

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Especialidad en Biotecnología

Autoproteólisis de la cabeza de camarón (*Litopenaeus vannamei*) como una alternativa en la obtención de péptidos con actividad antioxidante.

Presenta:

I.A. JOSE VICENTE HERNANDEZ ORTIZ

Asesoras:

Dra. Raquel García Barrientos

Dra. Isabel Guerrero Legarreta



Índice General

Índice general	1
Índice de figuras	3
Índice de tablas	4
Introducción	5
1. Revisión bibliográfica	6
1.1. Características del camarón	7
1.2. Anatomía funcional del camarón	7
1.3. Uso común de los desechos del camarón	9
1.4. Aspectos bromatológicos	10
1.4.1. Humedad	10
1.4.2. Cenizas	11
1.4.3. pH	12
1.4.4. Determinación de proteína	13
1.4.5. Color	14
1.5. Aspectos microbiológicos	16
1.5.1. Psicófilos	16
1.5.2. Enterobacterias	17
1.6. Las proteínas	17
1.6.1. Actividad enzimática	18
1.6.2. Enzimas proteolíticas	20
1.6.3. Enzimas comerciales utilizadas en la hidrólisis de péptidos bioactivos marinos	21
1.6.4. Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas	23
1.6.5. Hidrólisis proteínica: métodos de obtención de péptidos	23
1.7. Péptidos bioactivos	24
1.7.1. Definición	24
1.7.2. Fuentes de obtención	25
1.7.3. Actividad biológica	26
1.7.3.1. Péptidos con actividad antimicrobiana	28
1.7.3.2. Péptidos con actividad antihipertensiva	29
1.7.3.3. Péptidos con actividad antioxidante	30
2. Justificación	33
3. Hipótesis	33
4. Objetivo general	33
5. Objetivos particulares	33
6. Metodología	34
6.1. Obtención de materia prima	34
6.2. Análisis de muestras	36
6.2.1. Análisis bromatológicos	36
6.2.1.1. Humedad	36

6.2.1.2 Cenizas	37
6.2.1.3 Actividad de agua	37
6.2.1.4 Nitrógeno total (Proteína)	37
6.2.1.5 pH	38
6.2.1.6 Color	38
6.2.2 Análisis microbiológicos	39
6.2.2.1 Psicrófilos	39
6.2.2.2 Enterobacterias	39
6.2.3. Análisis enzimáticos	39
6.2.3.1. Determinación de la actividad enzimática	40
6.2.3.2. Determinación de proteína por método de Biuret	40
6.2.4. Obtención de péptidos de 50, 10 y 5 kDa	40
6.2.5. Análisis electroforético de péptidos	41
6.2.6. Análisis de Actividad antioxidante.	41
7. Resultados y Discusión	42
7.1. Determinaciones bromatológicas	42
7.2. Determinaciones microbiológicas	43
7.3. Determinaciones enzimáticas	44
7.4. Electroforesis	46
7.5. Péptidos obtenidos por ultrafiltración	50
7.6. Actividad antioxidante	51
8. Conclusiones	52
9. Bibliografía	53
Productividad	61
Anexos	62

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía general externa del camarón adulto	9
Figura 2. Espacio de color CIE-Lab	15
Figura 3. Principales clases de proteasas (peptidasas).	21
Figura 4. Estrategia experimental	34
Figura 5. Muestras de camarón	35
Figura 6. Cabezas de camarón	35
Figura 7. Cultivo de psicrófilos a 15 y 30 días	43
Figura 8. Cultivo de enterobacterias a 15 y 30 días	43
Figura 9. Actividad proteolítica tiempo 0.	45
Figura 10. Actividad proteolítica a 15 días	45
Figura 11. Actividad proteolítica a 30 días	46
Figura 12. SDS-PAGE. De extracto de cabeza de camarón	47
Figura 13. Cuantificación de péptidos de bajo peso molecular.	48
Figura 14. . Densitogramas de las electroforesis de los péptidos.	49
Figura 15. Electroforesis (SDS-PAGE) de extracto de camarón	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Órganos y funciones principales del camarón	8
Tabla 2. Resultados bromatológicos de cabezas de camarón	42
Tabla 3. Contenido de proteína en cabeza de camarón almacenada	44
Tabla 4. Actividad antioxidante en relación con la concentración de péptido	51

INTRODUCCIÓN

La industrialización del camarón genera grandes cantidades de residuos. Se ha estimado que estos constituyen cerca de 45% de la captura y, debido a su fácil degradación, son considerados una fuente potencial de contaminación ambiental (López- Cervantes y col 2006). Por tanto, las plantas procesadoras de crustáceos son grandes generadoras de desechos que pueden ser considerados como materia prima alternativa de los procesos de bioconversión. A partir de estos se pueden obtener compuestos químicos que tienen aplicación en las industrias farmacéutica y alimenticia. A la vez los desechos de camarón no ser aprovechados son contaminantes ambientales ya que se descomponen rápidamente en sustancias inorgánicas de difícil degradación. Estos generalmente se descargan en aguas costeras, terrenos abandonados o en rellenos sanitarios, afectando la capacidad de auto-purificación del agua y el medio ambiente (García, 1998). La cabeza de camarón es el material de desecho más importante, ya que ocupa cerca de 30 a 45% del peso total de la captura. Tan solo en los países del Sureste de Asia se ha llegado a producir cerca de 550,000 TM anuales; este desecho se concentra en las regiones de captura y en las granjas de cultivo.

Para dar solución a este problema, se han orientado varias investigaciones hacia la obtención de pigmentos, quitina y enzimas (Liu y Ye, 2007), así como a la recuperación de proteínas por hidrólisis proteica con tripsina y alcalasas. Sin embargo, este último proceso representa altos costos debido al uso de enzimas purificadas. Por lo que surge la necesidad de desarrollar un método eficiente y económico de extracción de proteínas y péptidos a partir de la cabeza de camarón.

Las enzimas en los animales marinos son de tipo endógeno (catepsinas –lisosomales- y calpainas –citosólicas-) inactivas en el músculo vivo y activadas después de la muerte del animal; también se encuentran enzimas exógenas, que ingresan al músculo por acción del metabolismo de algunos microorganismos de la flora nativa. En el presente trabajo se estudió la utilización de los desechos de la industria camarónica nacional, específicamente cabezas, para obtener péptidos con actividad antioxidante.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los camarones son el producto de mayor valor comercial a nivel mundial; representan aproximadamente el 20% del comercio internacional. Esta proporción se ha mantenido durante varios años a pesar de los cambios ocurridos en las estructuras comerciales y del suministro de productos pesqueros. El volumen de captura en México es de 95,077 TM anuales, 18 % de esta captura está destinada a la importación (Franco-Zavaleta y Guerrero-Legarreta, 2009). El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, es una de las especies de peneidos más importantes para la producción comercial. Con el desarrollo y expansión de la producción, procesamiento y comercialización internacional, la calidad de cría del camarón está tomando cada vez mayor importancia.

La región occidental del país aporta e 80% de la producción nacional, mientras que la región oriental contribuye con e 19% y la región central con e 1% restante. La captura de los camarones se realiza principalmente con métodos artesanales, representando 92% (3.625 TM) del total de la producción de la pesquería artesanal nacional. La pesca industrial de arrastre contribuye con el 8% restante (Morillo y col, 2006). El cultivo del camarón o camaronicultura se ha mantenido en constante crecimiento desde sus inicios. Recientemente en México se ha adoptado una variante de cultivo conocida como “cultivo de camarón tierra adentro” originario de Tailandia, la cual utiliza aguas de baja salinidad en zonas alejadas de la costa. Esto es posible debido a la capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* que le permite sobrevivir en un amplio intervalo de salinidades (de 0.5 a 45 g/L).

Las proteasas son probablemente las enzimas más estudiados que cualquier otro grupo de enzimas en el pescado y concha de pescado. Que estas enzimas reciben considerable atención no es sorprendente, debido a la aplicación de la hidrólisis de proteínas, que puede contribuir a la

mejoría o la pérdida de la calidad del marisco. La autólisis de las proteínas musculares en los mariscos crustáceos (por ejemplo: los camarones, la langosta, el cangrejo, entre otros) se produce rápidamente después de la captura o cosecha, y se ha atribuido a proteasas digestivas. Las proteasas pueden ser directamente responsable de los defectos de textura inusual en pescados y mariscos, por ejemplo, "ruptura de vientre", "abierta" y "blandura" de los peces óseos y "carne de la cola" ablandamiento de las especies de crustáceos; son, además, las causas de la mala calidad inicial y los rendimientos de filete. En los camarones, el hepatopáncreas tiene una actividad proteolítica especialmente alta. En el almacenamiento y procesamiento de camarón fresco, el rápido deterioro de las proteínas musculares es causada por la complejidad y la alta actividad de las enzimas proteolíticas procedentes de esta región anatómica.

1.1. Características del camarón

El camarón del pacífico *Litopaeneus vannamei* es un crustáceo de la especie de peneidos que se cultivan con mayor intensidad en Norteamérica debido al mayor conocimiento de su cultivo y a sus altos rendimientos. Recientemente se han implementado cultivos de esta especie en agua dulce o salinidades muy bajas (0.23 a 11%). *L. vannamei* es, en general, una especie capturada en mar abierto, valorado por la parte comestible que se utilizada directamente como alimento para humanos (Subasinghe, 2003).

1.2. Anatomía funcional del camarón

Las investigaciones existen, sobre la capacidad digestiva de los camarones están basados en la cuantificación de actividad enzimática presentes en el organismo digestivo. En la Tabla 1 y la Figura 1 se muestran las funciones y anatomía del camarón:

Tabla 1. Órganos y funciones principales del camarón

Órgano/Estructura	Función Principal
músculo abdominal estriado	movimiento de retroceso rápido para escape de predadores
antena	sensor táctil (detección predatora)
complejo glandular antenas	excreción y balance osmótico
antenas	quimiorrecepción
ceca anterior y posterior del intestino medio	desconocida
exoesqueleto	soporte externo y barrera protectora
intestino anterior (boca, esófago y estomago)	ingesta, masticación y almacenamiento temporal del alimento.
branquias	respiración, excreción, osmoregulación, fagocitosis.
hepatopancreas	digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes
órgano linfoide	posible entrapamiento de antígenos, fagocitosis
mandíbulas, palpos mandibulares y palpos branquiales	sensores táctiles, escojo de partículas alimenticias movimiento del agua sobre las branquias
intestino medio	absorción y excreción
periopodos y pleopodos	locomoción, quimiorrecepción

Figura 1. Anatomía general externa del camarón adulto

1.3. Uso común de los desechos del camarón

La cabeza de camarón, representando del 35 al 45% del peso total, es el material de desecho más importante. Tan solo en China se ha llegado a producir cerca de 550,000 TM/año, por lo que este

desecho es un problema de contaminación. Las conchas y caparazones de muchos crustáceos, entre ellos el camarón, contienen proteínas, lípidos y pigmentos. Los carotenoides, principalmente astaxantina, presentes en el camarón se utilizan para conferir color a otras especies acuícolas, como truchas y salmones, a través de la alimentación, aumentando así su valor comercial (Simpson y Haard, 1985). Las cabezas de camarón son también la materia prima principal en la producción de quitina y quitosan. Una vez desecadas, son descalcificadas usando ácidos minerales y desproteinizadas usando compuestos alcalinos para obtener una masa rica en quitina, la cual es secada al sol o al horno para obtener quitina con amplio uso industrial y farmacológico (Subasinghe, 2003).

1.4. Aspectos bromatológicos

1.4.1. Humedad

El agua se encuentra en los alimentos en tres formas: como agua de combinación, como agua adsorbida y en forma libre, aumentando el volumen. El agua de combinación está unida en alguna forma química como agua de cristalización o como hidratos, El agua adsorbida está asociada físicamente como una monocapa sobre la superficie de los constituyentes de los alimentos. El agua libre es aquella que es fundamentalmente un constituyente separado, con facilidad se pierde por evaporación o por secado. Dado que la mayor parte de los alimentos son mezclas heterogéneas de varias sustancias, pueden contener cantidades variables de agua de los tres tipos (Egan y col,1987).

La determinación de humedad puede ser el análisis más importante llevado a cabo en un producto alimentario y, sin embargo, puede ser el análisis del que es más difícil obtener resultados exactos y precisos. La materia seca que permanece en el alimento posterior a la remoción del agua se conoce como sólidos totales. Este valor analítico es de gran importancia económica para un fabricante de alimentos, ya que el agua es un “llenador barato”. Así, el contenido de humedad es un factor de calidad en la conservación de algunos productos, ya que afecta la estabilidad de alimentos tales como frutas y vegetales deshidratados, leches deshidratadas, huevo en polvo, papas deshidratadas y especias. La determinación de humedad se utiliza como factor de calidad de jaleas y ates, para evitar la cristalización del azúcar; en jarabes azucarados, cereales preparados – donde los convencionales contienen 4 a 8%; y los “inflados” de 7 a 8%. Por otra parte, se promueve la reducción de humedad por conveniencia en el empaque y/o embarque en leches concentradas, endulzantes; productos deshidratados que son difíciles de empacar si poseen un alto contenido de humedad; y en jugos de frutas concentradas, entre otros. El contenido de

humedad se especifica a menudo en estándares de identidad. Así, el queso Cheddar debe tener <39% de humedad; para harinas enriquecidas el contenido de humedad deberá ser <15%; en las carnes procesadas por lo común se especifica el porcentaje de agua añadida.

Todos los cálculos de valor nutricional requieren del conocimiento previo del contenido de humedad. Los datos sobre contenido de humedad se utilizan para expresar los resultados de otras determinaciones analíticas en una base uniforme (por ejemplo, con base en el peso seco). El contenido de humedad de los alimentos varía enormemente.

