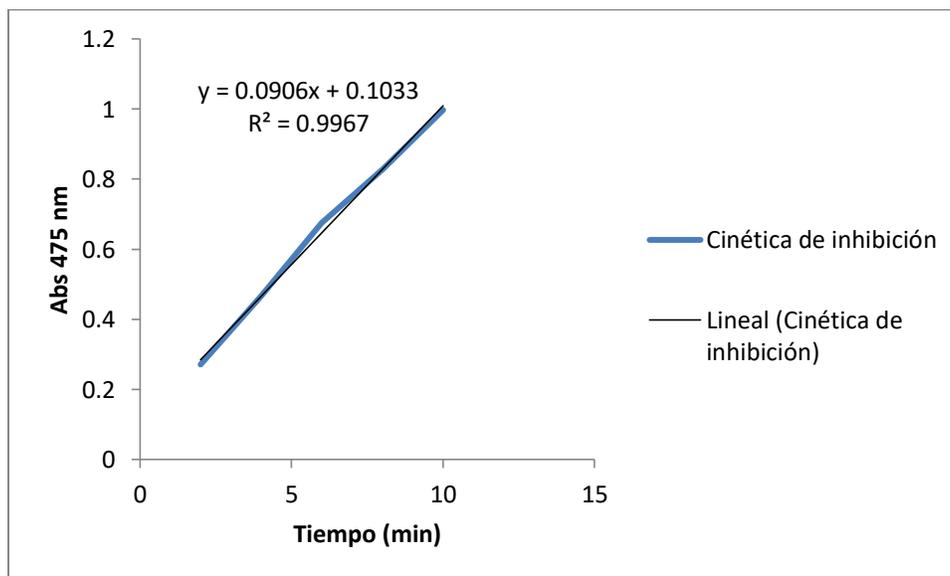
Concentración de L-Leucina (mM)	Abs (420 nm)
0	0
0.6	0.184
1.2	0.342
1.8	0.477
2.4	0.650
3	0.774
3.6	0.878
4.2	1.062
4.8	1.196
5.4	1.341
6	1.419