La forma de preparar la muestra para este análisis es tal vez la fuente mayor de error potencial, así que se deben tomar precauciones para minimizar las pérdidas o ganancias de agua inadvertidas que ocurren durante estos pasos. Obviamente, cualquier exposición de la muestra a la atmósfera abierta debe ser tan breve como sea posible. Se debe minimizar cualquier probabilidad de calentamiento de la muestra mientras se muele. La pérdida de humedad de la muestra se manifiesta en forma lineal con respecto a la humedad relativa ambiental (Hart y Fisher, 1991)

1.4.2. Cenizas

El contenido de cenizas de los alimentos se determina por procedimientos empíricos, basándose en la incineración de la muestra. La determinación de cenizas es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento. Es esencial el conocimiento básico de las características de varios métodos para analizar cenizas así como el equipo para llevarlo a cabo para garantizar resultados confiables. Existen tres tipos de análisis de cenizas: cenizas en seco para la mayoría de las muestras de alimentos; cenizas húmedas (por oxidación) para muestras con alto contenido de

grasa (carnes y productos cárnicos) como método de preparación de la muestra para análisis elemental y análisis simple de cenizas de plasma en seco a baja temperatura para la preparación de muestras cuando se llevan a cabo análisis de volátiles elementales.

La técnica que se utilizó en este trabajo fue en seco, la cual consiste en quemar la muestra al aire y posteriormente en una mufla para eliminar todo el material orgánico. La ceniza remanente es el residuo inorgánico y la medición de la ceniza total es útil en el análisis de alimentos, ya que se pueden determinar diversos minerales contenidos en la muestra. Algunos errores y dificultades involucrados en la determinación de las cenizas en seco son: la pérdida de ceniza debido a la intensidad con que arde la flama en el momento de quemar la muestra al aire y el cambio gradual en las sales minerales con el calor, como el cambio de carbonatos a óxidos; adhesión de las muestras con un contenido alto de azúcares, lo cual puede ocasionar pérdida de la muestra y fusión del carbón a partes no oxidadas atrapadas de la muestra. El método es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o en pasta no susceptibles a degradación al ser sometidos a temperaturas superiores a 105°C. Sin embargo, este método es inadecuado para productos ricos en sustancias volátiles distintas del agua.

1.4.3. pH

La medición de pH es importante para establecer la efectividad de los conservadores, así como para regular las operaciones de fabricación de alimentos. El valor del pH puede ser definido como el logaritmo común del número de litros de solución que contienen 1 g equivalente de ion hidrógeno (Egan y col, 1987).

En el caso de alimentos con actividad fisiológica residual después de la muerte, como el músculo (como es el caso de la carne, incluida la de animales de tierra y animales de mar como

el camarón), el pH depende de varios factores, entre otros de la condición postmortem del animal, del tiempo de almacenamiento y del manejo general de animal ante y postmortem. El pH en la carne fresca depende de la degradación de glucógeno, producida por las condiciones de manejo del animal antes y durante la matanza o captura. Estas condiciones pueden dar como resultado una pálida, suave y exudativa (PSE), en donde las reservas de glucógeno se degradan aceleradamente después del sacrificio; ello provoca un descenso brusco de pH que unido a temperaturas elevadas después de la muerte de los animales (alrededor de 30°C), inducen la desnaturalización proteica miofibrilar, con la consiguiente pérdida de retención de agua. Este es un problema característico sobre todo en aves y cerdos, en general es consecuencia de la producción de adrenalina por estrés o nerviosismo de los animales previo a su muerte. Generándose una carne pálida, suave y con mucha exudación por lo que al ser cocinada queda seca y con mal sabor por la gran pérdida de jugos. Otra condición que puede ocurrir en la carne es la llamada carne de corte oscuro o oscuro (DFD) (del inglés: dark=oscura, firm=firme, dry=seca); son carnes que presentan pH superior a 6.0, un color oscuro, textura firme y una apariencia seca debido a su elevada retención de agua. Un pH mayor a 6.2 puede dar origen a problemas tecnológicos y microbiológicos (Egan y col. 1987). Un animal sacrificado después de un fuerte ejercicio tiene casi agotadas sus reservas de glucógeno y por lo tanto se produce poco ácido láctico y el pH final es próximo a 6 favoreciendo con esto el crecimiento de microorganismos dando lugar a una carne oscura, dura y seca.

1.4.4. Determinación de proteína

Existen varios métodos mediante los cuales se puede determinar el contenido de proteína bruta, proteína real y nitrógeno no proteico en muestras tanto de origen vegetal como de origen animal. Se utiliza comúnmente el método de Kjeldahl, que está basado en la combustión húmeda de la muestra, calentándola con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos o de otro tipo para efectuar la reducción del nitrógeno orgánico de la muestra a amoníaco, el cual es retenido en solución como sulfato de amonio. La solución de la digestión se alcaliniza y se destila

por arrastra de vapor para liberar el amoniaco, que es atrapado y titulado. Se han empleado muchos catalizadores, pero se ha considerado más efectivo el mercurio en forma de óxido mercúrico así como el selenio, ambos tienen riesgos tóxicos y problemas para desecharlos. El mercurio forma complejos con el amoniaco en el líquido de digestión que requieren la adición de tiosulfato de sodio para romper esos complejos y liberar el amoniaco. La titulación se hace con una base valorada y en presencia de un indicador adecuado, de tal manera que se determina el ácido que no reaccionó con el hidróxido de amonio destilado y por diferencia, se calcula el hidróxido de amonio producido (Egan y col. 1987). Finalmente, el amoniaco indica la cantidad de nitrógeno total en la muestra, la cual es convertida a contenido de proteína al multiplicarse por un factor (6.25); en el caso de proteínas de cereales, este factor es 5.85.

1.4.5. Color

El color es probablemente el atributo que determina en mayor medida la aceptación de los alimentos por el consumidor. Desde un punto de vista físico, el color se puede definir como una sensación subjetiva, resultado de una compleja serie de respuestas fisiológicas y psicológicas a la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas en el intervalo de 400-700 nm. El color también se puede definir como la interacción de una fuente luminosa (iluminante) sobre un objeto (alimento) en un entorno definido y determinado por un observador (Pérez-Alvarez y col., 2000). Los carotenos son los responsables del color que presentan muchos pescados y mariscos, siendo éstos, en muchos casos, de gran importancia económica. Un aspecto

fundamental a tener muy en cuenta con estos compuestos es que no son sintetizados por el organismo animal y por lo tanto provienen de su asimilación y almacenamiento. En el caso de los carotenos presentes en los tejidos de los peces, éstos provienen de la ingesta de zooplancton y de algas. En el pescado, el contenido de carotenos puede ser muy elevado y en ocasiones en grandes cantidades. Se encuentran además, en el caparazón de muchos crustáceos como los camarones. Los pigmentos responsables del color de los peces, particularmente en los salmónidos (trucha, salmón entre otros), son la astaxantina y la cantaxantina, aunque estos pigmentos también pueden encontrarse en los túnidos y son uno de los pigmentos naturales de origen marino más importantes.

En el caso de las carnes de animales de tierra, el color se debe básicamente a la presencia de mioglobina y en menor grado a la hemoglobina. La mioglobina es una proteína conjugada, que además de la parte proteica llamada globina, contiene un grupo prostético de naturaleza no peptídica denominado hemo. El papel de este grupo en la molécula es fijar oxígeno y el de la globina es hacer que la fijación del oxígeno sea reversible. El grupo hemo está formado por un átomo de hierro y un gran anillo planar constituido de porfirina. La mioglobina contiene aproximadamente 90% del hierro de la carne, lo que equivale a un 10% del hierro total del animal vivo. El átomo de hierro puede existir en forma reducida (ferrosa) u oxidada (férica); en la forma ferrosa puede combinarse fácilmente con agua, oxígeno, óxido nítrico y bióxido de carbono y en la forma férica puede unirse con el agua o el ión hidroxilo pero no con oxígeno.

La medición del color en alimentos se puede llevar por métodos espectrofotométricos y colorimétricos. Sin embargo, el más empleado es el sistema CIE-Lab (del francés, Commission International de L'Eclairage, Comisión Internacional de la Iluminación), el cual utilizan escalas opuestas del color, que se basan en la teoría de Hering acerca de la visión en color. Dicha teoría

propone que en el ojo se comparan el color rojo con el verde y el amarillo con el azul, para definir la tonalidad percibida. Esta teoría se transforma a dos dimensiones del color: a que va de rojo (si es positiva) a verde (si es negativa) y b de amarillo (si es positiva) a azul (si es negativa). Asimismo se define una tercera coordenada: L (luminosidad), que es perpendicular a estas dos, donde 0 equivale al negro y 100 al blanco, y define un espacio. La Figura 2 muestra el espacio de color CIE-Lab.



Figura 2. Espacio de color CIE-Lab

De acuerdo a los valores obtenidos, la tonalidad más cercana al rojo es el ángulo más próximo a cero; el color más intenso es un valor de cromaticidad más alto; mientras que el color más pálido corresponde a una luminosidad más alejada de cero. Instrumentalmente, las muestras se comparan con un patrón de color definiendo las coordenadas L, a y b que son las de la muestra patrón. La cercanía o lejanía de las coordenadas de la muestra problema darán como resultado la desviación del color respecto a uno ideal (Guerrero Legarreta y col, 2002).

1.5. Aspectos microbiológicos

Los microorganismos que desempeñan un papel importante en la contaminación bacteriana se desarrollan a un rango de temperatura entre -10 y 80° C. Pocos microorganismos han sido capaces de crecer fuera de este intervalo; las bacterias normalmente se limitan a crecer a una escala de temperaturas en torno a los 35°C, mientras que los mohos lo hacen a temperaturas ligeramente inferiores a 30°C. Cada microorganismo exhibe temperaturas mínimas, máximas y óptimas de crecimiento, las cuales están influidas por factores como pH, Aw y disponibilidad de nutrientes. De acuerdo con esta capacidad, los microorganismos se clasifican en termófilos, mesófilos, psicrótrofos y psicrófilos (Prescott y col 1999).

En el camarón, los microorganismos presentes varían en los de la zona superficial y los del contenido intestinal; la microflora no es homogénea, depende del ambiente, del lugar y del sistema de captura, de la posibilidad de contaminación con el hielo utilizado para la conservación y de los tratamientos a bordo, así como de la manipulación que se le realice (Ketchum, 1988).

1.5.1. Psicrófilos

Los psicrófilos son microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas. Existen varias definiciones de psicrófilos, en un inicio se definía como psicrófilo a cualquier microorganismo

que podía crecer a 0°C. Sin embargo, parece haber dos grupos diferentes que pueden crecer a esa temperatura. El primer grupo está constituido por los *psicrófilos estrictos* o aquellos microorganismos que pueden crecer a 0°C pero cuya temperatura óptima es de 15°C. El otro grupo los constituyen aquellos microorganismos que pueden proliferar a 0°C pero que tienen temperaturas óptimas más elevadas 20 - 30 °C llamados *psicrófilos facultativos*. Ejemplo: *Pseudomonas* (Madigan y col, 2004).

1.5.2. Enterobacterias

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos, colonizan al hombre y presentan variada morfología, son anaerobios facultativos (crecen en aerobiosis y en anaerobiosis), metabolitamente activos, crecen en medios simples y no forman esporas. La mayoría son móviles y unas pocas son capsuladas (como algunas especies de *Escherichia coli* y *Klebsiella*). La mayoría de las especies son oportunistas, pero algunas son alta y específicamente patógenas y causan enfermedad entérica, urinaria o sistémica. Las enterobacterias pueden vivir libres en la naturaleza y habitualmente forman parte de la flora normal del colon humano, en escaso porcentaje (más de 98% de la flora intestinal son anaerobios de los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*). Pueden encontrarse transitoriamente en la piel (especialmente perianal), el tracto genital femenino y, muy ocasionalmente, el tracto respiratorio superior de los individuos sanos.

Las enterobacterias aparecen en una mayor proporción en la flora de individuos hospitalizados, especialmente en aquellos que sufren enfermedades graves y debilitantes. *E. coli* es la especie más comúnmente encontrada en la flora normal, seguida en orden de importancia por *Klebsiella*, *Proteus* y *Enterobacter*. Los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* son patógenos primarios para el hombre y no forman parte de la flora normal. Ciertos serotipos de *E. coli* son patógenos primarios. Las enterobacterias forman cerca del 80% de infecciones por Gram negativos y constituyen 50% de los aislamientos clínicos relevantes (Madigan y col 2004).

1.6. Las proteínas

Las proteínas son moléculas cuya carga neta depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos al pH considerado. Son macromoléculas compuestas por unidades de alfa – aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos y que alcanzan un peso molecular igual o superior a 5000 Da. Son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Pueden considerarse polímeros de unas pequeñas moléculas que reciben el nombre de aminoácidos y serían por tanto los monómeros. La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido; si el número de aminoácidos que forma la molécula no es mayor de 10, se denomina oligopéptido, si es superior a 10 se llama polipéptido y si el número de aminoácidos es superior a 50 se habla de una proteína. Los péptidos están formados por la unión de aminoácidos mediante un enlace peptídico. Es un enlace covalente que se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, dando lugar al desprendimiento de una molécula de agua. Las proteínas se pueden clasificar basándose en su solubilidad, albúminas (solubles en agua) y globulinas (insolubles en agua y solubles en soluciones salinas); también existe otra clase de proteínas, las prolaminas, que son solubles en soluciones alcohólicas al 70-80% aunque insolubles en agua y disolventes neutros (Fennema, 1994).

1.6.1. Actividad enzimática

Las enzimas poseen un pH característico donde su actividad es máxima: por encima o debajo de ese pH, la actividad disminuye. La relación pH-actividad enzimática constituye un factor de regulación intracelular de la actividad enzimática. La velocidad de las reacciones enzimáticas por lo general aumenta con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y activa. La velocidad se duplica por cada 10°C de aumento de temperatura. Sin embargo, las enzimas se

desnaturalizan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa cierta temperatura límite, la cual a su vez es la temperatura óptima de actividad. A bajas temperatura, las reacciones disminuyen considerablemente o se detienen, pero la acción catalítica reaparece cuando la temperatura se eleva a valores normales.

Las enzimas son macromoléculas con la capacidad de manipular otras moléculas, denominadas sustratos. Un sustrato es capaz de unirse al centro catalítico de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto a lo largo de una serie de pasos denominados mecanismo enzimático. Algunas enzimas pueden unir varios sustratos diferentes y/o liberar diversos productos, como es el caso de las proteasas al romper una proteína en dos polipéptidos.

La hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. Dicha ruptura puede producirse mediante métodos químicos, es decir, por tratamiento con ácidos o bases; métodos fermentativos, utilizando bacterias ácido lácticas o mediante métodos biológicos utilizando enzimas. El uso de la pepsina y tripsina no es nuevo para la obtención de hidrolizados de proteínas. La pepsina es una peptidasa, una enzima digestiva que degrada las proteínas en el estómago; las otras enzimas digestivas importantes son la tripsina y la quimotripsina. La tripsina rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos.

Este sistema de hidrólisis es ampliamente usado en la actualidad por ser un proceso que imita al aparato digestivo, haciéndolo una forma ideal para metabolizar la proteína; las condiciones de operación son fáciles, se puede lograr el control del proceso y lo más importante, los aminoácidos no sufren daño alguno siendo posible utilizarlos en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos, así como en nutrición infantil y clínica (Vioque y Millán, 2001a). La utilización de enzimas de distintos orígenes para hidrolizar proteínas es una de las técnicas más

empleadas en la producción y caracterización de péptidos bioactivos. La liberación de los péptidos con actividad depende del sustrato, de la enzima utilizada para llevar a cabo la proteólisis y de las condiciones del proceso tales como la temperatura, el pH y el tiempo.

En el caso del camarón, la degradación química de los alimentos se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente de la glándula del intestino medio o hepatopáncreas.

1.6.2. Enzimas proteolíticas

Las enzimas que hidrolizan a los enlaces peptídicos se conocen como peptidasas, péptido-hidrolasas, con diferencias entre proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas (Barrett,1986). En 1992, la Enzyme Comission of the International Union of Biochemistre, catalogó a las proteinasas dentro del grupo E.C.3.4. mientras que en 1992 Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology sugirió el termino general de peptidasa para nombrar a todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos, aunque ese término es poco usado en la literatura refiriéndose a enzimas proteolíticas como peptidasas .

Las proteasas pueden ser exopeptidasas, las cuales actúan sobre los grupos aminos o carboxilo terminal de aminoácidos mientras que las endopeptidasas, también llamadas proteinasas (Macdonald y col, 1986), actúan en los enlaces peptídicos internos de polipéptidos.

Las proteasas (peptidasas) están clasificadas de acuerdo a los mecanismos catalíticos en los cuales actúan, cuyo nombre deriva del aminoácido existente en el sitio catalítico de la enzima. Hay cinco clases de endoproteasas, metaloproteasas (webb. 1993) y las endopeptidasas de mecanismos desconocidos. La Figura 3 muestra las principales clases de proteasas (peptidasas) (Fan y Wu, 2005)

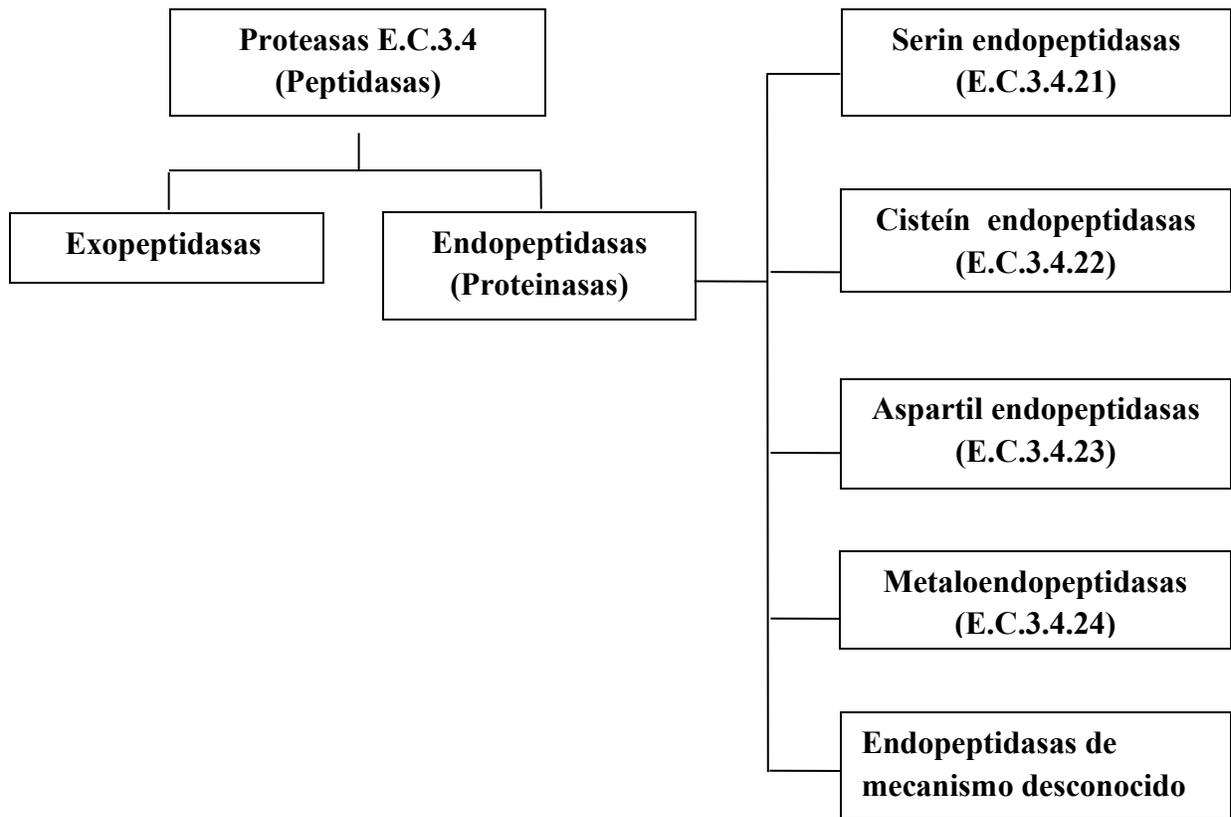


Figura 3. Principales clases de proteasas (peptidasas) de acuerdo a Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Fan y Wu, 2005)

1.6.3. Enzimas comerciales utilizadas en la hidrólisis de péptidos bioactivos marinos.

La hidrólisis enzimática de las proteínas permite la preparación de péptidos bioactivos y estos se pueden obtener en la hidrólisis *in vitro*. Las condiciones fisicoquímicas de la reacción, tales como temperatura y pH de la solución de la proteína, debe ajustarse a fin de optimizar la actividad de la enzima que se utiliza. Enzimas proteolíticas de microorganismos, plantas y animales pueden ser

usadas para el proceso de hidrólisis de proteínas de marinos para el desarrollo de péptidos bioactivos.

Para este fin, se ha utilizado proteinasas cruda extraída del ciego pilórico de atún, por hidrólisis enzimática de las proteínas de bacalao en condiciones óptimas, a fin de obtener un rendimiento máximo. Además de la quimotripsina, se han utilizado también papaína y tripsina para la hidrólisis del músculo de atún bajo condiciones óptimas de pH y temperatura de las respectivas enzimas.

Las enzimas comerciales que se han empleado para obtener péptidos de origen marino son pepsina y tripsina. La pepsina es una peptidasa digestiva que degrada las proteínas en el estómago. Actúa sobre las proteínas en un ambiente muy ácido. El pepsinógeno es el precursor de la pepsina, pierde aminoácidos por acción de HCl, transformándose en pepsina. El pH óptimo de la pepsina es entre 2 y 4; se desactiva permanentemente a pH arriba de 6. Corta a fenilalanina, tirosina y triptófano en los grupos amino.

La tripsina es una peptidasa producida en el páncreas y secretada en el duodeno (parte del intestino), donde es esencial para la digestión. Su pH y temperatura óptimos son 8 y 37°C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos arginina o lisina en la cadena, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial. La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinógeno (enzima inactiva), y activado en el duodeno por acción de enteroquinasa intestinal a tripsina (enzima activa) mediante corte proteolítico. La tripsina es secretada en el intestino delgado, donde actúa hidrolizando péptidos. Esto es necesario para el proceso de absorción de las proteínas presentes en la comida, ya que a pesar de que los péptidos son mucho más pequeños con respecto a las proteínas, son aún demasiado grandes para ser absorbidos en el íleo. El mecanismo enzimático es igual al de las otras serínproteasas: una tríada catalítica convierte a la serina del sitio activo en nucleofílica. Esto se logra modificando el ambiente electrostático de la serina. La reacción

enzimática catalizada por las tripsinas es termodinámicamente favorable pero tiene una alta energía de activación (es cinéticamente desfavorable).

1.6.4. Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas

Temperatura: Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta un valor óptimo, ya que después de aproximadamente 45°C inicia la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de 37°C, por encima de esa temperatura se inactiva y destruyen. Sin embargo, existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y en el otro extremo ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0°C.

pH: No afecta a la actividad enzimática directamente, sino que modifica la concentración de protones los cuales, además de alterar la estructura de la enzima y del sustrato, pueden participar en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Cualquier cambio rápido de pH, ya que las enzimas son proteínas, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Uribe y col, 2004).

1.6.5. Hidrólisis proteínica: métodos de obtención de péptidos

La hidrólisis proteínica es la ruptura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. Dicha ruptura puede producirse mediante métodos químicos, es decir, por tratamiento con ácidos o bases; métodos fermentativos, utilizando bacterias ácido lácticas o mediante métodos biológicos utilizando enzimas. La utilización de enzimas de distintos orígenes para hidrolizar proteínas es una de las técnicas más empleadas en la producción y caracterización de péptidos bioactivos. La liberación de los péptidos con actividad depende del sustrato, de la enzima utilizada para llevar a cabo la proteólisis y de las condiciones del proceso tales como la temperatura, el pH y el tiempo. Este

sistema de hidrólisis es ampliamente usado en la actualidad por ser un proceso que imita al aparato digestivo, haciéndolo una forma ideal para metabolizar la proteína; las condiciones de operación son fáciles, se puede lograr el control del proceso y lo más importante, los aminoácidos no sufren daño alguno siendo posible utilizarlos en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos, así como en nutrición infantil y clínica (Vioque y Millán, 2001b).

1.7. Péptidos Bioactivos

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión de las proteínas, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas con distintos números de aminoácidos. En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta que tienen una actividad biológica, regulando procesos fisiológicos, además de su valor nutricional. La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local y tracto gastrointestinal. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos pueden alterar el metabolismo celular y actuar como vaso reguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores.

La mayor parte de la proteína es absorbida en forma de péptidos y no como aminoácidos libres. Además de la acción de las enzimas proteolíticas, los péptidos sufren una digestión adicional mediante las peptidasas y citoplasmáticas. La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas, mientras que los dipéptidos y tripéptidos pueden ser absorbidos intactos. Las dipeptidasas y tripeptidasas pueden posteriormente hidrolizar estos péptidos a aminoácidos, pero parece probado que algunos de estos pueden escapar al ataque enzimático y alcanzar intactos la circulación sanguínea (Baró y col , 2001).

1.7.1. Definición

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de tamaño pequeño; algunos autores han observado actividad en cadenas de entre 2 y 15 aminoácidos (Korhonen y Pihlanto, 2006., Vioque y Millán, 2005), pero son inactivos cuando forman parte de una proteína. De forma que, al ser liberados de estas estructuras, ejercen efectos benéficos para la salud. Algunos péptidos bioactivos aislados de hidrolizados de proteínas de pescado han mostrado bioactividad numerosa como antihipertensiva, antitrombótica, inmunomoduladora y actividad antioxidante (Kim y Mendis, 2006) y se ha observado su actividad mediante la reducción de la presión arterial en ratas hipertensas (Je, y col., 2005; Fujita y Yoshikawa., 1999).

1.7.2 Fuentes de obtención

Los péptidos bioactivos pueden ayudar a reducir las epidemias de enfermedades crónicas a nivel mundial, las cuales representan 58 millones de muertes prematuras al año (Moller y col., 2008). Tanto los péptidos bioactivos como las proteínas tienen un impacto positivo sobre las funciones del cuerpo y la salud humana (Gilani y col, 2008; Mine y col. 2009; Boelsma y Kloek. 2009). En este sentido, las proteínas vegetales resultan una alternativa novedosa en relación a las tan estudiadas proteínas animales por su contenido proteínico, disponibilidad y accesibilidad económica. El interés en la industria alimentaria por fuentes alternas de péptidos como el frijol caupí, el frijol lima, el garbanzo o la soya se ha enfatizado por la importancia que hoy en día tiene el consumo de alimentos en la salud, debido a que éstos son componentes importantes de los denominados alimentos funcionales los cuales, hoy en día, son foco de estudio tanto por su evidente valor terapéutico como por su gran relevancia para la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contienen (Bagchi, 2006).