APÉNDICE E

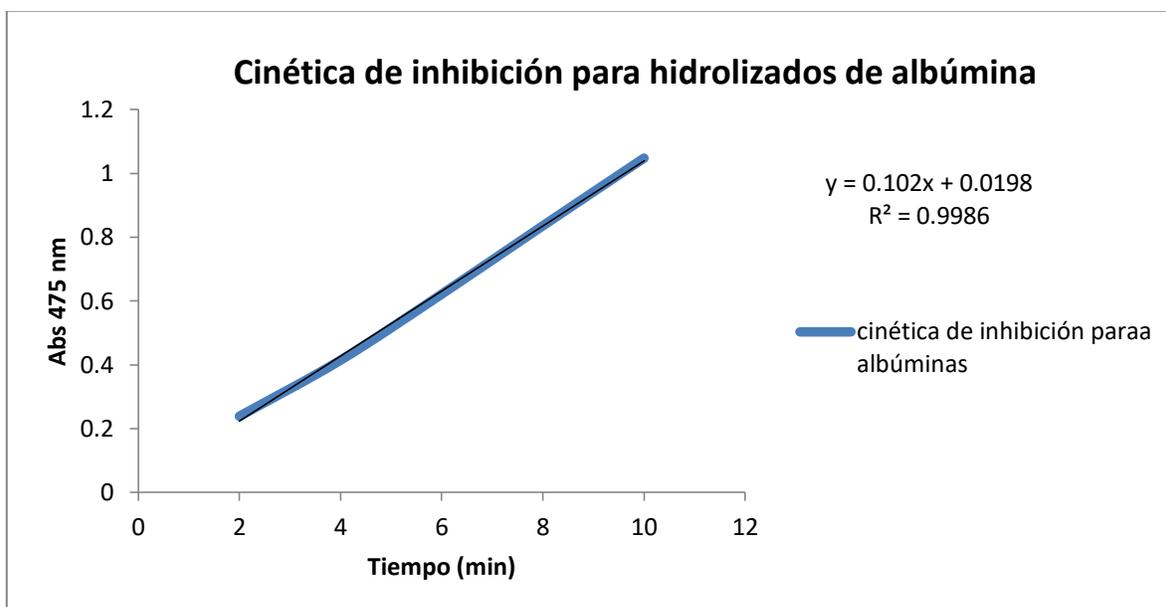
Cinética de inhibición de tirosinasa

Tiempo (min)	Abs (475 nm)
2	0.271
4	0.456
6	0.674
8	0.827
10	0.996



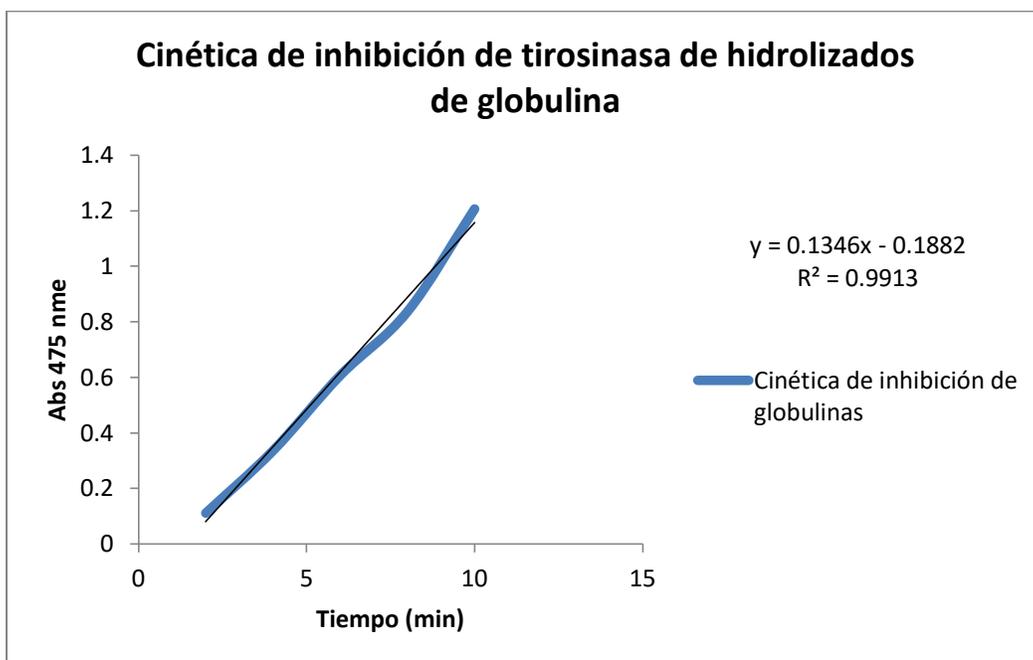
Cinética de inhibición de tirosinasa por hidrolizado de albúmina por catálisis de tripsina

Tiempo (min)	Abs (475 nm)
2	0.241
4	0.414
6	0.644
8	0.882
10	1.116



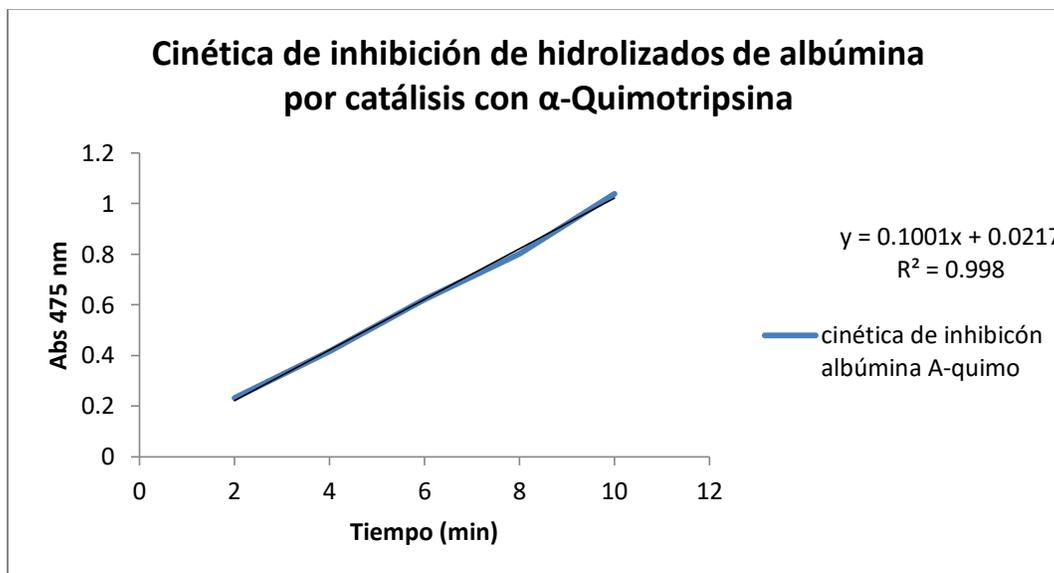
Cinética de inhibición de tirosinasa por hidrolizado de globulina por catálisis con tripsina.

Tiempo (min)	Abs (475 nm)
2	0.111
4	0.335
6	0.606
8	0.836
10	1.206



Cinética de inhibición de tirosinasa por hidrolizados de albúmina por catálisis de quimotripsina

Tiempo (min)	Abs (475 nm)
2	0.231
4	0.416
6	0.622
8	0.803
10	0.1.039



Cinética de inhibición de tirosinasa de hidrolizados de globulina por clisis con quimotripsina

Tiempo (min)	Abs (475 nm)
2	0.153
4	0.356
6	0.663
8	0.938
10	1.043