Es un hecho que toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos funcionales de forma que, aparte de la leche humana y de vaca que son los más estudiados, se han aislado péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas diversas como sardina, maíz, soja, gelatin. Algunos péptidos de la soya han observado un aumento de actividad antioxidante en comparación a las proteínas intactas (Chen y col., 1998). La digestión enzimática de

almacenamiento de la soya contiene β -conglucina y glicina. Ya se conoce la potente actividad antioxidante de algunos aminoácidos, tales como histidina, tirosina, triptofano, tiramina, metionina y lisina, así como el hecho de que la exposición del grupo R de algunos aminoácidos del grupo R aumenta la capacidad antioxidativa de los péptidos (Saito y col., 2003).

Algunas proteínas y péptidos con propiedades antioxidativas pueden ser derivados de huevo, leche, y platas. La yema de huevo de gallina contiene fosvitina, un proteína monoesterificado con 10% de fósforo y 57% de serina. Los oligofosfopéptidos preparados con yema de huevo, con 35% de retención de fosfato, han mejorado la habilidad de fijar calcio y hierro en humanos (Taborsky, 1983; Jiang., 2000).

Se han aislado algunos péptidos bioactivos de hidrolizados enzimáticos de proteínas en productos lácteos fermentados, los cuales también han sido relacionados con la digestión gastrointestinal de las mismas proteínas (Meisel, 2005). Las proteínas de suero de leche, como β -lactoglobulina, albumina sérica y lactoferrina, contienen niveles altos de cisteína y glutamilsteína que son precursores en la síntesis de glutatión. El aumento en la producción de glutatión es importante en la disminución de tumores en ratas alimentadas con suero y caseína de la leche.

Los hidrolizados enzimáticos del músculo de pescado también han mostrado *in vitro* propiedades anticoagulantes y antiplaquetarios; los resultados han sugerido la capacidad de estos para inhibir los factores de coagulación en la vía intrínseca de la coagulación. Los péptidos derivados de proteínas de pescado han demostrado la capacidad de ejercer una potente actividad antioxidante en diferentes sistemas oxidativos.

1.7.3. Actividad Biológica

Los organismos marinos son fuentes ricas de diversos compuestos bioactivos con diferentes actividades biológicas. La importancia y el interés de los organismos marinos con respecto a estos compuestos está en aumento ya que las especies marinas comprenden aproximadamente la mitad de la biodiversidad mundial total; por tanto el mar ofrece un enorme recurso para nuevos

compuestos. El medio ambiente marino sirve como una fuente de compuestos funcionales, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), polisacáridos, minerales y vitaminas, antioxidantes, enzimas y péptidos bioactivos (Kim y Mendis, 2006).

Por otra parte, algunos investigadores han reportado que los hidrolizados de proteínas alimenticias son fuentes de péptidos biológicamente activos, con alto potencial en la industria farmacéutica y de alimentos, así como con actividad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, antitrombótica, inmunomodulada, y en la prevención de enfermedades cardiovasculares al formar parte de algunos nutraceuticos y medicamentos (Kim y Mendis, 2006), además de su papel puramente nutricional (Venugopal, 2009).

En animales de origen marino el estudio en péptidos bioactivos se ha dirigido principalmente a los péptidos con actividad antihipertensiva obtenidos de merluza, sardina, salmón (Cling-Mars y col, 2008; Ono y col., 2003) y aquellos con actividad antioxidante en abadejo y atún (Je y col., 2005). Los péptidos bioactivos de origen marino pueden ser producidos por tres métodos: la extracción con disolventes, enzimáticos (hidrólisis) y fermentación microbiana de proteínas. Sin embargo, en las industrias alimentaria y farmacéutica se utiliza el método de hidrólisis enzimática debido a que los residuos dejados por los disolventes orgánicos o químicos son tóxicos (Baró y col 2001).

El fenómeno de autólisis se ha encontrado en varias especies marinas, principalmente en los pescados, donde las enzimas endógenas tales como fosforilasas, lipasas, enzimas digestivas, y catepsinas juegan un papel muy importante después de la muerte del animal, por lo que este fenómeno ha sido reportado como un medio para la obtención de hidrolizados de pescado. Sin embargo, en alimentos fermentados marinos tales como las salsas muy populares en la cocina tradicional del sureste de Asia, la hidrólisis es causada por microorganismos. Las enzimas en los animales marinos son de tipo endógeno (catepsinas –lisosomales- y calpainas –citosólicas-) inactivas en el músculo vivo y activadas después de la muerte del animal; también se encuentran enzimas exógenas, que ingresan al músculo por acción del metabolismo de algunos microorganismos de la flora nativa. Las calpainas y las catepsinas tienen una acción conjunta

durante el almacenamiento postmortem de la carne, tanto de animales terrestres como acuáticos; ambos sistemas proteolíticos inciden en la degradación de las miofibrillas por medio de la ruptura de las proteínas miofibrilares, dando como resultado la pérdida de la integridad y uniformidad de la fibra muscular. Las enzimas endógenas de animales acuáticos, aunque similares a las encontradas en los animales terrestres, presentan algunas diferencias. En los animales terrestres, estas enzimas tienen un efecto benéfico al participar en el proceso de maduración de la carne, mientras que en los animales acuáticos aceleran los mecanismos de autólisis posteriores a la captura (Jiang, 1998; Jiang, 2000; Cheret y col., 2007). Otros péptidos han sido aislados de la transformación de subproductos marinos sujetos a autólisis en la parte comestible del camarón, sin embargo, hay muy poca información disponible relacionada con la autólisis de la cabeza de camarón, o hepatopáncreas.

La velocidad de estos cambios depende de factores como el método de captura, la manipulación y el almacenamiento. En el camarón se observa una alta actividad proteolítica, la cual ha sido cuantificada por métodos zimográficos (García-Carreño, 1996). Recientemente, se ha añadido otro interés en este tema, referente al análisis de la estructura, composición y secuencia de péptidos bioactivos.

1.7.3.1. Péptidos con actividad antimicrobiana

Existe interés académico y comercial en los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana (PAM) a partir de invertebrados marinos, como crustáceos y moluscos. Estas investigaciones buscan información a nivel molecular, empleando como principal modelo al cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), un organismo considerado fósil viviente, aunque también se han detectado PAM en algunas especies comerciales, como el cangrejo de arena (*Carcinus maenas*), y el mejillón (*Mytillus edulis*).

Los PAM han podido ser clasificados basándose en su secuencia y estructura. Se conocen 5 grupos de PAM con las siguientes características: 1) dominios de hélice- α ; 2) alto contenido de cisterna; 3) dominios de hojas- β ; 4) alto contenido de un aminoácido específico; y 5)

aminoácidos modificados. Estos últimos se han descrito en bacterias y hongos (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002). Se reporta que los péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como hormonas o neurotransmisores, jugando un papel fisiológico importante a través de interacciones hormona-receptor y cascadas de señalización; también pueden ejercer su acción sobre la regulación del metabolismo (agua, minerales y otros nutrientes), controlando las glándulas de excreción, ajustando la presión arterial, impactando en el crecimiento del individuo o ejerciendo efecto sobre el sueño, aprendizaje, memoria, dolor, comportamiento sexual, apetito y los efectos de las vías de estrés sobre el sistema nervioso central (Wang y González de Mejía, 2005).

El mecanismo de acción de los PAM está conformado por tres etapas: atracción por la célula bacteriana, unión a la membrana celular y la inserción del péptido, y permeabilización de la membrana celular. El tiempo de acción biológica es variable, ya que existen reportes de que algunos péptidos lineales μ -helicoidales catiónicos destruyen bacterias muy rápidamente, mientras que otros pueden demorar de 15 hasta 90 minutos en ejercer su efecto bactericida. También se involucra la carga y la estructura del péptido (Gallo y Huttner, 1998), así como a los ácidos grasos que se encuentran en la membrana celular de los microorganismos (Conlon y col., 1999).

1.7.3.2. Péptidos con actividad Antihipertensiva

Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva lo hacen por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es una proteasa que actúa, por un lado hidrolizando el decapeptido angiotensina I para producir el octapéptido angiotensina II que es vasoconstrictor y, por otro degrada el péptido vasodilatador bradiquinina. La actividad de esta

enzima está directamente relacionada con un incremento de la presión arterial, la cual a su vez está asociada con las enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, la inhibición de la misma resulta de gran beneficio para el organismo por ser estos padecimientos causa de muerte a nivel mundial (Wang y González de Mejía, 2005).

1.7.3.3. Péptidos con actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos cuya función primordial en nuestro organismo es la protección del daño oxidativo que causan moléculas conocidas como radicales libres, entre otras. Dicho daño oxidativo es el responsable de importantes enfermedades de carácter degenerativo del sistema circulatorio, como enfermedades cardiovasculares, cataratas, envejecimiento precoz y cáncer, las cuales hoy son la principal causa de muerte en nuestra sociedad. Los radicales libres alteran el buen funcionamiento de las células del organismo, atacando a componentes estructurales claves de las mismas, tales como lípidos y proteínas de la membrana celular, enzimas e incluso al ADN, responsable del funcionamiento y renovación celular. Sin embargo, el organismo cuenta con un sistema de defensas antioxidantes representado fundamentalmente por ciertas enzimas. No obstante y dado el nivel de radicales libre que forma nuestro cuerpo, resulta indispensable la ingesta de antioxidantes en nuestra dieta. Por lo tanto, la oxidación es una de las principales causas de enfermedades y la patogénesis en los seres humanos, algunos radicales libres en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, resultan dañinas para la célula y juegan un rol importante en la arterosclerosis (Berlett y Stadtman., 1997).

Los componentes celulares y los constituyentes específicos son susceptibles a las especies reactivas del oxígeno (ROS), por ejemplo el radical hidroxilo (OH), el radical peroxilo (OOR), anión superóxido (O_2^-) y el peroxinitrilo (ONOO \cdot). La acumulación de compuestos carbonilos en proteínas son el resultado de la oxidación, es el mecanismo principal del proceso de envejecimiento en humanos (Stadtman, 2006).

El cuerpo humano es un procesador de compuestos químicos que provienen de alimentos (850 kg/año), agua (800 L/año) y oxígeno (7,000 m³/año); requiere de una compleja mezcla de medicamentos y vacunas, dependiendo de la región geográfica de que se trate. La oxidación de grasas y aceites es la reacción común de deterioro o pérdida de la calidad de los alimentos, y la ingesta de estos compuestos lipídicos causa estrés oxidativo de las células del organismo. (Kikugawa, 2004).

Los productos de la reacción de oxidación afectan las propiedades nutricionales, color, sabor y textura de los alimentos. Las causas principales de la oxidación son: la exposición de los alimentos ricos en grasas y aceites al oxígeno, aire, radiación, prooxidantes metálicos, temperaturas ambientales elevadas, y las propias enzimas del tipo lipoxígenas (Kevers y col. 2007). Esta reacción consta de tres etapas: la inicial, que no es percibida por el consumidor, seguida de una reacción en cadena o cíclica, hasta terminar en una compleja mezcla de productos tóxicos, olor desagradable tipo oxidado, colores oscuros y aspecto no deseable de los alimentos. (Morita y Tokita, 1993).

Los compuestos químicos principales que protegen la calidad del alimento, previniendo la oxidación lipídica. Se denominan suplementos antioxidantes a las vitaminas (β -caroteno ó A, E y C), polifenólicos (vitamina K), enzimas (catalasas, peroxidasas y dismutasa superperoxidasas) y minerales necesarios para que el sitio activo enzimático trabaje (selenio, manganeso, zinc y cobre). Los polifenoles imparten estabilidad oxidativa y microbiológica; además, algunos flavonoides poseen actividad biológica relacionada con el reforzamiento del sistema inmunológico, inhibición de procesos carcinógenos y mutágenos (Niki y col 1989). Los antioxidantes polifenólicos se originan en el metabolismo secundario de plantas, y su presencia en los tejidos humanos se debe a la ingestión frecuente y variada de vegetales, frutas, granos y semillas (Shahidi y Naczk, 1996). El tejido vegetal y los granos integrales aportan a la dieta carbohidratos complejos, principalmente, que el aparato enzimático transformará para obtener energía. Además, ambos grupos alimenticios contribuyen con fibra dietaria, vitaminas, minerales y biocomponentes, como antioxidantes, fitoesteroles y fitoestanoles, entre otros (Hergarty, 1996). En las plantas, los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción,

contribuyen al color típico del vegetal, además que actúan como antipatógenos. En los alimentos están presentes los ácidos fenólicos, flavonoides, coumarinas, taninos y ligninas de maderas usadas en productos ahumados. La avena, manzana, pera, uva, chile morrón y cebolla, poseen altas concentraciones de flavones y flavonoles como quercitina, avenantraminas, mirecetina, rutina y kaempferol. La soya contiene isoflavonas como genisteina, y el frijol pinto o amarillo es rico en un grupo amplio de taninos. La naranja y la uva aportan favonoles como naringina y neohesperidina. Los tes verdes y negros contienen flavonoides y catequinas (Chlu, 2006). Los cacahuates y nueces son ricos en luteolina. El arroz integral es rico en polifenoles del tipo tocoferol, tocotrienol y γ -oryzanol, precursores de vitamina E (Stringhan y Hammond, 2008).

Los antioxidantes naturales han sido objeto de estudio; se ha mostrado que algunas proteínas y péptidos tienen la habilidad de detener las reacciones de oxidación de lípidos en sistemas alimenticios y fisiológicos. Los péptidos antioxidantes pueden limitar el daño oxidativo, tanto en alimentos (usándolos como antioxidantes naturales), como frente a la oxidación de las células del organismo cuando son ingeridos en la dieta (Vioque y Millán, 2001b). Estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venéreo, 2002), siendo de importancia en la prevención de enfermedades degenerativas multifactoriales y envejecimiento.

Hatate y col (1990) reportaron que el hidrolizado de la sardina presenta péptidos con actividad antioxidante. Wu y col. (1984) reportaron péptidos de bacalao, de 1 a 1.5 kDa con alta actividad antioxidante. Aunado a esto, Jeon y col (1999), describieron que las fracciones menores a 5 kDa presentan mayor efectividad en la reducción de la oxidación de los lípidos en una emulsión modelo de ácido linoléico. Paralelamente, algunos estudios han demostrado que las proteasas pueden impactar en las propiedades antioxidantes de los hidrolizados proteicos (Saiga y col., 2003; Theodore y Kristinsson, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran producción camaronícola en México, y como una alternativa en la utilización de desechos de esta industria, se propone el uso de la cabeza de camarón (hepatopáncreas) como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos, un nuevo producto nutracéutico.

En el laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas se han llevado a cabo investigaciones sobre el uso de cabeza de la camarón para la obtención de compuestos con alto valor agregado, como pigmentos, quitina, proteínas y enzimas proteolíticas, así como el efecto de estas enzimas de camarón empleando extractos vegetales.

3. HIPÓTESIS

La cabeza de camarón es una fuente enzimas con alto potencial para la obtención de péptidos bioactivos. Al ser expuesta a una hidrólisis endógena, producirá cadenas de aminoácidos con actividad biológica antioxidante

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener péptidos bioactivos a partir de la autoproteólisis de la cabeza de camarón (hepatopáncreas) fresca y almacenada, con el fin de conocer el efecto del almacenamiento en la obtención de estos péptidos.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener péptidos bioactivos por medio de extracción en un medio de baja fuerza iónica.
- Analizar el perfil de pesos moleculares de los en péptidos bioactivos obtenidos de la hidrólisis de la cabeza de camarón por electroforesis SDS-PAGE
- Analizar la capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de la cabeza de camarón.

6. METODOLOGÍA

La Figura se indica la estrategia experimental llevada a cabo

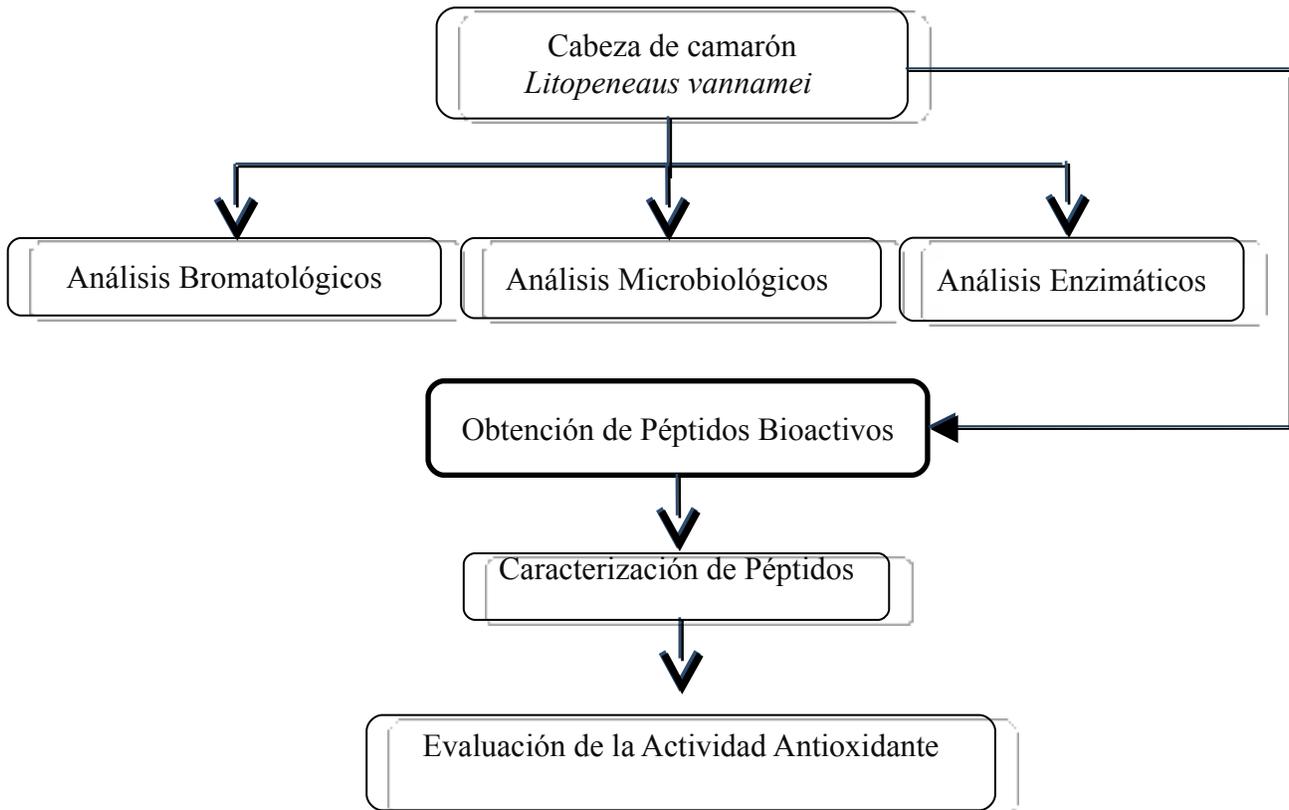


Figura 4. Estrategia experimental

6.1. Obtención de materia prima

Se obtuvo cabezas de camarón del mercado de la Nueva Viga que se encuentra ubicada en la ciudad de México. Se empacó al vacío y se almacenó a -30°C hasta su uso. La Figura 4 muestra el tipo de camarón que se empleó; la Figura 5 muestra las cabezas de camarón, una vez que se eliminó la parte comestible (colas).



Figura 5. Camaron fresco.

Al llegar al laboratorio, las muestras se manipularon asépticamente para evitar contaminación microbiana. Se prepararon los siguientes lotes:

- *Cabezas de camarón fresca:* Las cabezas de camarón se utilizaron una vez descongeladas
- *Cabezas de camarón almacenado:* Se almacenaron por 15 y 30 días a 4°C, al vacío.



Figura 6. Cabezas de camarón.

6.2. Análisis de muestras

La caracterización de la muestra comprendió a los siguientes análisis: bromatológicos, microbiológicos, enzimáticos, SDS-PAGE, cuantificación de péptidos bioactivos y actividad antioxidante, los cuales se resumen a continuación.

6.2.1. Análisis bromatológicos

Los análisis bromatológicos fueron: humedad, cenizas, actividad de agua (A_w), contenido de nitrógeno total y pH (Guerrero-Legarreta y col, 2002).

6.2.1.1. Humedad

Se realizó por triplicado mediante el método de secado reportado por Kirk y col. (1999). Se colocó una cápsula de porcelana de fondo plano y 7 cm de diámetro en el horno de secado (Ríos

Rocha, Modelo HS-41, México) a 100°, hasta peso constante; después se colocó en un desecador a que alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvo el peso de la cápsula vacía, se pesó en ella 1 g de muestra. Inmediatamente después se introdujo nuevamente la cápsula con la muestra en el horno, y se dejó durante 24 h a 100°, al finalizar este período se sacó y colocó en el desecador. Una vez que alcanzó la temperatura ambiente se pesó la cápsula. El porcentaje de humedad se calculó mediante la diferencia en el peso de la muestra antes y después del secado, de la siguiente forma:

$$\text{Sólidos (\%)} = [\text{peso de los sólidos (g)} / \text{peso de la muestra fresca (g)}] \times 100$$

$$\text{Humedad (\%)} = 100 - \text{sólidos (\%)}$$

6.2.1.2. Cenizas

El contenido de cenizas se analizó por triplicado, de acuerdo al método descrito por Kirk y col. (1999), el cual consiste en calcinar la muestra proveniente de la determinación de humedad, incinerándola en una mufla (Lindberg, México, D. F.), incrementando poco a poco la temperatura, hasta alcanzar 500°C; esta temperatura se mantiene por 4 h. Posteriormente se enfrió la muestra dentro de la mufla y enseguida se colocó en un desecador para que alcanzara la

temperatura ambiente. Finalmente se pesó la cápsula con las cenizas y se calculó su contenido en la muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = [\text{peso de las cenizas (g)} / \text{peso de la muestra fresca (g)}] \times 100$$

6.2.1.3. Actividad de agua (Aw)

Se llevó a cabo por triplicado, utilizando un medidor de actividad de agua (aw) marca Decagon CX-1 (Pullman, Washington, EUA). En un porta muestra se colocó el material a analizar, se colocó el botón en la posición leer y se tomó la lectura correspondiente.

6.2.1.4. Nitrógeno total (Proteína)

Se llevó a cabo por triplicado mediante una modificación al método Kjeldahl reportado por Pearson y Tauber (1984). Se pesaron 0.5 g transfiriéndolos a un matraz Kjeldahl de digestión. Se añadieron aproximadamente 0.5 g de mezcla catalítica (sulfato de potasio y sulfato de cobre) (Baker, Xalostoc, México) en una proporción de 10:1, 2 perlas de vidrio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (Baker). El calentamiento del matraz en posición inclinada se inició suavemente, incrementándose gradualmente hasta alcanzar la temperatura máxima del digestor Micro-Kjeldahl Labconco modelo 60011 (Labconco, Kansas City, Missouri, EUA), una vez que la muestra cambió a color verde transparente se digirió durante 3 h, después de este tiempo se dejó enfriar. El tubo de salida del condensador se sumergió en un matraz receptor que contenía 20 mL de ácido bórico (Baker) al 4%, al cual se le añadieron 3 gotas de indicador rojo de metilo.

El matraz de digestión se enjuagó con una cantidad mínima de agua, que se agregó a la mezcla a destilar; se dejaron caer suavemente por la pared del matraz 20 mL de una solución de NaOH (Baker) al 50%. Se dejó la mezcla en ebullición hasta que por lo menos se destilaron 40 mL, el cual se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N.

6.2.1.5. pH

Se determinó por triplicado, utilizando un potenciómetro digital (Conductronic, México, D. F.), calibrado con solución búfer pH 4 y 7. Una vez calibrado el equipo se colocaron 5g de muestra en un vaso de vidrio de 50 mL y 10 mL de agua destilada, se molió la muestra y se llevó a cabo la medición del pH.

6.2.1.6. Color

La determinación se realizó por triplicado, utilizando un colorímetro Hunter Lab modelo D25-PC2 (Chroma Meter CR-200, Tokio, Japón), colocando 10 g de muestra en un vaso de vidrio de 50 mL, cubriendo el fondo del vaso con la muestra. Se calibró el equipo, utilizando como estándares los valores de $L=94.5$, $a=1.0$, $b=1.9$, obtenidas de un patrón. A continuación se tomó la lectura en tres posiciones de la muestra, colocándola en el porta muestras y procurando no dejar espacios con aire en el recipiente, rotándola 90° entre cada lectura. Los parámetros estándar determinados fueron: L , a y b . Los valores de a y b se transformaron a coordenadas polares para obtener los valores de cromaticidad y tonalidad mediante las ecuaciones:

$$\text{Tonalidad} = \tan^{-1} b/a$$

$$\text{Cromaticidad} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

El valor de la luminosidad (L) se tomó directamente de la lectura en el colorímetro.

6.2.2. Análisis microbiológicos

Se llevaron a cabo cuentas de psicrófilos y enterobacterias con el fin de conocer la carga microbiana de la cabeza de camarón. La determinación se realizó en cabezas de camarón fresco, almacenadas a 15 días y a 30 días.

6.2.2.1. Psicrófilos

El cultivo de psicrófilos se llevó a cabo en el medio de cultivo agar Flo. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave por 15 min a 120°C, 15 psi; el medio de cultivo se dejó enfriar y posteriormente se llenaron las cajas Petri. Se sembraron dos diluciones: 10^{-2} y 10^{-3} , por triplicado. Se tomaron 10 g de muestra, se molieron en una licuadora convencional con 100 mL de agua esterilizada; de esta preparación se tomó 1 mL y se mezcló con 100 mL de NaOH al 0.86%, de aquí se tomó 1 mL y se inoculó en cajas Petri (dilución 10^{-2}); para la dilución 10^{-3} se tomó 1 mL de la solución de NaOH con muestra y se mezcló en un tubo de ensaye con 100 mL de solución de NaOH. Las cajas se incubaron por 24 h a 37°C.

6.2.2.2. Enterobacterias

El cultivo de enterobacterias se llevó a cabo en medio de cultivo agar bilis verde brillante, inoculando cajas, por triplicado, con diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . El medio de cultivo se preparó como se procedió con el medio Flo; de igual forma, las diluciones y la incubación de las cajas siguió el procedimiento llevado a cabo con la determinación de psicrófilos.

6.2.3. Análisis enzimáticos

Se realizó para determinar la actividad de las proteasas endógenas, empleado como sustratos caseína y hemoglobina, según los métodos de Anson (1938) y Kunitz (1947), reportado y modificado por Yamaguchi y col. (1983). La obtención del extracto enzimático se llevó a cabo a partir de 10 g de cabeza de camarón; estos se mezclaron con 20 mL de solución búfer de fosfato 20 mM, pH7. La mezcla se molió en una licuadora convencional a temperatura de 4°C, y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min en una centrifuga Eppendorf (modelo 5310R), se eliminó el tejido conectivo mediante papel filtro. Una vez obtenido el extracto, este se enfrió en un baño de hielo para evitar la degradación de las enzimas.

6.2.3.1. Determinación de la actividad enzimática

El pH de la hemoglobina se ajustó a 2, 3, 4 y 5, y el de la caseína a 6, 7, 8, 9 y 10. Con el extracto enzimático y los sustratos a pH ajustados, se colocaron en viales 250 µL de extracto enzimático, 1000 µL de hemoglobina o caseína, a los distintos pH. Posteriormente los viales se colocaron en un baño de agua 37°C por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió a cada vial 200µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% para detener la reacción, los viales se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min en una microcentrifuga. La cantidad de hemoglobina y caseína hidrolizada se determinaron leyendo la mezcla de reacción a 280 nm espectrofotómetro Beckman modelo DU-650. Este análisis se llevó a cabo por triplicado.

6.2.3.2. Determinación de proteína por método de Biuret

La curva patrón se elaboró con albumina de huevo para obtener una ecuación de regresión. Posteriormente, se tomó 1 mL de extracto de cabeza de camarón y 3 mL de reactivo de Biuret, se mezclaron y dejaron reposar por 30 min; se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Beckman). El análisis se llevó a cabo por triplicado.

6.2.4. Obtención de péptidos de 5, 10 y 50 kDa

Del extracto obtenido a partir de cabeza de camarón, de acuerdo a lo descrito en el inciso 6.2.3., se sujetó a ultrafiltración por centrifugación a 3000 rpm por 15 min. Se emplearon dos tipos de membranas: de 5, 10 y 50 kDa MWCD (Centrifugal Filter Devices), los permeados (aproximadamente 1 mL) se congelaron a -70°C para su conservación.

6.2.5. Análisis electroforético de péptidos

El análisis electroforético de los extractos enzimáticos se llevó a cabo por el método descrito por Shagger y von Jagow, 1987, utilizando geles verticales de 16% de bisacrilamida, en una cámara de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, California). Como referencia se aplicó un marcador que contenían 8 proteínas de peso molecular conocido: miosina (200 kDa), beta-galactosidasa (120 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), lisozima (19 kDa) y aprotinina (9kDa) (Sigma, C3312). Se conectó a una fuente de poder a 90 V y 4°C . Los geles se analizaron en un

autoanalizador de imagen Gel-Doc, cuantificando péptidos en 2 zonas específicas: de 1 a 50 kDa y de 50 a 100 kDa.

6.2.6. Análisis de Actividad antioxidante.

Las fracciones de 5, 10 y 50 kDa obtenidas de acuerdo al inciso 6.2.4. se liofilizaron para eliminar el contenido de agua y concentrar la proteína. Con el fin de medir la actividad antioxidante a 0, 15 y 30 días de almacenamiento, se agregó una solución de ABTS. Se midió espectrofotométricamente a 734 nm en un equipo Beckman DU-650. Los análisis se realizaron por triplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Determinaciones bromatológicas

La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis bromatológicos obtenidos. Algunos estudios realizados por otros autores en desechos industriales de camarón dan resultados similares (%): proteína, 46.76; cenizas, 20.89; humedad, 4.46 (Morillo y col, 2006).

Tabla 2. Resultados Bromatológicos de cabezas de camarón

Variable	Tiempo de almacenamiento (días)		
	0	15	30
Humedad (%)	77.54	82.54	83.01%
Cenizas (%)	3.0	2.8	2.2%
Proteína (%)	32.7	31.5	27.43%
Actividad de agua	0.975	0.980	0.989
pH	7.74	7.52	7.36
Color			
Tonalidad	41.24	45.42	53.68
Cromaticidad	243.91	223.19	170.78
luminosidad	34.74	35.58	37.20

7.2. Determinaciones microbiológicas

Psicrófilos. En la dilución 10^{-2} se observaron 10 colonias, mientras que la dilución 10^{-3} no se observó crecimiento (Figura 7).

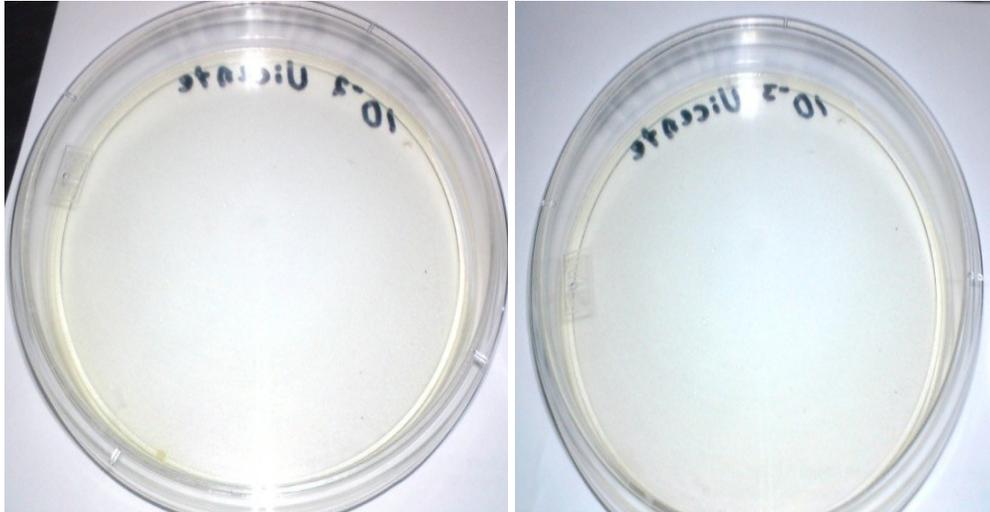


Figura 7. Cultivo de psicrófilos a 15 y 30 días

Enterobacterias. No se encontró crecimiento en las muestras de 15 o 30 días de almacenamiento (Figura 8).

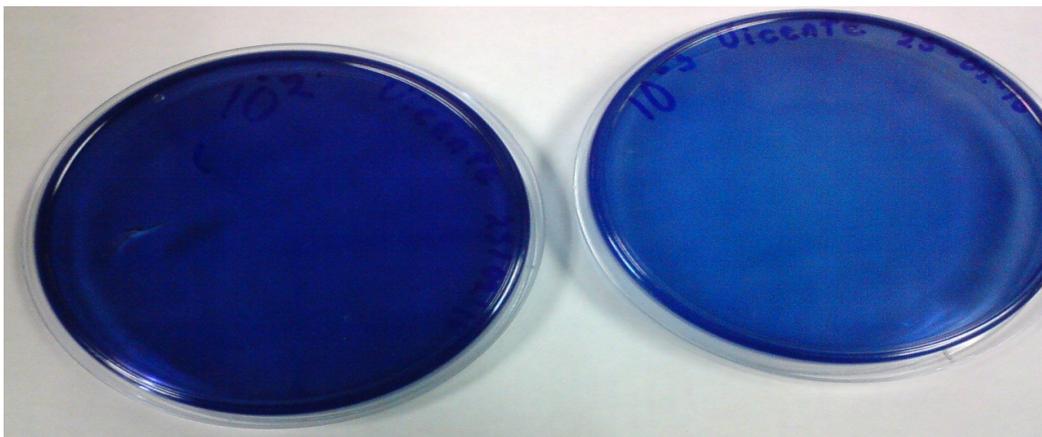


Figura 8. Cultivo de enterobacterias a 15 y 30 días.

7.3. Determinaciones enzimáticas

Análisis de proteína. La Tabla muestra el contenido de proteína en cabeza de camarón almacenada. A los 15 días de almacenamiento la concentración de proteína aumentó, pero a los 30 días mostró una disminución considerable.

Tabla 3. Contenido de proteína en cabeza de camarón almacenada

Tiempo de almacenamiento (días)	Contenido de proteína (mg/mL)
0	10.45
15	15.4
30	7.41

Actividad proteolítica. La Figura 8 muestra que tiempo 0, pH 2, 5 y 6 en sustratos de hemoglobina y caseína, hubo mayor actividad proteolítica.

A los 15 días de almacenamiento, la actividad proteolítica tuvo máximos a pH de 2, 4, 5 y 6, en sustratos de hemoglobina y caseína (Figura 9).

A los 30 días de almacenamiento se observó actividad proteolítica a pH 4, 6, 8 y 9, en sustratos de hemoglobina y caseína (Figura 19).

Figura 9. Actividad proteolitica tiempo 0.

Figura 10. Actividad proteolitica a 15 días.

Figura 11. Actividad proteolítica a 30 días

7.4. Electroforesis.

La Figura 11 muestra la electroforesis (SDS-PAGE) de los extractos de cabeza de camarón almacenados 0, 15 y 30 días. En la banda 2 se nota presencia de péptidos de bajo peso molecular, lo que pudo deberse a interacción entre proteína produciendo péptidos de mayor peso molecular. La Figura 12 muestra la cuantificación de péptidos de bajo peso molecular. Se observó la presencia de una zona de péptidos de bajo peso molecular, 1 a 50 kDa, donde al tiempo 0 (Banda 1) hubo una banda de 5.35 kDa. El péptido más pequeño a los 15 días de almacenamiento (Banda 2) fue de 3.74 kDa, mientras que a los 30 días de almacenamiento (Banda 3) el péptido más pequeño fue de 3.9 kDa. La Figura 13 muestra los densitogramas de las bandas obtenidas

M 1 2 3

Figura 12. SDS-PAGE. De extracto de cabeza de camarón.

200 kDa

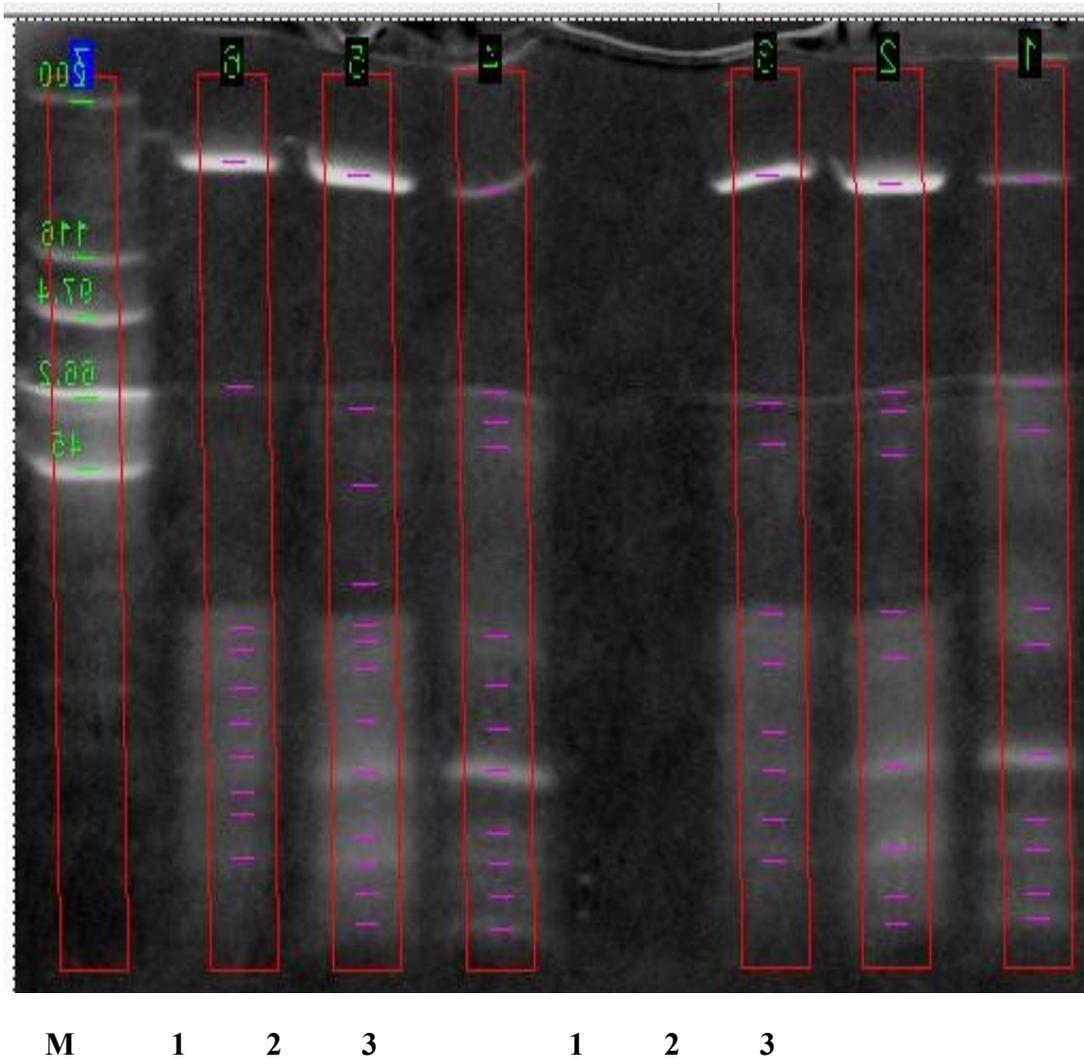


Figura 13. Cuantificación de péptidos de bajo peso molecular.

2 5 0

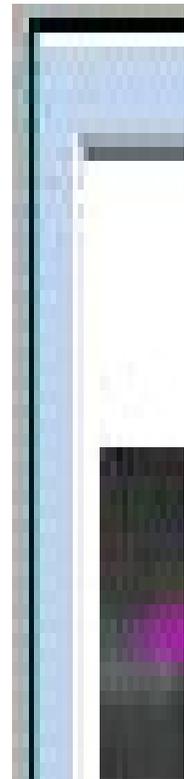


Figura 14. Densitogramas de las electroforesis de los péptidos obtenidos. M- Marcador molecular; extracto a tiempo 0 (1); extracto almacenado por 15 días (2); extracto almacenado por 30 días (3).

7.5. Péptidos obtenidos por ultrafiltración

La Figura 14 muestra la electroforesis (SDS-PAGE) del extracto obtenido por ultrafiltración del extracto de cabeza de camarón, utilizando un marcador de 200 a 9 kDa. Se observan bandas muy tenues a tiempo 0 en los péptidos de 5 y 10 kDa, mientras que a los 50 kDa se registra un alto contenido de péptidos. A los 15 días las bandas son similares al tiempo 0, pero se nota una banda definida en los péptidos de 50 kDa. Se observaron bandas similares a los 30 días.



Figura 15. Electroforesis (SDS-PAGE) de extracto de camarón a 0, 15 y 30 días de almacenamiento

120 kDa

Debido a que hubo una baja concentración de proteína en el extracto, las bandas de bajo peso molecular (5 y 10 kDa) fueron muy tenues.

7.6. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante actuó entre los 0 y 1 min después que se aplicó; a los 4 min ya no hubo presencia de oxígeno libre, lo cual indica que tiene una alta actividad antioxidante.

Tabla 4. Actividad antioxidante en relación con la concentración de péptido

Muestra	Actividad Antioxidante (μ M) equivalente ácido ascórbico			Concentración de péptidos (μ g/mL)
	Tiempo de reacción de ABTS			
	0 min	1 min	4 min	
Día 0				
5kDa	2.859	2.84	0	16.421
10kDa	2.812	2.83	0	34.022
50kDa	2.850	2.82	0	228.015
Día 15				
5kDa	2.81	2.80	0	144.067
10kDa	2.90	2.88	0	129.511
50kDa	2.60	2.86	0	146.872
Día 30				
5kDa	2.97	2.90	0	17.045
10kDa	2.56	2.88	0	71.894
50kDa	2.05	2.69	0	135.127

8. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en las determinaciones bromatológicas de la cabeza de camarón fueron similares en los 3 tratamientos.
- No se presentó crecimiento de microorganismos (psicrófilos o enterobacterias) en ninguno de los 3 tratamientos.
- El contenido de proteína fue mayor en camarón almacenado a 15 días, conforme pasa el tiempo disminuye la concentración de proteína.
- La actividad enzimática del extracto de cabeza de camarón fresco fue máxima a pH 2, 5 y 6. A los 15 días de almacenamiento fue máxima a pH 2, 4, 5 y 6; y a los 30 días de almacenamiento los máximos fueron a pH 4, 8 y 9.
- El fraccionamiento por medio de ultrafiltración mostro péptidos de bajo peso molecular en fracciones de 50kDa en los tres tratamientos.
- Se encontró actividad antioxidante mayor a la esperada, utilizando solo 40 μ L de muestra de cada fracción de péptidos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Anson., M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79-89.
- Bagchi, D. 2006. Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world. *Toxicol* 221:1-3.
- Barrett, A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. En: *Plant Proteolytic Enzymes*. M.J. Dalling (editor). CRC Press, Boca Raton. pp 1- 16.
- Baró L., Jiménez J., Martínez-Férez A., Bouza J. 2001. Bioactive milk peptides and proteins. pp. 135-138.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272(33):20313-20316).
- Boelsma, E., Kloek, J. 2009. Lactotripeptides and antihypertensive effects: A critical review. *Br J Nutr* 101 (6): 776 – 786 .
- Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine - containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein . *J Agric Food Chem* 46 (1): 49 – 53 .
- Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem* 101(4):1474-1479.
- Chlu, S. 2006. Is green tea really good for you?. *J Food Sci Ed* 5: 70-71.

- Clinq-Mars y col. 2008. Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in Pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *J Agric Food Chem* 56(2):410–419.
- Conlon, M.J., Halverson, T., Dulka, J., Platz, E.J., Knoop, C.F. 1999. Peptides with antimicrobial activity of the brevinin-1 family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenoccephala*. *J Peptide Res* 54: 522-527
- Dumay, J. 2006. Mild procedure for obtaining lipipeptic and peptidic fractions from sardine (*Sardina pilchard*). The 2nd Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference, Quebec City.
- Egan, H., Kirk, R. S., Sawyer, R. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental, México, D.F., 1987, pp. 20, 21, 25, 26.
- Fan, S. G., Wu, G.J. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot Bull Acad Sinica* 46:273-292.
- Fennema, O.R., 1994. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Editorial Reverté, S.A.
- Franco-Zavaleta, M., Guerrero-Legarreta, I. 2009. La Pesca en Mexico. En: Tecnología de productos de origen acuático. I. Guerrero, M. Rosmini, R. Armenta (editores). pp. 19-26. Editorial LIMUSA., Mexico., D.F.
- Fujita H, Yoshikawa M . 1999 . LKPNM: A prodrug - type ACE - inhibitory peptide derived from fi sh protein . *Immunopharmacol* 44:123 – 127 .
- Gallo, R.L., Huttner, K.M. 1998. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 111(5): 739-743.

- García-Carreño, F.L. 1996. Proteinase inhibitors. Trends Food Sci Technol 7:197-203
- García, L. 1998. Composición proximal y mineral en desechos de conchas de cangrejo. Trabajo Especial de Grado. Universidad del Zulia-Facultad de Ingeniería. Maracaibo, Venezuela. p89.
- Gilani, GS, Xiao C., Lee N. 2008. Need for accurate and standardized determination of amino acid and bioactive peptides for evaluating protein quality and potential health effects of foods and dietary supplements. J AOAC Int 91 (4): 894-900.
- Guerrero-Legarreta, I., Ponce, A.E., Pérez-Chabela, M.L. 2002. Parámetros fisicoquímicos en la calidad de carne y pescado. En: Curso Práctico de Tecnología de Carnes y Pescado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. pp. 11-18.
- Hart F.L., Fisher, H. J. 1991. Análisis Moderno de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. Pp. 345.
- Hatate, H., Numata, Y., Kochi, M. 1990. Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolyzates with antioxidant. Nippon Suisan Gakkaishi 56(6): 1011.
- Hergarty, V. 1996. Nutrition, Food and the Environment. Eagan Press, pp. 3-25, 171-180, 393-400.
- Je, J., Park, P. J., Kim, S.-K. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolyzate, Food Res Int 38(1): 45-50.
- Jeon, Y-J., Byun, H-G., Kim, S-E. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. Process Biochem 35: 471-478.

- Jiang, S.T. 2000 Enzymes and their effects on seafood texture En: Seafoods Enzymes. Marcel Dekker, Nueva York. pp. 411-450.
- Jiang., S.T. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. Proc Nat Sci Council Part B 22(3):97-107.
- Ketchum Paul A. 1988. Microbiology. Concepts and Applications. Editorial Panamericana. Pp. 345.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., Pincemail, J. 2007 , Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. J Agric Food Chem 55: 8596-8603.
- Kikugawa, K., 2004. Strategy in a living body to protect against oxidative stress-induced damage. J Health Sci 50: 443-455.
- Kim, S.K., Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts, A review. Food Res Int 39:383–393
- Kirk, L., Beaudette, L, Hart, M, Moutoglis, J, Hung, K, Treyors, J. 1999. Methods of studying soil microbial diversity. Rev J Microbiol Met 58:169– 188
- Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. Int Dairy J 16:950-960.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J Gen Physiol 30(4): 291-310.
- Liu, F., Ye, K.N. 2007. Comprehensive utilization of shrimp waste. J Aquacult 28(5): 30–33.

- López-Cervantes J., Sánchez-Machado D. I., Rosas-Rodríguez J. A. 2006. Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography. *J Chromat A* 1105: 106-110.
- Macdonald, J.K., Barret, A.J. 1986. *Mammalian Proteases. Volumen 2.* Academic Press, Nueva York. pp 357.
- Madigan M.T, Martingo J. M., Parker, J. 2004. *Biología de los Microorganismos.* Prentice Hall. Pp. 435-437.
- Meisel H . 2005 . Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr Medical Chem* 12:1905 – 1919.
- Mine Y., Miyashita K., Shahidi F. 2009. *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Diseases: Food Factors and Gene Interactions.* Wiley - Blackwell , Ames, Iowa.
- Möller N.P., Scholz - Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *Eur J Nutr* 47:171 – 182 .
- Montaño-Perez, K., Vargas-Albores, F. 2002. Peptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Rev Cient de Am Lat Caribe* 27(1):21-27.
- Morita M., Tokita, M. 1993. Courses of aldehyde formation during linoleate autoxidation and some information about precursors and mechanism. *Chem Phys Lipids* 66(5): 13-22.
- Morillo N., Montiel N., Belandria J., Mujica, F. 2006. Caracterización proximal de los desechos del procesamiento de los crustáceos (cangrejo y camarón) en el estado Zulia. *Vet Tropical.* pp 71-80

- Niki, E., Noguchi, N., Iwatsuki, M. 1989. Antioxidat activies of phenolic compounds in solution, membranes and lipoproteins. En: Nutrition, Lipids, Health and Disease. AOCS Press, pp. 1-7.
- Ono, S. Hosokawa M, Miyahita K ., Takahashi K. 2003. Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolyzate of upstream chum salmon muscle. *J Food Sci* 68 (5): 1611–1614.
- Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. 2000a. Fundamentos físicos, químicos, ultraestructurales y tecnológicos en el color de la carne. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. M. Rosmini, J.A. Pérez-Alvarez y J. Fernández-López (editores). Universidad Miguel Hernández. Elche, España.
- Prescott, L., Harley, J., Klein D. 1999. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 543.547.
- Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* 51: 3661–3667.
- Saito, K. Jin, DH. Ogawa, T., Muramoto, K. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *J Agric Food Chem* 51 (12):3668-3674.
- Shagger y von Jagow, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379.
- Shahidi, F., Naczk M.1996. Food Phenolics. Technomic Publishing. pp. 9-42.
- Simpson B,, Haard N.1985. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *J Appl Biochem* 7: 212-222.
- Stadtman, ER, 2006. Protein oxidation and againg. *Free Rad Res* 40:1250-1258.

- Stringhan, J. M., Hammond, B. R. 2008. Macular pigment and visual performance under glare conditions. *Optom Vision Sci* 85: 82-88.
- Subasinghe S. 2003 El camarón: un candidato ideal para el valor agregado. *Boletín Nicovita*; 8(1): 1-2.
- Taborsky G . 1983 . Phosvitin . *Adv Inorg Biochem* 5: 235 – 279.
- Theodore, A.E., Kristinsson, H.G. 2005. Bioactive properties offish protein hydrolysates at varying degrees of hydrolysis made from cat fish protein isolates. Annual IFT Meeting Book of Abstracts. July 16–20, Nueva Orleans. Abstract 50-5.
- Uribe G. y col. 2004. Cinética enzimática en alimentos, características. pp 5-8.
- Venugopal, V. 2009. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. CRC Press, Boca Raton FL. pp 103-142.
- Venéreo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Militar* 31(2): 126-133.
- Vioque, J., Millán, F 2005. Los peptidos bioactivos en la alimentación: nuevos agentes promotores de la salud. *CTC Alimentación* 26:103-107.
- Vioque, J., Millán, F. 2001a. Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *Grasas y Aceites* 2-8.
- Vioque, J., Millán, F. 2001b. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Grasas y Aceites* 2-5.

Wu, Y.C., Kellems, R.O., Holmes, Z.A., Nakaue, H.S. 1984. The effect of feeding four fish hydrolyzate meals on broiler performance and carcass sensory characteristics. *Poultry Sci* 63:2414–2418.

Wang, W., González de Mejía, E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 4: 63-78.

Yamaguchi, T., Yashita, Y., Takeda, I., Kiso, H. 1983. Enzymes in green asparagus kiwi fruit and munit: Occurrence and partial characterization. *Agric Biol Chem* 46(8):1983-1986.

PRODUCTIVIDAD

- Biopeptide production from shrimp heads by autolytic method. **IFT Annual Meeting and Food Expo, Chicago, Julio 2010.**
- Adición de tripsina en la cabeza de camarón (*Litopenaeus vannamei*) como una alternativa en la obtención de péptidos con fines alimenticios **CESIA, España Octubre 2010.**
- Obtention Of Food-Grade Peptides From Shrimp Head Discards (*Litopenaeus vannamei*) Using Exogenous Pepsin. **AMECA, Veracruz Noviembre 2010**
- Proteólisis endógena y exógena sobre un extracto de cabeza de camarón. **XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato 2010.**
- Autolisis con temperatura controlada en la obtención de peptidos a partir de la cabeza de camarón almacenada. **Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Huatulco Oaxaca, Mayo 2010.**
- Efecto de la inhibición de metalproteasas y serinproteasas de una pasta de lisa (mugil cephalus) sobre algunos parámetros fisicoquímicos de calidad. **Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. AMIDIQ, Mayo 2011.**
- Evaluación de moléculas de naturaleza proteica obtenidas por hidrólisis endógena de la cabeza de camarón (*litopeneanus vannamei*) almacenada. . **Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. AMIDIQ, Mayo 2011.**

Anexos

Anexo 1. Determinación de proteína por el método de Biuret (Gornall y col., 1949)

Reactivos:

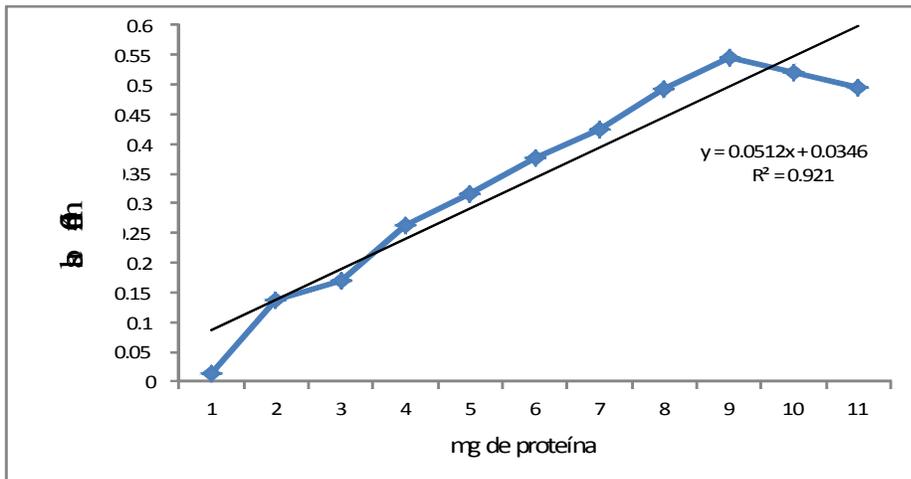
- 1.5 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 500 mL de agua destilada.

- 300 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %.

Se afora 1 000 mL con agua destilada, almacenándose en frasco ámbar.

Análisis:

- 1) Mezclar 1 mL de la muestra y 3 mL del reactivo de Biuret
- 2) Reposar durante 30 min
- 3) Leer la absorbancia en un espectrofotómetro en el intervalo de luz visible a 540 nm contra un blanco de reactivos.
- 4) Los datos obtenidos se interpolan con una curva patrón de albúmina sérica bovina de concentración de 0- 10 mg/mL.



Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Biuret.

Anexo 2. Determinación de la actividad antioxidante

Reactivos:

-0.0033 g de persulfato de potasio

-0.0194 g de ABTS

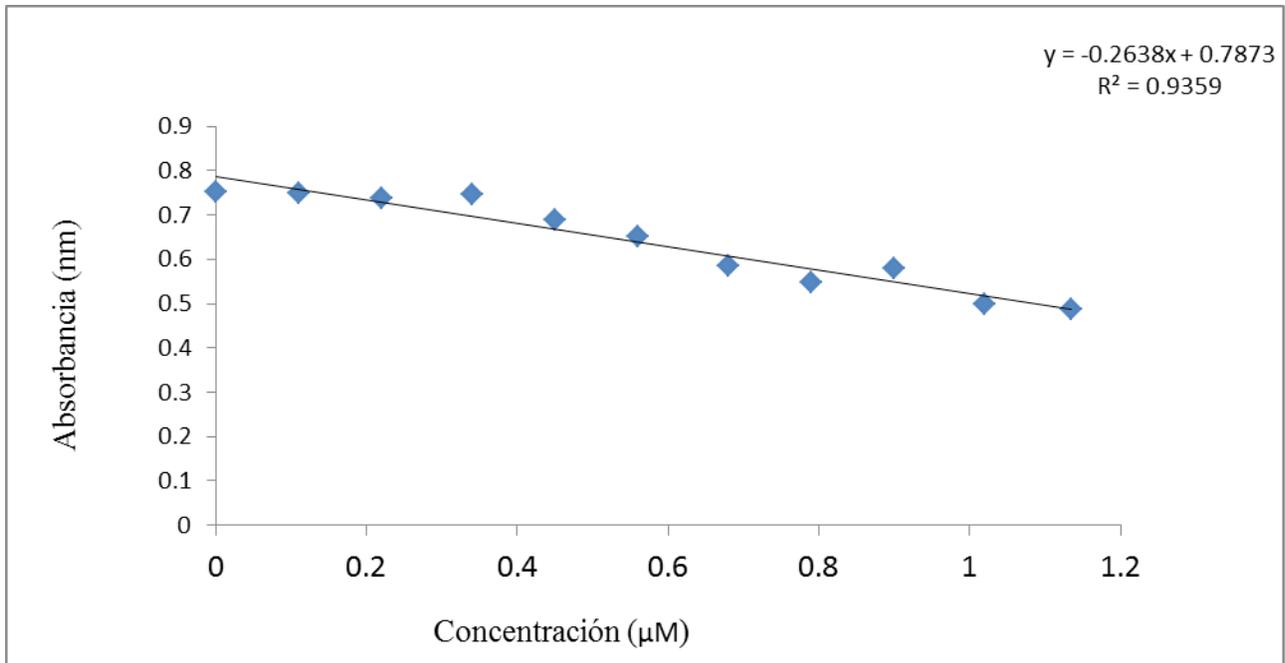
Los dos reactivos se aforan con 5ml de agua y se deja en oscuridad por 16 h para evitar la oxidación.

Análisis:

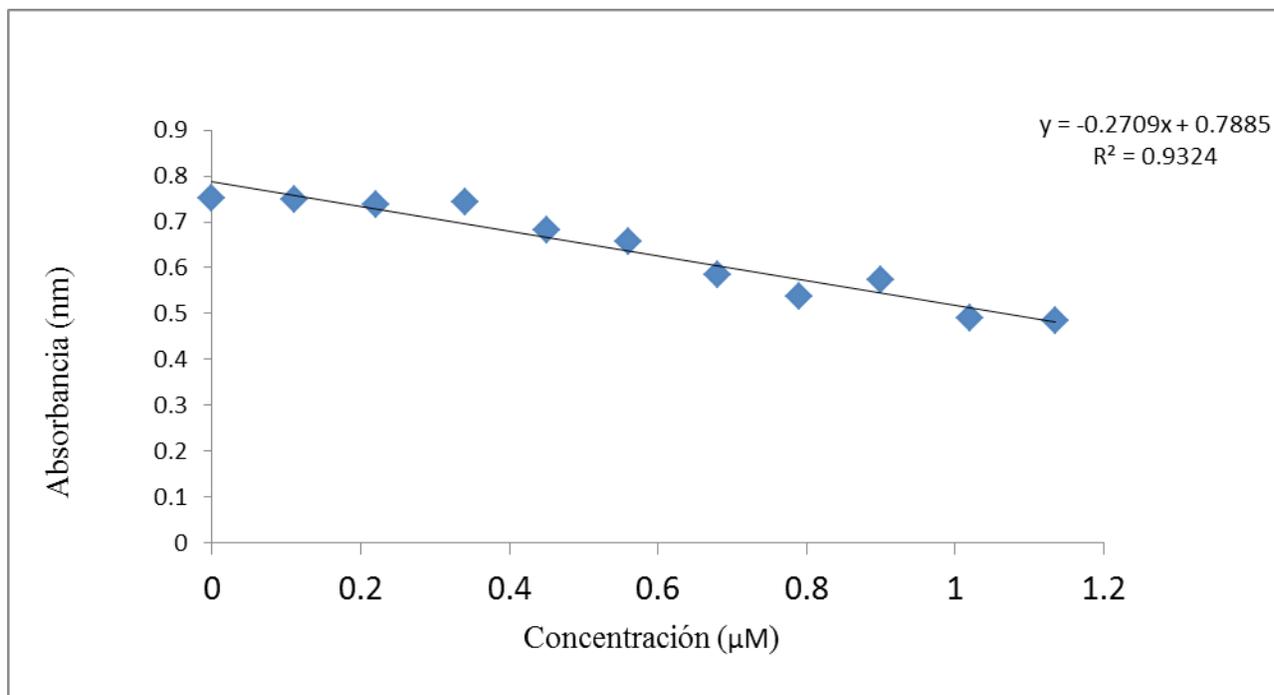
Mezclar 1960 μL del reactivo antioxidante y 40 μL de muestra.

Leer la absorbancia en un espectrofotómetro en el rango de luz visible a 734 nm contra un blanco de reactivos.

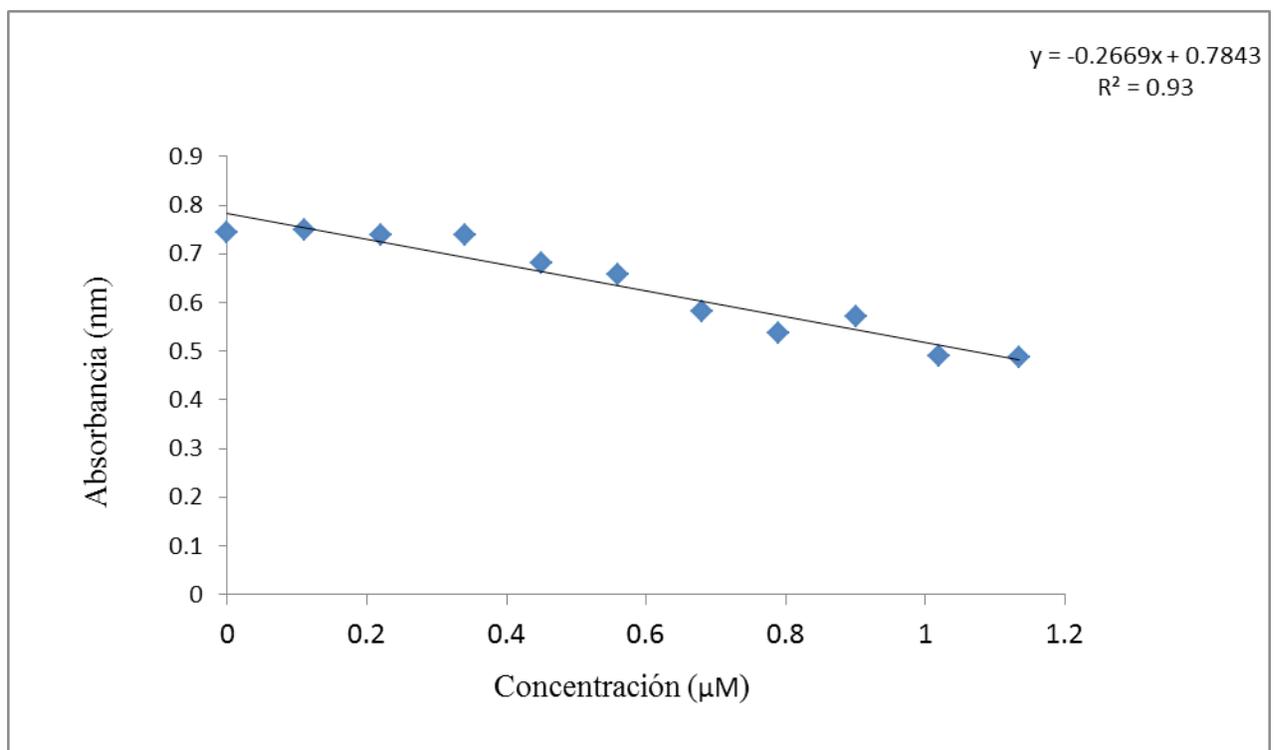
Los datos obtenidos se interpolan con una curva patrón de ácido ascórbico de concentración de 0- 10 mg/mL a los tiempos 0,1 4 y 7 min.



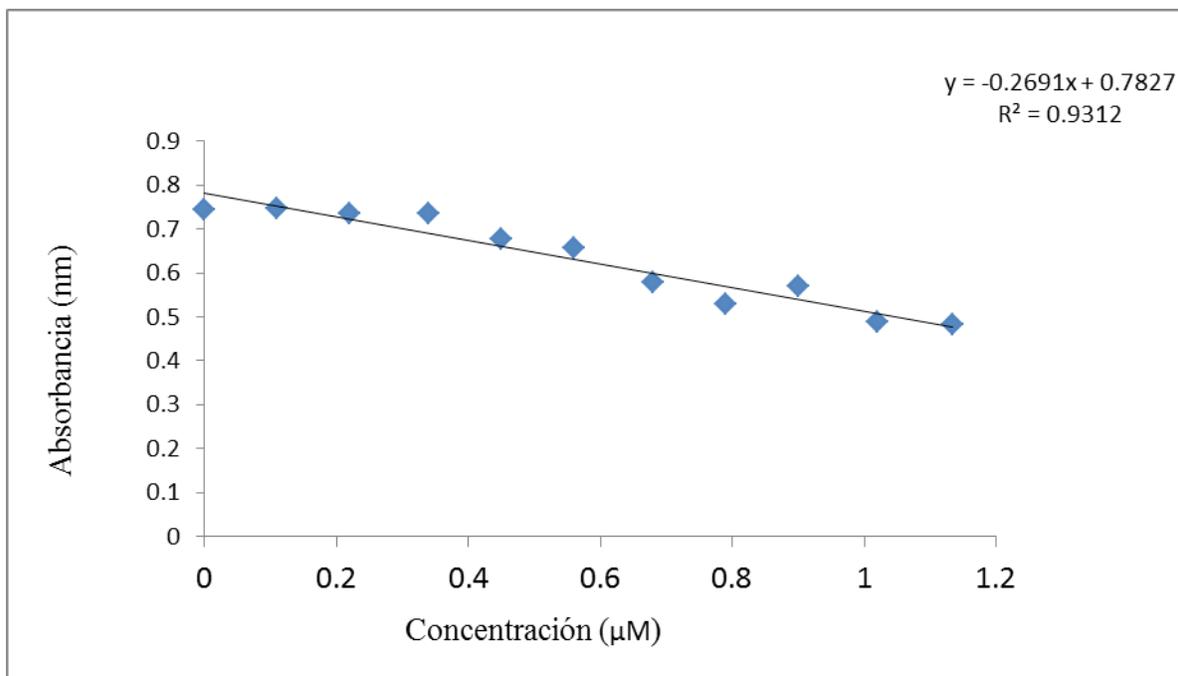
Curva patrón para determinar actividad antioxidante a tiempo 0 min.



Curva patrón para determinar actividad antioxidante en el tiempo 1 min.



Curva patrón para determinar actividad antioxidante a tiempo 4 min.



Curva patrón para determinar actividad antioxidante a tiempo 7 min.

Anexo 3. Preparación de hemoglobina al 1% (Técnica de Anson, 1938).

La hemoglobina se preparó en una solución de ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M y ácido acético 0.25 M, la mezcla se calentó y agitó en un baño maría por 20 min a 60°C posteriormente fue enfriado y almacenado a 4°C.

Anexo 4. Preparación de caseína al 1%

Se preparó caseína al 1% de acuerdo a la técnica de Kunitz (1947) reportada por Yamaguchi y col., (1983) en un amortiguador de fosfatos 20 mM (fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico), calentándose a 60°C con agitación por 20 min, se enfrió y almacenó a 4°C.